



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0135987
(43) 공개일자 2021년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70532 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7020465
(22) 출원일자(국제) 2019년11월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년06월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/063808
(87) 국제공개번호 WO 2020/113141
국제공개일자 2020년06월04일
(30) 우선권주장
62/774,131 2018년11월30일 미국(US)
62/862,001 2019년06월14일 미국(US)

(71) 출원인
알파인 이문 사이언시즈, 인코포레이티드
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188
(72) 발명자
스완슨, 라이언
미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트 블레인 스트리트 188 스위트 200
아르두렐, 덴
미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트 블레인 스트리트 188 스위트 200
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

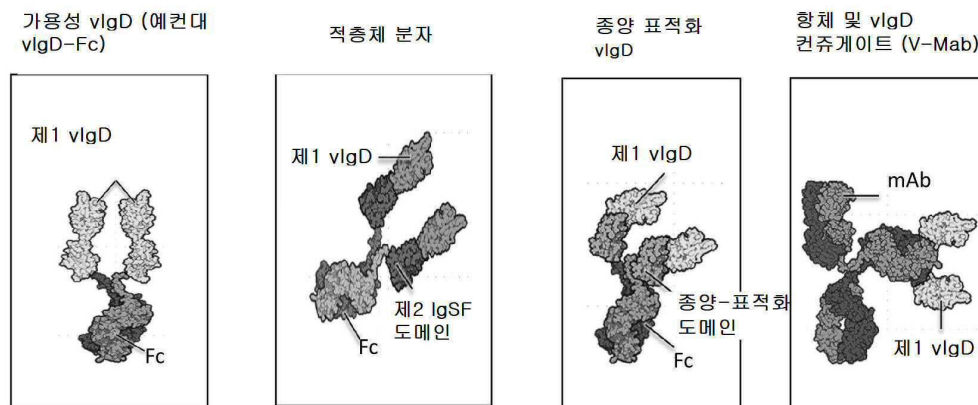
전체 청구항 수 : 총 172 항

(54) 발명의 명칭 CD86 변이체 면역조절 단백질 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명에 따라, 변이체 CD86 폴리펩타이드, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질, 및 그러한 단백질을 인코딩하는 핵산이 제공된다. 면역조절 단백질은 다양한 면역학적 및 종양학적 병태에 치료적으로 유용하다. 이러한 단백질을 제조 및 사용하기 위한 조성물 및 방법도 제공된다.

대표도 - 도24a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

(72) 발명자

퀴즈퍼, 조셉, 엘.

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트 블레인 스트리트
188 스위트 200

레빈, 스티븐, 데니스

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트 블레인 스트리트
188 스위트 200

명세서

청구범위

청구항 1

세포외 도메인 또는 IgV 도메인을 함유하는 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편이 제공되며, 여기서, 상기 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 제시된 위치를 참조로, 비변형 CD86 또는 그의 특이적 결합 단편의 13, 18, 25, 28, 33, 38, 39, 40, 43, 45, 52, 53, 60, 68, 71, 77, 79, 80, 82, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 97, 102, 104, 113, 114, 123, 128, 129, 132, 133, 137, 141, 143, 144, 148, 153, 154, 158, 170, 172, 175, 178, 180, 181, 183, 185, 192, 193, 196, 197, 198, 205, 206, 207, 212, 215, 216, 222, 223, 또는 224로부터 선택된 위치(들)에 대응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 포유동물 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 5

청구항 1-4 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86의 세포외 도메인을 포함하고, 하나 이상의 아미노산 변형은 비변형 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 하나 이상의 잔기에 존재하는 것인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 6

청구항 1-5 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:29에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함하는 그의 일부를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 7

청구항 1-6 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 그의 일부는 IgV 도메인의 아미노산 잔기 33-131 또는 24-134 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 9

청구항 1-6 및 8 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 123에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 123에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 함유하는 그의 일부를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 10

청구항 1-6 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:123에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 11

청구항 1-6, 8 및 9 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 122에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 122에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 12

청구항 1-6, 8, 9 및 11 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:122에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 13

청구항 1-12 중 어느 하나의 청구항에 있어서:

특이적 결합 단편은 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 95개 또는 그 이상의 아미노산 길이를 가지거나; 또는 특이적 결합 단편은 SEQ ID NO:2의 잔기 33-131로서 제시된 IgV 도메인의 길이의 적어도 80% 길이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 14

청구항 1-13 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 변형, 선택적으로 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 15

청구항 1-14 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/ L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, E38V/S114G/P143H, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, K80M/I88T, K92I/F113S, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, 또는 S28G/H90Y로부터 선택되는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 17

청구항 1-14 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및/또는 위치 90에 존재하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 18

청구항 1-14 및 17 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L, H90Y, 또는 H90L을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 19

청구항 1-14 및 17 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및 위치 90에서의 변형을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L로부터 선택되는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 21

청구항 1-20 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S/E212X, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, M60K/H90L; Q25L/F33I/H90L; Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T; Q25L/H90L; Q25L/H90L/P185S; Q25L/H90L/P185S/P224L; Q25L/H90L/S179R; Q25L/H90Y/S181P/I193V; Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P; Q25L/Q86R/H90L/K93T, S28G/H90Y, A13V/Q25L/H90L, Q25L/H90L/K93T/M97L, Q25L/Q86R/H90L 또는 I89V/H90L로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 22

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 23

청구항 1-22 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 24

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 25

청구항 1-21 및 24 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 26

청구항 1-21 및 24 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 27

청구항 1-21 및 26 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L/N104S를 포함

하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 28

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 29

청구항 1-21 및 28 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L/ I193V를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 30

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 M60K/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 31

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/ F33I/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 32

청구항 1-21 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/ H90L/P185S를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 33

청구항 1-32 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 34

청구항 1-33 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 증가된 친화성으로 특이적으로 결합하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 결합 친화성은 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 60배, 적어도 약 70배, 적어도 약 80배, 적어도 약 90배, 적어도 약 100배, 또는 적어도 약 125배 증가된 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 36

청구항 1-35 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 감소된 친화성으로 특이적으로 결합하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 감소된 결합 친화성은 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.75배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 4.0배, 또는 적어도 약 5.0배 감소된 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 38

청구항 1-37 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변

형 CD86의 동일한 엑토도메인에 대한 결합과 동일 또는 유사한 결합 친화성으로 특이적으로 결합하며, 선택적으로 상기 동일 또는 유사한 결합 친화성은 비변형 CD86의 결합 친화성의 약 90% 내지 120%인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 39

청구항 1-38 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 완전한 세포의 도메인을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 40

청구항 1-39 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편 및 SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 41

청구항 1-40 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 대해 95% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 42

청구항 34-41 중 어느 하나의 청구항에 있어서, CD28은 인간 CD28인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 43

청구항 34-42 중 어느 하나의 청구항에 있어서, CTLA-4는 인간 CTLA-4인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 44

청구항 1-43 중 어느 하나의 청구항에 있어서 가용성 단백질인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 45

청구항 1-44 중 어느 하나의 청구항에 있어서:

변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD86 막관통 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 결여하고/결여하거나;

변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포 표면에서 발현되지 못하는 것인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 46

청구항 1-45 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 멀티머화 도메인은 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 48

청구항 1-47 중 어느 하나의 청구항에 있어서 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 49

청구항 47 또는 청구항 48에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1이거나 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인

변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 50

청구항 47-49 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 51

청구항 47-50 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 52

청구항 47-50 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 각각 EU 넘버링 기준으로 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, N297G, V302C 및 K447del로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 변이체 IgG1 Fc 도메인인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 53

청구항 47-50 및 52 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 아미노산 변형 L234A/L235E/G237A를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 54

청구항 47-50, 52 및 53 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 C220S를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 55

청구항 47-50 및 52-54 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 K447del을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 56

청구항 47-50 및 52-55 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형을 하나 이상 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 57

청구항 47-50 및 52-56 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 58

청구항 47-57 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커, 선택적으로 G4S 링커를 통해 간접적으로 멀티머화 도메인 또는 Fc에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 59

청구항 1-43 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 더 포함하는 막관통 면역조절 단백질이고, 선택적으로 상기 막관통 도메인은 변이체 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인 (ECD) 또는 그의 특이적 결합 단편에 직접 또는 간접적으로 연결된, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 막관통 도메인은 SEQ ID NO:2의 잔기 248-268로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:2

의 잔기 248-268에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 61

청구항 59 또는 청구항 60에 있어서, 세포질 도메인을 더 포함하고, 선택적으로 상기 세포질 도메인은 직접 또는 간접적으로 막관통 도메인에 연결된, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 62

청구항 61에 있어서, 세포질 도메인은 천연 CD86 세포질 도메인이거나 이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 63

청구항 61 또는 청구항 62에 있어서, 세포질 도메인은 SEQ ID NO:2의 잔기 269-329로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:2의 잔기 269-329에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 64

청구항 61에 있어서, 세포질 도메인은 ITAM 시그널링 모티프를 포함하고/포함하거나 또는 CD3 제타의 세포내 시그널링 도메인을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 65

청구항 59 또는 청구항 60에 있어서, 폴리펩타이드는 세포질 시그널링 도메인을 함유하지 않고/않거나 세포 상에서 발현될 때 세포내 시그널을 매개하거나 조절할 수 없는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

청구항 66

청구항 1-58 중 어느 하나의 청구항에 기재된 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 청구항 1-58 중 어느 하나의 청구항에 기재된 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커를 통해 간접적으로 연결된 면역조절 단백질.

청구항 68

청구항 66 또는 청구항 67에 있어서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 각각 멀티머화 도메인에 연결됨으로 해서, 면역조절 단백질은 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머인 면역조절 단백질.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 멀티머는 다이머, 선택적으로 호모다이머인 면역조절 단백질.

청구항 70

청구항 66-69 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 동일한 것인 면역조절 단백질.

청구항 71

IgSF 패밀리의 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된, 청구항 1-58 중 어느 하나의 청구항에 기재된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 72

청구항 71에 있어서, IgSF 도메인은 친화성-변형된 IgSF 도메인이고, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF

패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인 면역조절 단백질.

청구항 73

청구항 72에 있어서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 결합하는 것에 비해 변경된 결합을 나타내는 친화성 변형된 IgSF 도메인인, 면역조절 단백질.

청구항 74

청구항 73에 있어서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 결합하는 것에 비해 증가된 결합을 나타내는 친화성 변형된 IgSF 도메인인, 면역조절 단백질.

청구항 75

청구항 71-74 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 IgSF 도메인은 종양 상에 발현하는 리간드에 결합하거나 또는 종양 상에 발현하는 리간드에 결합하는 종양-국소화 모이어티 또는 염증 환경과 관련된 세포 또는 조직에 결합하는 염증성-국소화 모이어티인, 면역조절 단백질.

청구항 76

청구항 75에 있어서, 리간드는 B7H6인 면역조절 폴리펩타이드.

청구항 77

청구항 75 또는 청구항 76에 있어서, IgSF 도메인은 Nkp30으로부터 유래하는 것인 면역조절 폴리펩타이드.

청구항 78

청구항 71-77 중 어느 하나의 청구항에 있어서 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 제2 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 79

청구항 71-78 중 어느 하나의 청구항에 있어서, IgSF 패밀리 멤버의 IgSF 도메인 또는 그의 친화성-변형된 IgSF 도메인을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 더 포함하되, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 면역조절 단백질.

청구항 80

청구항 79에 있어서:

제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 동일하거나; 또는

제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 상이한 것인, 면역조절 단백질.

청구항 81

청구항 79 또는 청구항 80에 있어서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드 및/또는 제3 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 82

청구항 68-70, 78 및 81 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 도메인이고, 선택적으로 상기 면역글로불린 단백질은 인간이거나 및/또는 Fc 도메인은 인간인 면역조절 단백질.

청구항 83

청구항 82에 있어서, Fc 도메인은 IgG1, IgG2 또는 IgG4, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인 면역조절

단백질.

청구항 84

청구항 83에 있어서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 선택적으로 인간 IgG1, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인 면역조절 단백질.

청구항 85

청구항 82-84 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 86

청구항 82-85 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 87

청구항 84 또는 청구항 85에 있어서, Fc 도메인은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1이고 하나 이상의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, 또는 N297G로부터 선택되되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.

청구항 88

청구항 87, Fc 도메인은 아미노산 치환 N297G, 아미노산 치환 R292C/N297G/V302C, 또는 아미노산 치환 L234A/L235E/G237A를 포함하되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.

청구항 89

청구항 87 또는 청구항 88에 있어서, 변이체 Fc 도메인은 아미노산 치환 C220S를 더 포함하되, 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인, 면역조절 단백질.

청구항 90

청구항 87-89 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 K447del을 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.

청구항 91

청구항 84, 85 및 87-90 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형 중 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 92

청구항 84, 85 및 87-91 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 93

제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질로서:

제1 폴리펩타이드는 링커를 통해 제1 Fc 도메인에 연결된 적어도 하나의 IgSF 도메인을 포함하되, 여기서 적어도 하나의 IgSF 도메인은 청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드 중 하나 또는 양자 모두를 포함하거나 또는 PD1 폴리펩타이드 또는 그의 변이체의 IgSF 도메인; 및

제2 폴리펩타이드는 링커를 통해 제2 Fc 도메인에 연결된 적어도 하나의 IgSF 도메인을 포함하되, 여기서 적어도 하나의 청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드 중 하나 또는 양자 모두를

포함하며;

여기서 상기 면역조절 단백질은 CD86의 적어도 하나의 IgSF 도메인 및 PD-1의 적어도 하나의 IgSF 도메인 또는 그의 변이체를 포함하는 것인, 면역조절 단백질.

청구항 94

청구항 93에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 95

청구항 93 또는 청구항 94에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 96

청구항 93-95 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인이고, 여기서 제1 IgSF 도메인은 청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드이고, 제1 폴리펩타이드는 링커를 통해 제1 Fc 도메인에 연결된 제2 IgSF 도메인을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 97

청구항 96에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 98

청구항 93-97 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인이고, 상기 제1 IgSF 도메인은 청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드이며, 제2 폴리펩타이드는 링커를 통해 제2 Fc 도메인에 연결된 제2 IgSF 도메인을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 99

청구항 98에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 100

청구항 93-99 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제1 Fc 도메인의 N- 또는 C-말단에 링커를 통해 연결되고;

제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제2 Fc 도메인의 N- 또는 C-말단에 링커를 통해 연결된 것인, 면역조절 단백질.

청구항 101

청구항 96-97 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인에 연결된 말단의 반대쪽 제1 Fc 도메인 말단에 연결된 것인, 면역조절 단백질.

청구항 102

청구항 98-101 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인에 연결된 말단의 반대쪽 제2 Fc 도메인 말단에 연결된 것인, 면역조절 단백질.

청구항 103

청구항 93-102 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 링커는 독립적으로 SEQ ID NO: 222 또는 224의 서열을 포함하되, 선택적으로 상기 링커는 SEQ ID NO: 222 또는 224의 서열의 반복체를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 104

청구항 93-103 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 동일하고, 선택적으로, 상기 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 105

청구항 93-104 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 제1 및 제2 Fc 도메인을 통해 다이머화하여 호모다이머를 형성하는, 면역조절 단백질.

청구항 106

청구항 93-104 및 105 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 호모다이머의 제1 및 제2 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 PD1 폴리펩타이드-링커-Fc-링커-변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 107

청구항 93-104 및 105-106 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 315의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 108

청구항 93-104 및 105-107 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 94 또는 150의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 109

청구항 93-104 및 105-108 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 호모다이머의 제1 및 제2 폴리펩타이드는 각각 SEQ ID NO: 348 또는 349의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 110

청구항 93-103 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 상이하고, 선택적으로 상기 제1 및 제2 Fc 도메인은 노-인트루-홀 돌연변이를 포함하되, 선택적으로 상기 제1 Fc 도메인 또는 제2 Fc 도메인은 SEQ ID NO: 346의 서열을 포함하고, 제1 Fc 도메인 또는 제2 Fc 도메인 중 다른 하나는 SEQ ID NO: 347의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 111

청구항 93-103 및 110 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 제1 및 제2 Fc 도메인을 통해 다이머화하여 헤테로다이머를 형성하는, 면역조절 단백질.

청구항 112

청구항 93-103, 110, 및 111 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 헤테로다이머의 제1 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 PD1 폴리펩타이드-링커-Fc를 포함하고 헤테로다이머의 제2 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 CD86 폴리펩타이드-링커-Fc, Fc-링커-변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 변이체 PD1-링커-Fc-링커-변이체 CD86를 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 113

청구항 93-103, 110, 및 111-112 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 315의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 114

청구항 93-103, 110, 및 111-113 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 94 또는 150의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 115

청구항 93-103, 110, 및 111-114 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 헤테로다이머의 제1 폴리펩타이드는 SEQ ID

NO: 350의 서열을 포함하고; 및

헤테로다имер의 제2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 351, 352, 또는 353의 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.

청구항 116

세포 표면의 분자에 특이적으로 결합하는 표적화 모이어티에 연결된 청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 컨쥬게이트.

청구항 117

청구항 116에 있어서, 세포는 면역 세포이거나 또는 종양 세포인 컨쥬게이트.

청구항 118

청구항 116 또는 청구항 117에 있어서, 모이어티는 단백질, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 나노입자인 컨쥬게이트.

청구항 119

청구항 116-118 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 모이어티는 항체 또는 항원-결합 단편인 컨쥬게이트.

청구항 120

청구항 119에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 항체의 V_H 또는 V_L 의 N- 또는 C-말단에 연결되는 컨쥬게이트.

청구항 121

청구항 119에 있어서, 항체는 항-HER2 항체 또는 항-EGFR 항체인 컨쥬게이트.

청구항 122

청구항 121에 있어서, 항-HER2 항체는 퍼투주맵인 컨쥬게이트.

청구항 123

청구항 122에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 퍼투주맵의 V_H 의 N-말단, 퍼투주맵의 V_H 의 C-말단, 퍼투주맵의 V_L 의 N-말단, 또는 퍼투주맵의 V_L 의 C-말단에 연결되고, 선택적으로 SEQ ID NO:342, 344, 343, 또는 345의 서열을 각각 포함하는, 컨쥬게이트.

청구항 124

청구항 121에 있어서, 항-EGFR 항체는 파니투무맵인 컨쥬게이트.

청구항 125

청구항 124에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 파니투무맵의 V_H 의 N-말단, 파니투무맵의 V_H 의 C-말단, 파니투무맵의 V_L 의 N-말단, 또는 파니투무맵의 V_L 의 C-말단에 연결되고, 선택적으로 SEQ ID NO:348, 350, 349, 또는 351의 서열을 각각 포함하는, 컨쥬게이트. 또는 항-EGFR 항체.

청구항 126

청구항 116-125 중 어느 하나의 청구항에 있어서 융합 단백질인 컨쥬게이트.

청구항 127

청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자(들).

청구항 128

청구항 127의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 129

청구항 128의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 130

변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 단백질의 제조 방법으로서, 청구항 127의 핵산 분자 또는 청구항 128의 벡터를, 단백질이 세포에서 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 131

청구항 130에 있어서, 세포로부터 단백질 분리하거나 정제하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 132

변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 조작하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산 분자를, 폴리펩타이드가 세포에서 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 133

청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨쥬게이트, 청구항 127의 핵산 분자 또는 청구항 128의 벡터를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 134

청구항 133에 있어서:

변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 포함하거나 또는 청구항 59-65 중 어느 하나의 청구항의 막관통 면역조절 단백질이고; 및/또는

변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 단백질은 세포 표면에서 발현되는 것인, 조작된 세포.

청구항 135

청구항 133에 있어서:

변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 포함하지 않거나 및/또는 세포 표면에서 발현되지 않고; 및/또는

변이체 CD86 폴리펩타이드는 조작된 세포로부터 분리될 수 있는 것인, 조작된 세포.

청구항 136

청구항 133-135 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 세포는 면역 세포인, 조작된 세포.

청구항 137

청구항 136에 있어서, 면역 세포는 림프구이고, 선택적으로 림프구는 T 세포인, 조작된 세포.

청구항 138

청구항 133-137 중 어느 하나의 청구항에 있어서 1차 세포인, 조작된 세포.

청구항 139

청구항 133-138 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 더 포함하는, 조작된 세포.

청구항 140

청구항 133-139 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 더 포함하는, 조작된 세포.

청구항 141

청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역 조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨주게이트, 청구항 127의 핵산 분자 또는 청구항 128의 벡터를 포함하는, 조작된 세포. 감염 물질.

청구항 142

청구항 141에 있어서, 감염 물질은 세균 또는 바이러스인, 감염 물질.

청구항 143

청구항 142에 있어서, 감염 물질은 바이러스이고 바이러스는 종양분해(oncolytic) 바이러스인, 감염 물질.

청구항 144

청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역 조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨주게이트, 청구항 133-140 중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포 또는 청구항 141-143 중 어느 하나의 청구항의 감염 물질을 포함하는, 의약 조성물.

청구항 145

청구항 144에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 146

청구항 144-145 중 어느 하나의 청구항의 의약 조성물을 바이알 또는 용기에 포함하는 제조 물품.

청구항 147

청구항 144-145 중 어느 하나의 청구항의 의약 조성물 또는 청구항 146의 제조 물품 및 사용 지침을 포함하는 키트.

청구항 148

대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨주게이트, 청구항 133-140 중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포, 청구항 141-143 중 어느 하나의 청구항의 감염 물질, 또는 청구항 144-145중 어느 하나의 청구항의 의약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 149

대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 청구항 133-140중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 150

청구항 149에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가인 방법.

청구항 151

청구항 149에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계인 방법.

청구항 152

청구항 148-151 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 면역 반응의 조절은 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 153

질병 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1-65 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 청구항 66-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 융합 단백질인 컨쥬게이트, 청구항 133-140 중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포, 청구항 141-143 중 어느 하나의 청구항의 감염 물질, 또는 청구항 144-145 중 어느 하나의 청구항의 의약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 154

질병 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 청구항 133-140 중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 155

청구항 154에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가인, 방법.

청구항 156

청구항 154에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계인, 방법.

청구항 157

청구항 148-156 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 면역 반응은 대상체에서 증가된 방법.

청구항 158

청구항 148, 152, 153 및 157 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 종양-국소화 모이어티에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트를 대상체에 투여하는 방법.

청구항 159

청구항 158에 있어서, 종양-국소화 모이어티는 종양 항원을 인식하는 결합 분자이거나 또는 이를 포함하는, 방법.

청구항 160

청구항 159에 있어서:

결합 분자는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 야생형 IgSF 도메인 또는 그의 변이체를 포함하고; 또는

결합 분자는 종양 항원에 결합하는 IgSF 멤버의 IgSF 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하되, 선택적으로 상기 IgSF 도메인은 PD-1 또는 Nkp30의 것인, 방법.

청구항 161

청구항 148 및 152-160 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 청구항 71-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질 또는 청구항 116-126 중 어느 하나의 청구항의 컨쥬게이트를 포함하는 의약 조성물을 대상체에 투여하는, 방법.

청구항 162

청구항 148-160 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 막관통 면역조절 단백질인 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포를 대상체에 투여하되, 선택적으로, 상기 조작된 세포는 청구항 133, 134 및 136-140 중 어느 하나의 청구항에 기재된 것인, 방법.

청구항 163

청구항 152-162 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 질병 또는 병태는 종양 또는 암인, 방법.

청구항 164

청구항 152-163 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 질병 또는 병태는 흑색종, 폐암, 방광암, 혈액암, 간암, 뇌암, 신장암, 유방암, 췌장암, 대장암, 비장암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁암, 위암종, 근골격계암, 두경부암, 위장암, 생식세포암, 또는 내분비 및 신경내분비암으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 165

청구항 148-156 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 면역 반응이 감소되는 방법.

청구항 166

청구항 148, 152, 153 및 165 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 가용성인 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 대상체에 투여하는 방법.

청구항 167

청구항 166에 있어서, 가용성 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 Fc 융합 단백질인 방법.

청구항 168

청구항 148, 152, 153 및 165-167 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 청구항 1-58 중 어느 하나의 청구항의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 청구항 66-74 및 78-115 중 어느 하나의 청구항의 면역조절 단백질을 포함하는 의약 조성물을 대상체에 투여하는 방법.

청구항 169

청구항 148, 152, 153 및 165 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 분비가능한 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포를 대상체에 투여하되, 선택적으로 여기서 상기 조작된 세포는 청구항 133 및 135-140 중 어느 하나의 청구항의 조작된 세포인 방법.

청구항 170

청구항 148, 152, 153 및 165-169 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 질병 또는 병태는 염증성 또는 자가면역 질병 또는 병태인 방법.

청구항 171

청구항 148, 152, 153 및 165-169 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 질병 또는 병태는 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증성 위장관 질환, 염증성 안질환, 염증성 신경 질환, 염증성 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질병인 방법.

172. 청구항 170 또는 청구항 171에 있어서, 질병 또는 병태는 염증성 장질환, 이식, 크론씨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스성 관절염 또는 건선으로부터 선택되는 방법.

청구항 172

청구항 170 또는 청구항 171에 있어서, 질병 또는 병태는 염증성 장질환, 이식, 크론씨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스성 관절염 또는 건선으로부터 선택되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

[0001] 본원은 이 출원은 발명의 명칭이 "CD86 변이체 면역조절 단백질 및 그의 용도"인 2018년 11월 30일자 미국 가특허출원 No. 62/774,131 및 발명의 명칭이 "CD86 변이체 면역조절 단백질 및 그의 용도"인 2019년 6월 14일자 미각 가특허출원 No. 62/862,001에 기초한 우선권 주장 출원으로서, 상기 출원의 내용은 그 전체가 참조 병합된다.

[0003] **서열목록의 참조 병합**

[0004] [0002] 본 발명은 전자형태의 서열목록과 함께 출원된다. 이 서열목록은 파일명이 761612002840SeqList.txt이고 크기가 599,034 바이트이며 2019년 11월 27일에 생성되었다. 이 전자형태의 서열목록에 담긴 정보는 그 전체가 참조 병합되었다.

[0005] **분야**

[0006] [0003] 본 발명은 암 및 면역학적 질환의 치료에 있어 면역 반응을 조절하기 위한 치료 조성물에 관한 것이다. 일부 태양에서, 본 발명은 동족 결합 파트너에 대해 변경된 결합 친화성, 예를 들어 CD2에 대해 증가된 친화성을 나타내는 CD86의 특정 변이체 및 그의 면역조절 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] **배경**

[0008] [0004] 항원-제시 세포 (APC) 또는 표적 세포와 림프구에 의해 또는 이들 간에 형성된 면역학적 시냅스(IS)에서 일어나는 프로세스에 개입함으로써 면역 반응을 조절하는 것은 의학적으로 점점 큰 관심의 대상이 되고 있다. 기계론적으로, IS 내 세포 표면 단백질은 이들이 결합하는 단일 단백질과 복수의 단백질 표적의 조합으로도 종종 동시적인 상호반응과 연관될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] IS 상호반응은 두 세포들 간의 정선과 밀접하게 연관되어 일어나며 이 구조 내 단일 단백질은 관련 세포(트랜스) 상의 단백질 뿐만 아니라 동일 세포(시스) 상의 단백질 양자 모두와 아마도 동시에 반응할 수 있다. 비록 IS를 조절하는 치료방법이 공지이긴 하지만, 개선된 치료법이 요구되고 있다. 본 발명에 따라, 이러한 요구사항을 만족하며, 세포 상에서 발현될 수 있는 가용성 단백질 또는 막관통 면역조절 단백질을 비롯한 면역조절 단백질이 제공된다.

과제의 해결 수단

[0010] **개요**

[0011] [0005] 본 발명에 따라, 세포의 도메인 또는 IgV 도메인을 함유하는 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편이 제공되며, 여기서, 상기 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 제시된 위치를 참조로, 비변형 CD86 또는 그의 특이적 결합 단편의 13, 18, 25, 28, 33, 38, 39, 40, 43, 45, 52, 53, 60, 68, 71, 77, 79, 80, 82, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 97, 102, 104, 113, 114, 123, 128, 129, 132, 133, 137, 141, 143, 144, 148, 153, 154, 158, 170, 172, 175, 178, 180, 181, 183, 185, 192, 193, 196, 197, 198, 205, 206, 207, 212, 215, 216, 222, 223, 또는 224로부터 선택된 위치(들)에 대응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 포유동물 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86의 세포의 도메인을 함유하되, 여기서 하나 이상의 아미노산 변형은 비변형 CD86 폴리펩타이드의 세포의 도메인의 하나 이상의 잔기에 존재한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:29에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 함유하는 일부를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86는 SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 그의 일부는 IgV 도메인의 아미노산 잔기 33-131 또는 24-134 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다.

[0012] [0006] 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 123에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 123에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 함유하는 그의 일부를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86는 SEQ ID NO:123에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] [0007] 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 122에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID

NO: 122에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:122에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] [0008] 일부 구체예에서, 특이적 결합 단편은 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 95개 또는 그 이상의 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구체예에서, 특이적 결합 단편은 SEQ ID NO:2의 잔기 33-131로서 제시된 IgV 도메인 길이의 적어도 80%인 길이를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산 변형, 선택적으로 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 치환이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 삽입이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 결실이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환이다.

[0015] [0009] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, E38V/S114G/P143H, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, K80M/I88T, K92I/F113S, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, 또는 S28G/H90Y로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및/또는 위치 90에 존재한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L, H90Y, 또는 H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 H90Y를 함유한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형 H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및 위치 90에서의 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L 및 추가적인 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L 및 A13V, Q18K, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다.

[0016] [0010] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, M60K/H90L; Q25L/F33I/H90L; Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T; Q25L/H90L; Q25L/H90L/P185S; Q25L/H90L/P185S/P224L; Q25L/H90L/S179R; Q25L/H90Y/S181P/I193V; Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P; Q25L/Q86R/H90L/K93T, S28G/H90Y, A13V/Q25L/H90L, Q25L/H90L/K93T/M97L,

Q25L/Q86R/H90L 또는 I89V/H90L로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다.

- [0017] [0011] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/ H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L/N104S를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L/ I193V를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 M60K/H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/F33I/H90L을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/P185S를 포함한다.
- [0018] [0012] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 29에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함한다.
- [0019] [0013] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 증가된 친화성으로 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 60배, 적어도 약 70배, 적어도 약 80배, 적어도 약 90배, 적어도 약 100배, 또는 적어도 약 125배 증가된다 [번역자 주: 본 명세서 전반에 걸쳐 "약"이라는 표현은 "약" 다음에 나오는 숫자나 값 자체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예컨대 "약 10"이라는 표현은 "10" 자체도 의미하는 것으로 한다].
- [0020] [0014] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 감소된 친화성으로 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 감소된 결합 친화성은 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.75배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 4.0배, 또는 적어도 약 5.0배 감소된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86의 동일한 엑토도메인에 대한 결합과 동일 또는 유사한 결합 친화성으로 특이적으로 결합하며, 선택적으로 상기 동일 또는 유사한 결합 친화성은 비변형 CD86의 결합 친화성의 약 90% 내지 120%이다.
- [0021] [0015] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 완전한 세포외 도메인을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 나타내고, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] [0016] 일부 구체예에서, CD28은 인간 CD28이다. 일부 구체예에서, CTLA-4는 인간 CTLA-4이다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 가용성 단백질이다.
- [0023] [0017] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD86 막관통 도메인(transmembrane domain) 및 세포내 시그널링 도메인을 결여하며; 및/또는 변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포 표면에서 발현되지 못한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 멀티머화 도메인에 연결된다. 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체이다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체에 연결된다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아

미노산 서열이거나 또는 이를 함유한다.

- [0024] [0018] 일부 구체예에서, Fc 도메인은 각각 EU 넘버링 기준으로 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, N297G, V302C 및 K447del로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 변이체 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 아미노산 변형 L234A/L235E/G237A를 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 C220S를 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 K447del을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고, 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형을 하나 이상 함유하는 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이거나 또는 이를 함유한다.
- [0025] [0019] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 멀티머화 도메인 또는 Fc에 링커, 선택적으로 G4S 링커를 통해 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 더 함유하는 막관통 면역조절 단백질이며, 선택적으로 상기 막관통 도메인은 변이체 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인 (ECD) 또는 그의 특이적 결합 단편에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 SEQ ID NO: 2의 잔기 248-268로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 2의 잔기 248-268에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포질 도메인을 더 함유하며, 선택적으로 상기 세포질 도메인은 막관통 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 세포질 도메인은 천연 CD86 세포질 도메인이거나 또는 이를 함유한다. 일부 구체예에서, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 2의 잔기 269-329로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 2의 잔기 269-329에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 함유한다. 일부 구체예에서, 세포질 도메인은 contains ITAM 시그널링 모티프를 함유하거나 및/또는 CD3 제타의 세포내 시그널링 도메인이거나 또는 이를 함유한다.
- [0026] [0020] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포질 시그널링 도메인을 함유하지 않고/않거나 세포 상에서 발현될 때 세포내 시그널을 매개하거나 조절할 수 없다.
- [0027] [0021] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드의 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 본원에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드의 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는, 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커를 통해 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 각각 멀티머화 도메인에 연결됨으로써 해서, 상기 면역조절 단백질은 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머이다. 일부 구체예에서, 멀티머는 다이머, 선택적으로 호모다이머이다. 일부 구체예에서, 멀티머는 호모다이머이다. 일부 구체예에서, 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 동일하다.
- [0028] [0022] 본 발명에 따라, IgSF 패밀리의 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 도메인을 함유하는 제2 폴리펩타이드에, 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된, 본원에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인은 친화성-변형된 IgSF 도메인이고, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF 패밀리의 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 함유한다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리의 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 상기 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 나타내는 결합과 비교하여, 변경된 결합을 나타내는 친화성 변형된 IgSF 도메인이다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리의 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 나타내는 결합에 비해, 증가된 결합을 나타낸다.
- [0029] [0023] 일부 구체예에서, 제2 폴리펩타이드의 IgSF 도메인은 종양에서 발현되는 리간드에 결합하는 종양-국소화 모이어티이거나 또는 염증 환경과 연관된 세포 또는 조직에 결합하는 염증-국소화 모이어티이다. 일부 구체예에서, 리간드는 B7H6이다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인은 Nkp30으로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 제2 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 함유한다. 일부 구체예에서, 본원에 설명된 면역조절 단백질은 IgSF 패밀리의 멤버의 IgSF 도메인 또는 그의 친화성-변형된 IgSF 도메인을 함유하는 제3 폴리펩타이드를 더 함유하되, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF 패밀리의 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 함유한다. 일부 구체예에서, 제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 동일하거나; 또는 제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 상이하다.

- [0030] [0024] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드 및/또는 제3 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 함유한다. 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 도메인이고, 선택적으로 면역글로불린 단백질은 인간이고 및/또는 Fc 영역은 인간이다. 일부 구체예에서, 면역글로불린 단백질은 인간이고 및/또는 Fc 영역은 인간이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 IgG1, IgG2 또는 IgG4, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 선택적으로 인간 IgG1, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하는 변이체 IgG1이고 상기 하나 이상의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, 또는 N297G로부터 선택되되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 N297G, 아미노산 치환 R292C/N297G/V302C, 또는 아미노산 치환 L234A/L235E/G237A를 함유하되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것이다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 더 함유하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것이다. 일부 구체예에서, Fc 영역은 K447del을 함유하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것이다. Fc 영역은 본원에서 Fc 도메인이라고도 칭한다.
- [0031] [0025] 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고, 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형 중 하나 이상을 함유하는 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이고 함유한다.
- [0032] [0026] 본 발명에 따라 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질이 제공되며, 여기서:
- [0033] 제1 폴리펩타이드는 제1 Fc 도메인에 링커를 통해 연결된 적어도 하나의 IgSF 도메인을 포함하되, 여기서 적어도 하나의 IgSF 도메인은 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드의 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 PD1 폴리펩타이드 또는 그의 변이체의 IgSF 도메인 중 하나 또는 양자 모두를 포함하고; 제2 폴리펩타이드는 제2 Fc 도메인에 링커를 통해 연결된 적어도 하나의 IgSF 도메인을 포함하되, 여기서 적어도 하나의 IgSF 도메인은 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드의 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 PD1 폴리펩타이드 또는 그의 변이체의 IgSF 도메인 중 하나 또는 양자 모두를 포함하며; 여기서 상기 면역조절 단백질은 CD86의 적어도 하나의 IgSF 도메인 및 PD-1의 적어도 하나의 IgSF 도메인 또는 그의 변이체를 포함한다.
- [0034] [0027] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드인 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인이고, 여기서 제1 IgSF 도메인은 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드인 변이체 CD86 폴리펩타이드이며, 제1 폴리펩타이드는 링커를 통해 제1 Fc 도메인에 연결된 제2 IgSF 도메인을 포함한다. 본원에 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인이고, 여기서 제1 IgSF 도메인은 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드인 변이체 CD86 폴리펩타이드이며, 제2 폴리펩타이드는 링커를 통해 제2 Fc 도메인에 연결된 제2 IgSF 도메인을 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제2 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 변이체 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0035] [0028] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 링커를 통해 제1 Fc 도메인의 N- 또는 C-말단에 연결되고; 제2 폴리펩타이드의 적어도 하나의 IgSF 도메인은 링커를 통해 제2 Fc 도메인의 N- 또는 C-말단에 연결된다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인에 연결된 말단의 반대쪽 제1 Fc 도메인 말단에 연결된다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제2 폴리펩타이드의 제2 IgSF 도메인은 제1 IgSF 도메인에 연결된 말단의 반대쪽 제2 Fc 도메인 말단에 연결된다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 링커는 독립적으로 SEQ ID NO: 222 또는 224의 서열을 포함하되, 선택적으로 링커는 SEQ ID NO: 222 또는 224의 서열의 1 내지 4개의 반복부(repeats)를 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 동일하고, 선택적으로, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 SEQ ID

NO: 230의 서열을 포함한다.

- [0036] [0029] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 제1 및 제2 Fc 도메인을 통해 다imer화하여 호모다imer를 형성한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 호모다imer의 제1 및 제2 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 PD1 폴리펩타이드-링커-Fc-링커-변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0037] [0030] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 변이체 PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 315의 서열을 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예 중 일부에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 94 또는 150의 서열을 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 상이하고, 선택적으로 제1 및 제2 Fc 도메인은 knob-into-hole(knob-into-hole) 돌연변이를 포함하며, 선택적으로 제1 Fc 도메인 또는 제2 Fc 도메인 중 하나는 SEQ ID NO: 346의 서열을 포함하고, 제1 Fc 도메인 또는 제2 Fc 도메인의 다른 하나는 SEQ ID NO: 347의 서열을 포함한다.
- [0038] [0031] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 제1 및 제2 Fc 도메인을 통해 다imer화하여 헤테로다imer를 형성한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 헤테로다imer의 제1 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 PD1 폴리펩타이드-링커-Fc를 포함하고 헤테로다imer의 제2 폴리펩타이드는 좌에서 우로 변이체 CD86 폴리펩타이드-링커-Fc, Fc-링커-변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 변이체 PD1-링커-Fc-링커-변이체 CD86를 포함한다.
- [0039] [0032] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 변이체 PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 315의 서열을 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예 중 일부에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 94 또는 150의 서열을 포함한다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 헤테로다imer의 제1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 350의 서열을 포함하고; 및 헤테로다imer의 제2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 351, 352, 또는 353의 서열을 포함한다.
- [0040] [0033] 본 발명에 따라, 세포 표면에서 분자에 특이적으로 결합하는 표적화 모이어티에 연결된 본원에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 컨쥬게이트가 제공된다. 일부 구체예에서, 세포는 면역 세포 또는 종양 세포이다. 일부 구체예에서, 모이어티는 단백질, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 나노입자이다. 일부 구체예에서, 모이어티는 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 본원에 설명된 컨쥬게이트는 융합 단백질이다.
- [0041] [0034] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 항체의 V_H 또는 V_L 의 N- 또는 C-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 항체의 V_H 또는 V_L 의 N- 또는 C-말단에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 본원에 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 항체는 항-HER2 항체 또는 항-EGFR 항체이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 항-HER2 항체는 퍼투주맵이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 선택적으로 각각 SEQ ID NO: 342, 344, 343, 또는 345의 서열을 포함하는, 퍼투주맵의 V_H 의 N-말단, 퍼투주맵의 V_H 의 C-말단, 퍼투주맵의 V_L 의 N-말단, 퍼투주맵의 V_L 의 C-말단에 연결된다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 항-EGFR 항체는 파니투무맵이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 선택적으로 각각 SEQ ID NO: 348, 350, 349, 또는 351의 서열을 포함하는 파니투무맵의 V_H 의 N-말단, 파니투무맵의 V_H 의 C-말단, 파니투무맵의 V_L 의 N-말단, 또는 파니투무맵의 V_L 의 C-말단, 또는 항-EGFR 항체에 연결된다.
- [0042] [0035] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질, 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트 중 어느 하나를 인코딩하는 핵산 분자가 제공된다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 합성 핵산이다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 cDNA이다.
- [0043] [0036] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 핵산 분자를 함유하는 벡터가 제공된다. 일부 구체예에서, 벡터는 발현 벡터이다. 일부 구체예에서, 벡터는 포유동물 발현 벡터 또는 바이러스 벡터이다.
- [0044] [0037] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 핵산 분자를 함유하는 세포가 제공된다. 일부 구체예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 인간 세포이다.
- [0045] [0038] 본 발명에 따라, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 단백질의 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 설명된 핵산 분자 또는 본원에 설명된 벡터를, 세포에서 단백질이 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 이 방법은 세포로부터 단백질을 분리 또는 정제하는 단계를 더 포함한다.

- [0046] [0039] 본 발명에 따라, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 조작하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산 분자를, 상기 폴리펩타이드가 세포에서 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함한다.
- [0047] [0040] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트, 본원에 설명된 핵산 분자 또는 본원에 설명된 벡터를 함유하는, 조작된 세포가 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 함유하거나 또는 본원에 설명된 막관통 면역조절 단백질이며; 및/또는 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 단백질은 세포 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 함유하지 않고/않거나 세포 표면에서 발현되지 않고/않거나 변이체 CD86 폴리펩타이드는 조작된 세포로부터 분비될 수 있다. 일부 구체예에서, 단백질은 세포질 시그널링 도메인 또는 막관통 도메인을 함유하지 않고/않거나 세포 표면에서 발현되지 않고/않거나; 단백질은 발현시 조작된 세포로부터 분비되지 못한다.
- [0048] [0041] 일부 구체예에서, 조작된 세포는 면역 세포이다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 림프구이다. 일부 구체예에서, 림프구는 T 세포이다. 일부 구체예에서, T 세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포이다. 일부 구체예에서, T 세포는 조절 T 세포(Treg)이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 1차 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 인간 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 더 포함한다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 더 함유한다.
- [0049] [0042] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트, 본원에 설명된 핵산 분자 또는 본원에 설명된 벡터를 함유하는 감염 물질이 제공된다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 세균 또는 바이러스이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 바이러스이고 바이러스는 종양분해(oncolytic) 바이러스이다.
- [0050] [0043] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트, 본원에 설명된 조작된 세포 또는 본원에 설명된 감염 물질을 함유하는 의약 조성물이 제공된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 함유한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 멸균성이다.
- [0051] [0044] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 의약 조성물을 바이알 또는 용기에 함유하는 제조 물품(articles of manufacture)이 제공된다. 일부 구체예에서, 바이알 또는 용기는 밀봉된다.
- [0052] [0045] 본 발명에 따라, 본원에 설명된 의약 조성물 또는 본원에 설명된 제조 물품 및 사용 지침을 함유하는 키트가 제공된다.
- [0053] [0046] 본 발명에 따라, 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트, 본원에 설명된 조작된 세포, 본원에 설명된 감염 물질, 또는 본원에 설명된 의약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0054] [0047] 본 발명에 따라, 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본원에 설명된 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가(autologous)이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계(allogenic)이다. 일부 구체예에서, 면역 반응을 조절하면 대상체에서 질병 또는 병태가 치료된다.
- [0055] [0048] 본 발명에 따라, 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 융합 단백질인 컨쥬게이트, 본원에 설명된 조작된 세포, 본원에 설명된 감염 물질, 또는 본원에 설명된 의약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0056] [0049] 본 발명에 따라, 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본원에 설명된 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계이다.
- [0057] [0050] 일부 구체예에서, 면역 반응은 대상체에서 증가된다. 일부 구체예에서, 종양-국소화 모이어티에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트가 대상체에 투여된다. 일부

구체예에서, 종양-국소화 모이어티는 종양 항원을 인식하는 결합 분자이거나 또는 이를 함유한다. 일부 구체예에서, 결합 분자는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 함유하거나 또는 야생형 IgSF 도메인 또는 그의 변이체를 함유한다.

[0058] [0051] 일부 구체예에서, 본원에 설명된 면역조절 단백질 또는 본원에 설명된 컨주게이트를 함유하는 의약 조성물을 대상체에 투여한다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질인 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 조작된 세포를 대상체에 투여하되, 선택적으로, 조작된 세포는 본원에 설명된 것이다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 본원에 설명된 바와 같다.

[0059] [0052] 일부 구체예에서, 질병 또는 병태는 종양 또는 암이다. 일부 구체예에서, 질병 또는 병태는 흑색종, 폐암, 방광암, 혈액암, 간암, 뇌암, 신장암, 유방암, 췌장암, 대장암, 비장암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁암, 위암종, 근골격계암, 두경부암, 위장암, 생식세포암, 또는 내분비 및 신경내분비암으로부터 선택된다.

[0060] [0053] 일부 구체예에서, 면역 반응이 설명된다. 일부 구체예에서, 가용성인 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질이 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, 가용성 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 Fc 융합 단백질이다.

[0061] [0054] 일부 구체예에서, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 본원에 설명된 면역조절 단백질을 함유하는 의약 조성물이 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, 분비가능한 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 조작된 세포가 대상체에 투여되며, 선택적으로 조작된 세포는 본원에 설명된 임의의 것이다.

[0062] [0055] 일부 구체예에서, 질병 또는 병태는 염증성 또는 자가면역 질병 또는 병태이다. 일부 구체예에서, 질병 또는 병태는 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증성 위장관 질환, 염증성 안질환, 염증성 신경 질환, 염증성 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질환이다. 일부 구체예에서, 질병 또는 병태는 염증성 장질환, 이식, 크론씨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스성 관절염 또는 건선으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0063] [0056] 도 1A는 다양한 수의 HLA-A2+ HPV+ 표적 세포(SCC152)와 공동 배양 24시간 후 상등액에서 TCR을 단독으로 발현하거나 표시된 CD86 ECD TIP를 공동-발현하는 모의(Mock) 형질도입 T 세포 및 E6 TCR-형질도입 T 세포로부터의 IFN-감마(IFN γ ; 좌상단), IL2(우상단) 및 TNF α (하단)의 방출을 나타낸다.

[0057] 도 1B 및 1C는 다양한 수의 HLA-A2+ HPV+ 표적 세포(SCC152)와 함께 표시된 CD86 ECD TIP를 공동-발현하거나 TCR을 단독으로 발현하는 모의(Mock) 형질도입된 T 세포 또는 E6 TCR-형질도입된 T 세포의 공동-배양 개시 3일 후, CD4+ 및 CD8+ T 세포 증식을 각각 나타낸다.

[0058] 도 1D는 HLA-A2+ HPV+ 표적 세포 (SCC152)와의 공동-배양 4일 후 상이한 여러 이펙터 대 표적 비(E:T)에서, TCR을 단독으로 발현하거나 표시된 CD86 ECD TIP를 공동-발현하는 모의(Mock) 형질도입된 T 세포 및 E6 TCR-형질도입된 T 세포의 살해 활성을 나타낸다.

[0059] 도 2A는 CEM-T2, SCC152, 및 NCI-N87 세포주에서의 HER2 발현 수준을 도시한다.

[0060] 도 2B는 NCI-N87와의 공동-배양 24시간 후 상이한 여러 이펙터 대 표적 비(E:T)에서, CAR을 단독으로 발현하거나 표시된 CD86 ECD TIP를 공동-발현하는 모의(Mock) 형질도입된 T 세포 및 E6 TCR-형질도입된 T 세포의 살해 활성을 나타낸다.

[0061] 도 2C는 SCC152와의 공동-배양 24시간 후 상이한 여러 이펙터 대 표적 비(E:T)에서, CAR을 단독으로 발현하거나 표시된 CD86 ECD TIP를 공동-발현하는 모의(Mock) 형질도입된 T 세포 및 항-HER2 CAR-형질도입된 T 세포의 살해 활성을 나타낸다.

[0062] 도 3은 "CD86(B7-2)"(SEQ ID NO: 2)으로 명명된 CD86의 잔기 24-247을 함유하는 SEQ ID NO: 29에 제시된 야생형 CD86 세포외 도메인(ECD) 서열과 "CD86(B7-2)" (SEQ ID NO: 2)로 명명된 잔기 33-131을 함유하는 SEQ ID NO: 122에 제시된 야생형 IgV 서열(SEQ ID NO: 2)의 예시적인 서열 정렬도를 나타낸다. 기호 "*"는 두 개의 정렬된 잔기가 동일함을 나타낸다. 두 개의 정렬된 잔기 사이에 "*"가 없으면 정렬된 아미노산들이 동일하지 않음을 나타낸다. 기호 "-"는 정렬의 간격을 나타낸다. 예시적인, SEQ ID NO: 29에 제시된 넘버링을 갖는 위치에 상응하는 SEQ ID NO: 122의 예시적이고도 비제한적인 위치를 박스 안에 나타내었다.

[0063] 도 4A 및 도 4B는 유세포 분석에 의해 평가된 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정된, 동족 결합 파트너

CTLA-4에 대한 다양한 농도(0.1nM 내지 100nM)에서의 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물의 결합을 도시한다.

[0064] 도 5A 및 도 5B는 유세포 분석에 의해 평가된 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정된, 동족 결합 파트너 CD28에 대한 다양한 농도(0.1nM 내지 100nM)에서의 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물의 결합을 도시한다.

[0065] 도 6A 및 도 6B는 유세포 분석에 의해 평가된 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정된, 동족 결합 파트너 PD-L1에 대한 다양한 농도(0.1 nM 내지 100 nM)에서 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물의 결합을 도시한다.

[0066] 도 7A 및 도 7B는 IL-2 발광 상대 휘도 단위(RLU)에 의해 측정된, Jurkat/IL-2 리포터 세포 (도 7A) 또는 PD-L1을 발현하는 Jurkat/IL-2 리포터 세포 (도 7B)를 사용하여 CD28의 PD-L1 의존성 공동자극을 전달하는 예시적인 변이체 PD1-CD86 적층 작제물의 능력을 도시한다.

[0067] 도 8 및 도 9는 거대세포바이러스(CMV) 항원-특이적 기능 분석으로부터의 T 세포 상등액의 사이토카인 농도(pg/mL)를 도시한다. ELISA에 의해 평가된 바와 같이, IL-2(도 8) 및 IFN γ (도 9)에 대해 상등액을 결정하였다.

[0068] 도 10은 hIgG PE 증양값으로 결정된, 다양한 농도(100 내지 100,000pM)에서의 예시적인 NKp30-CD86 적층 작제물의 CD28 및 CTLA-4에 대한 결합을 도시한 것이다.

[0069] 도 11A는 유세포 분석에 의해 평가된, 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정된, 1차 T 세포에 대한 예시적인 NKp30-CD86 적층 작제물의 결합 능력을 도시한다. 도 11B는 CFSE 염료를 사용하여 유세포 분석에 의해 평가된 T 세포 증식 퍼센트를 보여준다.

[0070] 도 12는 ELISA에 의해 평가된, T 세포 상등액으로부터 수확된 IL-2(pg/mL)의 농도를 도시한다.

[0071] 도 13은 B7H6의 존재(좌측) 및 부재(우측) 하에 예시적인 NKp30-CD86 적층 작제물의 공동자극을 도시한다. 유세포 분석에 의해 평가된 퍼센트 T 세포 증식.

[0072] 도 14A-14D는 예시적인 포맷된 적층 작제물의 구조를 나타낸다.

[0073] 도 15A 및 도 15B는 유세포 분석법에 의해 평가되고 평균 형광 강도(MFI)에 의해 측정된 동족 결합 파트너 PD-L1(좌측) 및 CD28(우측)에 대한 다양한 농도(1:4로 8회 100 nM 연속 희석)에서 예시적인 포맷된 적층 작제물의 결합을 도시한다.

[0074] 도 16A 및 도 16B는 루시페라제 리포터 세포 시스템에서 시험되고 상대 발광 단위(RLU)를 사용하여 결정된 예시적인 포맷된 적층 작제물의 공동자극 능력을 도시한다.

[0075] 도 17A는 IFN γ , IL2, 및 TNF α (pg/mL)의 농도에 의해 측정된 바와 같이 T 세포에서 사이토카인 생산을 촉진하는 예시적인 CD86-PD-1 적층 작제물의 능력을 도시한다.

[0076] 도 17B는 상대 발광 단위(RLU)에 의해 평가된 인큐베이션 후 24시간, 48시간 및 72시간에 HLA-A2+ HPV+ 표적 세포에 대한 T 세포 세포독성 활성을 촉진하는 예시적인 CD86-PD-1 적층 작제물의 능력을 도시한다.

[0077] 도 18A, 도 18B, 및 FIG 18C는 HER2 및 EGFR 표적화 항체를 갖는 예시적인 변이체 CD86 IgV 분자의 컨จู게이트의 예시적인 구성을 도시한다.

[0078] 도 19는 평균 형광 강도에 의해 측정된 HER2에 대한 예시적인 퍼투주맵-CD86 컨จู게이트(도 19A) 및 예시적인 파니투무맵-CD86 컨จู게이트의 EGFR(도 19B)에 대한 결합을 도시한다.

[0079] 도 20은 상대 발광 단위(RLU)로 측정된 IL-2 루시페라제 리포터 분석에서 T 세포에 공동자극을 제공하는 퍼투주맵-CD86 컨จู게이트(도 20A) 및 예시적인 파니투무맵-CD86 컨จู게이트(도 20B)의 능력을 도시한다.

[0080] 도 21은 SCC-152 표적 세포의 퍼센트 사멸로 측정된, 1차 인간 T 세포의 다양한 이펙터 대 표적 비(E:T)에서 시험된 바와 같은, T 세포 세포독성 활성을 촉진하는 예시적인 퍼투주맵-CD86 컨จู게이트(도 21A) 및 예시적인 파니투무맵-CD86 컨จู게이트(도 21B)의 능력을 도시한다.

[0081] 도 22는 세포 상등액에서 IFN γ , IL2, 및 TNF α (nM 단백질)의 농도를 결정함으로써 T 세포에서 사이토카인 생산을 촉진하는 퍼투주맵-CD86 컨จู게이트(도 22A) 및 예시적인 파니투무맵-CD86 컨จู게이트(도 22B)의 능력을 도시한다.

[0082] 도 23A는 제1 변이체 IgSF 도메인(제1 vIgD) 및 제2 IgSF 도메인, 예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인(제2 vIgD)을 함유하는 적층 분자의 다양한 예시적인 구성을 도시한다. 도 23B는 제1 변이체 IgSF 도메인(제1 vIgD),

제2 IgSF 도메인, 예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인(제2 vIgD), 및 제3 IgSF 도메인, 예컨대 제3 변이체 IgSF 도메인(제 vIgD)을 함유하는 적층 분자의 다양한 예시적인 구성을 도시한다.

[0083] 도 24는 제공된 변이체 IgSF 도메인 분자의 다양한 포맷을 도시한다. 도 24A는 가용성 분자를 도시하고 도 24B는 세포의 표면 상에 발현된 변이체 IgSF 도메인(vIgD)을 함유하는 막관통 면역조절 단백질(TIP)을 도시한다.

[0084] 도 25는 변이체 IgSF 도메인(vIgD)이 제1 T 세포(예를 들어, CAR T 세포)와 같은 세포로부터 분리되는, 분리된 면역조절 단백질(SIP)을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

[0085] 본원에 따라 적어도 하나의 표적 리간드 동족 결합 파트너(카운터-구조물 리간드 단백질이라고도 칭함)에 대해 변경된 결합 활성 또는 친화성을 나타내는 CD86의 변이체 또는 돌연변이체 및 그의 특이적 결합 단편인 또는 이들을 포함하는 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드에 비해 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 아미노산 치환, 결실 또는 부가)을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드에 비해 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 치환)을 함유한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드의 IgSF 도메인(예를 들어, IgC의 IgV)에 있는 것과 같은 세포의 도메인에 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형을 함유하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86과 비교하여 CD28 또는 CTLA-4 중 하나 이상에 대해 변경된, 예컨대 증가 또는 감소된 결합 활성 또는 친화성을 나타낸다.

[0086] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형을 함유하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해 CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형을 함유하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해, 적어도 CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 하나 이상의 변형을 함유하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해, 적어도 1.2배, 1.4배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배, 20.0배, 30.0배, 40.0배, 50.0배, 60.0배, 70.0배, 80.0배, 90.0배, 100.0배, 124.0배 또는 그 이상 변경(예컨대 증가)된다.

[0087] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형을 함유하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86과 비교하여 CTLA-4에 대해 감소되거나, 변화가 없거나, 또는 더 크지 않은 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, CTLA-4에 대한 결합 친화도는 감소된다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해, 적어도 1.2배, 1.4배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 그 이상 변경(예를 들어 감소)된다.

[0088] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질은 면역 반응을 증가 또는 감소시키는 것과 같은 면역학적 면역 반응을 조절한다. 특정 조절은 특정 포맷이 길항제 또는 차단 활성 또는 작용제 활성을 제공하는지 여부에 따라 변이체 CD86 폴리펩타이드의 포맷에 기초할 수 있다. 또한 제공된 변이체 폴리펩타이드의 다양한 면역조절 단백질 포맷도 제공된다. 본 명세서에 나타난 바와 같이, 대안적 포맷은 면역 반응의 조작을 용이하게 할 수 있고, 따라서 치료적 적용을 촉진할 수 있다. 상황에 따라 면역 반응을 길항하거나 작용하도록 다양한 구성으로 변이체 폴리펩타이드를 포맷하는 능력은 결합 파트너에 대한 변이체 CD86의 동일한 증가된 결합 및 활성을 기반으로 하는 치료 적용에서 유연성을 제공한다. 예를 들어, 변이체 CD86 단백질을 표면에 테더링하면 국소화된 공동자극 시그널을 전달할 수 있는 반면, 다른 경우에 CD86을 비국소화된 가용성 형태로 제시하면 길항 활성을 부여할 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질은 조절장애 면역 반응과 관련된 질병 또는 병태의 치료에 이용될 수 있다.

[0089] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 가용성이다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 세포 표면에서 발현될 수 있는 막관통 면역조절 단백질이다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 그것이 발현되는 세포로부터 분리될 수 있는 분리가 가능한 면역조절 단백질이다. 일부 구체예에서, 본원에 따라 본원에서 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 하나 이상의 다른 모이어티 또는 폴리펩타이드를 함유하는 컨주게이트 또는 융합체인 하나 이상의 다른 면역조절 단백질도 제공된다. 일부 태양에서, 막관통 면역조절 단백질 또는 분리가 가능한 면역조절 단백질을 함유하는 조작된 세포도 제공된다. 일부 태양에서, 발현을 위해 막관통 면역조절 단백질 또는 분리가 가능한 면역조절 단백질을 세포내로 전달할 수 있는 감염 물질도 제공된다. 일부 구체예에서, 본 발명에서 제공된

변이체 CD86 폴리펩타이드 및 하나 이상의 다른 모이어티 또는 폴리펩타이드를 함유하는 컨쥬게이트 또는 융합체인 하나 이상의 다른 면역조절 단백질도 제공된다.

- [0070] [0090] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 그의 동족 결합 파트너 CD28의 작용제 활성을 나타내고/나타내거나 CD28을 통한 공동자극 시그널링을 자극하거나 개시하는 포맷으로 제공된다. 이러한 면역조절 단백질 포맷 중에는 막관통 면역조절 단백질로서 변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현하는 조작된 세포가 포함된다. 다른 경우에, 면역조절 포맷은 종양-국소화 도메인(예: vCD86-NkP30 작제물) 뿐만 아니라 항체 컨쥬게이트 포맷(예컨대 vCD86-항-HER2 또는 vCD86-항HER1 작제물)을 비롯한 다른 IgSF 도메인과의 특정한 "적층 분자"에 의해 제공되는 바와 같은, 또 다른 분자와의 융합체를 포함할 수 있다. 이러한 변이체 CD86 면역조절 단백질 및 그의 포맷(예: 조작된 세포 또는 융합 작제물)은 암, 바이러스 감염 또는 세균 감염을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 면역조절 단백질 및 그의 포맷(예컨대 조작된 세포 또는 융합 작제물)은 증진된 공동자극 활성을 나타내고, 이에 의해 1차 T 세포 분석에서와 같이, 야생형 또는 비변형 CD86 대조군에 비해 증가된 T 세포 활성(예를 들어, 생체내 또는 시험관내)을 초래한다. 일부 태양에서, T 세포 활성은 IL-2, IFN-감마 또는 TNF α와 같은 사이토카인의 생산을 평가함으로써 평가될 수 있다. 일부 태양에서, IFN-감마, IL-2 또는 TNF α의 증가와 같은 증가는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해, 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.5배, 3.0배, 3.5배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 그 이상 더 큰 것이다.
- [0071] [0091] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 그의 동족 결합 파트너 CD28의 길항제 활성을 나타내고/나타내거나 CD28을 통한 공동자극 시그널링을 차단 또는 억제하는 포맷으로 제공된다. 이러한 면역조절 단백질 포맷에는 가용성인 변이체 CD86 폴리펩타이드(예: 변이체 CD86-Fc 융합 단백질)가 포함된다. 이러한 변이체 CD86 면역조절 단백질은 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 면역조절 단백질 및 그의 포맷(예컨대 가용성 변이체 CD86-Fc 융합 단백질)은 공동자극 시그널링을 억제하거나 차단하여 1차 T 세포 분석에서와 같이 야생형 또는 비변형 CD86 대조군에 비해, 감소된 T 세포 활성(예를 들어, 생체내 또는 시험관내)을 초래한다. 일부 태양에서, T 세포 활성은 IL-2, IFN-감마 또는 TNF α와 같은 사이토카인의 생산을 평가함으로써 평가될 수 있다. 일부 태양에서, IFN-감마, IL-2, TNF α의 감소와 같은 감소는, 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 비변형 또는 야생형 CD86에 비해, 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 그 이상 더 크다.
- [0072] [0092] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 공동자극 시그널링 분자들과의 상호작용을 통해 T 세포 활성화, 팽창, 분화 및 생존을 조절한다. 일반적으로, 항원 특이적 T-세포 활성화는 대체로 2 가지 구별되는 시그널을 필요로 한다. 제1 시그널은 항원 제시 세포(APC) 상에 존재하는 주요 조직적합 복합체(MHC) 관련 항원과 T-세포 수용체(TCR)와의 상호작용에 의해 제공된다. 제2 시그널은 TCR 개입에 대해 공동자극성, 예컨대 CD28 공동자극 시그널이고 T-세포 아포토시스 또는 아네르기(anergy)를 피하는데 필요하다.
- [0073] [0093] 일부 구체예에서, 정상적인 생리 조건 하에서, T 세포-매개된 면역 반응은 T 세포 수용체 (TCR)에 의한 항원 인식에 의해 개시되며 공동-자극과 억제 시그널(예컨대, 면역 체크포인트 단백질)의 밸런스에 의해 조절된다. 면역계는 자가면역성(즉, 자가-관용성)을 방지하고 면역 반응 동안, 예를 들어 병원체 감염에 대한 공격 동안 조직을 과도한 손상으로부터 보호하기 위해 면역 체크포인트에 의존한다. 그러나 경우에 따라, 이들 면역조절 단백질은 면역계를 공격하는 메커니즘으로서, 종양을 비롯한 질병 및 병태에서 조절불능될 수 있다.
- [0074] [0094] 일부 구체예에서, T-세포 공동자극 수용체로서, 리간드 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86) (이들 두 가지 모두 APC 상에 존재함)에 대한 T-세포 공동자극 수용체인, CD28이 알려져 있다. 이들 동일한 리간드들은 또한 CD28에 대해서보다 더 큰 친화성으로 억제 T-세포 수용체 CTLA-4 (세포독성 T-림프구-관련 단백질 4)에 결합할 수도 있다; CTLA-4에 대한 결합은 면역 반응을 하향-조절하는 작용을 한다.
- [0075] [0095] CD28 및 CTLA-4 수용체의 활성의 증강 또는 억압은 염증성 및 자가면역 질환, 암, 및 바이러스 감염의 치료에 있어 임상적 의미를 갖는다. 그러나, 일부 경우에서, 이들 두 가지 수용체의 공동자극 효과에 개입 및 변경하는 치료법은 면역학적 시냅스의 경계에 의해 부과된 크기 제한뿐만 아니라 공간 배향 요구에 의해 제약받는다. 일부 태양에서, 항체 약물을 비롯한 기존 치료 약물은 이들 상호작용의 조절과 관련된 복수개의 표적 단백질과 동시에 상호작용하지 못할 수 있다. 또한, 일부 사례에서, 기존의 치료 약물은 면역 반응을 길항하는 능력만 있을 뿐 자극하는 능력은 없을 수 있다. 또한, 이들 두 수용체 중 하나 또는 다른 하나를 독자적으로 표적으로 하는 약물들 간의 약물동력학적 차이는 치료 과정 전반에 걸쳐 그러한 약물 조합의 원하는 혈액 농도를

적절히 유지하는데 어려움을 야기할 수 있다. 본원에 설명된 바와 같은 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질 및 기타 포맷들은 이러한 문제점을 해소한다. CD86 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질의 이러한 변이체의 제조 및 사용 방법 역시도 제공된다.

[0076] [0096] 특허, 특허 출원, 과학기사 및 데이터베이스를 비롯한 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 마치 이들 특허, 특허 출원, 과학기사 및 데이터베이스가 개별적으로 그리고 구체적으로 참조 병합되는 것으로 표시된 것처럼, 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합된다. 만일 본 명세서에 제시된 정의가 본 명세서에 참조 병합된 특허, 특허 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물에 제시된 정의와 상반되거나 일치하지 않을 경우, 본 명세서 상의 자체 정의가 이들 참조 병합된 문헌의 정의에 우선한다.

[0077] [0097] 본 명세서에서 사용된 섹션 제목은 정리 목적을 위한 것일 뿐 설명된 주제를 한정하려는 의도로 제공된 것이 아니다.

[0078] I. 정의

[0079] [0098] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술용어, 각주, 및 기타 기술 및 과학용어들은 본 발명이 속한 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 몇몇 경우, 그 의미가 널리 이해되는 용어들도 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에 정의하였고, 본 명세서에 이들 정의가 포함되었다 해서 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 추정되어서는 아니된다.

[0080] [0099] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어들은 특수한 경우 달리 언급되지 않는 한 하기 정의된 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서, 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 문맥상 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수 의미를 아울러 포함한다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 언급된 모든 기술 및 과학 용어들, 두문자어 및 약어들은 본 발명이 속한 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 달리 명시되지 않는 한, 화학 및 생화학명의 약칭 및 심볼은 IUPAC-IUB 명명법에 따른다. 달리 지시되지 않는 한, 모든 수치 범위는 범위를 한정하는 값들은 물론 그 사이의 정수 값들을 아울러 포함한다.

[0081] [0100] 면역글로불린 슈퍼패밀리 도메인의 문맥상 사용된 "변형된 친화성(affinity modified)"이라는 용어는, 포유동물 면역글로불린 슈퍼패밀리(IgSF) 도메인이 변경된 아미노산 서열(대응하는 야생형의 모(母) IgSF 도메인 또는 비변형 IgSF 도메인에 비해)을 가짐으로 해서, 모(母) IgSF 도메인 또는 비변형 (즉, 비-친화성 변형된) IgSF 대조군 도메인에 비해, 그의 동족 결합 파트너들(달리, "카운터-구조물들") 중 적어도 하나에 대해 증가 또는 감소된 결합 친화성 또는 결합능(avidity)을 갖는 것을 의미한다. 문맥 상, 친화성 변형된 CD86 IgSF 도메인도 포함된다. 일부 구체예에서, 친화성-변형된 IgSF 도메인은 야생형 또는 변형되지 않은 IgSF 도메인에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 아미노산 차이, 예컨대 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 결합 친화성 또는 결합능의 증가 또는 감소는 유세포 분석법과 같은 공지의 결합 분석법을 이용하여 알아낼 수 있다. Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). Linsley 외, Immunity, 1: 793-801 (1994) 참조. 어떤 단백질의 그의 동족 결합 파트너(들)에 대한 결합 친화성 또는 결합능의 증가는 야생형 IgSF 도메인 대조군의 값보다 적어도 10% 더 큰 값을 의미하며 일부 구체예에서, 야생형 IgSF 도메인 대조군 값에 비해 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 5000%, 또는 10000% 더 큰 것을 의미한다. 어떤 단백질의 그의 동족 결합 파트너(들)에 대한 결합 친화성 또는 결합능의 감소는 대조군의 90% 이하 그러나 야생형 IgSF 도메인 대조군 값의 10% 이상의 값을 의미하고, 일부 구체예에서, 야생형 IgSF 도메인 대조군 값의 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하, 그러나 10% 이상의 값을 의미한다. 친화성 변형된 단백질은 아미노산 잔기의 치환, 부가 또는 결실에 의해 주요 아미노산 서열이 변경된 것이다. 용어 "친화성 변형된 IgSF 도메인"은 그 친화성 변형된 IgSF 도메인이 형성된 특정한 방법 또는 출발 조성물에 대해 어떠한 조건을 부과하는 것으로 상정되어서는 아니된다. 따라서, 본 발명의 친화성 변형된 IgSF 도메인들은 친화성 변형의 어떤 특정한 프로세스에 의해 친화성 변형된 IgSF 도메인으로 형질전환될 야생형 IgSF 도메인들로 한정되지 않는다. 친화성 변형된 IgSF 도메인 폴리펩타이드는, 예컨대, 야생형의 포유동물 IgSF 도메인 서열 정보로부터 출발하여 생성된 다음, 그의 동족 결합 파트너에 대한 결합에 관하여 가상적으로(in silico) 모델링된 다음 마지막으로, 친화성 변형된 IgSF 도메인 조성물의 생성을 위해 재조합적으로 또는 화학적으로 합성된다. 한 가지 별법 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인은 야생형 IgSF 도메인의 위치-지향된(site-directed) 돌연변이에 의해 만들어질 수 있다. 따라서, 친화성 변형된 IgSF 도메인은 생성물을 가리키는 것이지, 반드시 주어진 프로세스에 의해 만들어진 생성물을 가리키는 것은 아니다. 재조합 방법, 화학적 합성법

또는 이들의 조합을 비롯한 다양한 기술을 이용할 수 있다.

- [0082] [0101] 본 명세서에서 용어 "동종이계(allogeneic)"이라 함은 하나의 생물체에서 제거된 다음 동일한 종의 유전적으로 다른 생물체로 주입되거나 입양적으로 전달된 세포 또는 조직을 의미한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 종은 쥐 또는 인간이다.
- [0083] [0102] 본 명세서에서 용어 "자가 (autologous)"는 나중에 주입되거나 입양적으로 전달된 동일한 생물체로부터 제거된 세포 또는 조직을 의미한다. 자가 세포 또는 조직은 예를 들어, 재조합 DNA 방법론에 의해 변형될 수 있어, 생물체로부터 제거된 천연 세포 또는 천연 조직과 유전적으로 동일하지 않게된다. 예를 들어, 천연의 자가 T 세포는 재조합 DNA 기술에 의해 유전적으로 조작되어 막관통 면역조절 단백질 및/또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 자가 조작된 세포가 될 수 있는데, 이것은 몇몇 경우 T-세포 또는 TIL(종양 침윤 림프구)을 조작하는 것을 포함한다. 조작된 세포는 이어서 천연 T-세포가 분리된 환자에게 주입될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물체는 인간 또는 쥐이다.
- [0084] [0103] 본 명세서에서 "결합 친화성(binding affinity)," 및 "결합능(binding avidity)"이라는 용어는 특수한 결합 조건 하에서, 어떤 단백질의 그의 카운터-구조물에 대한 특이적인 결합 친화성 및 특이적인 결합능을 각각 의미한다. 생화학적 동력학에서 결합능이라 함은 CD86과 그의 카운터-구조물인 CD28, 및/또는 CTLA-4 사이와 같이 개별적인 비공유 결합 상호 작용의 다중 친화력의 축적된 강도를 지칭한다. 따라서, 결합능은 단일 상호 작용의 강도를 나타내는 친화성과 구별된다. 친화성 변형된 CD86 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 CD86의 그의 카운터-구조물에 대한 결합 친화성의 증가 또는 약화는 IgV 도메인과 같은 천연 또는 야생형 IgSF 도메인을 함유하는 비변형 CD86과 같은 비변형 CD86의 결합 친화성에 상대적으로 결정된다. 결합 친화성 또는 결합능을 결정하는 방법은 기술 분야에 알려져 있다. 예컨대, 문헌 [Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)] 참조. 일부 구체예에서, 예컨대 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 CD86은 결합 분석에서 비변형 CD86 대조군에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 더 큰 평균 형광 강도(Mean Fluorescence Intensity: MFI) 값을 나타내는 결합 친화성을 갖는 것으로 유세포 분석법으로 측정되는 바와 같이 CD28 및/또는 CTLA-4에 특이적으로 결합한다.
- [0085] 일부 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 것과 같은 변이체 CD86은 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군보다 적어도 10%, 20%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 더 큰 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CD28에 특이적으로 결합한다.
- [0086] 일부 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 것과 같은 변이체 CD86은 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군보다 적어도 10%, 20%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 적은 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CTLA-4에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 것과 같은 변이체 CD86은 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군의 결합 친화성과 유의하게 다르지 않은 평균 형광 강도(MFI) 값 또는 비변형 CD86 대조군의 결합 친화성보다 크기 않은 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CTLA-4에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 것과 같은 변이체 CD86은 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군보다 적어도 10%, 20%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 더 큰 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CD28에 특이적으로 결합하고, 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군에 비해 CTLA-4에 대해 더 크지 않은 결합 친화도를 나타낸다. 일부 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 것과 같은 변이체 CD86은 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군보다 적어도 10%, 20%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 더 큰 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CD28에 특이적으로 결합하고, 결합 분석에서 유세포 분석에 의해 측정시 비변형 CD86 대조군에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상 더 적은 평균 형광 강도(MFI) 값을 산출하는 결합 친화성으로 CTLA-4에 대한 결합 친화성 감소를 나타낸다.
- [0087] [0104] "생물학적 반감기(biological half-life)"라는 용어는 본 발명의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 폴리펩타이드와 같은 물질이 그의 약리학적 또는 생리학적 활성 또는 농도의 절반을 잃어버리는데 걸리는 시간을 가리킨다. 생물학적 반감기는 해당 물질의 제거, 배출, 분해(예컨대 효소 분해), 또는 신체 장기 또는 조직에서의 흡수 및 농축에 의해 영향받을 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 반감기는 어떤 물질의 혈장 농도가 그의 정상 상태 수준의 절반에 도달하는데 걸리는 시간("혈장 반감기")을 측정함으로써 평가될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드의 생물학적 반감기를 유도 및 증가시키는데 이용될 수 있는 컨쥬게이트는 기술분야

에 공지이며 이의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 히드록시에틸 전분(HES), XTEN (연장된 재조합 펩타이드; WO2013130683 참조), 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 지질(아실화), 폴리-Pro-Ala-Ser (PAS), 및 폴리글루탐산(글루타밀화)을 들 수 있다.

[0088] [0105] 본 명세서에서 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 적어도 엑토도메인, 막관통, 및 엔도도메인을 포함하는 포유동물 세포 상에서 발현된 인공적인(즉, 사람이 만든) 막관통 단백질을 가리킨다. 선택적으로, CAR 단백질은 엑토도메인을 막관통 도메인에 공유적으로 링크시키는 "스페이서"를 포함한다. 스페이서는 종종 펩타이드 결합을 통해 엑토도메인을 막관통 도메인에 링크하는 폴리펩타이드이다. CAR은 일반적으로 포유동물 림프구 상에서 발현된다. 일부 구체예에서, CAR은 T-세포 또는 종양 침윤 림프구 (TIL)와 같은 포유동물 세포 상에서 발현된다. T-세포 상에서 발현된 CAR은 본 명세서에서 CAR T-세포 또는 "CAR-T"라 칭한다. 일부 구체예에서, CAR-T는 T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포, 내추럴 킬러 T-세포, 메모리 T-세포, 조절 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포이다. 예컨대 임상 세포 전달 등에서 임상적으로 사용될 경우, 환자의 종양에 대한 항원 결합 특이성이 있는 CAR-T는 일반적으로 그 환자로부터 수득된 천연 T-세포 상에서 발현되도록 조작된다. 그 다음 CAR을 발현하는 조작된 T-세포는 환자에게 다시 주입된다. 따라서 비록 동종이게 CAR-T가 본 발명의 범위 내에 포함되지만 CAR-T는 종종 자가 CAR-T이다. CAR의 엑토도메인은 생리학적 조건하에 종양 특이 항원과 같은 표적 항원과 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 (예컨대 scFv)과 같은 항원 결합 영역을 포함한다. 특이적 결합시, 생화학적 연쇄 사건(즉, 시그널 전달도입: 시그널 transduction)은 CAR-T의 면역학적 활성의 조절을 초래한다. 따라서, 예를 들어, CAR-T의 항원 결합 영역에 의한 그의 표적 항원에 대한 특이적 결합시 세포 독성, 증식 또는 사이토카인 생성의 변화에 의해 반영되는 T-세포 활성의 면역학적 활성의 변화가 야기될 수 있다. CAR-T 활성화시 시그널 전달도입은 일부 구체예에서 천연 포유동물 T-세포에서 시그널 전달도입에 관여하는 CD3-제타 사슬 ("CD3-z")에 의해 달성된다. CAR-T는 T-세포의 면역조절 반응을 추가로 조절하기 위해, CD28, 4-1BB 또는 OX40과 같은 복수개의 시그널링 도메인들을 추가로 포함할 수 있다. CD3-z은 T-세포 수용체 시그널 전달도입에 관여하는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)로서 알려진 보존적 모티프를 포함한다.

[0089] [0106] 시험관내 분석시 2 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드의 존재 하에 유도되는 사이토카인 생산과 관련하여 사용될 경우 "집합적으로" 또는 "집합적"이라는 용어는, 개별적인 변이체 CD86 폴리펩타이드에 의해 유도되는 사이토카인 생산과 무관하게 전체적인 사이토카인 발현 수준을 의미한다. 일부 구체예에서, 분석되는 사이토카인은 시험관내 1차 T-세포 분석에서 IFN-감마 또는 IL-2이다.

[0090] [0107] 변이체 CD86의 IgSF 도메인 관련에서와 같이, 폴리펩타이드와 관련된 "동족 결합 파트너" ("카운터-구조물")이라는 용어는 특정 결합 조건 하에서 문제의 폴리펩타이드가 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 분자(일반적으로 천연 포유동물 단백질)을 가리킨다. 일부 태양에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 CD86은 증가 또는 약화된 친화성으로 대응하는 천연 또는 야생형 CD86의 카운터-구조물에 특이적으로 결합한다. 특이적 결합 조건 하에서 그의 동족 수용체를 인식하여 특이적으로 결합하는 리간드 중은 그 수용체의 카운터-구조물 또는 동족 결합 파트너의 일례이다. "동족 세포 표면 결합 파트너"는 포유동물 세포 표면에서 발현된 동족 결합 파트너이다. "세포 표면 분자중"은 면역학적 시냅스를 형성하는 포유동물 세포 등의 세포에 의해 그리고 세포 상에 발현되는 면역학적 시냅스(IS)의 리간드의 동족 결합 파트너이다.

[0091] [0108] 본 명세서에서 "컨쥬게이트", "컨쥬게이션" 또는 이의 문법적 파생어는 2 이상의 화합물들이 기술분야에 알려진 임의의 결합 또는 연결 방법에 의해 한데 결합 또는 연결되어 다른 화합물이 형성되는 것을 가리킨다. 이것은 2 이상의 화합물의 결합 또는 연결에 의해 생성되는 화합물을 가리키는 것일 수도 있다. 예를 들어, 1 이상의 화학적 모이어티 또는 폴리펩타이드에 직접 또는 간접적으로 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 예시적인 컨쥬게이트이다. 이러한 컨쥬게이트들에는 융합 단백질, 화학적 컨쥬게이트에 의해 생성된 것들 및 다른 방법에 의해 생성된 것들이 포함된다.

[0092] [0109] 본 명세서에서 "경쟁적 결합(competitive binding)"이라는 용어는 어떤 단백질이 적어도 2개의 동족 결합 파트너들과 특이적으로 결합할 수 있으나 하나의 동족 결합 파트너의 그 특이적인 결합이 제2 동족 결합 파트너의 동시적인 결합을 방지 또는 배제하는 것과 같이 저해하는 것을 의미한다. 그러므로, 몇몇 경우에서, 단백질이 2개의 동족 결합 파트너에 동시에 결합할 수는 없다. 일반적으로, 경쟁적 바인더는 특이적인 결합에 대하여 동일하거나 중복적인 결합 부위를 함유하지만, 반드시 요구되는 것은 아니다. 일부 구체예에서, 경쟁적 결합은 제2 동족 결합 파트너의 특이적인 결합으로 인해, 그의 동족 결합 파트너 중 하나에 대한 단백질의 특이적 결합을 측정가능하게 억제한다(부분적 억제 또는 완전한 억제). ELISA(효소결합면역흡수 분석법)와 같이, 경쟁적 결합을 정량하는 다양한 방법이 알려져 있다.

- [0093] [0110] 본 명세서에서 "보존적 아미노산 치환"이라는 용어는 어떤 아미노산 잔기가, 화학적 특성(예컨대 전하 또는 소수성)이 유사한 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 아미노산 치환을 의미한다. 화학적 특성이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예로는: 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-히드록시 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르트산 및 글루탐산; 및 7) 함황 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 들 수 있다. 보존적 아미노산 치환 그룹으로는 다음을 들 수 있다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트 및 아스파라긴-글루타민.
- [0094] [0111] 단백질 위치와 관련하여 "대응하는(corresponding to)"이라는 용어, 예컨대, 개시된 서열, 예컨대 서열 목록 내의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치에 "대응하는" 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치라 함은 구조적인 서열 정렬 또는 GAP 알고리즘과 같은 표준 정렬 알고리즘에 기초하여, 개시된 서열과의 정렬에 의해 동정된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치를 가리킨다. 예를 들어, 대응하는 잔기들은 레퍼런스 서열을 본 명세서에 설명된 구조 정렬 방법에 의해 SEQ ID NO:29 (ECD 도메인)에 제시된 야생형 CD86??의 서열과 정렬시킴으로써 결정될 수 있다. 서열들을 정렬함으로써, 통상의 기술자는 예컨대 보존된 그리고 동일한 아미노산 잔기들을 가이드로 사용하여, 대응하는 잔기들을 동정할 수 있다. 무화과. 도 3은 상응하는 잔기를 확인하기 위해 SEQ ID NO:29에 기재된 참조 서열과 서열의 정렬을 예시한다. 예를 들어, 도 3에 도시된 예시적인 정렬에서, SEQ ID NO:29의 잔기 13은 SEQ ID NO: 122의 잔기 4에 상응한다.
- [0095] [0112] 본 명세서에서 "감소하다(decrease)" 또는 "약화되다/감쇠하다(attenuate)" 또는 "억제하다(suppress)" 등의 용어는 통계적으로 유의한 양으로 감소한다는 의미이다. 감소는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%일 수 있다.
- [0096] [0113] "유도체" 또는 "유도되다"라는 용어는 단백질을 직접 또는 간접적으로 조성물에 공유적으로 연결시켜 변형시킴으로써 생물학적 반감기, 생체이용성, 면역원성, 가용성, 독성, 강도 또는 효능을 그의 치료학적 이점을 유지 또는 증강시키면서 변경시키는 것을 의미한다. 본 발명의 면역조절 폴리펩타이드의 유도체는 본 발명의 범위에 속하며 예를 들어 글리코실화, 폐결화, 지질화 또는 Fc-융합체에 의해 만들어질 수 있다.
- [0097] [0114] 본원에서 검출은 단백질의 시각화(육안 또는 장비에 의한)를 허용하는 방법을 포함한다. 단백질은 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 시각화할 수 있다. 단백질의 검출은 또한 검출가능한 표지를 포함하는 태그와의 단백질 융합에 의해 또는 제2 항체와 같이, 검출가능한 표지를 포함하는 단백질에 특이적인 제2 시약과의 접촉에 의해서도 촉진될 수 있다.
- [0098] [0115] 본 명세서에서, 도메인 (일반적으로 3개 이상, 일반적으로 5개 또는 7개 또는 그 이상의 아미노산, 예컨대 10 내지 200개의 아미노산 잔기)은 단백질 또는 인코딩 핵산과 같은 어떤 분자의 다른 부분들과 구조적 및/또는 기능적으로 구별되는, 그 분자의 어떤 부분을 가리키는 것으로 동정가능한 부분을 의미한다. 예를 들어, 도메인들에는 하나 이상의 구조적 모티프로 만들어진 단백질 내에서 독립적으로 폴딩된 구조를 형성할 수 있는, 및/또는 결합 활성과 같은 기능적 활성에 의해 인식되는, 폴리펩타이드 사슬의 일부가 포함된다. 하나의 단백질은 하나 또는 복수개의 구별되는 도메인들을 가질 수 있다. 예를 들어, 주요(primary) 서열 상동성 또는 관련된 패밀리 멤버들에 대한 구조 상동성, 예컨대 모티프에 대한 상동성에 의해, 도메인을 동정, 정의 또는 구별할 수 있다. 또 다른 예에서, 도메인은 동족 결합 파트너와 같은, 바이오분자와 상호작용하는 능력과 같은, 그의 기능에 의해 구별될 수 있다. 도메인은 생물학적 기능 또는 활성을 독립적으로 나타낼 수 있으므로, 도메인은 독립적으로 또는 다른 분자에 융합되어 예컨대 결합과 같은 활동을 수행할 수 있다. 도메인은 아미노산의 선형 서열이거나 또는 아미노산의 비-선형 서열일 수 있다. 많은 폴리펩타이드들이 도메인을 복수개 함유한다. 이러한 도메인들은 공지이고, 통상의 기술자에 의해 동정될 수 있다. 예시를 위해, 도메인에 대한 정의가 제시되었지만, 통상의 기술자들에게는 특정 명칭의 도메인들이 잘 인식되어 있다. 필요한 경우, 적절한 소프트웨어를 이용하여 도메인들을 동정할 수 있다.
- [0099] [0116] 본 명세서에서 "엑토도메인(ectodomain)"이라는 용어는 소포성 막(vesicular membrane)의 외부에 위치한, 막통과 단백질과 같은 막 단백질 영역을 가리키는 것이다. 엑토도메인들은 예를 들어 리간드 또는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 통해, 리간드 또는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 종종 포함한다. 세포의 막통과 단백질의 엑토도메인은 달리 세포의 도메인(ECD)이라고도 칭해진다.
- [0100] [0117] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"이라 함은 단백질 조성물 또는 세포 조성물과 같은 본 발명의 치료

용 조성물이 단독으로 (즉, 단독요법) 또는 부가적인 치료제와 조합적으로, 생체외(ex vivo) 투여되거나 (환자로부터의 세포와의 접촉에 의해) 또는 생체내 투여될 경우(환자 체내로의 투여에 의해), 예컨대 질병의 증상 및/또는 원인을 완화 또는 제거함으로써, 질병 진행을 통계적으로 유의하게 저감시키는 치료 조성물의 양 및/또는 농도를 의미한다. 유효량은 그 질환 또는 장애와 연관된 생물학적 반응 또는 효과 또는 적어도 하나의 증상을 감소, 경감 또는 완화시키거나, 또는 환자의 신체 기능을 향상시키는 양이다. 세포 치료법 사례에서, 유효량은 입양세포 치료에 의해 환자에게 투여된 세포의 유효한 투여량 또는 개수이다. 일부 구체예에서 환자는 비인간 영장류 또는 인간 환자와 같은 포유동물이다.

[0101] [0118] 본 명세서에서 용어 "엔도도메인(endodomain)"은 세포 표면막에 의해 정의된 내부 공간으로 연장되는, 막관통 단백질과 같은 일부 막 단백질에서 발견되는 영역을 가리킨다. 포유동물 세포에서, 엔도도메인은 막 단백질의 세포질 영역이다. 세포에서, 엔도도메인은 세포내 구성성분들과 상호반응하여 시그널 형질도입에서 일정 역할을 할 수 있고, 그에 따라 몇몇 경우 세포내 시그널링 도메인일 수 있다. 세포성 막관통 단백질의 엔도도메인은 달리 세포질 도메인이라고도 칭해지며, 몇몇 경우, 세포질 시그널링 도메인일 수도 있다.

[0102] [0119] 본 명세서에서 포유동물 림프구의 면역학적 활성을 증가시킨다는 맥락상 용어 "증강된(enhanced)" 또는 "증가된(increased)"은 문맥상, 림프구의 하나 이상의 활성을 증가시킨다는 것을 의미한다. 증강된 활성은 예컨대 통계적 유의량만큼 세포 생존능, 세포 증식, 사이토카인 생산량 또는 T-세포 세포독성 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구체예에서, 증강된 면역학적 활성에 대한 레퍼런스는 예컨대, 통계적으로 유의한 양으로, 인터페론 감마(IFN-감마), IL-2, 또는 TNF α 생산이 증가되는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 면역학적 활성은 림프구 혼합 배양반응 (MLR) 분석법에 의해 평가될 수 있다. MLR 분석법의 실시 방법은 기술분야에 공지이다. Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56. 림프구의 활성을 평가하는 그 밖의 방법은 본 명세서에 설명된 임의의 분석법을 비롯하여 기술분야에 알려져 있다. 몇몇 구체예에서, 증강은 비-제로 대조군 값보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 또는 500% 더 큰 증가일 수 있다.

[0103] [0120] 본 명세서에서 용어 "조작된 세포(engineered cell)"라 함은 재조합 DNA 방법 또는 바이러스 형질도입에 의한 것과 같은 인간 개체에 의해 유전적으로 변형된 포유동물 세포를 가리킨다. 일부 구체예에서, 세포는 면역 세포, 예컨대 림프구 (예컨대 T 세포, B 세포, NK 세포) 또는 항원 제시 세포 (예컨대 수지상 세포)를 가리킨다. 세포는 환자로부터의 1차 세포(primary cell)일 수도 있고 세포주일 수도 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 조작된 세포는 변이체 CD86 폴리펩타이드가 그에 특이적으로 결합하는, CD28, 또는 CTLA-4를 발현하는 T-세포의 면역학적 활성을 조절하도록 조작된 본 발명의 변이체 CD86을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86은 세포의 도메인을 함유하는 막관통 면역조절 단백질 (이하 "TIP"라 칭함) 또는 막관통 도메인 (예컨대 CD86 막관통 도메인)에 연결된 IgV 도메인, 및 선택적으로 세포내 시그널링 도메인을 함유하는 그의 일부분이다. 일부 경우에서, TIP는 이중 세포질 시그널링 도메인 또는 엔도도메인을 함유하는 키메라 수용체로서 포맷된다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 본 발명에 설명된 바와 같은 면역조절 단백질을 발현 및 분비할 수 있다. 제공된 조작된 세포들 중에는 조작된 T-세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 더 함유하는 세포도 포함된다.

[0104] [0121] 본 명세서에서 "조작된 T-세포"라 함은 재조합 DNA 방법 또는 바이러스 형질도입 방법 등 인간의 개입에 의해 유전학적으로 변형된, T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포 (또는, 세포독성 T 림프구 또는 CTL), 내추럴 킬러 T-세포, 조절 T-세포, 메모리 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포와 같은 T-세포를 가리킨다. 조작된 T-세포는 T-세포 상에서 발현되어 조작된 T-세포 자신, 또는 T-세포 상에서 발현된 변이체 CD 86이 특이적으로 결합하는 포유동물 세포의 면역학적 활성을 조절하도록 조작되는 본 발명의 변이체 CD86 막관통 면역조절 단백질(TIP) 또는 분비된 면역조절 단백질(SIP)을 포함한다.

[0105] [0122] 용어 "조작된 T-세포 수용체" 또는 "조작된 TCR"이라 함은 입양 면역치료법에서 종종 사용되는, T-세포 집단 내로 선택, 클로닝 및/또는 후속적으로 도입되는 주요조직적합 복합체 (MHC)/펩타이드 표적 항원에 대해 원하는 친화성으로 특이적으로 결합하도록 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 가리킨다.

[0106] [0123] 본 발명에서 용어 "발현되다(expressed on)"라 함은 포유동물 세포와 같은 세포 표면에서 발현되는 단백질과 관련하여 사용된다. 그러므로, 단백질은 막 단백질로서 발현된다. 일부 구체예에서, 발현된 단백질은 막관통 단백질이다. 일부 구체예에서, 단백질은 약물 또는 검출가능한 표지 등의 소형 분자 모이어티에 컨쥬게이트된다. 세포 표면에서 발현된 단백질에는 세포-표면 단백질 예컨대 포유동물 세포에서 발현되는 세포 표면 수용체가 포함된다.

[0107] [0124] 용어 "반감기 연장 모이어티"라 함은 그 모이어티에 컨쥬게이트되지 않은 단백질의 반감기에 비해, 포유

동물 혈청에서 순환하는 단백질의 반감기를 연장시키는 폴리펩타이드 융합 또는 화학적 컨주게이트의 모이어티를 가리킨다. 일부 구체예에서, 반감기는 1.2배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 또는 6.0배 이상, 또는 약 1.2배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 또는 6.0배 이상 연장된다. 일부 구체예에서, 반감기는 반감기 연장 모이어티가 없는 단백질에 비해 생체내 투여 후 6시간 이상, 12시간 이상, 24시간 이상, 48시간 이상, 72시간 이상, 96시간 이상 또는 1주일 이상 연장된다. 반감기는 단백질이 그의 농도, 양 또는 활성의 절반을 상실하는데 걸리는 시간을 가리킨다. 반감기는 예를 들어, ELISA 분석 또는 활성 분석을 이용함으로써 구할 수 있다. 예시적인 반감기 연장 모이어티에는 Fc 도메인, 멀티머화 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 히드록시에틸 전분 (HES), XTEN (연장된 재조합 펩타이드; W02013130683 참조), 인간 혈청 알부민 (HSA), 소혈청 알부민 (BSA), 지질 (아실화), 폴리-Pro-Ala-Ser (PAS), 및 폴리글루탐산 (글루타미드)가 포함된다.

[0108] [0125] 본 명세서에서 "면역학적 시냅스(immunological synapse)" 또는 "면역 시냅스(immune synapse)"라는 용어는 항원-제시 세포 또는 종양세포와 같이 MHC I (주조직적합 복합체) 또는 MHC II을 발현하는 포유동물 세포와 이펙터 T 세포 또는 내츨 킬러(NK) 세포와 같은 포유동물 림프구 간의 인터페이스를 의미한다.

[0109] [0126] 면역글로불린 분자의 Fc (결정화가능한 단편: fragment crystallizable) 영역 또는 도메인 (Fc 폴리펩타이드라고도 칭함)은 대체로 면역글로불린 중쇄의 불변 영역에 대응하고, 항체의 이펙터 기능(들)을 비롯한, 다양한 기능에 책임이 있다. Fc 도메인은 CH2 및 CH3 도메인 플러스 면역글로불린 분자의 힌지 도메인의 일부 또는 전부를 함유한다. Fc 도메인은 하나 이상의 다이설파이드 결합에 의해 결합된 2개의 폴리펩타이드 사슬의 다이머를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, Fc는 이펙터 기능을 용이하게 하기 위해 감소된(예컨대 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소된) 활성을 나타내는 변이체 Fc이다. 일부 구체예에서, Fc 영역에서의 아미노산 치환은 특정한 SEQ ID NO.를 참조로 설명되지 않는 한 EU 넘버링 시스템에 따른다. EU 넘버링은 공지이며 가장 최근에 업데이트된 IMGT Scientific Chart (IMGT®, international ImMunoGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (생성일: 2001년 5월 17일, 마지막 업데이트일: 2013년 6월 10일) 및 Kabat, E.A. 등에서 보고된 바와 같은 EU 인덱스에 따른다 [Sequences of Proteins of Immunological interest. 제5판, US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)].

[0110] [0127] 면역조절 Fc 융합 단백질과 같은 면역글로불린 Fc 융합체 ("Fc-융합체")는, 면역글로불린의 Fc 영역에 작동적으로 연결된 하나 이상의 폴리펩타이드(또는 하나 이상의 소분자)를 포함하는 분자이다. Fc-융합체는, 예를 들어, 항체의 Fc 영역 (일부 경우에서, 약물동력학을 용이하게 함) 및 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 면역글로불린 Fc 영역은 하나 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 소분자 (융합 파트너)에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 다양한 링커들이 기술분야에 알려져있으며 Fc-융합체를 생성하도록, 융합 파트너에 Fc를 연결하는데 이용될 수 있다. 동일 종의 Fc-융합체들은 다이머화(이량화)되어 Fc-융합체 호모다이머를 형성하거나, 또는 비-동일 종을 이용함으로써, Fc-융합체 헤테로다이머를 형성할 수도 있다. 일부 구체예에서, Fc는 쥐, 토끼 또는 인간 Fc와 같은 포유동물 Fc이다.

[0111] [0128] 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터에 의해 인코딩된 단백질을 발현하는데 사용될 수 있는 세포를 가리킨다. 숙주 세포는 예컨대 대장균과 같은 원핵생물일 수 있고 또는 진핵생물, 예컨대 단세포 진핵생물(예컨대 효모 또는 기타 진균류), 식물 세포 (예컨대, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포 (예컨대, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마일 수도 있다. 숙주 세포의 예로는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 이의 유도체 예컨대 Veggie CHO, DG44, Expi CHO, 또는 CHOZN 및 무혈청 배지에서 성장하는 관련 세포주 또는 DHFR 결핍된 CHO 균주 DX-B11을 들 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포 (예컨대, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 곤충 세포)일 수 있다.

[0112] [0129] 본 명세서에서 용어 "면역글로불린" ("Ig"라 약칭됨)은 5가지 임의의 인간 항체 클래스, 즉: IgA (서브클래스 IgA1 및 IgA2를 포함한다), IgD, IgE, IgG (서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함한다), 및 IgM를 비롯한 포유동물 면역글로불린 단백질을 가리키는 것이다. 이 용어는 또한 항원 결합 단편 (Fab), 가변 단편 (Fv)을 함유하는 V_H 및 V_L, 한 사슬 내에 한데 연결된 단일 사슬 가변 단편 (scFv)을 함유하는 V_H 및 V_L, 및 그 밖의 항체 V 영역 단편, 예컨대 Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, dsFv 다이아바디, Fc, 및 Fd 폴리펩타이드 단편 등, 전적으로 또는 부분적으로 합성적이거나(예컨대, 재조합 또는 화학 합성) 또는 자연적으로 생산된, 전장 길이 미만의 면역글로불린도 포함한다. 호모이종특이 항체 및 헤테로이종특이 항체와 같은 이종특이 상체도 이 용어에 포함된다.

- [0113] 본 명세서에서 용어 "면역글로불린 슈퍼패밀리" 또는 "IgSF"는 세포의 인식, 결합 또는 부착 프로세스에 관여하는 일군의 세포 표면 및 가용성 단백질을 의미한다. 분자들은 면역글로불린들(즉 항체들)과 공유된 구조적 속성에 기반하여 이 슈퍼패밀리의 멤버로서 분류된다; 이들 모두는 면역글로불린 도메인 또는 폴드라 알려진 도메인을 갖는다. IgSF의 멤버들에는 면역계의 세포 표면 항원 수용체들, 공동-수용체들 및 공동-자극 분자들, 림프구에 대한 항원 제시와 관련된 분자, 세포 부착 분자, 특정한 사이토카인 수용체들 및 세포내 근육 단백질들이 포함된다. 이들은 면역계 내에서의 역할에 공통적으로 연관되어 있다. 면역학적 시냅스 내의 단백질들은 종종 IgSF의 멤버이다. IgSF는 기능과 같은 공유 속성에 따라 "서브패밀리"로 세분될 수 있다. 이러한 서브패밀리들은 대개 4 내지 30개의 IgSF 멤버들로 이루어진다.
- [0114] 본 명세서에서 "IgSF 도메인" 또는 "면역글로불린 도메인" 또는 "Ig 도메인"이라는 용어는 IgSF 단백질들의 구조 도메인을 가리킨다. Ig 도메인들은 면역글로불린 분자들의 이름을 따서 명명된다. 이들은 약 70-110개의 아미노산을 함유하며 이들의 크기와 기능에 따라 분류된다. Ig-도메인들은 역평행 베타 스트랜드들 2개 시트에 의해 형성되는 샌드위치-유사 구조를 갖는 특징적인 Ig-폴드를 갖는다. 샌드위치의 내측의 소수성 아미노산들과 B 스트랜드와 F 스트랜드의 시스테인 잔기들 간에 형성된 고도로 보존된 디설파이드 결합 간의 상호반응은, Ig-폴드를 안정화시킨다. Ig 도메인의 한쪽 말단은 이들의 리간드들에 대한 항체 특이성에 중요한 보체결정 영역이라 칭해지는 섹션을 갖는다. Ig 유사 도메인들은: IgV, IgC1, IgC2, 또는 IgI로 분류될 수 있다. 대부분의 Ig 도메인들은 가변성(IgV)이거나 불변성(IgC)이다. 9개의 베타 스트랜드를 갖는 IgV 도메인들은 7개의 베타 스트랜드를 갖는 IgC 도메인들 보다 일반적으로 더 길다. IgSF의 몇몇 멤버들의 Ig 도메인들은 아미노산 서열 내 IgV 도메인들과 유사하면서도, 그 크기는 IgC 도메인들과 유사하다. 이들은 IgC2 도메인들이라 칭해지며, 표준 IgC 도메인들은 IgC1 도메인이라 칭해진다. T-세포 수용체 (TCR: T-cell receptor) 사슬은 세포의 부분에 2개의 Ig 도메인을 갖는데 구체적으로: 하나의 IgV 도메인은 N-말단에, 하나의 IgC1 도메인은 세포막 근처에 위치한다. CD86은 두 개의 Ig 도메인, 즉: IgV 및 IgC를 포함한다.
- [0115] 본 명세서에서 "IgSF 종"이라는 용어는 동일 또는 실제로 동일한 주요 아미노산 서열을 갖는 IgSF 멤버 단백질들의 앙상블을 의미한다. 각각의 포유동물 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 멤버는 그 IgSF 멤버에 속하는 모든 IgSF 종들의 독특한 아이덴티티를 정의한다. 그러므로, 각각의 IgSF 패밀리 멤버는 다른 IgSF 패밀리 멤버들과는 구별되며, 그에 따라, 특정한 IgSF 패밀리 멤버의 각각의 종들은 다른 IgSF 패밀리 멤버의 종들과 구별된다. 그럼에도 불구하고, 글리코실화, 인산화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 번역후 변형의 차이로 인하여, 동일한 IgSF 종들의 분자들 간에도 다양성이 존재할 수 있다. 이에 더해, 유전자 다형성에 기인하는 단일 IgSF 종들 내의 마이너한 서열 차이로 인해, 예컨대 단백질 가수분해 절단에 기인하는 IgSF 종들의 야생형 트렁케이트 형태가 그러하듯 단일 IgSF 종들 내에서도 또 다른 다양성 형태가 일어난다. "세포 표면 IgSF 종들"은 세포, 일반적으로 포유동물 세포 표면에서 발현되는 IgSF 종들이다.
- [0116] 본 명세서에서 T-세포와 같은 포유동물 림프구 관점에서 "면역학적 활성화"라는 용어가 사용될 경우 이는 하나 이상의 세포 생존, 세포 증식, 사이토카인 생산 (예컨대 인터페론-감마), 또는 T-세포 세포독성 활성을 가리킨다. 일부 경우에서, 면역학적 활성화는 케모카인 또는 인터류킨과 같은 사이토카인의 그의 발현을 의미할 수 있다. 면역학적 활성화의 증가 또는 억제를 알아내기 위한 분석법에는 배양 상등액에서 사이토카인 수준, 예컨대 인터페론-감마 또는 IL-2 수준을 측정하는 MLR (림프구 혼합 배양반응) 분석법 (Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56), SEB (스타필로코커스 내독소 B) T 세포 자극 분석법 (Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56), 및 항-CD3 T 세포 자극 분석법 (Li 및 Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104)이 포함된다. T 세포 활성화는 사이토카인, 예컨대 IFN-감마 또는 IL-2의 분비와 연관되어 있으므로, 이들 시험관내 인간 T 세포 분석에 의해 배양 상등액 내 이러한 사이토카인 수준을 측정하는 것은 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 분석될 수 있다 (Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57-62). 면역 반응의 유도는 정지(quiescent) 림프구에 비해 면역학적 활성화의 증가를 야기한다. 본 발명에 제시된 바와 같은, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 CD86 폴리펩타이드 등의 면역조절 단백질은 야생형 IgSF 멤버 또는 IgSF 도메인 대조군에 대한 주요 T-세포 분석에 있어 어떤 구체예에서는 IFN-감마 (인터페론-감마) 또는 IL-2의 발현을 증가시키고, 다른 구체예에서는 그 발현을 감소시킬 수 있다. 통상의 기술자라면 IFN-감마 또는 IL-2 발현의 증가를 알아내는데 사용되는 주요 T-세포 분석법이 IFN-감마 또는 IL-2 발현의 감소를 알아내기 위한 분석법에 사용되는 것과 다르다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 면역조절 단백질 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의, 주요 T-세포 분석법에서 IFN-감마 또는 IL-2 발현을 감소시키는 능력을 분석하는데 있어서, 림프구 혼합 배양반응(MLR) 분석법을 이용할 수 있다. 간편하게, 본 발명의 친화성 변형된 IgSF 도메인의 가용성 형태를 사용하여, MLR에서 IFN-감마 또는 IL-2 발현을 길항하여 그에 따라 감소시키는 그의 능력을 알아낼 수 있다. 별법으로, 본 발명의

면역조절 단백질 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의, 주요 T-세포 분석법에서의 IFN-감마 또는 IL-2 발현을 증가시키는 능력을 분석함에 있어서, 공동-고정화(co-immobilization) 분석법을 이용할 수 있다. 공동-고정화 분석법에서는, 일부 구체에서 항-CD3 항체에 의해 제공되는 T-세포 수용체 시그널을 공동-고정화된 친화성 변형된 IgSF 도메인, 예컨대 변이체 CD86과 연계 사용하여, 야생형 IgSF 도메인 대조군에 비해 IFN-감마 또는 IL-2 발현을 증가시키는 능력을 탐지한다. 변이체 CD86 막관통 면역조절 단백질의 활성을 평가하는 것을 포함하여, 조작된 세포의 면역학적 활성 분석법은 기술 분야에 알려져 있으며, 이의 예로는 항원 자극 후 T 세포 팽창 능력, 재-자극 부재시 T 세포 팽창 유지 능력, 및 적절한 동물 모델에서의 항암 활성 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이러한 분석법에는 표준 ^{51}Cr -방출 분석법(참조: 예컨대 Milone 외, (2009) Molecular rapy 17: 1453-1464) 또는 흐름(flow) 기반 세포독성 분석법, 또는 임피던스 기반 세포독성 분석법 (Peper 외 (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192-198)이 포함된다.

[0117] [0134] "면역조절 폴리펩타이드" 또는 "면역조절 단백질"은 면역학적 활성을 조절하는 폴리펩타이드 또는 단백질 분자이다. 면역 반응을 "조절" 또는 "조절하다"라 함은 면역학적 활성이 증가되거나 감소된다는 것이다. 면역조절 단백질은 단일 폴리펩타이드 사슬이거나 또는 예를 들어 사슬간 다이설파이드 결합에 의해, 서로 공유결합된 적어도 두 개의 폴리펩타이드 사슬의 멀티머(다이머 또는 고차수의 멀티머)일 수 있다. 따라서, 모노머, 다이머 및 고차수 멀티머 폴리펩타이드는 상기 정의된 용어 범위 내에 포괄된다. 멀티머 폴리펩타이드는 호모멀티머(동일한 폴리펩타이드 사슬들의) 또는 헤테로멀티머(비-동일 폴리펩타이드 사슬들의)일 수 있다. 본원에서 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0118] [0135] 본 명세서에서 용어 "증가하다"라 함은 통계적으로 유의한 양으로 증가하는 것을 의미한다. 증가는 비-제로 대조군 값보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 또는 그 이상 클 수 있다.

[0119] [0136] CD86의 "이소폼(isoform)"은 아미노산 서열을 달리하는, 복수개의 자연발생적인 CD86 폴리펩타이드들 중 하나이다. 이소폼은 단일 유전자에 의해 발현된 RNA 전사체의 스플라이스 변이체의 산물이거나 또는 유전자 복제로부터 일어날 수 있는 것과 같은 기능적으로 유사한 단백질을 생성하는 고도로 유사하지만 상이한 유전자들의 발현 산물일 수 있다. 본 명세서에서 CD86의 "이소폼"이라는 용어는 CD86 유전자의 상이한 대립유전자(alleles)의 산물을 가리키기도 한다.

[0120] [0137] 용어 "표지"는 검출가능한 시그널을 제공하기 위해 직접적으로 또는 간접적으로 부착되거나 연결될 수 있거나 검출가능한 시그널을 변형시키기 위해 제2 라벨과 상호반응할 수 있는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지된 폴리펩타이드를 생성하기 위해 표지를 폴리펩타이드에 직접 또는 간접적으로 컨쥬게이트시킬 수 있다. 표지는 그 자체로 검출되거나(예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지) 또는, 효소 표지의 경우, 검출가능한 기질 화합물 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다. 표지의 비제한적인 예로는 형광발생 모이어티, 녹색 형광 단백질 또는 루시페라제를 들 수 있다.

[0121] [0138] 본 명세서에서 "림프구"라는 용어는 포유동물 면역계에서 백혈구 세포의 3가지 서브타입 중 어느 하나를 의미한다. 이들은 내츨 킬러 세포(NK 세포) (세포-매개된, 선천성 세포독성 면역에서 기능한다), T 세포(세포 매개된, 후천성 세포독성 면역용), 및 B 세포(체액성의, 항체-구동된 후천성 면역용)를 포함한다. T 세포에는:T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포, 내츨 킬러 T-세포, 메모리 T-세포, 조절 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포가 포함된다. 선천성 림프구 세포(ILC) 역시도 림프구 정의에 포함된다.

[0122] [0139] "포유동물", 또는 "환자"라는 용어는; 인간, 침팬지, 레수스 원숭이, 시노몰구스 원숭이, 개, 고양이, 마우스 또는 래트 중 적어도 하나를 특별히 포함한다.

[0123] [0140] 본 명세서에서 용어 "막 단백질"은 생리적 조건 하에서, 지질 이중층에 직접 또는 간접적으로 부착되는 단백질을 의미한다. 막을 형성하는 지질 이중층은 진핵세포(예컨대 포유동물) 세포막 또는 인공(즉, 사람이-만든) 막 예컨대 리포솜에서 발견되는 막과 같은 생물학적 막일 수 있다. 지질 이중층에 대한 막 단백질의 부착은 공유 결합, 또는 비-공유적 상호반응 예컨대 소수성 또는 정전기 상호반응에 의한 것일 수 있다. 막 단백질은 내재성(integral) 막 단백질 또는 외재성(peripheral) 막 단백질일 수 있다. 외재성 막 단백질은 내재성 막 단백질에 비공유적으로 부착되거나 지질 이중층에 비공유적으로 부착된다. 외재성 막 단백질은 지질 이중층에 일시적으로 부착되어 포유동물의 생리적 조건 범위 하에서, 외재성 막 단백질은 지질 이중층과 회합 및/또는 해리될 수 있다. 외재성 막 단백질과 대조적으로, 내재성 막 단백질은 막의 지질 이중층에 실제로 영구적인 결합을 형성하여 포유동물의 생리적 조건 범위에서, 내재성 막 단백질은 지질 이중층에 대한 그의 결합으로부터 해리되지 않는다. 막 단백질은 지질 이중층의 한 개층(모노토픽)을 통해 막에 부착되거나, 또는 막의 두 개층 모두(폴리토픽)에 부착될 수 있다. 오직 하나의 지질 이중층과 상호반응하는 내재성 막 단백질은 "내재성

모노토픽 단백질"이다. 지질 이중층 두 개 모두와 상호반응하는 내재성 막 단백질은 "내재성 폴리토픽 단백질"이며 달리 본 명세서에서 "막관통 단백질"이라고도 칭해진다.

[0124]

[0141] 본 명세서에서 포유동물의 면역 반응과 같은 면역 반응 맥락에서 "조절하는" 또는 "조절하다"라는 용어는 본 발명의 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드의 투여 결과로 또는 본 발명의 변이체 CD86 막관통 면역조절 단백질과 같은 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포의 투여 결과로 일어나는, 존재하거나 또는 잠재적인 면역 반응의 증가 또는 감소와 같은 임의의 변경을 가리킨다. 따라서, 이 용어는 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 단백질이 투여된 경우 또는 투여되지 않은 경우 일어나거나 존재하는 면역 반응에 비해, 면역 반응의 증가 또는 감소와 같은 변경을 의미한다. 이러한 조절은 면역 세포의 면역학적 활성의 면역학적 활성의 정도나 범위의 유도, 활성화, 억제 또는 변경을 모두 포함한다. 면역 세포에는 B 세포, T 세포, NK (내츄럴 킬러) 세포, NK T 세포, 프로페셔널 항원-제시 세포(APCs), 비-프로페셔널 항원-제시 세포, 및 염증 세포(호중구, 대식세포, 단핵구, 호염기구)가 포함된다. 조절은 기존의 면역 반응, 발달중인 면역 반응, 잠재적인 면역 반응, 또는 면역 반응을 유도, 조절하거나 면역반응에 영향을 주거나 또는 면역반응에 응답하는 능력에 대한 여하한 변화를 모두 포함한다. 조절은 면역 반응의 일부로서 면역 세포 내 유전자, 단백질 및/또는 기타 분자들의 발현 및/또는 기능에서의 여하한 변경을 모두 포함한다. 면역학적 활성의 조절 또는 면역 반응의 조절에는 예컨대 다음이 포함된다: 면역 세포의 제거, 결실 또는 격리(sequestration); 자가반응성 림프구, 항원 제시 세포 또는 염증 세포와 같은 기타 세포들의 기능성 성능을 조절할 수 있는 면역 세포의 유도 또는 생성; 면역 세포에서의 비반응성 상태의 유도(즉, 무감작(anergy)); 비제한적인 예로서, 이들 세포에 의해 발현되는 단백질의 패턴을 변형시키는 것을 비롯한, 면역 세포의 활성 또는 기능을 증강 또는 억압하는 것. 이의 예로는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 전사 인자, 키나아제, 공동자극 분자 또는 기타 세포 표면 수용체들과 같은 특정 부류의 분자들의 변경된 생성 및/또는 분비, 또는 이들 조절 이벤트들의 여하한 조합을 들 수 있다. 조절은 예컨대 일차 T 세포 분석법에서 야생형 또는 변형되지 않은 CD86 대조군과 비교한 IFN-감마 (인터페론 감마) 또는 IL-2의 변경에 의해 평가될 수 있다 [참조: Zhao 및 Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340(1) 132-138]. 조절은 예를 들어, 야생형 CD86 막관통 단백질에 의해 조작된 세포와 비교시 조작된 세포의 사이토카인 분비의 변경 또는 조작된 세포의 세포독성 활성의 변경과 같이, 조작된 세포의 면역학적 활성의 변경에 의해 평가할 수 있다.

[0125]

[0142] 용어 "멀티머화 도메인"이라는 용어는 어떤 폴리펩타이드 분자와 하나 이상의 부가적인 폴리펩타이드 분자와의 안정한 상호작용을 촉진시키는 아미노산 서열을 가리키는 것으로 상기 부가적인 폴리펩타이드들 각각은 동일 또는 상이한 멀티머화 도메인을 수 있는, 상보적인 멀티머화 도메인(예컨대 제1 멀티머화 도메인 및 제2 멀티머화 도메인)을 함유하는 것들이다. 상보적 멀티머화 도메인들 간의 상호반응, 예컨대 제1 멀티머화 도메인과 제2 멀티머화 도메인 간의 상호반응은 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성하여 폴리펩타이드 분자와 부가적인 폴리펩타이드 분자의 멀티머를 생성한다. 경우에 따라, 멀티머화 도메인은 동일하고 그 자신과 상호작용하여 두 개의 폴리펩타이드 사슬 간에 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성한다. 일반적으로, 폴리펩타이드는 멀티머화 도메인에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 예시적인 멀티머화 도메인에는 면역글로불린 서열 또는 그의 일부, 류신 지퍼, 소수성 영역, 친수성 영역 및 호환가능한(compatible) 단백질-단백질 상호작용 도메인들이 포함된다. 멀티머화 도메인은, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서브타입을 비롯한 IgG, IgA, IgE, IgD, IgM 및 이들의 변형된 형태로부터의 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인, 예컨대 Fc 도메인 또는 그의 일부일 수 있다.

[0126]

[0143] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 핵산 잔기 (예컨대, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드)의 폴리머를 가리키는 용어로 호환적으로 사용된다. 달리 특별히 한정하지 않는 한 이 용어들은 천연 뉴클레오타이드들의 공지 유사체를 함유하는 핵산 및 그에 대한 유사한 결합 특성을 갖고 자연발생적인 뉴클레오타이드들과 유사한 방식으로 대사되는 것들을 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 명시적으로 지목된 서열("레퍼런스 서열") 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체(예컨대, 축퇴 코돈 치환) 및 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들에 의해 치환된 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈들의 세 번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들에 의해 치환된 서열을 생성함으로써 얻을 수 있다. 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드라는 용어는 어떤 유전자에 의해 인코딩된 cDNA 또는 mRNA도 포괄한다.

[0127]

[0144] 본 명세서에서 "분자종들"이라는 용어는 1차 아미노산과 동일 또는 실질적으로 동일한 단백질들의 앙상블을 의미하는데 이용된다. 각각의 포유동물 면역글로불린 슈퍼패밀리(IgSF) 멤버는 동일 또는 실제로 동일한 분자종들의 집합을 정의한다. 그러므로, 예컨대 인간 CD86은 IgSF 멤버이고 각각의 인간 CD86 분자는 CD86의 분자종이다. 동일한 분자종들의 분자들 간에도, 글리코실화, 인산화, 유퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 번역후 변형에서의 차이로 인해, 변이가 일어날 수 있다. 이에 더해, 예컨대, 단백질분해 절

단으로 인한 단일 분자종들의 야생형 트렁케이트 형태가 그러하듯, 유전자 다형성으로 인해 단일 분자종들 간에도 마이너한 서열 차이가 있을 수 있어 단일 분자종들 사이에 또 다른 형태의 변이 형태가 나타날 수 있다. "세포 표면 분자종들"은 포유동물 세포의 표면에서 발현되는 분자종들이다. IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 어느 한쪽에만 (두 개 모두에는 아님) 배타적으로 존재하는, 2 이상의 상이한 단백질 종들은 서로 "시스" 또는 "시스 배열" 상태에 있다고 칭해진다. 2가지 상이한 단백질 종들로서, 첫 번째 종은 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 하나에만 배타적으로 존재하고 두 번째 종은 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 다른 하나에만 배타적으로 존재하는 경우, 이들 2 가지 상이한 단백질 종들은 "트랜스" 또는 "트랜스 배열" 상태에 있다고 칭해진다. 각 단백질이 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포 모두에 존재하는 2개의 상이한 단백질 종들은 이들 세포에서 시스 배열과 트랜스 배열 모두로 존재하는 것이다.

[0128] [0145] 본 명세서에서 용어 "비-경쟁적 결합(bi-competitive binding)"이라 함은 어떤 단백질이 적어도 2개의 동족 결합 파트너들과 동시에 특이적으로 결합하는 능력을 의미한다. 따라서, 비록 결합 반응이 동일 기간 동안 존재할 할 필요는 없으나, 적어도 2개의 상이한 동족 결합 파트너들에 대해 당해 단백질에 동시에 결합할 수 있으므로, 몇몇 경우, 당해 단백질은 동족 결합 파트너들 중 오직 하나에만 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 결합은 특이적인 결합 조건 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 동시 결합은 하나의 동족 결합 파트너의 결합이 제2 동족 결합 파트너의 동시적인 결합을 실질적으로 저해하지 않도록 한다. 일부 구체예에서, 비-경쟁적 결합은 비-경쟁적 결합은 제2 동족 결합 파트너를 단백질 상의 그의 결합 부위에 결합시키는 것이 제1 동족체 결합 파트너의 단백질상 의 그의 결합 부위에 대한 결합을 대체하지 않는다는 것을 의미한다. 비-경쟁적 결합의 평가 방법은 예를 들어 문헌 [Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr: 96(4): 663-670]에 설명된 바와 같이 기술분야에 잘 알려져 있다. 몇몇 경우, 비-경쟁적 상호반응에서, 제2 동족 결합 파트너가 제1 동족 결합 파트너의 결합을 직접적으로 간섭하지 않게끔, 제1 동족 결합 파트너는 제2 동족 결합 파트너의 상호반응 부위와 중복되지 않는 상호반응 부위에서 특이적으로 결합한다. 따라서, 제2 동족 결합 파트너의 결합에 의한 동족 결합 파트너의 결합에 미치는 효과는 어느 것이든 제1 동족 결합 파트너의 결합을 직접적으로 간섭하는 것을 제외한 메커니즘을 통한 것이다. 예를 들어, 효소-기질 상호반응 맥락에서, 비-경쟁적 억제제는 효소의 활성 부위 이외의 부위에 결합한다. 비-경쟁적 결합은, 제2 동족 결합 파트너가 제1 동족 결합 파트너의 결합과 중복되지 않는 상호반응 부위에 특이적으로 결합하지만 제1 상호반응 부위가 제1 동족 결합 파트너에 의해 점령된 경우에 한해 제2 상호반응 부위에 결합하는, 비경쟁적(uncompetitive) 결합 상호반응을 포괄한다.

[0129] [0146] "의약 조성물"이라는 용어는 포유동물 대상체, 종종 인간에 있어서 의약 요도로 적합한 조성물을 가리킨다. 의약 조성물은 일반적으로 유효량의 활성물질 (예컨대, 변이체 CD86 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포 또는 변이체 CD60을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드) 및 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 일반적으로 각각 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 말한다.

[0130] [0147] "폴리펩타이드" 및 "단백질"라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며 펩타이드 결합을 통해 2 이상의 아미노산들이 연결되어 있는 분자쇄를 가리킨다. 이 용어는 생성물의 특정 길이를 지칭하는 것이 아니다. 그러므로, "펩타이드" 및 "올리고펩타이드"는 폴리펩타이드 정의에 포함된다. 이 용어는 예컨대 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등과 같은 폴리펩타이드의 번역후 변형을 포함한다. 이 용어는 또한 하나 이상의 아미노산이 공지의 단백질 조작 기술을 이용하여 합성되거나 재조합적으로 발현되는 분자들인 유사체 또는 비정규적인 또는 비천연 아미노산들도 포괄한다. 이에 더해, 단백질은 유도화될 수 있다.

[0131] [0207] 본원에 사용된 용어 "1차 T-세포 분석(primary T-cell assay)"은 사이토카인, 예를 들어 인터페론-감마 ("IFN-감마") IL-2의 생성, 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)의 발현과 같은 T 세포 활성을 측정하기 위한 시험관내 분석을 지칭한다. 이러한 다양한 일차 T-세포 분석법은 기술분야에 공지이다. 일부 구체예에서, 사용된 분석법은 항-CD3 공동고정화 분석법이다. 이 분석법에서, 일차 T 세포는 부가적인 재조합 단백질 존재 또는 부재 하에 고정된 항-CD3에 의해 자극된다. 배양 상등액을 대개 24-72시간 경화 시점에서 수확한다. 또 다른 구체예에서, 사용된 분석법은 혼합 림프구 반응(MLR)이다. 이 분석법에서 일차 T 세포들은 동종이형(allogenic) APC에 의해 자극된다. 배양 상등액은 대개 24-72 시간 경과 시점에서 수확된다. 배양 상등액 중 사이토카인 수준, 예컨대 IFN-감마, IL-2 또는 TNF α의 수준을 표준 ELISA 기술로 측정한다. 납품업자들로부터 상업용 키트를 구입할 수 있으며 제조업자의 권장 지침에 따라 분석을 수행하면된다.

[0132] [0149] 본 발명의 면역조절 단백질을 인코딩하는 것과 같은 핵산에 적용되는 바와 같은 "정제된(purified)"이라는 용어는 일반적으로 기술 분야에 잘 알려진 분석 기술에 의해 탐지되는 다른 성분들이 실제로 없는 핵산 또는 폴리펩타이드를 의미한다 (예컨대, 정제된 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 전기영동 겔, 크로마토그래피 유출물, 및/또는 밀도구배 원심분리 처리되는 매질에서 불연속 밴드를 형성한다). 예컨대, 전기영동 겔에서

기본적으로 하나의 밴드로 나타나는 핵산 또는 폴리펩타이드는 "정제"된 것이다. 본 발명의 정제된 핵산 또는 단백질은 적어도 약 50% 순수하고, 대체로 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 99% 또는 그 이상 순수한 것이다 (예컨대 중량 백분율 또는 몰 기준임).

[0133] [0150] "재조합(recombinant)"이라는 용어는 물질(예컨대 핵산 또는 폴리펩타이드)이 인간의 개재로 인해 인공적으로(즉, 비-자연적으로) 변경되었음을 가리킨다. 이러한 변경은 그의 자연 환경 또는 상태 내의 물질에 대해 수행되거나 또는 자연 환경 또는 상태에서부터 제거될 수 있다. 예를 들어, "재조합 핵산"은 예컨대 클로닝, 친화성 변형, DNA 서플링 또는 기타 공지의 분자생물학적 과정이 일어나는 동안 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 만들어지는 것이다. "재조합 DNA 분자"는 이러한 분자생물학적 기술 수단에 의해 함께 연결된 DNA의 세그먼트들로 이루어진다. 본 명세서에서 "재조합 단백질" 또는 "재조합 폴리펩타이드"라 함은 재조합 DNA 분자를 이용하여 발현되는 단백질 분자이다. "재조합 숙주 세포"는 재조합 핵산을 함유 및/또는 발현하는 세포이거나 또는 예컨대 세포 내로 본원에서 제공된 막관통 면역조절 단백질과 같은 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 도입하는 것과 같은 유전자 조작에 의해 달리 변경된 세포이다. 진핵생물 중의 전사 조절 시그널은 "프로모터"와 "인핸서" 요소를 포함한다. 프로모터 및 인핸서는 전사에 관여하는 세포상 단백질과 특이적으로 상호반응하는 DNA 서열들의 짧은 어레이로 구성된다. 프로모터 및 인핸서 요소들은 효모, 곤충 및 포유동물 세포를 비롯한 다양한 진핵생물 소스 및 바이러스로부터 분리된 바 있다(유사 조절 요소, 즉 프로모터들은 원핵세포에서도 발견된다). 특정한 프로모터 및 인핸서의 선택은 목적하는 단백질을 발현시키기 위해 어떤 세포 유형을 이용할 것인지에 의해 좌우된다. 본 명세서에서 "작동가능한 조합으로(in operable combination)," "작동가능한 순서로(in operable order)" 및 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어들은 목적하는 단백질 분자의 합성 및/또는 주어진 유전자의 전사를 지시할 수 있는 핵산 분자가 생산되는 방식으로 또는 그러한 배열로 이루어진 핵산 서열의 결합(linkage)을 가리킨다.

[0134] [0151] 본 명세서에서 용어 "재조합 발현 벡터"라 함은 목적하는 특정 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열 및 코딩 서열을 함유하는 DNA 분자를 가리킨다. 원핵세포에서의 발현에 필요한 핵산 서열들에는 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위 및 가능하게는 기타 서열들이 포함된다. 진핵 세포들은 프로모터, 인핸서 그리고 종결 및 폴리아데닐화 시그널을 이용하는 것으로 알려져 있다. 소망될 경우, 세포로부터의 보다 용이한 융합 단백질의 분리를 위해, 분비 시그널 펩타이드 서열은 또한, 임의로 재조합 융합 단백질과 같은 재조합 단백질에 대한 코딩 서열에 작동적으로 연결된 재조합 발현 벡터에 의해 인코딩되어, 발현된 융합 단백질이 재조합 숙주 세포에 의해 분비될 수 있다. 이 용어는 이것이 도입된 숙주 세포의 계능 내로 병합된 벡터 뿐만 아니라 자가-복제 핵산 구조물로서의 벡터도 포함한다. 벡터에는 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 들 수 있다.

[0135] [0152] 용어 "선택성"은 다른 동족 결합 결합 파트너와 같은 다른 기질에 대한 특이적 결합과 비교하여 하나의 동족 결합 결합 파트너와 같은 하나의 기질의 특이적 결합에 대한 대상 단백질 또는 폴리펩타이드의 선호를 지칭한다. 선택성은 제1 동족 결합 파트너 (예컨대, K_{d1})와 같은 제1 기질과 대상 단백질의 결합 활성 (예컨대 결합 친화성)과, 제2 동족 결합 파트너 (예컨대, K_{d2})와 동일한 대상 단백질의 결합 활성 (예컨대 결합 친화성)과의 비율로서 반영될 수 있다.

[0136] [0153] 본 명세서에서 "서열 동일성(서열 동일성)"이라는 용어는 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 수준에서 유전자들 또는 단백질들 간의 서열 동일성을 가리킨다. "서열 동일성"은 뉴클레오타이드 수준에서 핵산들 간의 동일성의 척도이자 아미노산 수준에서의 단백질들 간의 동일성의 척도이다. 단백질 서열 동일성은 아미노산 서열들이 정렬된 경우 각 서열들에 있어서의 주어진 위치에서 아미노산 서열을 비교함으로써 알아낼 수 있다. 마찬가지로, 핵산 서열 동일성은 뉴클레오타이드 서열들이 정렬된 경우 각 서열에서의 주어진 위치에서 뉴클레오타이드 서열을 비교함으로써 알아낼 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 이러한 방법으로는 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA를 들 수 있다. BLAST 알고리즘은 퍼센트 서열 동일성을 산출하는데 2개의 서열들 간의 유사성을 통계적으로 분석한다. BLAST 분석법을 수행하는 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 웹사이트를 통해 공공연히 입수가능하다.

[0137] [0154] 명세서에서 단백질과 관련하여 "가용성(soluble)"이라 함은, 그 단백질이 막 단백질이 아님을 의미한다. 일반적으로, 가용성 단백질은 IgSF 패밀리의 멤버 수용체의 세포외 도메인만을, 또는 IgSF 도메인 또는 도메인들을 함유하는 그의 일부 또는 그의 특이적-결합 단편만을 독점적으로 함유할 뿐 막관통 도메인은 함유하지 않는다. 일부 경우에서, 단백질의 가용성은 Fc 도메인에 대한 직접 또는 링커를 통한 간접적 연결 또는 결합에 의해 향상될 수 있고, 몇몇 경우에는 이러한 연결 또는 결합은 단백질의 안정성 및/또는 반감기도 향상시킬 수 있

다. 일부 태양에서, 가용성 단백질은 Fc 융합 단백질이다.

- [0138] [0155] 본 명세서에서 폴리펩타이드 또는 핵산과 관련하여 사용될 경우 용어 "종(species)"은 동일하거나 실제로 동일한 서열들을 갖는 분자들의 앙상블을 의미한다. 동일한 종의 폴리펩타이드들 사이에서 변이는 글리코실화, 포스포릴화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 후-번역 변형의 차이로 인해 일어날 수 있다. 아미노-말단 또는 카르복실-말단의 전장 중이 1, 2, 또는 3 아미노산 미만만큼 다른(또는 이러한 차이를 인코딩하는) 폴리펩타이드의 약하게 트렁크화된 서열은 단일 종의 것으로 간주된다. 이러한 마이크로이질성은 제조된 단백질들의 공통적인 속성이다.
- [0139] [0156] 본 명세서에서 전장 야생형 포유동물 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 ECD, IgV 또는 IgC 도메인과 관련하여 사용될 경우 용어 "특이적 결합 단편"은 ECD, IgV 및/또는 IgC 도메인의 서브서열을 갖고 시험관내 및/또는 생체내에서 포유동물 CD28, 및/또는 포유동물 CTLA-4, 예컨대 인간 또는 쥐의 CD28, 및/또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 의미한다. 일부 구체예에서, CD86 ECD, CD86 IgV 또는 CD86 IgC의 특이적 결합 단편은 전장 야생형 ECD, IgV, 또는 IgC 서열의 길이의 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 길이를 갖는다. 특이적 결합 단편은 서열 변경에 의해 변이체 CD86을 형성할 수 있다.
- [0140] [0157] 본 명세서에서 "특이적으로 결합하다"라는 표현은, 특이적인 결합 조건 하에서, 충분한 통계적 크기를 갖는 무작위적인 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 집합체에 대한 동일 단백질의 평균적인 친화성이나 결합능에 비해, 그의 친화성 또는 결합능이 적어도 5배, 그러나 임의로 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 또는 500배, 심지어 적어도 1000배 더 커지는, 표적 단백질에 대한 단백질의 결합 능력을 의미한다. 특이적으로 결합하는 단백질은 단일 표적 분자에만 결합할 필요는 없으며 표적과 비-표적(예컨대 파라로그(paralogs) 또는 오솔로그(orthologs)) 사이의 구조적 배열의 유사성으로 인해, 비-표적 분자에도 특이적으로 결합할 수 있다. 통상의 기술자라면 상이한 동물종에서 동일한 기능을 갖는 분자에 대한 특이적 결합(즉 오솔로그) 또는 표적 분자와 실질적으로 유사한 에피토프를 갖는 비-표적 분자에 대한 특이적 결합(예컨대, 파라로그)이 가능함과 독특한 비-표적(예컨대 무작위적인 폴리펩타이드)의 통계적으로 합당한 집합에 대해 상대적으로 구해지는 결합의 특이성과 상충하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 교차-반응성으로 인해, 표적 분자의 두 개 이상의 상이한 종들과 특이적으로 결합할 수도 있다. 2개의 단백질들 간의 특이적 결합을 알아내기 위해 고상 ELISA 면역분석법 또는 표면 플라즈몬 공명(예컨대 Biacore) 측정을 이용할 수 있다. 일반적으로, 2개의 결합 단백질들 간의 상호작용들의 해리 상수(K_d)는 1x10⁻⁵ M 미만이고, 흔히 1 x 10⁻¹² M 정도로 낮다. 본 발명의 특정 구체예에서, 2개의 결합 단백질들 간의 상호작용의 해리 상수는 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁷ M, 1x10⁻⁸ M, 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹⁰ M 또는 1x10⁻¹¹ M이다.
- [0141] [0158] 폴리펩타이드를 발현하는 포유동물 세포와 관련하여 "표면 발현하다" 또는 "표면 발현"이라는 용어는 그 폴리펩타이드가 막 단백질로서 발현됨을 의미한다. 일부 구체예에서, 막 단백질은 막관통 단백질이다.
- [0142] [0159] 예컨대 합성 핵산 분자 또는 합성 유전자 또는 합성 펩타이드와 관련한 "합성"이라는 용어는 제조 방법 및/또는 화학적 합성 방법에 의해 생산된 핵산 분자 또는 폴리펩타이드 분자를 가리킨다.
- [0143] [0160] 본 명세서에서 "표적화 모이어티(targeting moiety)"라 함은 변이체 CD86을 포함하는 폴리펩타이드에 공유적 또는 비공유적으로 결합하거나 또는 이를 물리적으로 내포하는 조성물을 가리킨다. 표적화 모이어티는 목적하는 카운터-구조물 예컨대, 세포 표면 수용체(예컨대, CD28), 또는 종양 특이 항원(TSA)이나 종양 관련 항원(TAA) 예컨대 B7-H6과 같은 종양 항원에 대해 특이적인 결합 친화성을 갖는다. 일반적으로, 목적하는 카운터 구조물은 특이적인 조직 또는 세포-유형 상에 위치한다. 표적화 모이어티에는: 항체, 항원 결합 단편(Fab), V_H 및 V_L를 함유하는 가변 단편(Fv), 하나의 사슬 내에 V_H 및 V_L를 함께 연결한 채로 함유하는 단일사슬 가변 단편(scFv) 및 그 밖의 항체 V 영역 단편들, 예컨대 Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, dsFv 다이아바디, 나노바디, 가용성 수용체들, 수용체 리간드들, 성숙한 친화성 수용체들 또는 리간드들, 그리고 소형 분자(<500 달톤) 조성물(예컨대, 특이 결합 수용체 조성물)이 포함된다. 표적화 모이어티는 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 내포하는 리포솜의 지질 막에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합할 수도 있다.
- [0144] [0161] 본 명세서에서 용어 "막관통 단백질(transmembrane protein)"은 포유동물 세포와 같은 생물학적 막 또는 리포솜과 같은 인공 구조물에서 발견되는 지질 이중층과 같은 지질 이중층에 실질적으로 또는 완전히 걸쳐있는(span) 막 단백질을 의미한다. 막관통 단백질은 이를 통해 지질 이중층에 통합되고 생리학적 조건 하에서 열역학적으로 안정한 막관통 도메인(transmembrane domain)("transmembrane domain")을 포함한다. 막관통 도메인

은 일반적으로 수성 환경(예컨대 세포질, 세포외 유액)과 상호반응하는 단백질 영역에 비해 높은 그의 소수성에 기초하여, 임의의 수의 상업적으로 이용 가능한 생물정보학 소프트웨어 적용을 통해 그들의 아미노산 서열로부터 예측 가능하다. 막관통 도메인은 종종 흔히 막을 통해 뚫어있는 소수성 알파 나선이다. 막관통 단백질은 지질 이중층의 두 층을 한 번 또는 여러 번 통과할 수 있다. 막관통 단백질은 본 명세서에 기술된 본원에서 제공된 막관통 면역조절 단백질을 포함한다. 막관통 도메인에 더해, 본 발명의 막관통 면역조절 단백질은 엑토도메인 및 일부 구체예에서 엔도도메인을 추가로 포함한다.

[0145] [0162] 본 명세서에서 질병 또는 장애와 관련하여 "치료하는", "치료" 또는 "치료법"이라는 용어는 치료 조성물(예컨대, 면역조절 단백질 또는 조작된 세포를 함유하는)을 단독으로 또는 본 명세서에 설명된 다른 화합물과 조합 투여함으로써 임상적 또는 진단적 증상의 감소, 중단 또는 제거에 의해 입증되는 바와 같이 질병 또는 장애의 진행을 둔화, 중단 또는 역전시키는 것을 의미한다. "치료하는", "치료" 또는 "치료법"은 또한 급성 또는 만성 질병 또는 장애에 있어서 증상의 위중도의 감소 또는 자가면역 질환의 염증 측면에서 염증의 감소 또는 자가면역 질환 경과의 재발 또는 감퇴(remitting)의 경우 재발율의 감소를 의미하기도 한다. 본 명세서에서 암과 관련하여 암을 "치료" 또는 "억제하다", "억제하는" 또는 "억제"라는 의미는: 종양 성장 속도의 통계적으로 유의한 감소, 종양 성장의 중단, 또는 Response Evaluation Criteria for Solid Tumors(RECIST)와 같은 표준 기준법(그러나 이에 한정되지 않음)에 의해 측정되는 바와 같은, 종양의 크기, 질량, 대사 활성 또는 볼륨의 감소, 또는 무진행 생존(PFS: progression free survival) 또는 전체적인 생존(OS: overall survival)의 통계적으로 유의적인 증가 중 적어도 하나를 가리킨다. 본 발명의 문맥 상 본 명세서에서 질병 또는 장애와 관련하여 "예방하다", "예방 (prophylaxis, 또는 prevention)"의 의미는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 조작된 세포를 단독으로 또는 다른 화합물과 조합하여, 투여하는 것을 의미한다. 질병 또는 장애 또는 질병 또는 장애의 증상의 일부 또는 전부의 개시 또는 발생을 방지하거나 또는 질병 또는 장애의 개시 가능성을 경감시키는 것을 의미한다.

[0146] [0163] 본 명세서에서 "종양 특이 항원(tumor specific antigen)" 또는 "TSA"라 함은 포유동물 대상체의 종양 세포에 주로 존재하지만 포유동물 대상체의 정상 세포에서는 일반적으로 발견되지 않는 카운터 구조물을 가리킨다. 종양 특이 항원은 종양 세포에 대해서만 배타적일 필요는 없으나 종양 특이 항원을 갖는 특정 포유동물 세포의 백분율은 충분히 높거나 또는 종양 표면에 대한 종양 특이 항원의 수준은 충분히 높아서 본 발명의 면역조절 폴리펩타이드와 같은 항-종양 요법에 의해 표적화될 수 있고, 종양의 효과로부터 포유동물의 예방 또는 치료가 제공된다. 일부 구체예에서, 종양이 있는 포유동물로부터의 세포의 무작위 통계 표본에서, TSA를 나타내는 세포들의 적어도 50%는 암세포이다. 또 다른 구체예에서, TSA를 나타내는 세포들의 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%는 암세포이다.

[0147] [0164] 본 명세서에서 변이체 CD86과 관련하여 사용된 용어 "변이체" ("변형된" 또는 돌연변이"라는 용어도)는 인간의 개입에 의해 생성된 포유동물 (예컨대, 인간 또는 쥐) CD86과 같은 CD86을 의미한다. 변이체 CD86??은 비변형 또는 야생형 CD86에 상대적으로 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이다. 변이체 CD60은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 부가, 또는 이의 조합에 의해 야생형 CD86 이소폼 서열과 상이한 폴리펩타이드이다. 본 발명의 목적 상, 변이체 CD86은 적어도 하나의 친화성 변형된 도메인을 함유하여, 이에 의해 하나 이상의 아미노산 차이가 IgSF 도메인 (예컨대 IgV 도메인 또는 IgC 도메인)에서 발생한다. 변이체 CD86은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 그 이상의 아미노산 차이, 예컨대 아미노산 치환을 포함한다. 변이체 CD86 폴리펩타이드는 일반적으로 대응하는 야생형 또는 비변형 CD86, 예컨대 SEQ ID NO:2의 서열, 그의 성숙한 서열 또는 그의 세포외 도메인 또는 IgSF 도메인을 함유하는 그의 일부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86?? 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 122, 또는 SEQ ID NO: 123에 제시된 서열을 포함하는 대응하는 야생형 또는 비변형 CD86에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타낸다.

[0148] [0165] 자연발생적인 아미노산 뿐만 아니라 비-자연발생적인 아미노산도 허용가능한 치환 또는 부가 범위 내에 포함된다. 변이체 CD86은 예를 들어, 드 노보 화학 합성, 드 노보 재조합 DNA 기술, 또는 이의 조합과 같은 임의의 특정 제조방법으로 한정되지 않는다. 본 발명의 변이체 CD86은 포유동물 종의 CD28, 및/또는 CTLA-4 중 적어도 하나 또는 그 이상에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 변경된 아미노산 서열은 비변형 또는 야생형 CD86 단백질에 비해 CD28, 및/또는 CTLA-4에 대해 변경된(즉, 증가 또는 감소된) 결합 친화성 또는 결합능을 결 과시킨다. 결합 친화성 또는 결합능의 증가 또는 감소는 유세포 분석법 등 잘 알려진 결합 분석법을 이용하여

알아낼 수 있다. Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). Linsley 외, Immunity, Vol 1 (9): 793-801 (1994)도 참조할 것. CD28, 및/또는 CTLA-4에 대한 변이체 CD86 결합 친화성 또는 결합능의 증가는 CD28, 및/또는 CTLA-4에 대한 비변형 또는 야생형 CD86의 그것에 대해 적어도 5% 더 큰 값일 수 있고 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 CD86 대조군 값의 그것보다 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100% 더 큰 것일 수 있다. CD28, 및/또는 CTLA-4에 대한 CD86 결합 친화성 또는 결합능의 감소는 비변형 또는 야생형 CD86 대조군 값의 95% 이하의 값이고, 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 CD86 대조군 값의 결합 친화성 또는 결합능의 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 이하 또는 검출 불가능한 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 친화성 또는 결합능의 변경은 변이체 CD86의 결합 친화성 또는 결합능과 비변형 또는 야생형 CD86의 결합 친화성 또는 결합능 사이의 유의한 차이의 결과로서 보여진다. 일부 구체예에서, 결합 친화성 또는 결합능은 하나의 동족 결합 파트너에 대해 변경될 수 있고 다른 동족 결합 파트너에 대해서는 변경되지 않을 수 있다. 예를 들어, 변이체 CD86은 CD28에 대해 증가된 결합 친화성 또는 결합능을 나타낼 수 있고, 야생형 또는 비변형 CD86 분자의 결합 친화성 또는 결합력과 비교하여 CTLA-4에 대한 결합 친화성 또는 결합능의 변화를 나타내지 않을 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 친화성 또는 결합능은 두 가지 모두의 동족 결합 파트너에 대해 변경될 수 있다. 일부 구체예에서, 변경은 동일한 방향(예를 들어, 양자 모두 증가 또는 감소)이다. 일부 구체예에서, 변경은 상이한 방향으로 이루어진다(예를 들어, 하나의 동족 결합 파트너에 대해서는 증가되고 다른 동족 결합 파트너에 대해서는 감소됨). 예를 들어, 변이체 CD86은 CD28에 대해 증가된 결합 친화성 또는 결합능을 나타낼 수 있고, 야생형 또는 비변형 CD86 분자의 결합 친화성 또는 결합력과 비교하여 CTLA-4에 대해서는 감소된 결합 친화도 또는 결합성을 나타낼 수 있다. 일부 구체예에서, CD86 변이체 또는 야생형 또는 비변형된 폴리펩타이드는 CD28 및/또는 CTLA-4의 엑토도메인에 결합한다. 따라서, 일부 구체예에서, 친화성 및 결합능은 CD28 및/또는 CTLA-4의 엑토도메인에 대한 CD86 변이체 또는 야생형 또는 비변형 폴리펩타이드의 결합에 기초하여 결정된다. 변이체 CD86 폴리펩타이드는 아미노산 잔기의 치환, 추가 또는 결실에 의해 1차 아미노산 서열이 변경된다. 변이체 CD86 폴리펩타이드와 관련하여 용어 "변이체"는 어떠한 특정 출발 조성물에 대한 조건이나 변이체 CD60을 생성하는 방법에 대한 어떠한 조건을 부과하는 것으로 여겨져서는 아니된다. 변이체 CD86은 야생형 포유동물 CD86 서열 정보로부터 출발하여 CD28, 및/또는 CTLA-4에 결합하기 위해 in silico 모뮬링된 다음 최종적으로 재조합 또는 화학적으로 합성에 의해 변이체 CD86을 수득할 수 있다. 한 가지 별법 사례에서, 변이체 CD86은 비변형 또는 야생형 CD86의 부위-지향된 돌연변이생성에 의해 생성될 수 있다. 그러므로, 변이체 CD86은 조성물(composition)일 수 있고 반드시 임의의 주어진 방법에 의해 생산되는 생성물이어야 할 필요는 없다. 재조합 방법, 화학적 합성 또는 이들의 조합을 포함하는 다양한 기술이 사용될 수 있다.

[0149] [0166] 본 명세서에서 용어 "야생형" 또는 "천연 또는 자연 (natural 또는 native)"은 핵산 분자, 단백질 (예컨대 CD86), IgSF 구성원, 숙주 세포 등과 같은 생물학적 물질과 관련하여 사용되고, 자연에서 발견되고 인간의 개입에 의해 변경되지 않는 것들을 지칭한다.

[0150] II. 변이체 CD86 폴리펩타이드

[0151] [0167] 본 발명에 따라 하나 이상의 CD86 동족 결합 파트너에 대해 변경된 (증가 또는 감소된) 결합 활성 또는 친화성을 나타내는 변이체 CD86 폴리펩타이드가 제공된다. 일부 구체예에서, CD86 결합 파트너는 CD28, 또는 CTLA-4이다. 일부 구체예에서, CD86 동족 결합 파트너는 CD28이다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 또는 IgD 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 야생형 또는 비변형 CD86의 일부에 비해 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 도메인 (IgD)에 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 하나 이상의 치환 (또는 "돌연변이" 또는 "교체"), 결실 또는 부가를 포함한다. 따라서, 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)이 IgD에 있는 것인 변이체 IgD (이하 "vIgD"라 칭함)이거나 또는 이를 포함한다.

[0152] [0168] 일부 구체예에서, 변이체는 비변형 CD86 서열의 서열에 비해 하나 이상의 IgSF 도메인에서 변형된다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 서열은 야생형 CD86이다. 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 CD86은 천연 CD86 또는 그의 오솔로그(이종상동체: ortholog)의 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86은 CD86의 세포외 도메인(ECD) 또는 IgV 도메인을 함유하는 이의 일부이거나 이를 포함한다(표 2 참조). 일부 구체예에서, 변이체 CD86은 CD86의 세포외 도메인(ECD) 또는 IgV 도메인을 함유하는 이의 일부이거나 이를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86은 가용성이고 막관통 도메인이 결여되어 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86은 막관통 도메인 및 일부 경우에는 세포질 도메인을 추가로 포함한다.

- [0153] [0169] 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 서열은 포유동물 CD86 서열이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 서열은 인간, 마우스, 사이노몰구스 원숭이 또는 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유동물 CD86일 수 있다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 서열은 인간이다.
- [0154] [0170] 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 서열은 (i) SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 시그널 서열이 결여된 그의 성숙한 형태, (ii) SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 그의 성숙한 형태를 갖거나, 또는 (iii) IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 (i) 또는 (ii)의 일부이다.
- [0155] [0171] 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 서열은 CD86의 IgV 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 세포외 도메인 또는 그의 일부분이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123에 제시된 아미노산 서열, 또는 그의 오솔로그를 포함한다. 일부 경우에, 비변형 또는 야생형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123에 제시된 아미노산의 서열, (ii) SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 서열의 특이적 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 29(SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 24-247에 상응)에 제시된 아미노산 서열, 또는 그의 오솔로그를 포함한다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 122에 제시된 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 33-131에 상응), 또는 그의 오솔로그를 포함한다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 123에 제시된 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 24-134에 상응), 또는 그의 이중상동체를 포함한다. 일부 구체예에서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 야생형 또는 비변형 CD86은 CD28 또는 CTLA-4 중 하나 이상과 같은, 하나 이상의 CD86 동족 결합 단백질에 결합할 수 있다.
- [0156] [0172] 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편과 같은 CD86의 특이적 결합 단편을 함유한다. 일부 구체예에서, 특이적 결합 단편은 CD28 및/또는 CTLA-4에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 특이적 결합 단편은 CD28 및/또는 CTLA-4의 엑토도메인에 결합할 수 있다. 특이적 결합 단편은 50개 이상의 아미노산 길이, 예컨대 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 또는 220개 이상의 아미노산 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, IgV 도메인의 특이적 결합 단편은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 33-131로서 제시된 IgV 도메인의 길이의 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 길이의 아미노산 서열을 함유한다.
- [0157] [0173] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 친화성 변형된 IgSF 도메인을 포함하는 세포외 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인, 또는 IgSF 도메인이 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 함유하는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 전장 IgV 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 전장 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 ECD 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 전장 IgV 도메인을 포함하는 ECD 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함하는 ECD 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다.
- [0158] [0174] 일반적으로, 폴리펩타이드들의 다양한 각 속성들을 이하에 개별적으로 개시한다 (예컨대, 가용성 및 막 결합 폴리펩타이드, CD28 및 CTLA-4에 대한 CD86의 친화성, 폴리펩타이드 사슬 당 변이 개수, 연결된 폴리펩타이드 사슬 개수, 변이체 CD86 당 아미노산 변경의 개수 및 성질, 등). 그러나, 통상의 기술자에게는, 임의의 특정한 폴리펩타이드가 이들 독립적인 속성들의 조합을 포함할 수 있다는 것이 명확히 이해될 것이다. IgSF 도메인의 도메인 조직을 설명하는데 사용된 SEQ ID NO로서 제시된 특정 서열에 대한 것을 비롯하여 아미노산을 참조로 한 것은 어디까지나 설명 목적을 위한 것일 뿐 제공된 구체예 범위로 본 발명이 한정되는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 폴리펩타이드 및 그의 도메인 설명은 상동성 분석 및 유사 분자의 정렬에 기초하여 이론적으로 유도된 것이다. 그러므로, 정확한 위치는 달라질 수 있고, 각 단백질에 대해 반드시 동일할 필요는 없다. 따라서, 특이적 IgSF 도메인, 예컨대 특이적 IgV 도메인은 수 개의 아미노산 (예컨대 1, 2, 3 또는 4개)만큼 짧거나 길 수 있다.
- [0159] [0175] 또한, 이하에 설명되는 바와 같은 본 발명의 다양한 구체예는 위에 개시된 바와 같이 정의된 용어의 의미 내에서 제공된다. 따라서, 특정 정의에 설명된 구체예들은 정의된 용어가 본 명세서에서 설명된 다양한 양상

및 속성을 설명하는데 이용될 때 참조로서 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 표제, 다양한 양태 및 구체예의 제시 순서, 및 각각의 독립적인 속성의 개별적인 개시는 본 개시의 범위에 대한 제한을 의미하지 않는다.

[0160] **A. 예시적 변형**

[0176] 본 발명에 따라, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 함유된 IgSF 도메인에 비해 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인(예를 들어, IgV) 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 변이체 CD86 폴리펩타이드가 제공되어, 상기 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드와 비교하여 하나 이상의 리간드 CD28 또는 CTLA-4에 대해 변경된(증가 또는 감소된) 결합 활성 또는 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 예를 들어 고체상 ELISA 면역분석, 유세포 분석, ForteBio Octet 또는 Biacore 분석에 의해 결정되는 바와 같이, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 대조군 서열의 것과 상이한 CD28 및/또는 CTLA-4에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대한 결합 친화성의 변화를 나타내지 않는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대한 결합 친화성의 증가를 나타내지 않는다. CD28 및/또는 CTLA-4는 인간 단백질 또는 쥐 단백질과 같은 포유동물 단백질일 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체, 야생형 및 비변형 CD86 폴리펩타이드는 CD28 및/또는 CTLA-4의 엑토도메인에 결합한다. 따라서, 일부 구체예에서, 친화성 또는 결합 활성은 CD28 및/또는 CTLA-4의 엑토도메인에 대한 변이체, 야생형 및 비변형 CD86 폴리펩타이드의 결합과 관련하여 결정된다.

[0177] 동족 결합 파트너 각각에 대한 결합 친화도는 독립적이다; 즉, 일부 구체예에서 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해, CD28에 대해서는 증가된 결합 친화도를 갖지만 CTLA-4에 대해서는 그렇지 않다.

[0178] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 갖고 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해서는 감소된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CD28에 대해서는 증가된 결합 친화성을 갖지만, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대한 결합 친화성에는 변화가 없다.

[0179] 일부 구체예에서, CD28에 대해 증가된 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28에 대해, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 대조군에 비해 적어도 약 5%, 예를 들어 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 또는 50%의 결합 친화성 증가를 가질 것이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 대한 결합 친화성의 증가는 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 125배, 150배, 175배, 200배, 225배, 250배, 275배, 300배, 325배, 350배, 375배, 또는 400배를 초과한다. 이러한 예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형(예: 치환)을 함유하지 않는다는 점을 제외하고는 변이체 CD86 폴리펩타이드와 동일한 서열을 갖는다.

[0180] 일부 구체예에서, CTLA-4에 대한 결합 친화성이 저감되거나 감소된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 대조군에 비해 CTLA-4에 대해 결합 친화성이 적어도 5%, 예컨대 적어도 약 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 감소될 것이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 결합 친화성의 감소는 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배 또는 50배를 초과한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 대조군과 비교시 CTLA-4에 대한 결합 친화도의 변화를 나타내지 않는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 대조군에 비해 CTLA-4에 대한 결합 친화성의 증가를 나타내지 않는다. 이러한 예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형(예: 치환)을 함유하지 않는다는 점을 제외하고는 변이체 CD86 폴리펩타이드와 동일한 서열을 갖는다.

[0181] 일부 구체예에서, CD28 및/또는 CTLA-4에 대한 임의의 전술한 구체예의 평형 해리 상수(K_d)는 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M, 또는 1×10^{-12} M 이하일 수 있다.

- [0167] [0182] 야생형 또는 비변형 CD86 서열이 반드시 본 명세서에 개시된 변이체 CD86 폴리펩타이드 제조를 위한 출발 조성물로서 사용될 필요는 없다. 그러므로, "치환"과 같은 "변형"이라는 용어의 사용은 본 발명의 구체예가 변이체 CD86 폴리펩타이드의 특정 제조방법으로 한정됨을 시사하는 것은 아니다. 변이체 CD86 폴리펩타이드는 예를 들어, 드 노보 펩타이드 합성에 의해 만들어질 수 있고 따라서 그 치환을 인코딩하기 위해 코돈을 변경시키는 의미의 변형, 예컨대 "치환"이 반드시 요구되지 않는다. 이 원리는 아미노산 잔기의 "부가" 및 "결실" 등의 용어에도 적용되며 마찬가지로 특정 제조 방법을 시사하는 것이 아니다. 변이체 CD86 폴리펩타이드가 설계 또는 생성되는 수단은 어떤 특정한 방법으로 한정되지 않는다. 그러나 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 인코딩 핵산은 야생형 또는 비변형 CD86 유전자 물질로부터 돌연변이되어 소망되는 특이적 결합 친화성 및/또는 IFN-감마 발현 또는 기타 활성의 유도에 대해 스크리닝된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 임의의 수의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 이용 가능한 단백질 또는 핵산 서열을 이용하여 새롭게 합성된 다음 스크리닝된다. National Center for Biotechnology Information은 그러한 정보를 제공하며, 그의 웹 사이트는 UniProtKB 데이터베이스와 마찬가지로 인터넷을 통해 공개적으로 액세스할 수 있다.
- [0168] [0183] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서의 전 개시를 통해 나타난 바와 같이, 아미노산 변형(들)은 SEQ ID NO: 29에 제시된 비변형 ECD 서열의 위치 넘버링에 상응하는 아미노산 위치 번호에 의해 다음과 같이 지정된다:
- [0169] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVNEVYLGKEKFDSVHVKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPEIVPIISNITENVYINLTCSIIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO: 29)
- [0170] [0184] 본원에서 제공되는 변형은 SEQ ID NO: 29에 제시된 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 또는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 함유하는 그의 일부에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 122에 기재된 바와 같은 CD86의 IgV를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 122에 제시된 IgV 서열보다 아미노산 길이가 1-20개, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 아미노산만큼 더 길거나 더 짧은 IgV를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123, 또는 그의 특이적 결합 단편에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOs: 29, 122 및 123 중 어느 하나에 제시된 서열을 갖는다.
- [0171] NETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVNEVYLGKEKFDSVHVKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELS (SEQ ID NO: 122)
- [0172] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVNEVYLGKEKFDSVHVKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLA (SEQ ID NO: 123)
- [0173] [0185] 이를테면 레퍼런스 서열을 SEQ ID NO:29과 정렬시킴으로써, IgV 도메인을 함유하는 그의 일부를 비롯한 CD86 폴리펩타이드의 아미노산 치환과 같은 변형의 상응하는 위치를 동정하는 것은 당업자의 통상 기술 수준 범위 내이다. 야생형 CD86의 잔기 24-247을 함유하는 SEQ ID NO: 29과 야생형 CD86의 잔기 31-131을 함유하는 SEQ ID NO: 122과의 예시적으로 정렬이 도 3에 도시되어 있다. 본 명세서 전반에 걸쳐, 변형 리스트에서, 아미노산 위치는 중간에, 대응하는 비변형(예컨대, 야생형) 아미노산은 상기 번호 앞에, 그리고 식별된 변이체 아미노산 치환은 번호 다음에 표시한다. 변형이 위치의 결실이면 "del"로 표시되고 변형이 그 위치에서의 삽입이면 "ins"로 표시된다. 경우에 따라, 중간에 표시된 아미노산 위치와 함께 삽입이 기재되고, 대응하는 비변형(예컨대 야생형) 아미노산은 번호 앞뒤에, 그리고 동정된 변이체 아미노산 삽입은 비변형(예컨대 야생형) 아미노산 다음에 기재한다.
- [0174] [0186] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 서열에서 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)을 갖는다. 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)은 야생형 또는 비변형 CD86 서열의 엑토도메인 (세포외 도메인, ECD)에서 일어날 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대, 치환은 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대, 치환은 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대, 치환은 ECD 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다.
- [0175] [0186] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 서열에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, 야생형 또는 비변형 CD86 서열의 엑

토도메인 (세포외 도메인; ECD)에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은 ECD 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다.

[0176] [0187] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 변형 (예컨대 치환)은 IgV 도메인에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 변형은 ECD에 존재한다. 일부 구체예에서, 변형은 ECD 및 IgV 도메인에 존재한다. 일부 구체예에서, 변형은 IgV 도메인에 존재한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 ECD 또는 그의 특이적 결합 단편에 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드 또는 SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123의 아미노산 서열을 갖는 그의 특이적 결합 단편에 대해 100% 미만의 서열 동일성 및 적어도 약 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0177] [0188] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 제시된 위치를 참조로, 13, 18, 25, 28, 33, 38, 39, 40, 43, 45, 52, 53, 60, 68, 71, 77, 79, 80, 82, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 97, 102, 104, 113, 114, 123, 128, 129, 132, 133, 137, 141, 143, 144, 148, 153, 154, 158, 170, 172, 175, 178, 180, 181, 183, 185, 192, 193, 196, 197, 198, 205, 206, 207, 212, 215, 216, 222, 223, 또는 224에 대응하는 비변형 CD86 또는 그의 특이적 결합 단편의 위치(들)에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 224에서의 변형은 결실이다. 일부 구체예에서, 이러한 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CD28 및/또는 CTLA-4 중 하나 이상에 대해 변경된 결합 친화성을 나타낸다. 예컨대, 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 감소된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 어떠한 결합 친화성도 나타내지 않는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 결합 친화성의 증가를 나타내지 않는다.

[0178] [0189] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 보존적 아미노산 치환은 야생형 또는 비변형 아미노산 이외의 치환된 아미노산과 동일한 클래스의 아미노산에 속하는 임의의 아미노산이다. 아미노산 클래스로는 지방족 (글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신), 히드록실 또는 황-함유 (세린, 시스테인, 트레오닌, 및 메티오닌), 시클릭 (프롤린), 방향족 (페닐알라닌, 티로신, 트립토판), 염기성 (히스티딘, 리신, 및 아르기닌), 및 산성/아미드 (아스파테이트, 글루타메이트, 아스파라긴, 및 글루타민)을 들 수 있다.

[0179] [0190] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 2 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0180] [0191] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 제시된 위치를 참조로 13, 18, 25, 28, 33, 38, 39, 40, 43, 45, 52, 53, 60, 68, 71, 77, 79, 80, 82, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 97, 102, 104, 113, 114, 123, 128, 129, 132, 133, 137, 141, 143, 144, 148, 153, 154, 158, 170, 172, 175, 178, 180, 181, 183, 185, 192, 193, 196, 197, 198, 205, 206, 207, 212, 215, 216, 222, 223, 또는 224로부터 선택된 위치

(들)에 상응하는 위치에서 하나 이상의 변형(예컨대 아미노산 치환)을 함유한다. 일부 구체예에서, 아미노산 변형은 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환이다.

[0181] [0192] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 그의 보존적 치환을 함유한다.

[0182] [0193] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 25 또는 90로부터 선택된 위치에서 적어도 하나의 변형(예컨대 치환)을 함유한다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 Q25L, H90Y, 또는 H90L이다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 Q25L이다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 H90Y 또는 H90L이다.

[0183] [0194] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/ L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, E38V/S114G/P143H, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, K80M/I88T, K92I/F113S, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, 또는 S28G/H90Y로부터 선택된 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S/ E212X, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, S28G/H90Y, A13V/Q25L/H90L, Q25L/H90L/K93T/M97L, Q25L/Q86R/H90L, 또는 I89V/H90L로부터 선택된 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 아미노산 치환 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L을 함유한다.

[0184] [0195] 일부 구체예에서, 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드는 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T, 또는 I223F로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다.

[0185] [0196] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드로는 아미노산 치환 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T,

Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P,
 Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V,
 Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L,
 Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T,
 Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D,
 Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, E38V/S114G/P143H, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V,
 K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, K80M/I88T, K92I/F113S, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L,
 Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R,
 Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, 또는 S28G/H90Y를 갖는 CD86 폴
 리펩타이드를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드로서, 아미노산 치환
 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D,
 A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H,
 Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D,
 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P,
 Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P,
 Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N,
 Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S/E212X, H90Y/L180S, H90Y/Y129N,
 I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T,
 Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V,
 Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, S28G/H90Y, A13V/Q25L/H90L, Q25L/H90L/K93T/M97L,
 Q25L/Q86R/H90L, 또는 I89V/H90L을 갖는 CD86 폴리펩타이드를 들 수 있다.

[0186] [0197] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 표 1에 수록된 임의의 치환 (돌연변이들)을 포함한다. 표 1은 또한 야생형 CD86 또는 예시적인 변이체 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인(ECD) 또는 IgV 도메인에 대한 SEQ ID NO를 참조로 예시적인 서열을 제공한다. 일부 경우에, 표 1에 표시된 IgV는 ECD보다 짧으므로 표 1에 나열된 모든 아미노산 치환, 예컨대 IgV 도메인 외부의 아미노산 치환을 포함하지 않을 수 있다. 표시된 바와 같이, 주어진 도메인에 상응하는 정확한 위치 또는 잔기는, 이를테면 도메인을 동정 또는 분류하는데 사용된 방법에 따라 달라질 수 있다. 또한, 경우에 따라, 발현될 경우 이를테면 도메인의 적절한 폴딩을 확보하기 위해, 변이체 IgSF 폴리펩타이드의 서열에 주어진 도메인 (예컨대, ECD 또는 IgV)의 인접 N- 및/또는 C-말단 아미노산들이 포함될 수도 있다. 따라서, 표 1의 SEQ ID NOS의 예시는 제한적인 것으로 상정되어서는 아니된다. 예컨대, 특정 도메인, 이를테면 변이체 CD86 폴리펩타이드의 IgV 도메인은 각각의 SEQ ID NO에 제시된 아미노산 서열에 비해 이를테면 1-20개, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 아미노산과 같이, 수개의 아미노산만큼 길거나 짧을 수 있다.

[0187] [0198] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121, 124-134, 141-221, 및 314에 제시된 임의의 서열이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121, 124-134, 141-221, 및 314 중 어느 하나에 제시된 임의의 서열에 대해 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 예컨대 적어도 96% 동일성, 97% 동일성, 98% 동일성, 또는 99% 동일성을 나타내고, 야생형 또는 비변형 CD86에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유하는 폴리펩타이드 서열이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121, 124-134, 314, 및 141-221 중 어느 하나의 특이적 결합 단편이거나 또는 이를 포함하고, 야생형 또는 비변형 CD86에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86는 SEQ ID NOS: 89, 93, 94, 107, 111, 112, 115, 117, 124-134, 145, 149, 150, 163, 167, 168, 171, 173, 182, 186, 187, 200, 204, 205, 208, 210, 215-221, 또는 314에 제시된 서열이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 89, 93, 94, 107, 111, 112, 115, 117, 124-134, 145, 149, 150, 163, 167, 168, 171, 173, 182, 186, 187, 200, 204, 205, 208, 210, 215-221, 또는 314 중 어느 하나에 제시된 임의의 서열에 대해 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 예컨대 적어도 96% 동일성, 97% 동일성, 98% 동일성, 또는 99% 동일성을 나타내고, 야생형 또는 비변형 CD86에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유하는 폴리펩타이드 서열이거나 또는 이를 포함한다.

[0188] [0199] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121, 124-134, 141-221, 또는 314 중 어느 하나의 특이적 결합 단편이거나 또는 이를 포함하고, 야생형 또는 비변형 CD86에는 존재하지 않는 아미노산

변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 89, 93, 94, 107, 111, 112, 115, 117, 124-134, 145, 149, 150, 163, 167, 168, 171, 173, 182, 186, 187, 200, 204, 205, 208, 210, 215-221, 또는 314 중 어느 하나의 특이적 결합 단편이거나 또는 이를 포함하고, 야생형 또는 비변형 CD86에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유한다.

표 1: 예시적인 변이체 CD86 폴리펩타이드			
돌연변이(들)	SEQ ID NO		
	ECD (24-247)	IgV (24-134)	IgV (33-131)
야생형	29	123	122
Q25L/T71A/H90Y	85	141	178
Q25L/D53G/E212V	86	142	179
Q25L/H90L	87	143	180
N43K/I79N/H90L/I178T/E198D	88	144	181
A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T	89	145	182
Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H	90	146	183
Q25L/F33L/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P	91	147	184
Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D	92	148	185
Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V	93	149	186
Q25L/Q86R/H90L/N104S	94	150	187
Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P	95	151	188
Q18K/Q25L/F33L/L40S/H90L	96	152	189
Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P	97	153	190
Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P	98	154	191
Q25L/S28G/F33L/F52L/H90L/Q102H/I178T	99	155	192
Q25L/F33L/H90L/K144E/L180S	100	156	193
Q25L/F33L/H90L/K153E/E172G/T192N	101	157	194
Q25L/F33L/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D	102	158	195
Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S	103	159	196
E38V/S114G/P143H	104	160	197
H90Y/L180S	105	161	198
H90Y/Y129N	106	162	199
I89V/H90L/I193V	107	163	200
K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L	108	164	201
K80M/I88T	109	165	202
K92I/F113S	110	166	203
M60K/H90L	111	167	204
Q25L/F33L/H90L	112	168	205
Q25L/F33L/Q86R/H90L/K93T	113	169	206
Q25L/H90L	114	170	207
Q25L/H90L/P185S	115	171	208
Q25L/H90L/P185S/P224L	116	172	209
Q25L/H90L/S179R	117	173	210
Q25L/H90Y/S181P/I193V	118	174	211
Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P	119	175	212
Q25L/Q86R/H90L/K93T	120	176	213

S28G/H90Y	121	177	214
A13V/Q25L/H90L	131	124	215
Q25L/H90L/K93T/M97L	132	125	216
Q25L/Q86R/H90L	314	126	217
I89V/H90L	133	127	218
M60K/H90L	111	128	219
Q25L/F33L/H90L	112	129	220
Q25L/H90L	134	130	221

[0200] 일부 구체예에서, CD86의 제공된 임의의 변이체는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드에 비해 증가된 친화성을 갖는 결합을 비롯하여 CD86 폴리펩타이드가 CD28에 결합하는 한, 전술한 바와 같은 더 짧거나 더 긴 폴리펩타이드, 예컨대 표 1에 제시된 아미노산 서열에 비해 1-20개 아미노산, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 아미노산 만큼 더 짧거나 더 긴 폴리펩타이드로서 포함될 수 있다.

[0201] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드, 예를 들어 SEQ ID NO: 29, 122 또는 123에 제시된 서열과 비교하여 CD28의 엑토도메인에 대해 증가된 친화성을 나타낸다.

[0202] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 폴리펩타이드, 예컨대 SEQ ID

NO: 29, 122, 또는 123에 제시된 서열에 비해, CD28의 엑토도메인 결합에 대해 증가된 결합 친화성을 나타내고 CTLA-4에 대해 감소된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형과 비교하여 CD28의 엑토도메인에 대해 증가된 친화성을 나타내고 CTLA-4의 엑토도메인에 대한 결합에 대해서는 친화성 변화를 나타내지 않는다.

[0194] [0203] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28 결합 대 CTLA-4 결합 비(CD28:CTLA-4 결합 비)가 나타내는 바와 같이, CD28 대 CTLA-4 결합에 대한 비변형 CD86 폴리펩타이드 (예컨대 SEQ ID NO: 29, 122, 또는 123에 제시됨)에 비해 CD86 대 CTLA-4에 대해 증가된 선택성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 결합 비는 1보다 크다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28 대 CTLA-4 결합 비가 약 또는 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 또는 그 이상인인 CD28 대 CTLA-4 결합 비를 나타낸다.

[0195] III. 변이체 폴리펩타이드의 포맷

[0196] [0204] vIgD가 함유된 본 발명의 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 가용성 단백질, 막 결합 단백질, 또는 분비된 단백질을 비롯한 다양한 방식으로 포맷될 수 있다. 일부 구체예에서, 특정 포맷은 소망되는 치료 용도에 따라 선택될 수 있다. 일부 경우에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 그의 결합 파트너, 예컨대 CTLA-4 및/또는 CD28의 활성을 길항 또는 차단하기 위한 포맷으로 제공된다. 일부 경우에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 그의 결합 파트너, 예컨대 CD28의 활성을 작용(agonize) 또는 자극하는 포맷으로 제공된다. 일부 구체예에서, CD28의 작용성은 종양학에서 면역성을 촉진하는데 유용할 수 있다. 통상의 기술자는 하나 이상의 특이적 동족 결합 파트너를 길항 또는 작용하기 위한 것과 같은, 특정 포맷의 활성을 용이하게 구할 수 있다. 이러한 활성들을 평가하기 위한 예시적인 방법은 실시예를 비롯하여 본 명세서에 제공되어 있다. 제공된 면역조절 단백질의 모듈 포맷은 복수의 카운터 구조(복수의 동족 결합 파트너)의 활성을 조절하기 위해 면역조절 단백질을 조작 또는 생성하는데 있어 유연성을 제공한다.

[0197] [0205] 일부 태양에서, 예컨대 Fc 사슬에 융합된, 그러한 단백질이 가용성인 CD86의 vIgD를 포함하는 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 태양에서, 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인, 예컨대 하나 이상의 부가적인 vIgD가 본 발명에 제공된 CD86의 vIgD에 연결될 수 있다 (이하 "적층" 또는 "적층된" 면역조절 단백질이라 칭함). 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질의 모듈형 포맷은 다중 카운터구조물(다중 동족 결합 파트너)의 활성을 조절하기 위해 면역조절 단백질을 조작 또는 생성하기 위한 유연성을 제공한다. 일부 구체예에서, 이러한 "적층" 분자들은 가용성 포맷에서 제공되거나 또는 몇몇 사례에서, 막 결합된 또는 분비된 단백질로서 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 면역조절 단백질은 CD86의 vIgD가, 예를 들어 대상체에게 투여되는 경우처럼 vIgD를 특이적인 환경 또는 세포에 표적화 또는 국소화시키기 위해 리간드 예컨대 항원에 특이적으로 결합하는 표적화 물질 또는 모이어티 예컨대 항체 또는 기타 결합 분자에 직접 또는 간접적으로 연결되어 있는, 컨쥬게이트로서 제공된다. 일부 구체예에서, 표적화 물질, 예컨대 항체 또는 기타 결합 분자는 종양 항원에 결합함으로써, vIgD를 함유하는 변이체 CD86을 종양 미세환경에 국소화시켜, 예를 들어, 종양 미세환경에 특이적인 종양 침윤 림프구(TIL)의 활성을 조절할 수 있다.

[0198] [0206] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 세포에서 발현되어 조작된 세포 치료법(ECT)의 일부로서 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 면역 세포 (예컨대 T 세포 또는 항원 제시 세포) 등의 세포에서 막-결합 형태로서 발현됨으로써, 막관통 면역조절 단백질 (이하 "TIP"라 칭함)이 제공된다. 일부 구체예에서, TIP에 의해 인식되는 동족 결합 파트너(들)에 따라, TIP를 발현하는 조작된 세포들은 다른 조작된 세포 및/또는 내인성 T 세포에 양성 또는 음성 공동자극 시그널을 제공함으로써 동족 결합 파트너를 인식할 수 있다. 일부 구체예에서, TIP를 발현하는 조작된 세포는 상이한 세포 상의 동족 결합 파트너에 결합한다. 일부 구체예에서, TIP를 발현하는 조작된 세포가 상이한 세포 상의 동족 결합 파트너에 결합하는 경우, 공동자극은 트랜스(trans) 공동자극으로 지칭된다. 일부 구체예에서, TIP를 발현하는 조작된 세포는 그 자체로 동족 결합 파트너에 결합함으로써 그 자체로 공동자극을 유도한다. 일부 구체예에서, 세포 상의 TIP가 그 자체의 동족 결합 파트너에 결합하는 경우, 공동자극은 시스(cis) 공동자극으로 지칭된다. 일부 태양에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포, 예를 들어 면역 세포 (예컨대 T 세포 또는 항원 제시 세포)에서 분비가능한 형태로 발현됨으로써 예컨대 세포가 대상체에게 투여될 때, 변이체 CD86 폴리펩타이드의 분비된 또는 가용성 형태(이하, "SIP"라 칭함)를 생성한다. 일부 태양에서, SIP에 의해 인식되는 동족 결합 파트너(들)에 따라, SIP를 발현하는 조작된 세포는 그것이 분비되는 환경(예컨대 종양 미세환경)에서 동족 결합 파트너를 길항 또는 작용시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는, 세포에서 TIP 또는 SIP로서 변이체 폴리펩타이드의 전달 또는 발현을 위

해, 대상체에게 투여시 생체내에서 면역 세포(예컨대 T 세포 또는 항원 제시 세포)와 같은 세포를 감염시킬 수 있는 감염 물질(예컨대 바이러스 또는 세균성 물질)에서 발현된다.

[0199] [0207] 일부 구체예에서, vIgD를 함유하는 변이체 CD86와 같은 가용성 면역조절 폴리펩타이드는, 리포솜 내에 캡슐화되어 제공된 컨쥬게이트들(예컨대 표적화 모이어티)의 임의의 어느 하나 또는 임의 조합에 리포솜 그 자체가 컨쥬게이트될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 가용성 또는 막 결합 면역조절 폴리펩타이드는 탈글리코실화된다. 보다 특정한 구체예에서, 변이체 CD86 서열은 탈글리코실화된다. 보다 특정한 구체예에서, 변이체 CD86의 IgV 및/또는 IgC (예컨대 IgC2) 도메인 또는 도메인들이 탈글리코실화된다.

[0200] [0208] 제공된 포맷의 비제한적인 예는 이하에서 더욱 상세히 설명된다.

[0201] B. 가용성 단백질

[0202] [0209] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질은 가용성 단백질이다. 통상의 기술자는 세포 표면 단백질이 전형적으로 세포내, 막관통, 및 세포외 도메인 (ECD)을 갖는다는 것 그리고 그러한 단백질의 가용성 형태가 세포외 도메인 또는 그의 면역학적 활성 서브서열을 이용하여 만들어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 그러므로, 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질은 막관통 도메인 또는 막관통 도메인의 일부를 결여한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86를 함유하는 면역조절 단백질은 세포내 (세포질) 도메인 또는 세포내 도메인의 일부를 결여한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질은 ECD 도메인 또는 IgV 도메인 및/또는 IgC (예컨대 IgC2) 도메인 또는 도메인들 또는 아미노산 변형(들)을 함유하는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 그의 일부를 함유하는 vIgD 부분만을 함유한다.

[0203] [0210] 일부 구체예에서, 변이체 CD86를 함유하는 면역조절 폴리펩타이드는 본 발명의 하나 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서 본 발명의 폴리펩타이드는 정확히 1, 2, 3, 4, 5개의 변이체 CD86 서열을 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 서열들 중 적어도 두 개는 동일한 변이체 CD86 서열이다.

[0204] [0211] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 폴리펩타이드는 CD86의 2 이상의 vIgD 서열을 포함한다. 폴리펩타이드 사슬 내 복수개의 변이체 CD86 폴리펩타이드들은 서로 동일하거나(즉 동일 종) 또는 동일하지 않은(즉, 상이한 종) 변이체 CD86 서열일 수 있다. 단일 폴리펩타이드 사슬 구체예에 더해 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드 2, 3, 4개 이상이 서로 공유 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따라 모노머, 다이머 및 더 고차수 (예컨대, 3, 4, 5 이상)의 멀티머 단백질이 제공된다. 예를 들어, 일부 구체예에서 본 발명의 폴리펩타이드 정확히 2개가 서로 공유 또는 비공유적으로 결합되어 다이머를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 결합은 사슬간 시스테인 다이설파이드 결합을 통해 형성된다. 본 발명의 2 이상의 폴리펩타이드들을 포함하는 조성물은 동일 종 실질적으로 동일한 종의 폴리펩타이드(예컨대 호모다이머) 또는 상이한 종의 폴리펩타이드(예컨대 헤테로다이머)의 것일 수 있다. 본 발명의 연결된 폴리펩타이드들을 복수개 갖는 조성물은 전술한 바와 같이 각 폴리펩타이드 사슬 내에 본 발명의 동일 또는 상이한 변이체 CD86 폴리펩타이드를 하나 이상 가질 수 있다.

[0205] [0212] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 모노머 형태이거나 및/또는 그의 결합 파트너에 대해 1가 결합을 나타내는 변이체 CD86 폴리펩타이드이거나 이를 함유한다. 일부 태양에서, 가용성이거나 및/또는 막관통 도메인 및 세포내 시그널링 도메인이 없는 변이체 CD86과 같은 변이체 CD86 폴리펩타이드는 추가적 모이어티에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 추가 모이어티는 단백질, 펩타이드, 소분자 또는 핵산이다. 일부 구체예에서, 1가 면역조절 단백질은 융합 단백질이다. 일부 구체예에서, 모이어티는 반감기 연장 분자이다. 이러한 반감기 연장 분자의 예로는, 알부민, 알부민-결합 폴리펩타이드, Pro/Ala/Ser(PAS), 인간 융모성 생식선 자극 호르몬의 베타 서브유닛의 C-말단 펩타이드(CTP), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 아미노산의 구조화되지 않은 긴 친수성 서열(XTEN), 하이드록시에틸 전분(HES), 알부민-결합 소분자 또는 이들의 조합을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0206] [0213] 일부 구체예에서, 변이체 CD86를 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 아미노산 Pro, Ala, 및 Ser로 이루어진 입체형태 장애 폴리펩타이드 서열을 포함하는 모이어티에 연결될 수 있다(예컨대, WO2008/155134, SEQ ID NO: 242 참조). 일부 경우에서, 아미노산 반복(repeat)은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 아미노산 잔기이고, 여기서 각 반복은 (an) Ala, Ser, 및 Pro 잔기(들)을 포함한다. 그러므로, 본원에 따라 변이체 CD86 폴리펩타이드가

Pro/Ala/Ser(PAS)에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되어 있는, PASylated 단백질인 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 부가적인 링커 구조가 사용될 수 있다.

- [0207] [0214] 일부 구체예에서, 상기 모이어티는 변이체 CD86 폴리펩타이드의 탐지 또는 정제를 용이하게 해준다. 일부 경우에서, 면역조절 폴리펩타이드는 CD86 폴리펩타이드의 N- 및/또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로 연결된 친화성 또는 정제 태그와 같은 태그 또는 융합 도메인을 포함한다. 다양한 적절한 폴리펩타이드 태그 및/또는 융합 도메인들이 알려져 있으며, 이의 비제한적인 예로는 폴리-히스티딘(His) 태그, FLAG-태그(SEQ ID NO: 248), Myc-태그, 및 형광 단백질-태그(예컨대, EGFP, SEQ ID NOs: 244-246에 제시됨)을 들 수 있다. 일부 경우에서, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 적어도 6개의 히스티딘 잔기를 포함한다 (SEQ ID NO: 249에 제시됨). 일부 경우에서, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 여러 모이어티들의 다양한 조합을 추가로 포함한다. 예컨대, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 하나 이상의 폴리히스티딘-태그 및 FLAG 태그를 더 포함한다.
- [0208] [0215] 일부 구체예에서, CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 252에 제시된 것과 같은 1가 형태로 남아 있는 변형된 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc)에 연결된다.
- [0209] [0216] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 멀티머화 도메인에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 태양에서, 멀티머화 도메인은 분자의 반감기를 증가시킨다. 2 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드들의 상호반응은 그 자신이 상호반응하여 적절한 구조를 형성할 수 있는 임의의 모이어티 또는 다른 폴리펩타이드에 대한 직접 또는 간접적인 그들의 연결에 의해 쉬워질 수 있다. 예컨대, 멀티머화에 의해 별도로 인코딩된 변이체 CD86 폴리펩타이드 사슬들이 합쳐질 수 있고, 이에 의해 폴리펩타이드들의 멀티머화가 멀티머화 도메인에 의해 매개된다. 전형적으로, 멀티머화 도메인은 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드와 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드 간의 안정한 단백질-단백질 상호반응의 형성을 제공한다.
- [0210] [0217] 별도의 변이체 CD86 폴리펩타이드들의 공동발현으로부터 호모멀티머 또는 헤테로멀티머 폴리펩타이드들이 생성가능하다. 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드들은 같거나 다를 수 있다. 특정 구체예에서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 호모다имер에서 동일하고, 각각은 동일한 멀티머화 도메인에 연결된다. 다른 구체예에서, 헤테로다имер는 상이한 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드들을 연결함으로써 형성될 수 있다. 이러한 구체예에서, 일부 태양에서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 헤테로다имер 형성을 촉진할 수 있는 상이한 멀티머화 도메인에 연결된다.
- [0211] [0218] 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 안정한 단백질-단백질 상호반응을 형성할 수 있는 임의의 것을 함유한다. 멀티머화 도메인은 다음을 통해 상호반응할 수 있다: 면역글로불린 서열(예컨대 Fc 도메인; 예컨대, 국제특허공개 Nos. WO 93/10151 및 WO 2005/063816 US; 미국특허공개 No. 2006/0024298; 미국특허 No. 5,457,035 참조); 류신 지퍼(예컨대 핵 형질 전환 단백질 fos 및 jun 또는 프로토-종양 유전자 c-myc 또는 질소의 일반 제어 (GCN4)로부터)(예컨대, Busch 및 Sassone-Corsi(1990) Trends Genetics, 6:36-40; Gentz 외, (1989) Science, 243:1695-1699 참조); 소수성 영역; 친수성 영역; 또는 호모멀티머 또는 헤테로멀티머의 키메라 분자 사이에 분자간 이황화 결합을 형성하는 유리 티올. 또한, 멀티머화 도메인은 예컨대, 미국특허 No. 5,731,168; 국제특허공개 Nos. WO 98/50431 및 WO 2005/063816; Ridgway et al.(1996) Protein Engineering, 9:617-621에 설명된 바와 같은, 홀(hole)을 포함하는 아미노산 서열에 상보적인 돌기를 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 멀티머화 영역은 입체적 상호반응이 안정적인 상호반응을 촉진할 뿐만 아니라 키메라 모노머의 혼합물로부터 호모다имер보다 헤테로다имер 형성을 더 촉진하도록 조작될 수 있다. 일반적으로, 돌기들(protruberances)은 제1 폴리펩타이드의 계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 구성된다. 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동(compensatory cavities)은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 폴리펩타이드의 계면에 선택적으로 생성된다. 예시적인 멀티머화 도메인에 대하여 후술한다.
- [0212] [0219] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 아무데서나, 그러나 전형적으로는 그의 N-말단 또는 C-말단을 통해 멀티머화 도메인의 N-말단 또는 C-말단에 결합되어 키메라 폴리펩타이드를 형성할 수 있다. 결합은 직접적이거나 또는 링커를 통한 간접적인 것일 수 있다. 키메라 폴리펩타이드는 융합 단백질일 수 있고 또는 공유 또는 비공유 상호반응을 통한 것과 같은 화학적 결합에 의해 형성될 수 있다. 예를 들어, 멀티머화 도메인을 함유하는 키메라 폴리펩타이드 제조시, 변이체 CD86 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 인코딩하는 핵산은 멀티머화 도메인 서열을 인코딩하는 핵산에 직접적으로 또는 간접적으로 또는 선택적으로 링커 도메인을 통해 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 작제물은 변이체 CD86 폴리펩타이드의 C-말단이 멀티머화 도메인의 N-말단에 연

결된 키메라 단백질을 인코딩한다. 일부 경우에서, 어떤 작제물은 변이체 CD86 폴리펩타이드의 N-말단이 멀티머화 도메인의 C-말단에 연결된 키메라 단백질을 인코딩할 수 있다.

[0213] [0220] 폴리펩타이드 멀티머는 동일 또는 상이한 2개의 변이체 CD86 폴리펩타이드들을 멀티머화 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결시킴으로서 생성되는 복수개, 예컨대 2개의 키메라 단백질을 함유한다. 일부 예에서, 멀티머화 도메인이 폴리펩타이드인 경우 멀티머화 도메인 및 변이체 CD86 폴리펩타이드를 인코딩하는 유전자 융합체가 적절한 발현 벡터 내로 삽입된다. 결과적인 키메라 또는 융합 단백질은 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 발현되어 멀티머로 조립될 수 있고 이 멀티머에서 멀티머화 도메인들이 상호반응하여 다가 폴리펩타이드들을 형성한다. 변이체 CD86 폴리펩타이드에 대한 멀티머화 도메인의 화학 결합은 이중기능성 링커를 이용하여 수행가능하다.

[0214] [0221] 결과적인 키메라 폴리펩타이드들, 이를테면 그로부터 형성된 융합 단백질, 및 멀티머들은 예컨대 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼에 대한 친화성 크로마토그래피에 의한 것과 같은 임의의 적절한 방법에 의해 정제될 수 있다. 상이한 폴리펩타이드들을 인코딩하는 2개의 핵산 분자가 세포 내로 형질전환되는 경우, 호모다имер와 헤테로다имер의 형성이 일어난다. 호모다имер 형성에 비해 헤테로다имер 형성이 선호되도록 발현 조건을 조정할 수 있다.

[0215] [0222] 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린으로부터의 Fc 도메인 또는 부분들이다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 면역글로불린 Fc에 부착된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함한다(CD86 vIgD-Fc 융합체라고도 칭하는 "변이체 CD86-Fc 융합체"와 같은 "면역조절 Fc 융합체"를 생성함). 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Fc의 N-말단에 부착된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Fc의 C-말단에 부착된다. 일부 구체예에서, 2 이상의 CD86 변이체 폴리펩타이드들(동일 또는 상이)이 N-말단과 C-말단에 독립적으로 부착된다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 CD86-Fc 변이체 융합체는 상기 섹션 II에 기재된 설명에 따른 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유한다.

[0216] [0223] 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, Fc는 쥐 또는 인간 Fc이다. 일부 구체예에서, Fc는 포유동물 또는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 구체예에서, Fc는 IgG1, 예컨대 인간 IgG1으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 229, 230, 또는 253에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229, 230, 또는 253에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0217] [0224] 일부 구체예에서, Fc 영역은 그의 정상적인 기능 중 하나 이상을 변경(예컨대 감소)시키기 위해 하나 이상의 변형을 함유한다. 일반적으로, Fc 영역은 면역글로불린의 주요 기능인, 항원-결합능에 더해, 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)과 같은 이펙터 기능에 책임이 있다. 또한, Fc 영역 내에 존재하는 FcRn 서열은 생체내에서 FcRn 수용체에 대한 친화성에 의해 생체내 반감기를 증가시킴으로써 혈청 내 IgG 수준을 조절하는 역할을 한다. 일부 구체예에서, 이러한 기능들은 제공된 Fc 융합 단백질들과의 사용을 위해 Fc에서 감소 또는 변경될 수 있다.

[0218] [0225] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본 발명에서 제공된 CD86-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역에 도입되어, Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, Fc 영역 변이체는 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 이펙터 기능을 변경시킬 수 있는 Fc 서열에 대한 변화 또는 돌연변이에는 많은 예가 있다. 예를 들어, WO 00/42072, WO2006019447, WO2012125850, WO2015/107026, US2016/0017041 및 Shields 외 J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)에는 FcR에 대해 증강 또는 저감된 결합을 나타내는 예시적인 Fc 변이체들이 설명되어 있다. 이들 문헌의 내용은 본 명세서에 상세히 참조 병합된다.

[0219] [0226] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 CD86-Fc 융합체는 감소된 이펙터 기능을 나타내는 Fc 영역을 포함하는데, 이로 인해, 생체내에서의 CD86-Fc 변이체 융합체의 반감기가 중요하면서도 특정 이펙터 기능(예컨대 CDC 및 ADCC)은 불필요하거나 해롭기까지 한 적용예에 있어서 바람직한 후보가된다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 수행할 수 있다. CD86-Fc 변이체 융합체가 Fc γ R 결합능을 결여하지만(따라서 ADCC 활성을 결여할 가능성이 높음), FcRn 결합능은 보유한다는 것을 확인하기 위해 예컨대, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하기 위한 1차 세포, NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단구(monocytes)는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상에서의 FcR 발현이 문헌[Ravetch 및 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)의 464 페이지 표 3]에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석법의 비제한적인 예가 미국특허 No. 5,500,362 (예컨대 Hellstrom, I. 외 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 참조) 및 Hellstrom, I 외, Proc. Nat'l

Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 미국특허 No. 5,821,337 (Bruggemann, M. 외, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)참조)에 설명되어 있다. 별법으로 비방사능 분석법도 사용가능하다 (예를 들어, 유세포 분석을 위한 ACT1TM 비방사능 세포독성 분석법 (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; 및 CytoTox 96TM 비방사능 세포독성 분석법 (Promega, Madison, Wis.)). 이러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포들에는 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 내추럴 킬러(NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 이에 더해, 관심 분자의 ADCC 활성은 예컨대 문헌 [Clynes 외Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 설명된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가될 수도 있다. CD86-Fc 변이체 융합체가 C1q에 결합하지 못함으로 해서 CDC 활성을 결여한다는 것을 확인하기 위해 C1q 결합 분석법 역시도 수행가능하다. 예컨대, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA 부분 참조. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수도 있다 (예를 들어, Gazzano-Santoro 외, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. 외, Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M. S. 및 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) 참조). FcRn 결합 및 생체내 소거/반감기 산정 역시도 기술분야의 공지 방법에 의해 수행가능하다 (예컨대, Petkova, S. B. 외, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006) 참조).

[0220] [0227] 이펙터 기능이 감소된 CD86-Fc 변이체 융합체들에는 EU 넘버링에 의한 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329들 중 하나 이상이 치환되어 있는 것들이 포함된다 (미국특허 No. 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체에는 잔기 265 및 297가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, EU 넘버링에 의한 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2 이상이 치환된 Fc 돌연변이체가 포함된다 (미국특허 No. 7,332,581).

[0221] [0228] 일부 구체예에서, CD86-Fv 변이체 융합체의 Fc 영역은 위치 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 및 329 (EU 넘버링에 따름) 중 1 이상의 임의의 아미노산이 천연 Fc 영역에 비해 상이한 아미노산으로 치환되어 있는 Fc 영역을 갖는다. Fc 영역의 이러한 변경은 전술한 변경에 국한되지 않으며, 예를 들어 Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691에 설명된, 탈글리코실화된 사슬 (N297A 및 N297Q), IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, 및 IgG4-L236E 등의 변경; WO 2008/092117에 설명되어 있는 G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R, 및 N325LL328R 등의 변경; 위치 233, 234, 235, 및 237 (EU 넘버링에 의함)에서의 아미노산 삽입; 및 WO 2000/042072에 설명된 위치에서의 변경 등이 포함된다.

[0222] [0229] FcRs에 대해 증강 또는 저감된 결합능을 갖는 어떤 Fc 변이체들이 설명된다 (예컨대, 미국특허 No. 6,737,056; WO 2004/056312, WO2006019447 및 Shields 외, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) 참조.)

[0223] [0230] 일부 구체예에서, 본원에 설명된 바와 같은 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 반감기를 증가시키거나 및/또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 CD86-Fc 변이체 융합체가 제공된다. 반감기가 증가되고 FcRndp 대해 개선된 결합을 나타내는 항체들이 US2005/0014934A1 (Hinton 외) 또는 WO2015107026에 설명되어 있다. 이 항체들은 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 향상시키는 치환이 Fc 영역에 하나 이상 포함되어 있다. 이러한 Fc 변이체에는 Fc 영역 잔기들: EU 넘버링에 의할 때 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상이 치환된, 예컨대 Fc 영역 잔기 434가 치환된 것들이 포함된다 (미국특허 No. 7,371,826).

[0224] [0231] 일부 구체예에서, CD86-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역은 EU 넘버링에 의한 하나 이상의 아미노산 치환 E356D 및 M358L을 포함한다. 일부 구체예에서, CD86-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역은 EU 넘버링에 의한 하나 이상의 아미노산 치환 C220S, C226S, 및/또는 C229S을 포함한다. 일부 구체예에서, CD86 변이체 융합체의 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 치환 R292C 및 V302C을 포함한다. 그 밖의 Fc 영역 변이체에 대하여는 Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 미국특허 No. 5,648,260; 미국특허 No. 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조할 것.

[0225] [0232] 일부 구체예에서, 야생형 IgG1 Fc는 EU 넘버링으로 위치 356 및 358에서 잔기 Glu(E) 및 Met(M)을 함유하는 동종이형(allotype)(예를 들어, f 동종이형)을 갖는 SEQ ID NO: 229에 제시된 Fc일 수 있다. 다른 구체예에서, 야생형 IgG1 Fc는 예컨대 SEQ ID NO: 332에 제시된 것과 같이, 위치 356 및 358에서 Asp(D) 및 Leu(L)를 함유하는 잔기와 같은 인간 G1m1 동종이형의 아미노산을 함유한다. 따라서, 일부 경우에, 본원에 제공된 Fc는 동종이형 G1 m1(예를 들어, 알파 동종이형)의 잔기를 재구성하기 위해 아미노산 치환 E356D 및 M358L을 함유할 수 있다. 일부 태양에서, 야생형 Fc는 이펙터 활성을 감소시키거나 Fc 이펙터 기능에 대해 Fc를 불활성으로 만

들기 위해 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형된다. 예시적인 무이펙터(effectorless) 또는 불활성 돌연변이는 본원에 기재된 것들을 포함한다. 본원에 제공된 작제물의 Fc에 포함될 수 있는 무이펙터 돌연변이 중에는 EU 넘버링에 의한 L234A, L235E 및 G237A가 있다. 일부 구체예에서, 야생형 Fc는 EU 넘버링에 의한 위치 220(C220S)에서 시스테인 잔기를 세린 잔기로 교체하는 것과 같이 하나 이상의 시스테인 잔기의 제거에 의해 추가로 변형된다. 감소된 이펙터 기능을 갖는 예시적인 불활성 Fc 영역은 SEQ ID NO: 333 또는 256 및 SEQ ID NO: 258 또는 230에 제시되어 있으며, 이는 각각 SEQ ID NO: 229 또는 SEQ ID NO: 332에 제시된 동종이형에 기초한다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 작제물에 사용된 Fc 영역은 C-말단 라이신 잔기가 추가로 결합될 수 있다.

[0226] [0233] 일부 구체예에서, 예컨대 미국특허 No. 6,194,551, WO 99/51642, 및 Idusogie 외, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)에 설명된 바와 같이, 감소된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 결과시키는 변경이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0227] [0234] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하되, IgG1, 예컨대 인간 IgG1으로부터 유래된 변이체 Fc 영역을 포함하는, CD86-Fc 변이체 융합체가 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열로부터 유래된다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 229의 넘버링에 의한 경우 N82G(EU 넘버링의 N297G에 대응)인 적어도 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 229의 넘버링에 의한 경우 R77C 또는 V87C(EU 넘버링의 R292C 또는 V302C에 대응)인 적어도 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 SEQ ID NO: 254에 제시된 Fc 영역처럼, SEQ ID NO: 229의 넘버링에 의한 경우 C5S 아미노산 변형(EU 넘버링의 C220S에 대응)을 함유한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 다음의 아미노산 변형을 포함한다: EU 넘버링에 의한 다음의 아미노산 변형 C220S, R292C 또는 V302C 중 한 가지 이상 및 V297G (SEQ ID NO: 229를 참조시 다음의 아미노산 변형 C5S, R77C 또는 V87C 중 한 가지 이상 및 N82G에 대응), 예컨대, Fc 영역은 SEQ ID NO: 255에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 변형 C220S, L234A, L235E 또는 G237A 중 하나 이상을 포함하고, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO: 256에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 변형 C220S, L235P, L234V, L235A, G236del 또는 S267K 중 하나 이상을 포함하고, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO: 257에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc는 아미노산 변형 C220S, L234A, L235E, G237A, E356D 또는 M358L 중 하나 이상을 포함하고, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO: 258에 제시된 서열을 포함한다.

[0228] [0235] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 CD86-Fc 변이체 융합체는 전술한 섹션 II에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역에 연결된 전술한 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 CD86-Fc 변이체 융합체가 제공되며, 여기서 변이체 Fc 영역은 돌연변이 R292C, N297G 및 V302C (SEQ ID NO: 229에 제시된 야생형 인간 IgG1 Fc를 참조로 R77C, N82G 및 V87C에 대응)를 함유하는 인간 IgG1 Fc가 아니다. 일부 구체예에서, Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드 중 어느 하나를 포함하는 CD86-Fc 변이체 융합체가 제공되며 여기서 상기 변이체 CD86 폴리펩타이드는 3개의 알라닌으로 구성된 링커에 의해 Fc에 연결되지 않는다.

[0229] [0236] 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO: 229에 제시된 야생형 또는 비변형 Fc의 위치 232에 대응하는 C-말단 라이신을 결여한다(EU 넘버링의 K447del에 대응). 일부 태양에서, 이러한 Fc 영역은 전술한 바와 같은 아미노산 치환과 같은 부가적인 변형을 하나 이상 더 포함할 수 있다. 이러한 Fc 영역의 예는 SEQ ID NO: 255-257, 258 또는 259-261에 제시되어 있다.

[0230] [0237] 일부 구체예에서, SEQ ID NOS: 255, 258, 256, 257, 254, 또는 259-261 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NOS: 255, 258, 256, 257, 254, 또는 259-261 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Fc를 포함하는 CD86-Fc 변이체 융합체가 제공된다.

[0231] [0238] 일부 구체예에서, Fc는 IgG2, 예컨대 인간 IgG2로부터 유래한다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 262에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 262에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0232] [0239] 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 263에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 263에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, IgG4 Fc는 인간 IgG4의 CH3 도메인이 인간 IgG1의 CH3 도메인으로 치환되고 억제된 응집체 형성을 나타내는 안정화된 Fc, 인간 IgG4의 CH3 및 CH2 도메인이 인간 IgG1의 CH3 및 CH2 도메인으로 각각 치환되어 있는 항체, 또는 Kabat 등에 의해 제안된 EU 인덱스로 표시할 경우 위치 409의

아르기닌이 리신으로 치환되고 억제된 응집체 형성을 나타내는 항체이다 (예컨대 미국특허 No. 8,911,726 참조). 일부 구체예에서, Fc는 Fab-아암(Fab-arm) 교환에 의해 내인성 IgG4와 치료용 항체 간의 재조합을 방지하는 것으로 나타난, S228P 돌연변이를 함유하는 IgG4이다(예컨대 Labrijin 외 (2009) Nat. Biotechnol., 27(8)767-71 참조). 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 264에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO: 264에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0233] [0240] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커를 경유하는 등에 의해 Fc 서열에 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 "펩타이드 링커들"이 변이체 CD86 폴리펩타이드와 Fc 도메인을 연결한다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 단일 아미노산 잔기이거나 또는 더 긴 길이일 수 있다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖지만 그 길이는 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 아미노산 잔기 이하이다. 일부 구체예에서, 링커는 가요성(flexible) 링커이다. 일부 구체예에서, 링커는 (1-문자 아미노산 코드로 표시할 경우): GGGGS ("4GS" 또는 "G₄S"; SEQ ID NO: 223) 또는 4GS 링커의 멀티머, 예컨대 2, 3, 4, 또는 5 4GS 링커, 이를테면 2, 3, 4, 또는 5 4GS 링커의 반복, 이를테면 SEQ ID NO: 225 (2xGGGGS: (G₄S)₂) 또는 SEQ ID NO: 224(3xGGGGS); (G₄S)₃)에 제시된 것이다. 일부 구체예에서, 링커는 또한 알라닌 잔기의 시리즈를 단독으로 또는 다른 펩타이드 링커(이를테면 4GS 링커 또는 그 의 멀티머)에 더해 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 각 시리즈의 알라닌 잔기 개수는: 2, 3, 4, 5, 또는 6 알라닌이다. 일부 구체예에서, 링커는 3개의 알라닌이다(AAA). 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커를 통해 Fc 서열에 간접 연결되며 여기서 상기 링커는 3개의 알라닌으로 구성되지 않는다. 일부 예에서, 링커는 3개의 알라닌이 후행하는 2xGGGGS이다 (GGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 226). 일부 구체예에서, 링커는 클로닝에 의해 도입된 아미노산 및/또는 제한 부위로부터의 아미노산을 더 포함할 수 있고, 예컨대 링커는 제한 효소 자리 BAMHI를 사용하여 도입된 아미노산 GS(1-문자 아미노산 코드로 표시할 경우)를 포함할 수 있다. 예컨대, 일부 구체예에서, 링커(1-문자 아미노산 코드로 표시할 경우)는 GSGGGGS(SEQ ID NO: 222), GS(G₄S)₃(SEQ ID NO: 227), 또는 GS(G₄S)₅(SEQ ID NO: 228)이다. 일부 경우에서, 링커는 경성(rigid) 링커이다. 예컨대, 링커는 α-나선형 링커이다. 일부 구체예에서, 링커는 (1문자 아미노산 코드로): EAAAK 또는 EAAAK 링커의 멀티머이며 예컨대 SEQ ID NO: 265 (1xEAAAK), SEQ ID NO: 266 (3xEAAAK), 또는 SEQ ID NO: 247 (5xEAAAK)에 제시된 바와 같은, EAAAK 링커의 2, 3, 4, 또는 5개 반복체일 수 있다. 일부 경우에서, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 펩타이드 링커들의 다양한 조합을 포함한다.

[0234] [0241] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Fc 서열에 직접 연결된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 Fc, 이를테면 힌지 영역의 전부 또는 일부가 부가적으로 결여된 불활성 Fc에 직접 연결된다. 힌지 영역의 일부 (6 아미노산)를 결여하는 예시적인 Fc가 SEQ ID NO: 267에 제시되어 있다.

[0235] [0242] CD86 폴리펩타이드가 Fc 서열에 직접 연결되는 일부 구체예에서, CD86 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 그 이상의 아미노산에 의해 C-말단에서 절단(truncated)될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 IgV 영역과 IgC 영역을 연결하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산을 제거하기 위해 절단된다.

[0236] [0243] 일부 구체예에서, 변이체 CD86-Fc 융합 단백질은 Fc 도메인에 연결된 2개의 변이체 CD86 Fc 폴리펩타이드들에 의해 형성되는 다이머이다. 일부 특정 구체예에서, 동일하거나 실질적으로 동일한 (3개 이하의 N-말단 또는 C-말단 아미노산 서열 차이를 허용함) CD86-Fc 변이체 융합 폴리펩타이드 종들을 다이머화하여 호모다이머를 생성할 수 있다. 일부 구체예에서, 다이머는 그의 2개의 변이체 CD86 Fc 폴리펩타이드들이 동일한 호모다이머이다. 별법으로, 상이한 종의 CD86-Fc 변이체 융합 폴리펩타이드들을 다이머화하여 헤테로다이머를 수득할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 다이머는 2개의 변이체 CD86 Fc 폴리펩타이드들이 서로 상이한 헤테로다이머이다.

[0237] [0244] 변이체 CD86-Fc 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자도 제공된다. 일부 구체예에서, Fc 융합 단백질의 생산을 위해, 변이체 CD86-Fc 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자가 적절한 발현 벡터에 삽입된다. 결과적인 변이체 CD86-Fc 융합 단백질은, Fc 도메인들 간의 어셈블리가 Fc 모이어티들 간에 형성된 사슬간 다이설파이드 결합에 의해 일어나, 다이머, 예컨대 2개의 변이체 CD86-Fc 융합 단백질가 형성되는 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포에서 발현될 수 있다.

[0238] [0245] 결과적인 Fc 융합 단백질은 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼에 대해 친화성 크로마토그래피에 의해 쉽게 정

제가능하다. 헤테로다имер 생성을 위해서는 부가적인 정제 단계가 필요할 수 있다. 예를 들어, 상이한 변이체 CD86 폴리펩타이드들을 인코딩하는 2개의 핵산을 세포에 형질전환되는 경우, 헤테로다имер의 형성은 생화학적으로 달성되어야 하는데 이는 Fc-도메인을 갖는 변이체 CD86 분자가 다이설파이드-연결된 호모다имер로서도 발현될 것이기 때문이다. 그러므로, 호모다имер은 사슬간 다이설파이드의 파괴를 선호하지만 사슬내 다이설파이드에는 아무런 영향을 미치지 않는 조건 하에서 감소될 수 있다. 일부 경우에서, 상이한 변이체-CD86 Fc 모노머들을 동 몰량으로 혼합 및 산화시켜 호모다имер과 헤테로다имер의 혼합물을 형성한다. 이 혼합물의 성분들을 크로마토그래피 기술에 의해 분리한다. 별법으로, 이러한 유형의 헤테로다имер 형성은 유전자 조작 및 후술되는 knob-into-hole(knob-into-hole) 방법을 이용하여, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 Fc 용합 분자를 유전자 조작 및 발현함으로써 우회될 수 있다.

[0239] **C. 부가적인 IgSF 도메인을 갖는 적층 분자들(stack molecules)**

[0240] [0246] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질들은 하나 이상의 다른 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된, 본 발명에서 제공된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유할 수 있다 ("적층된 (stacked)" 면역조절 단백질 구조물 및 "II형" 면역조절 단백질이라고도 칭함). 일부 태양에서, 이것은 2 이상, 예컨대 3 이상의 동족 결합 파트너와 결합함으로써 면역 시냅스의 멀티-표적화 조절을 제공하는 독특한 멀티-도메인 면역조절 단백질을 만들 수 있다.

[0241] [0247] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 야생형 IgSF 패밀리의 멤버에서는 발견되지 않는 또 다른 IgSF 패밀리의 멤버(예컨대 포유동물 IgSF 패밀리의 멤버)의 하나 이상의 다른 친화성 변형된 및/또는 비-친화성 변형된 IgSF 도메인 서열의 조합("비-야생형 조합") 및/또는 배열 ("비-야생형 배열" 또는 "비-야생형 순열")을 포함한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 2, 3, 4, 5 또는 6개의 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 도메인을 포함하며, 여기서 IgSF 도메인 중 적어도 하나는 본 발명에 따른 변이체 CD86 IgSF 도메인 (CD86의 vIgD)이다.

[0242] [0248] 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인의 서열은 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인에 비해, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 함유하는 변형된 IgSF 도메인일 수 있다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인은 비-친화성 변형된 (예컨대, 야생형) 것이거나 또는 친화성 변형된 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인은 마우스, 래트, 시노물구스 원숭이, 또는 인간 유래, 또는 이의 조합으로부터 유래할 수 있다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 표 2에 제시된 IgSF 패밀리의 멤버의 IgSF 도메인일 수 있다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 표 2에 제시된 IgSF 패밀리의 멤버에 함유된 IgSF 도메인에 비해, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 함유하는 친화성-변형된 IgSF 도메인일 수 있다.

[0243] [0249] 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 시그널-조절 단백질(SIRP) 패밀리의 골수세포 상에 발현된 촉발 수용체 유사(TREML) 패밀리의, 암배아 항원-관련 세포 부착 분자(CEACAM) 패밀리의, 시알산 결합 Ig-유사 렉틴(SIGLEC) 패밀리의, 부티로필린 패밀리의, B7 패밀리의, CD28 패밀리의, V-set 및 면역글로불린 도메인 함유(VSIG) 패밀리의, V-set 막관통 도메인(VSTM) 패밀리의, 주요조직적합 복합체 (MHC) 패밀리의, 시그널링 림프구 활성화 분자(SLAM) 패밀리의, 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 (LIR), 넥틴 (Nec) 패밀리의, 넥틴-유사 (NECL) 패밀리의, 폴리오바이러스 수용체 관련 (PVR) 패밀리의, 내추럴 세포독성 촉발 수용체 (NCR) 패밀리의, T 세포 면역글로불린 및 뮤신(TIM) 패밀리의 또는 킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR) 패밀리로 부터 선택된 패밀리의 IgSF 패밀리의 멤버에 함유된 친화성 또는 비-친화성 변형된 IgSF 도메인이다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD274 (PD-L1, B7-H1), PDCD1LG2(PD-L2, CD273), ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2), CD276(B7-H3), VTCN1(B7-H4), CD28, CTLA-4, PDCD1(PD-1), ICOS, BTLA(CD272), CD4, CD8A(CD8-알파), CD8B(CD8-베타), LAG3, HAVCR2(TIM-3), CEACAM1, TIGIT, PVR(CD155), PVRL2(CD112), CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R1(CD200R), 및 NC R3 (NKp30)로 이루어진 군으로부터 선택된 IgSF 단백질로부터 독립적으로 유래한다.

[0244] [0250] 표 2의 첫 번째 열은 명칭 및 선택적으로 그 특정 IgSF 멤버에 대한 가능한 어떤 동의어의 명칭을 나타낸다. 두 번째 열은 uniprot.org에서 인터넷을 통해 접근가능한 공개적으로 이용가능한 데이터베이스인 UniProtKB 데이터베이스의 단백질 동정자, 또는, 일부 경우 GenBank Number를 나타낸다. Universal Protein Resource (UniProt)는 단백질 서열 및 주석이 달린 데이터의 포괄적인 리소스이다. UniProt 데이터베이스는 UniProt Knowledgebase (UniProtKB)를 포함한다. UniProt은 UniProt은 유럽 생물 정보학 연구소 (EMBL-EBI), SIB 스위스 생물 정보학 연구소 및 PIR (Protein Information Resource) 간의 공동 작업으로 미국 국립 보건원 (NIH)의 보조금으로 주로 지원되고 있다. GenBank는 공개적으로 이용 가능한 모든 DNA 서열의 주석이 달린 컬렉션인 NIH 유전자 서열 데이터베이스이다 (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1):D36-42). 세 번째 열은

표시된 IgSF 도메인이있는 영역을 나타낸다. 이 영역은 도메인이 범위를 정의하는 잔기를 포함하는 범위로 지정된다. 컬럼 3은 지정된 IgSF 영역에 대한 IgSF 도메인 클래스를 나타내기도 한다. 컬럼 4는 표시된 추가 도메인이 있는 영역을 나타낸다. (시그널 펩타이드, S; 세포외 도메인, E; 막관통 도메인, T; 세포질 도메인, C). 도메인의 설명은 도메인을 식별하거나 분류하는데 사용되는 방법에 따라 달라질 수 있으며, 서로 다른 출처와 다르게 식별될 수 있다. 표 2의 도메인에 상응하는 잔기에 대한 설명은 단지 예시를 위한 것이며 수 개의 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3 또는 4개)만큼 길거나 짧을 수 있다. 컬럼 6는 나열된 IgSF 멤버 중 일부에 대해 그의 동종 세포 표면 결합 파트너 중 일부를 나타낸다.

표 2. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.							
IgSF 멤버 (동의어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 클래스	다른 도메인	동종 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙한 잔기)	성숙	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1 P33681	35-135, 35-138, 37-138, 또는 35-141 IgV, 145-230 또는 154-232 IgC	S: 1-34, E: 35-242, T: 243-263, C: 264-288	CD28, CTLA4, PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 28
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV, 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268, C: 269-329	CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1 NP_054862.1	24-130 또는 19-127 IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259, C: 260-290	PD-1, B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 30
PDCD1LG2 (PD-L2, CD273)	Q9BQ51.2	21-118 IgV, 122-203 IgC2	S: 1-19, E: 20-220, T: 221-241, C: 242-273	PD-1, RGMb	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 31
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 32

[0245]

표 2. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.							
IgSF 멤버 (동위어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 클래스	다른 도메인	동족 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙한 잔기)	성숙	ECD
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV2, 363-456, 367- 453 IgC2	S: 1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280, C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-152, T: 153-179, C: 180-220	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 8 (19-220)	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 35
CTLA-4	P16410.3	39-140 IgV	S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182, C: 183-223	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 36
PDCD1 (PD-1)	Q15116.3	35-145 IgV	S: 1-20, E: 21-170, T: 171-191, C: 192-288	PD-L1, PD-L2	SEQ ID NO: 10 (21-288)	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 37
ICOS	Q9Y6W8. 1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21-140, T: 141-161, C: 162-199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 38

[0246]

표 2. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.							
IgSF 멤버 (동의어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 클래스	다른 도메인	동족 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙한 광기)	성숙	ECD
BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31-157, T: 158-178, C: 179-289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203 IgC2, 204-317 IgC2, 317-389, 318- 374 IgC2	S: 1-25, E: 26-396, T: 397-418, C: 419-458	MHC 클래스 II	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8-alpha)	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203, C: 204-235	MHC 클래스 I	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8-beta)	P10966.1	22-132 IgV	S: 1-21, E: 22-170, T: 171-191, C: 192-210	MHC 클래스 I	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 42
LAG3	P18627.5	37-167 IgV, 168-252 IgC2, 265-343 IgC2, 349-419 IgC2	S: 1-28, E: 29-450, T: 451-471, C: 472-525	MHC 클래스 II	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 43
HAVCR2 (TIM-3)	Q8TDQ0.3	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-202, T: 203-223, C: 224-301	CEACAM-1, phosphatidylser- ine, Galectin-9, HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 44

[0247]

표 2. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.							
IgSF 멤버 (동의어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 클래스	다른 도메인	동족 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙한 장기)	성숙	ECD
CEACAM1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232 IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC2	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 45
TIGIT	Q495A1.1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162, C: 163-244	CD155, CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 46
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV, 145-237 IgC2, 244-328 IgC2	S: 1-20, E: 21-343, T: 344-367, C: 368-417	TIGIT, CD226, CD96, poliovirus	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256 IgC2, 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381, C: 382-538	TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 48
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336	CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 49
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235, C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 50
CD160	O95971.1	27-122 IgV	N/A	HVEM, MHC 패밀리 of 단백질	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 51

[0248]

표 2. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.							
IgSF 멤버 (동위어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 플래스	다른 도메인	동족 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙한 장기)	성숙	ECD
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259, C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 52
CD200R1 (CD200R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264, C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 53
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC- like	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156, C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO:27 (19-201)	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 54
VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV1, 146-257 IgV2	S: 1-21 E: 22-263 T: 264-284 C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 82 (22-414)	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84

[0249]

[0250]

[0251] "적층된(stacked)" 면역조절 단백질 구조물 (비-야생형 조합이건 또는 비-야생형 배열이건)에 존재하는 이러한 비-친화성 변형된 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 수는 적어도 2, 3, 4, 또는 5개이고 일부 구체예에서는 정확히 2, 3, 4, 또는 5개의 IgSF 도메인이다 (이로써 친화성 변형된 IgSF 도메인의 수의 측정은 그의 비특이적 결합 분획 서열 및/또는 그의 실질적으로 면역학적으로 불활성인 분획 서열을 무시한다).

[0251]

[0252] 본원에서 제공된 적층형 면역조절 단백질의 일부 구체예에서, 변형된 친화성의 수 및 비-친화성 변형된 IgSF 도메인의 수는 각각 독립적으로 적어도: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 따라서, 친화성 변형된 IgSF 도메인의 수 및 비-친화성 변형된 IgSF 도메인의 수 (친화성 변형된 IgSF 도메인: 비-친화성 변형된 IgSF 도메인)는 정확하게 또는 적어도 2 : 0 (친화성 변형된 것: 야생형), 0:2, 2:1, 1:2, 2:2, 2:3, 3:2, 2:4, 4:2, 1:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 1:5, 또는 5:1이다.

[0252]

[0253] 적층된 면역조절 단백질의 일부 구체예에서, 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인들 중 적어도 2개는 동일한 IgSF 도메인이다.

[0253]

[0254] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 적층된 면역조절 단백질은 단일 IgSF 멤버로부터 유래하지만 비-야생형 배열 (대안적으로, "순열")인 적어도 2개의 친화성 변형된 및/또는 비-친화성 변형된 IgSF 도메인을 포함한다. 비 야생형 배열 또는 순열의 하나의 예시는 그 IgSF 도메인 서열이 본원에서 제공된 바와 같은 변이체 IgSF 도메인의 공급원으로 사용된 것인 야생형 CD86에서 발견되는 것들에 상대적으로 친화성 변형된 및/또는 비-친화성 변형된 IgSF 도메인 서열의 비-야생형 차수를 포함하는 면역조절 단백질이다. 따라서, 일례에서, 면역조절 단백질은 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 형태임에도 불구하고 막관통 도메인에 대해 근위(proximal)인 IgV 및 원위(distal)인 IgC를 포함할 수 있다. 본원에서 제공된 면역조절 단백질에서, 비친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 비-야생형 조합 및 비-야생형 배열 두 가지 모두의 존재 역시도 본 발명의 보호범위 내이다.

[0254]

[0255] 적층된 면역조절 단백질의 일부 구체예에서, 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인은 비-동일 (즉, 상이한) IgSF 도메인이다. 비-동일한 친화성 변형된 IgSF 도메인들은 특이적 결합 조건 하에서 상이한 동족 결합 파트너들과 결합하며 이들이 조작된 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인이 동일하였던 것인지와 무관하게 "비-동일"하다. 그러므로, 예를 들어, 면역조절 단백질 내 적어도 두 개의 비-동일 IgSF 도메인의 비-야생형 조합은 그의 기원이 하나 이상의 CD86으로부터 유래하고 유일한 적어도 하나의 IgSF 도메인 서열 및 그 기원이 CD86이 아닌 다른 IgSF 패밀리 멤버로부터 유래하고 유일한 것인 적어도 하나의 제2 IgSF 도메인 서열을 포함하며, 여기서 면역조절 단백질의 IgSF 도메인은 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 형태이다. 그러나, 대안적인 구체예에서, 2개의 비-동일 IgSF 도메인은 동일한 IgSF 도메인 서열로부터 유래하지만, 적어도 하나는

상이한 동족 결합 파트너에 특이적으로 결합하도록 친화성 변형된 것이다.

[0255]

[0256] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 변이체 PD-L2 폴리펩타이드를 함유하는 것에 더해, 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개의 부가적인 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 도메인들, 예컨대 표 2에 제시된 IgSF 패밀리 멤버의 IgD 도메인을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 하나 이상의 추가 IgSF 도메인 (예를 들어, 제2 IgSF 도메인)을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 2개의 추가의 IgSF 도메인 (예를 들어, 제2 및 제3 IgSF 도메인)을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 3개의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2, 제3 및 제4)을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 4개의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2, 제3, 제4 및 제5)을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 5개의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6)을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 6개의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7)을 함유한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질 내의 각각의 IgSF 도메인은 서로 상이하다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인 중 적어도 하나는 면역조절 단백질 내의 적어도 하나의 다른 IgSF 도메인과 동일하다. 일부 구체예에서, 각각의 IgSF 도메인들은 상이한 IgSF 패밀리 멤버로부터 유래하거나 그로부터의 것이다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인 중 적어도 두 개는 동일한 IgSF 패밀리 멤버로부터의 것이거나 그로부터 유래한다.

[0256]

[0257] 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 IgV 도메인 또는 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들, 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편 또는 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 전장 IgV 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 전장 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 IgV 도메인의 특이적 결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인은 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들 특이적 결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 단일의(동일) IgSF 멤버로부터의 적어도 2개의 부가적인 IgSF 도메인을 함유한다. 예컨대, 일부 태양에서, 면역조절 단백질은 전장 IgV 도메인 및 전장 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들 또는 그의 특이적 결합 단편들을 함유하는 IgSF 멤버의 ECD 또는 그의 일부분을 함유한다. 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 하나의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2 또는 경우에 따라, 제3 IgSF 도메인)을 함유하되 여기서 적어도 하나의 부가적인, 또는 제2 IgSF 도메인은 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인에 제시된 IgSF 도메인이거나 또는 SEQ ID NOS: 1-27 및 240 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 함유된 그의 특이적 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인은 IgV 도메인 또는 IgC 도메인, 이를테면 IgC1 또는 IgC2 도메인이다.

[0257]

[0258] 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 적어도 하나의 부가적인 IgSF 도메인(예컨대 제2 또는 경우에 따라, 제3 IgSF 도메인 등등)을 함유하되 여기서 적어도 하나의 부가적인, 또는 제2 IgSF 도메인은 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인에 제시된 IgSF 도메인이거나 또는 SEQ ID NOS: 2-27 및 82 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 함유된 그의 특이적 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인은 IgV 도메인 또는 IgC 도메인, 이를테면 IgC1 또는 IgC2 도메인이다.

[0258]

[0259] 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은, 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 것에 더해, 적어도 하나의 부가적인 친화성-변형된 IgSF 도메인(예컨대 제2 또는 경우에 따라 제3의 친화성-변형된 IgSF 도메인 등등)도 함유하는데 여기서 적어도 하나의 부가적인 IgSF 도메인은 표 2에 제시된 IgSF 패밀리 멤버의 IgSF 도메인과 같은, 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인 내 IgSF 도메인과 비교시, 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대 치환, 결실 또는 돌연변이)를 함유하는 vIgD이다. 일부 구체예에서, 상기 부가적인 예컨대, 제2 또는 제3의, 친화성-변형된 IgSF 도메인은 SEQ ID NOS: 2-27 및 82 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 함유된 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 IgSF 도메인은 IgV 도메인 또는 IgC 도메인, 이를테면 IgC1 또는 IgC2 도메인이다. 일부 구체예에서, 부가적인, 예컨대, 또는 제2 또는 제3의 IgSF 도메인은 친화성-변형된 IgV 도메인 및/또는 IgC 도메인이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인은 IgV 도메인 및/또는 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들, 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편 및/또는 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들의 특이적 결합 단편을 함유하는 친화성-변형된 IgSF 도메인으로, 여기서 상기 IgV 및/또는 IgC 도메인은 아미노산 변형(들)(예컨대, 치환(들))을 함유한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 부가적인 친화성-변형된 IgSF 도메인은 아미노산 변형(들)(예컨대 치환(들))을 함유하는 IgV 도메인을 함유한다. 일부 구체예에서, 하나

이상의 부가적인 친화성-변형된 IgSF 도메인은 전장 IgV 도메인 및 전장 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들, 또는 이들의 특이적 결합 단편과 같은, 대응하는 비변형 IgSF 패밀리 멤버의 ECD 또는 ECD의 일부분에 존재하는 IgSF 도메인을 포함한다.

[0259] [0260] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질은 야생형의 IgSF 도메인(예컨대 IgV) 또는 CD86을 제외한 비변형 IgSF 도메인에 비해, 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하는 vIgD인 적어도 하나의 부가적인 또는 제2의 IgSF 도메인(등등) IgSF 도메인을 함유한다.

[0260] [0261] 변이체 CD86의 적어도 하나의 IgSF 도메인 및 하나 이상의 제2 또는 추가 IgSF 도메인을 함유하는 적층 분자 면역조절 단백질은 섹션 III.C.3에 기재된 바와 같은 다양한 작제물 형식으로 제공될 수 있다. 작제물의 비제한적인 예가 하기에 제시되어 있다.

[0261] 1. PD-1 IgSF 도메인

[0262] 일부 구체예에서, 적어도 하나의 추가(예를 들어, 제2 또는 제3) vIgD는 비변형 또는 야생형 PD-1과 비교하여 IgSF 도메인(예: IgV)에 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들어, 치환, 결실 또는 추가)을 함유하는 변이체 PD-1 폴리펩타이드의 IgSF 도메인(예를 들어, IgV)이다. 일부 구체예에서, PD-1의 IgSF 도메인은 IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, IgD는 전체 세포의 도메인(ECD), 또는 PD-1의 Ig 도메인의 임의의 조합을 포함하는 IgV 단독일 수 있다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열 또는 시그널 서열을 결여하는 그의 성숙한 형태, (ii) SEQ ID NO: 10에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 성숙한 형태를 갖거나, 또는 (iii) IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 (i) 또는 (ii)의 일부이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 has (i) SEQ ID NO: 37에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 37에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 (iii) IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 (i) 또는 (ii)의 일부이다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 37, 335, 336, 또는 337, 또는 그의 특이적 결합 단편에 대해 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NOs: 37, 335, 336, 또는 337 중 어느 하나에 제시된 서열을 갖는다.

[0263] 일부 구체예에서, PD-1의 IgSF 도메인은 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인(예를 들어, IgV 또는 IgC)을 함유하는 변이체 PD-1 폴리펩타이드이거나, 또는 그의 특이적 결합 단편은 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 함유된 IgSF 도메인으로서, 상기 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드와 비교시 PD-L1 또는 PD-L2에 대해 변경된(증가 또는 감소된) 결합 활성 또는 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 함유된 IgSF 도메인에 비해 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인(예컨대, IgV)을 포함하는 변이체 PD-1 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편 예컨대 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드와 비교시 하나 이상의 리간드 PD-L1 또는 PD-L2에 대해 변경된(증가 또는 감소된) 결합 활성 또는 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 예컨대 고체상 ELISA 면역분석, 유세포 분석, ForteBio Octet 또는 Biacore 분석에 의해 결정되는 바와 같이, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드 대조군 서열의 것과 상이한 PD-L1 및/또는 PD-L2에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 PD-L1 및/또는 PD-L2에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-L1 폴리펩타이드에 비해, PD-L2에 대해 감소된 결합 친화성을 갖는다. PD-L1 및/또는 PD-L2는 포유동물 단백질, 예컨대 인간 단백질 또는 쥐의 단백질일 수 있다.

[0264] 동족 결합 파트너 각각에 대한 결합 친화성은 독립적이다; 즉, 일부 구체예에서 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해, PD-L1 및/또는 PD-L2 중 하나 또는 둘 모두에 대해 증가된 결합 친화성, 및 PD-L1 및 PD-L2 중 하나 또는 둘 모두에 대해 감소된 결합 친화성을 갖는다.

[0265] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L1에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-L1 폴리펩타이드에 비해 PD-L2에 대해 증가되거나 감소된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L1에 대해 증가된 결합 친화성을 갖고 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L2에 대해 감소된 결합 친화성을 갖는다.

- [0266] 일부 구체예에서, PD-L1 및/또는 PD-L2에 대해 증가되거나 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드 대조군에 비해, PD-L1 및/또는 PD-L2에 대해 적어도 약 5%, 예컨대 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 또는 50%의 결합 친화성 증가를 가질 것이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드와 비교한 결합 친화성의 증가는 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 40배 또는 50배 초과이다. 이러한 예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 치환)을 함유하지 않는다는 점을 제외하고는 변이체 PD-1 폴리펩타이드와 동일한 서열을 갖는다.
- [0267] 일부 구체예에서, PD-L2에 대해 저감 또는 감소된 결합 친화성을 갖는 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드 대조군에 비해, PD-L2에 대해 적어도 5%, 예컨대 적어도 약 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 결합 친화성 감소를 가질 것이다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드와 비교한 결합 친화성 감소는 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 40배 또는 50배를 초과한다. 이러한 예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 치환)을 함유하지 않는다는 점을 제외하고는 변이체 PD-1 폴리펩타이드와 동일한 서열을 갖는다.
- [0268] PD-L1 및/또는 PD-L2는 포유동물 단백질, 예컨대 인간 단백질 또는 쥐의 단백질일 수 있다. 일부 구체예에서, PD-L1은 인간 단백질이다. 일부 구체예에서, PD-L2는 인간 단백질이다.
- [0269] 일부 구체예에서, PD-L1 및/또는 PD-L2에 대한 임의의 전술한 구체예의 평형 해리 상수(K_d)는 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M, 또는 1×10^{-12} M 이하일 수 있다.
- [0270] 야생형 또는 비변형 PD-L1 서열이 반드시 본 명세서에 개시된 변이체 CD86 폴리펩타이드 제조를 위한 출발 조성물로서 사용될 필요는 없다. 그러므로, "치환"과 같은 "변형"이라는 용어의 사용은 본 발명의 구체예가 변이체 PD-L1 폴리펩타이드의 특정 제조방법으로 한정됨을 시사하는 것은 아니다. 변이체 PD-L1 폴리펩타이드는 예를 들어, 드 노보 펩타이드 합성에 의해 만들어질 수 있고 따라서 그 치환을 인코딩하기 위해 코돈을 변경시키는 의미의 변형, 예컨대 "치환"이 반드시 요구되지 않는다. 이 원리는 아미노산 잔기의 "부가" 및 "결실" 등의 용어에도 적용되며 마찬가지로 특정 제조 방법을 시사하는 것이 아니다. 변이체 PD-L1 폴리펩타이드가 설계 또는 생성되는 수단은 어떤 특정한 방법으로 한정되지 않는다. 그러나 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-L1 인코딩 핵산은 야생형 또는 비변형 PD-L1 유전자 물질로부터 돌연변이되어 소망되는 특이적 결합 친화성 및/또는 IFN- γ 발현 또는 기타 활성의 유도에 대해 스크리닝된다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-L1 폴리펩타이드는 임의의 수의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 이용 가능한 단백질 또는 핵산 서열을 이용하여 새롭게 합성된 다음 스크리닝된다. National Center for Biotechnology Information은 그러한 정보를 제공하며, 그의 웹 사이트는 전술한 바와 같이 UniProtKB 데이터베이스와 마찬가지로 인터넷을 통해 공개적으로 액세스할 수 있다.
- [0271] 달리 언급되지 않는 한, 본 개시내용 전체에 걸쳐 개시되는 바와 같이, 아미노산 치환(들)은 SEQ ID NO: 37에 제시된 비변형 ECD 서열 또는 적용 가능한 경우, SEQ ID NO: 10의 잔기 35-145를 함유하는 비변형 IgV 서열의 위치의 넘버링에 상응하는 아미노산 위치 넘버로 지정된다.
- [0272] 본원에서 제공되는 변형은 SEQ ID NO: 37에 제시된 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드 또는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 함유하는 이의 일부에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 335에 제시된 PD-1의 IgV를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 335에 제시된 아미노산 서열에 비해 수 개, 예컨대 1-15개, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개 아미노산 만큼 더 길거나 더 짧을 수 있는 IgV를 함유한다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 37, 335, 336, 또는 337에 대해 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 37에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 335에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 336에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 337에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 비변형 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 339에 제시된 서열을 갖는다.
- [0273] 이를테면 레퍼런스 서열을 SEQ ID NO: 37과 정렬시킴으로써, IgSF 도메인 (예컨대 IgV)을 함유하는 그의 일부를 비롯한 PD-L1 폴리펩타이드의 아미노산 치환과 같은 변형의 상응하는 위치를 동정하는 것은 당업자의 통

상 기술 수준 범위 내이다. 예컨대, 정렬 후, SEQ ID NO: 37의 잔기 112는 SEQ ID NO: 336의 잔기 107에 상응한다.

[0274] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 서열에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, 야생형 또는 비변형 PD-1 서열의 엑토도메인 (세포외 도메인)에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 존재한다.

[0275] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 변형 (예컨대 치환)은 IgV 도메인에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편에 대해, 예컨대 SEQ ID NO: 37, 335, 336, 337, 또는 339의 아미노산 서열에 대해 100% 미만의 서열 동일성 및 적어도 약 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0276] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 비변형 PD-1 또는 그의 특이적 결합 단편에서 SEQ ID NO: 37에 제시된 위치를 참조로 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 100, 102, 104, 105, 107, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 119, 120, 125, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 또는 144에 상응하는 위치(들)에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 이러한 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L1 및/또는 PD-L2 중 하나 이상에 대해 변경된 결합 친화성을 나타낸다. 예컨대, 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L1 및/또는 PD-L2에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 PD-1 폴리펩타이드에 비해 PD-L1 또는 PD-L2에 대해 감소된 결합 친화성을 나타낸다.

[0277] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 P8T, D9E, D9G, D9N, D9V, P11A, W12G, W12L, W12R, N13D, N13S, N13Y, P14H, P14L, P14S, T16A, T16I, T16S, F17I, F17L, F17V, F17Y, S18T, A20S, A20T, A20V, L21V, L22I, V23E, V23G, V24L, T25A, D28E, N29D, N29S, A30V, T31I, T31N, T31S, T33I, C34Y, S35N, F36I, F36L, F36Y, S37P, S37T, N38D, N38S, N38T, T39A, T39R, T39S, S40P, S40T, E41D, E41V, S42G, S42R, F43L, F43Y, V44H, V44M, V44R, L45I, L45V, N46I, N46V, Y48F, Y48H, Y48N, R49Y, R49L, M50D, M50E, M50I, M50L, M50Q, M50V, M50T, S51G, P52A, P52L, S53D, S53G, S53L, S53N, S53T, S53V, N54C, N54H, N54D, N54G, N54S, N54Y, Q55E, Q55H, Q55K, Q55R, T56A, T56L, T56M, T56P, T56S, T56V, D57F, D57R, D57V, D57Y, K58L, K58R, K58T, L59M, L59R, L59V, A61L, A61S, E64D, E64K, R66H, R66S, S67C, S67G, S67I, S67N, S67R, Q68E, Q68I, Q68L, Q68P, Q68R, Q68T, P69H, P69L, P69S, G70C, G70E, G70F, G70I, G70L, G70N, G70R, G70V, G70S, Q71H, Q71K, Q71L, Q71P, Q71R, D72A, D72G, D72N, C73A, C73G, C73H, C73P, C73S, C73R, C73Y, F75Y, R76G, R76H, R76S, V77D, V77I, T78I, T78S, Q79A, Q79P, Q79R, L80Q, P81S, N82S, R84H, R84Q, D85G, D85N, F86Y, H87L, H87Q, H87R, M88L, M88F, S89G, S89N, V90L, V90M, V91A, V91D, V91I, R92G, R92N, R92S, A93V, R94Q, R95L, R95K, R95G, N96D, N96S, N96T, T100A, T100I, T100S, Y101F, L102F, L102I, L102Y, L102V, G104A, G104T, G104S, G104V, A105C, A105G, A105I, A105L, A105V, I106L, S107A, S107F, S107L, S107T, S107V, L108F, L108I, L108T, L108Y, A109D, A109G, A109H, A109S, P110A, K111E, K111G, K111I, K111M, K111N, K111R, K111T, K111V, A112I, A112P, A112V, Q113R, Q113W, I114T, K115D, K115E, K115IN, K115N, K115Q, K115R, E116D, R119G, R119H, R119L, R119P, R119Q, R119W, A120V, T125A, T125K, T125I, T125S, T125V, R127F, R127L, R127K, R127S, R127V, R128G, R128M, A129S, E130K, V131A, V131E, V131I, V131R, P132H, P132R, P132S, P132T, T133A, T133R, T133S, A134D, A134V, H135N, H135R, H135Y, P136L, P136T, S137C, P138S, P138T, S139T, P140A, P140L, P140R, R141G, R141M, R141S, R141W, P142A, P142L, P142R, P142T, A143D, A143S, A143V, G144D, 또는 G144S, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0278] 일부 구체예에서, 변이체 PD-1은 N13D, N13S, F17L, T25A, N29S, A30V, N38D, T39A, V44H, V44R, L45I,

L45V, N46I, N46V, Y48F, Y48H, R49Y, R49L, M50D, M50E, M50I, M50L, M50Q, M50V, S53D, S53G, S53L, S53N, S53V, N54C, N54D, N54G, N54S, N54Y, Q55E, Q55H, Q55K, T56A, T56L, T56V, D57F, D57R, D57V, D57Y, K58L, K58T, A61L, A61S, S67G, Q68E, Q68I, Q68L, Q68P, Q68R, Q68T, P69L, P69S, G70F, G70I, G70L, G70N, G70R, G70V, Q71P, Q71R, D72A, D72G, C73S, C73R, R76G, V77I, T78I, Q79A, Q79R, N82S, H87Q, H87R, M88L, M88F, R92G, R95K, R95G, N96D, N96S, Y101F, L102I, L102Y, L102V, G104S, A105I, A105V, S107A, S107F, S107L, S107T, S107V, L108F, L108I, L108Y, A109D, A109H, A109S, P110A, K111E, K111G, K111I, K111R, K111T, K111V, A112I, A112P, A112V, K115R, R119G, A120V, T125A, T125I, T125V, R127F, R127L, R127K, R127V, R128G, V131I, V131R, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터의 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하는 변이체 PD-1이다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 아미노산 치환 S67N/C73R/F86Y/V91D/S107T/A112V/K115D/A120V를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 315에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 315에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 아미노산 치환 V44H/L45V/N46I/Y48H/M50E/N54G/K58T/L102V/A105V/A112I를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:334에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:334에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 변이체 PD-L1 폴리펩타이드는 설명된 바와 같은 하나 이상의 다른 면역글로불린 수퍼패밀리(IgSF) 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다.

[0279] 본 발명에 따라, 섹션 II에 기재된 것과 같은, 변이체 CD86 폴리펩타이드, 및 PD-L1 폴리펩타이드의 IgSFehapdls 또는 PD-L1 및/또는 PD-L2에 결합하는 그의 변이체를 함유하는 면역조절 단백질이 제공된다 (CD86/PD-1 면역조절 단백질). 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD86의 세포의 도메인 또는 그의 IgSF (예컨대 IgV) 도메인 또는 본원에 설명된 임의의 것과 같은, 하나 이상의 변형(예컨대 치환)을 함유하는 그의 특이적 결합 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 PD-1 폴리펩타이드는 PD-1의 세포의 도메인 또는 그의 IgSF (예컨대 IgV) 도메인 또는 본원에 설명된 임의의 것과 같은, 하나 이상의 변형(예컨대 치환)을 함유하는 그의 특이적 결합 단편이거나 이를 포함한다. CD86/PD-1 면역조절 단백질은 섹션 III.C.3에 설명된 바와 같은 다양한 작제물 포맷으로 제공될 수 있다.

[0280] 2. 중앙 항원 결합 IgSF 도메인

[0280] 일부 구체예에서, 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인 (예컨대 제2 또는 제3 IgSF) 도메인은 중앙 항원에 결합하거나 이를 인식하는 IgSF 도메인 (예컨대 IgV)이다. 그러한 구체예에서, IgSF 패밀리 멤버는 중앙-국소화 모이어티 역할을 함으로 해서, CD86의 vIgD를 중앙 미세환경의 면역 세포 근방으로 가져온다. 일부 구체예에서, 부가적인 IgSF 도메인 (예컨대 제2 IgSF) 도메인은 중앙 세포에서 발현되는 B7-H6에 결합하거나 이를 인식하는, NKp30의 IgSF 도메인이다.

[0281] 일부 구체예에서, 적어도 하나의 부가적인 (예컨대 제2) IgSF 도메인, 예컨대 NKp30은 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대 치환, 결실 또는 부가)을 함유하는 친화성-변형된 IgSF 도메인 또는 vIgD이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 비변형 IgSF 도메인, 예컨대 NKp30에 비해 B7-H6에 대한 결합 친화성 및/또는 선택성을 적어도 또는 적어도 약 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 40배 또는 50배 이상 증가시킨다. 변이체 NKp30 폴리펩타이드의 IgSF 도메인 (예컨대 IgC-유사 또는 완전한 ECD)에서의 예시적인 아미노산 변형, 이를테면 치환, 결실 또는 부가를 표 2에 나타내었다. 예시적인 폴리펩타이드들로는 SEQ ID NO: 54에 제시된 위치에 대응하는 NKp30 세포의 도메인의 위치를 참조로 돌연변이 L30V/A60V/S64P/S86G를 함유하는 NKp30 변이체를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 표 3에 제시된 임의의 아미노산 변형을 포함하는 IgC-유사 도메인, 이를테면 SEQ ID NOS: 268-272 중 어느 하나에 제시된 IgV 도메인 또는 SEQ ID NOS: 268-272 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖고 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 IgC-유사 도메인을 함유하는 변이체 NKp30 폴리펩타이드 및 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 중 어느 하나를 함유하는 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, IgSF 도메인 또는 도메인들을 함유하는 ECD 또는 그의 일부를 함유하는 변이체 NKp30 폴리펩타이드 및 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 중 어느 하나를 함유하는 면역조절 단백질이 제공되며, 여기에는 표 3에 제시된 임의의 아미노산 변형, 이를테면 SEQ ID NOS: 273-277 중 어느 하나에 제시된 ECD 또는 SEQ ID NOS: 273-277 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖고 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 ECD가 함유된다.

[0283] [0282] 표 3은 본 발명에서 제공된 적층 작제물에 사용가능한 하나 이상의 친화성-변형된 IgSF 도메인을 함유하는 예시적인 폴리펩타이드를 제공한다.

표 3: 예시적인 변이체 Nkp30 폴리펩타이드		
돌연변이(들)	ECD SEQ ID NO	IgC SEQ ID NO
야생형	54	278
L30V/A60V/S64P/S86G	273	268
L30V	274	269
A60V	275	270
S64P	276	271
S86G	277	272
L30V/A60V/S64P/S86G/G117del	231	268

[0284]

[0283] 본 발명에 따라, 섹션 II에 기재된 임의의 것과 같은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 및 B7-H6에 결합하는 Nkp30 폴리펩타이드 또는 그의 변이체를 함유하는 면역조절 단백질이 제공된다(CD86/Nkp30 면역조절 단백질). 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD86의 세포외 도메인 또는 그의 IgSF(예를 들어, IgV) 도메인, 또는 본원에 기재된 임의의 것과 같은 하나 이상의 변형(예를 들어, 치환)을 함유하는 그의 특이적 결합 단편이거나 이를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 Nkp30 폴리펩타이드는 Nkp30의 세포외 도메인 또는 그의 IgSF(예를 들어, IgV) 도메인, 또는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 변형(예를 들어, 치환)을 함유하는 그의 특이적 결합 단편이거나 이를 함유한다. CD86/Nkp30 면역조절 단백질은 섹션 III.C.3에 설명된 바와 같은 다양한 작제물 포맷으로 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, CD86/Nkp30 면역조절 단백질은 SEQ ID NOS: 135, 136, 137, 138, 139 또는 140 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86/Nkp30 면역조절 단백질은 SEQ ID NOS: 135, 136, 137, 138, 139 또는 140에 제시된 서열을 갖는다.

[0286]

3. 작제물

[0287]

[0284] 일부 구체예에서, 다른 IgSF 패밀리의 멤버로부터의 하나 이상의 추가적인 IgSF 도메인 (예컨대 제2 또는 제3의 변이체 IgSF 도메인) 및 CD86의 vIgD를 포함하는 2 이상의 IgSF 도메인은 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된다. 적층된 면역조절 단백질 폴리펩타이드 내 복수의 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인들은 서로 공유적으로 직접 연결될 필요는 없다. 일부 구체예에서, 2 이상의 IgSF 도메인들은 직접 또는 링커를 통한 것과 같이 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 잔기의 개재 스패(intervening span)는 IgSF 도메인들을 서로 간접적으로 공유결합시킨다. 이러한 연결은 N-말단 내지 C-말단 잔기들을 통해 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 연결은 IgSF 도메인(들)의 N-말단 또는 C-말단에 위치하지 않는 아미노산 잔기의 측쇄를 통해 이루어질 수 있다. 따라서, 결합은 말단 또는 내부 아미노산 잔기 또는 이들의 조합을 통해 이루어질 수 있다.

[0288]

[0285] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 각각 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되는 적어도 2개의 IgSF 도메인을 함유한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 각각 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되는 적어도 3개의 면역조절 단백질을 함유한다. 다양한 구성을 도 23A 및 23B에 나타내었다.

[0289]

[0286] 일부 구체예에서, 하나 이상의 "펩타이드 링커들"은 CD86의 vIgD 및 하나 이상의 추가적인 IgSF 도메인 (예컨대 제2 또는 제3 변이체 IgSF 도메인)을 연결한다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 단일 아미노산 잔기이거나 또는 더 긴 길이일 수 있다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 아미노산 잔기를 적어도 한 개 그러나 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 길이로 갖는다. 일부 구체예에서, 링커는 가요성 링커이다. 일부 구체예에서, 링커는 (1-문자 아미노산 코드로서): GGGGS ("4GS") 또는 4GS 링커의 멀티머, 예컨대 2, 3, 4, 또는 5 4GS 링커들의 반복체이다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 (GGGGS)₂(SEQ ID NO: 225) 또는 (GGGGS)₃(SEQ ID NO: 224)이다. 일부 구체예에서, 링커는 또한 알라닌 잔기 시리즈를 단독으로 또는 다른 펩타이드 링커(예컨대 4GS 링커 또는 그의 멀티머)에 더해 포함할 수도 있다. 일부 구체예에서, 각 시리즈 내의 알라닌 잔기 개수는: 2, 3, 4, 5, 또는 6 알라닌이다. 일부 구체예에서, 링커는 알라닌 잔기 시리즈를 단독으로 또는 다른 펩타이드 링커에 더해 더 포함할 수 있다 (예컨대 4GS 링커 또는 그의 멀티머). 일부 구체예에서, 각 시리즈 내의 알라닌 잔기의 수는 2, 3, 4, 5, 또는 6 알라닌이다. 일부 구체예에서, 링커는 경성 링커이다. 예컨대, 링커는 알파-나선형 링커이다. 일부 구체예에서, 링커는(1-문자 아미노산 코드로 표시할 경우): EAAAK 또는 EAAAK 링커의 멀티머, 이를테면 SEQ ID NO: 265(1xEAAAK), SEQ ID NO: 266(3xEAAAK) 또는 SEQ ID NO: 247(5xEAAAK)에 제시된 바와 같은 2, 3, 4, 또는 5 EAAAK 링커의 반복체이다. 일부 구체예에서, 링커는 클로닝에 의해 도입되거나 및/또는 제한효소 자리로부터의 아

미노산을 더 포함할 수 있으며, 예컨대 링커는 제한효소 자리 BAMHI의 사용에 의해 도입되는 바와 같이 아미노산 GS(1-문자 아미노산 코드로 표시할 경우)를 포함할 수 있다. 예컨대, 일부 구체예에서, 링커 (1-문자 아미노산 코드로서)는 GSGGGGS (SEQ ID NO:222), GS(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 227), 또는 GS(G₄S)₅ (SEQ ID NO: 228)이다. 일부 예에서, 링커는 3개의 알라닌이 후행하는 2xGGGGGS 이다 (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 226). 일부 경우에서, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 펩타이드 링커의 다양한 조합을 포함한다.

[0290] [0287] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 분자 및 변이체 NKp30 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 135, 136, 137, 138, 139, 또는 140에 의해 제시된 서열에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 135, 136, 137, 138, 139, 또는 140에 제시된 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 전술한 임의의 서열은 호모다имер을 형성한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 면역조절 단백질에 함유된 Fc 도메인인 멀티머화 도메인을 통해 형성된다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 135의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 136의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 137의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 138의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 139의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: SEQ ID NO: 140의 서열을 포함한다.

[0291] [0288] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 분자 및 변이체 PD-1 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 또는 323에 의해 제시된 서열에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 또는 323에 의해 제시된 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 326 또는 327에 의해 제시된 서열에 대해 적어도 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 326 또는 327에 제시된 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 전술한 임의의 서열은 호모다имер을 형성한다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 면역조절 단백질에 함유된 Fc 도메인인 멀티머화 도메인을 통해 형성된다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: 326의 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 호모다имер은 SEQ ID NO: 327의 서열을 포함하거나 갖는다.

[0292] [0289] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 328, 329, 330, 또는 331에 제시된 서열에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 328, 329, 330, 또는 331에 제시된 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서 전술한 임의의 서열은 헤테로다имер을 형성한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер은 면역조절 단백질에 함유된 Fc 도메인인 멀티머화 도메인을 통해 형성된다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер의 제1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 350의 서열을 포함하고 및 헤테로다имер의 제2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 351의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер의 제1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 350의 서열을 포함하고 헤테로다имер의 제2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 352의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер의 제1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 350의 서열을 포함하고 헤테로다имер의 제2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 353의 서열을 포함한다.

[0293] [0290] 일부 구체예에서, 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인들은 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인들의 N-말단 및/또는 C-말단에 삽입된 "야생형 펩타이드 링커들"에 의해 연결된다. 이들 링커들은 선행 서열(비-친화성 변형된 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인에 대해 N-말단) 또는 후행 서열(비-친화성 변형된 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인에 대해 C-말단), 및 IgSF의 Ig 폴드의 구조 예측 바로 바깥으로 확장하는 야생형 단백질에 존재하는 서열로 칭해진다. 일부 구체예에서, "야생형 링커"는 야생형 단백질의 아미노산 서열에서 시그널 서열 후에, 그러나 IgSF 도메인, 이를테면 정의된 IgV 도메인 앞에 존재하는 아미노산 서열이다. 일부 구체예에서, "야생형" 링커는 야생형 단백질의 아미노산 서열에서 IgSF 도메인 바로 뒤에, 이를테면 정의된 IgV 도메인의 바로 뒤에 그러나 IgC 도메인 앞에 존재하는 아미노산 서열이다. 이들 링커 서열은 인접 IgSF 도메인(들)의 적절한 폴딩 및 기능에 기여할 수 있다. 일부 구체예에서, 제1 IgSF 도메인의 N-말단에 삽입된 선행 펩타이드 링커 및/또는 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 C-말단에 삽입된 후행 서열이 존재한다. 일부 구체예에서, 제2 IgSF 도메인의 N-말단에 삽입된 제2 선행 펩타이드 링커 및/또는 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 C-말단에 삽입된 제2 후행 서열이 존재한다.

다. 제1 및 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인들이 동일한 부모 단백질로부터 유래하고 동일한 방향으로 연결된 경우, 제1 및 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인 사이의 야생형 펩타이드 링커들은 중복되지 않는다. 예를 들어, 제1 선행 야생형 펩타이드 링커 및 제2 선행 야생형 펩타이드 링커가 동일한 경우, II형 면역조절 단백질은 제1 후행 야생형 펩타이드 링커 또는 제2 선행 야생형 펩타이드 링커를 포함하지 않는다.

[0294] [0291] 일부 구체예에서, II형 면역조절 단백질은 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 N-말단에 삽입된 제1 선행 야생형 펩타이드 링커를 더 포함하는데, 여기서 제1 선행 야생형 펩타이드 링커는 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 개재 서열로부터 적어도 5개 (예컨대 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 이상)의 연속 아미노산을 부모 IgSF 도메인과 바로 직전의 도메인 (예컨대 시그널 펩타이드 또는 IgSF 도메인) 사이에 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 선행 야생형 펩타이드 링커는 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 전체 개재 서열을 부모 IgSF 도메인과 바로 직전의 도메인 (예컨대 시그널 펩타이드 또는 IgSF 도메인) 사이에 포함한다.

[0295] [0292] 일부 구체예에서, II형 면역조절 단백질은 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 C-말단에 삽입된 제1 후행 야생형 펩타이드 링커를 더 포함하며, 여기서 상기 제1 후행 야생형 펩타이드 링커는 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 개재 서열로부터 적어도 5개 (예컨대 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 이상)의 연속 아미노산을 부모 IgSF 도메인과 바로 직후의 도메인 (예컨대 IgSF 도메인 또는 막관통 도메인) 사이에 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 후행 야생형 펩타이드 링커는 제1 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 전체 개재 서열을 부모 IgSF 도메인과 바로 직후의 도메인 (예컨대 IgSF 도메인 또는 막관통 도메인) 사이에 포함한다.

[0296] [0293] 일부 구체예에서, II형 면역조절 단백질은 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 N-말단에 삽입된 제2 선행 야생형 펩타이드 링커를 더 포함하며, 여기서 제2 선행 야생형 펩타이드 링커는 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 개재 서열로부터 적어도 5개 (예컨대 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 이상)의 연속 아미노산을 부모 IgSF 도메인과 바로 직전의 도메인 (예컨대 시그널 펩타이드 또는 IgSF 도메인) 사이에 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 선행 야생형 펩타이드 링커는 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 전체 개재 서열을 부모 IgSF 도메인과 바로 직전의 도메인 (예컨대 시그널 펩타이드 또는 IgSF 도메인) 사이에 포함한다.

[0297] [0294] 일부 구체예에서, II형 면역조절 단백질은 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의 C-말단에 삽입된 제2 후행 야생형 펩타이드 링커를 더 포함하며, 여기서 상기 제2 후행 야생형 펩타이드 링커는 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 개재 서열로부터 적어도 5개 (예컨대 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 이상)의 연속 아미노산을 부모 IgSF 도메인과 바로 직후의 도메인 (예컨대 IgSF 도메인 또는 막관통 도메인) 사이에 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 후행 야생형 펩타이드 링커는 제2 비-친화성 변형된 및/또는 친화성 변형된 IgSF 도메인이 유래된 야생형 단백질 내 전체 개재 서열을 부모 IgSF 도메인과 바로 직후의 도메인 (예컨대 IgSF 도메인 또는 막관통 도메인) 사이에 포함한다.

[0298] [0295] 일부 구체예에서, CD86의 vIgD를 포함하는 2개 이상의 IgSF 도메인 및 또 다른 IgSF 패밀리의 멤버로부터의 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인 (예컨대 제2 및/또는 제3 변이체 IgSF 도메인)이 Fc에 연결 또는 부착되어 Fc 융합체가 형성되고, 이것은 일부 태양에서 세포에서 발현되어, 다이머 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질을 생성한다. 그러므로, 본원에 따라, 다이머 멀티-도메인 면역조절 단백질도 제공된다.

[0299] [0296] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 하나 이상의 IgSF 도메인은 Fc 영역의 N- 또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인의 적어도 하나는 직접 또는 간접적으로 연결되고, 변이체 CD86 중 하나와 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인 중 하나도 직접 또는 간접적으로 Fc 영역의 N- 또는 C-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, Fc 영역의 N- 또는 C-말단은 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인에 연결되고 Fc 영역의 다른 N- 또는 C-말단은 다른 CD86 변이체 또는 또 다른 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인에 연결된다. 일부 구체예에서, Fc에 대한 연결은 P컨대 전술한 바와 같은 펩타이드 링커를 통한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86과 하

나 이상의 부가적인 IgSF 도메인 간의 결합은 펩타이드 링커, 예컨대 전술한 펩타이드 링커를 경유한다. 일부 구체예에서, CD86의 vIgD, 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인, 및 Fc 도메인은 도 5A 및 5B에 도시된 바와 같은 다양한 구성으로 함께 연결될 수 있다. 예시적인 구성을 실시예에서 설명한다. 예컨대, 도 14A-14D 참조.

- [0300] [0297] 일부 구체예에서, 적층된 면역조절 단백질은 2개의 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드에 의해 형성된 다이머이다. 임의의 적층된 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자도 제공된다. 일부 구체예에서, 다이머형 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 세포에서 발현에 의해, 또는 일부 경우 다이머형 Fc 융합 단백질 생성과 관련하여 전술한 바와 같이, 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드의 공동-발현에 의해 생성될 수 있다.
- [0301] [0298] 일부 구체예에서, 다이머형 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 각 Fc 영역에 대해 2가, 각 서브유닛에 대해 1가, 또는 하나의 서브유닛에 대해 2가 및 또 다른 하나에 대해 4가이다.
- [0302] [0299] 일부 구체예에서, 다이머형 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 호모다이머형 멀티-도메인 적층 Fc 단백질이다. 일부 구체예에서, 다이머형 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 제1 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드 및 제2 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하되 여기서 제1 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 것이다. 일부 구체예에서, 다이머 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 호모다이머 멀티-도메인 적층 Fc 단백질이다. 일부 구체예에서, 다이머 멀티-도메인 적층 면역조절 단백질은 제1 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드 및 제2 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하되 여기서 제1 및 제2 폴리펩타이드는 동일한 것이다. 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 변이체 CD86과 제2 IgSF 도메인을 함유하는 제1 Fc 융합 폴리펩타이드 및 변이체 CD86과 제2 IgSF 도메인을 함유하는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 변이체 CD86, 제2 IgSF 도메인, 및 제3 IgSF 도메인을 함유하는 제1 Fc 융합 폴리펩타이드 및 변이체 CD86, 제2 IgSF 도메인, 및 제3 IgSF 도메인을 함유하는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 융합 폴리펩타이드의 Fc 부분은 전술한 Fc 중 어느 하나일 수 있다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 융합 폴리펩타이드의 Fc 부분 또는 영역은 동일하다.
- [0303] [0300] 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 예컨대 제1 및 제2 Fc 융합 폴리펩타이드와 같은 2개의 상이한 Fc 융합 폴리펩타이드들을 포함하는 헤테로다이머로서 여기서 적어도 하나는 적어도 하나의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 Fc 융합 폴리펩타이드이거나 및/또는 적어도 하나는 제2 IgSF 도메인(예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인)을 함유하는 Fc 융합 폴리펩타이드이다. 일부 구체예에서, 제1 또는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드는 제3 IgSF 도메인(예컨대 제3 변이체 IgSF 도메인)을 더 함유한다. 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 변이체 CD86을 함유하는 제1 Fc 융합 폴리펩타이드 및 제2 IgSF 도메인을 함유하는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유하되, 여기서 경우에 따라, 제1 또는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드는 제3 IgSF 도메인을 부가적으로 함유한다. 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 변이체 CD86, 제2 IgSF 도메인, 및 일부 경우에서, 제3 IgSF 도메인을 함유하는 제1 Fc 융합 폴리펩타이드 및 변이체 CD86 폴리펩타이드나 부가적인 IgSF 도메인에 연결되지 않은 제2 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 융합 폴리펩타이드의 Fc 부분 또는 영역은 동일하다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 융합 폴리펩타이드의 Fc 부분 또는 영역은 상이하다.
- [0304] [0301] 일부 구체예에서, 멀티-도메인 적층 분자는 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 부가적인 IgSF 도메인을 함유하는 제1 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유하되, 여기서 제1 적층 Fc 융합 폴리펩타이드 내 IgSF 도메인의 총 개수는 2, 3, 4, 5, 6개를 초과한다. 이러한 구체예의 일례에서, 제2 적층 Fc 융합 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 부가적인 IgSF 도메인을 함유하되, 여기서 제1 적층 Fc 융합 폴리펩타이드 내 IgSF 도메인의 총 개수는 2, 3, 4, 5, 6개를 초과한다. 이러한 구체예의 또 다른 일례에서, 제2 Fc 융합 폴리펩타이드는 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 부가적인 IgSF 도메인에 연결되지 않는다.
- [0305] [0302] 일부 구체예에서, 헤테로다이머 적층 분자는 제1 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드 및 제2 적층 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드를 함유하되 여기서 제1 및 제2 폴리펩타이드는 상이하다. 일부 구체예에서, 헤테로다이머 적층 분자는 Fc 영역 및 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및/또는 제2 IgSF 도메인(예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인)을 함유하는 제1 Fc 폴리펩타이드 융합체와, Fc 영역 및 다른 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 제2 IgSF 도메인을 함유하는 제2 폴리펩타이드 융합체를 함유한다. 일부 구체예에서, 헤테로다이머 적층 분자는 Fc 영역 및 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및/또는 제2 IgSF 도메인(예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인)을 함유하는 제1 Fc 폴리펩타이드 융합체 및 상기 제1 Fc 영역과는 다른 배향 또는 구성으로 Fc 영역 및 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 제2 IgSF 도메인(예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인) 두가지 모두를 함유하는 제2 Fc 폴리펩타이드 융합체를 함유한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 Fc 융합 폴리펩타이드는 또한 제3 IgSF 도메인(예컨

대 제3 변이체 IgSF 도메인)도 함유한다.

- [0306] [0303] 일부 구체예에서, 제1 및 제2 적층된 면역조절 Fc 융합 폴리펩타이드 중 하나 또는 두 가지 모두의 Fc 도메인은, Fc 분자의 인터페이스가 헤테로다имер화를 용이화 및/또는 촉진하도록 변형되는 변형(예컨대 치환)을 포함한다. 일부 구체예에서, 변형은 돌출부(손잡이: knob)의 제1 Fc 폴리펩타이드로의 도입 및 공동(구멍: hole)의 제2 폴리펩타이드로의 도입을 포함함으로써 해서 상기 돌출부가 공동 내에 위치가능하게 되어 제1 및 제2 Fc-함유 폴리펩타이드의 복합체 형성을 촉진시키는 것이다. 폴리펩타이드에서 돌출부 또는 공동을 생성하기 위한 치환 및/또는 변형을 목표로하는 아미노산은 전형적으로 제2 폴리펩타이드의 인터페이스에서 하나 이상의 아미노산과 상호작용하거나 접촉하는 인터페이스 아미노산이다.
- [0307] [0304] 일부 구체예에서, Fc 서열이 서열의 N-말단 부분인 작제물의 경우 아미노산 서열이 Fc 서열 앞에 첨가된다. 일부 경우에, 아미노산 서열 HMSSVSAQ(SEQ ID NO: 279)는 Fc 서열이 서열의 N-말단 부분인 작제물에 있어서 Fc 서열 바로 앞에 부가된다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер 적층 분자는 Fc 영역(knob; 예컨대 SEQ ID NOS: 252 또는 324에 제시된 Fc 서열) 및 제1 변이체 폴리펩타이드 및/또는 제2 IgSF 도메인(예컨대 제2 변이체 IgSF 도메인)을 함유하는 제1 Fc 폴리펩타이드 융합체 및 Fc 영역(hole; 예컨대 SEQ ID NO: 280 또는 325에 제시된 Fc 서열)을 함유하는 제2 Fc 폴리펩타이드 융합체를 함유하고 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드 융합체의 두 개의 Fc 영역 모두의 바로 앞에 스테퍼(stuffer) 서열 HMSSVSAQ(SEQ ID NO: 279)이 첨가된다.
- [0308] [04305] 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 돌출부(knob) 아미노산을 함유하도록 변형된 제1 폴리펩타이드는 제1 폴리펩타이드의 인터페이스로부터 돌출된 적어도 하나의 측쇄를 갖는 아미노산으로 천연 또는 오리지널 아미노산이 치환됨으로써 해서 제2 폴리펩타이드의 인접 인터페이스내의 상보적인 공동(hole)에 위치가능하다. 가장 흔하게는, 치환 아미노산은 오리지널 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 것이다. 통상의 기술자라면 돌출부 형성을 위한 이상적인 치환 아미노산을 동정하기 위한 아미노산 잔기의 특성을 결정 및/또는 평가하는 방법을 알 것이다. 일부 구체예에서, 돌출부 형성을 위한 치환 잔기는 자연발생적인 아미노산 잔기이며 예컨대 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 또는 트립토판 (W)을 들 수 있다. 일부 사례에서, 치환을 위해 동정된 오리지널 잔기는 예를 들어, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌, 또는 발린과 같이, 소형 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이다.
- [0309] [0306] 일부 구체예에서, 공동(구멍)을 함유하도록 변형된 제2 폴리펩타이드는 그 제2 폴리펩타이드의 인터페이스로부터 리세스된 적어도 하나의 측쇄를 갖는 아미노산에 의해 천연 또는 오리지널 아미노산이 치환되어 제1 폴리펩타이드의 인터페이스로부터의 대응하는 돌출부를 수용할 수 있는 것이다. 가장 흔하게는, 이러한 치환 아미노산은 오리지널 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 것이다. 통상의 기술자라면 공동 형성을 위한 이상적인 치환 잔기를 동정하기 위해 아미노산 잔기를 어떻게 결정 및/또는 평가하는지 알 것이다. 일반적으로, 공동 형성을 위한 치환 잔기는 자연발생적인 아미노산이고, 여기에는 예를 들어 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 및 발린 (V)이 포함된다. 일부 사례에서, 치환을 위해 동정된 오리지널 아미노산은 예를 들어, 티로신, 아르기닌, 페닐알라닌, 또는 트립토판과 같은 대형 측쇄를 갖는 아미노산이다.
- [0310] [0307] 인간 IgG1의 CH3 인터페이스는, 예를 들어, 각 표면으로부터 1090A2 문헌 4개의 역평행 β -가닥 상에 위치한 각 도메인 상에 16 개의 잔기를 포함한다 (예컨대, 참조: Deisenhofer 외 (1981) Biochemistry, 20:2361-2370; Miller 외, (1990) J Mol. Biol., 216, 965-973; Ridgway 외, (1996) Prot. Engin., 9: 617-621; 미국특허 No. 5,731,168). 돌출부 또는 공동을 생성하기 위한 CH3 도메인의 생성에 대해서는 예를 들어, 미국특허 No. 5,731,168; 국제특허출원 WO98/50431 및 WO 2005/063816; 및 Ridgway 외, (1996) Prot. Engin., 9: 617-621에 설명되어 있다. 일부 사례에서, 돌출부 또는 공동을 생성하기 위한 CH3 도메인의 변형은 2개의 중심 역평행 β -가닥 상에 위치한 잔기에 표적화된다. 그 목적은 생성된 돌출부가 파트너 CH3 도메인의 보상성 공동 (compensatory cavity)에 의해 수용되기보다는 주변 용매로 돌출됨으로써 수용될 수 있는 위험을 최소화하는 것이다.
- [0311] [0308] 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는 "손잡이 사슬(knob chain)"의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이를, 그리고 "구멍 사슬(hole chain)"의 CH3 도메인에는 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 함유한다. 일부 경우에서, 예컨대 Y349C 돌연변이를 "knob" 또는 "hole" 사슬 내로 도입하거나 또는 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 또 다른 사슬의 CH3 도메인 내로 도입함으로써 이들 CH3 도메인들 간의 부가적인 사슬간 다이설파이드 다리 역시도 사용될 수 있다 (Merchant, A. M., 외, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681). 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는 두 개의 CH3 도메인 중 하나에 S354CT366W 돌연변이를, 그리고 두 개의 CH3 도메인 중 다른 하나에 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 함유한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는

두 개의 CH3 도메인 중 하나에 E356C, T366W 돌연변이를, 그리고 두 개의 CH3 도메인 중 다른 하나에 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는 두 개의 CH3 도메인 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를, 그리고 두 개의 CH3 도메인 중 다른 하나에 E356C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는 두 개의 CH3 도메인 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를, 그리고 두 개의 CH3 도메인 중 다른 하나에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 그 밖의 다른 손잡이에 구멍 (knobs-in-holes) 기술이 예컨대 EP 1 870 459 A1에 설명되어 있다.

[0312] [0309] 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자의 Fc 영역들은 전술한 것과 같은 하나 이상의 다른 Fc 돌연변이를 부가적으로 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 헤테로다имер 분자는 이펙터 기능을 감소시키는 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 함유한다.

[0313] [0310] 일부 구체예에서, CH3 돌출부(손잡이(knob))/공동(구멍(hole)) 변형을 함유하는 Fc 변이체는 적층된 면역조절 폴리펩타이드의 어디에든, 그러나 일반적으로는 그의 N-또는 C-말단을 통해 제1 및/또는 제2 적층된 면역조절 폴리펩타이드의 N-또는 C-말단에 결합되어 예컨대 융합 폴리펩타이드를 형성할 수 있다. 이러한 연결은 직접적이거나 또는 링커를 경유한 간접적인 것일 수 있다. 일반적으로, 손잡이 및 구멍 분자는 CH3 돌출부 변형(들)을 함유하는 Fc 변이체에 연결된 제1 적층 면역조절 폴리펩타이드와 CH3 공동 변형(들)을 함유하는 Fc 변이체에 연결된 제2 적층 면역조절 폴리펩타이드의 공동-발현에 의해 생성된다.

[0314] D. 변이체 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질의 컨주게이트 및 융합체

[0315] [0311] 일부 구체예에서, 본 발명에서 제공된 IgSF 패밀리의 Ig 도메인의 변이체 (vIgD)를 포함하는 면역조절 단백질인, 변이체 폴리펩타이드는, 이펙터 모이어티와 같은 모이어티, 예컨대 또 다른 단백질과 직접 또는 간접적으로 컨주게이트 또는 융합되어 컨주게이트 ("IgSF 컨주게이트")를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 부착은 공유적이거나 또는 바이오틴-스트렙타비딘 비공유 상호작용을 통한 비공유적일 수 있다. CD86-Fc 변이체 융합의 일부 구체예에서 전술한 컨주게이트들 중 어느 하나 또는 2 이상의 조합이 Fc에 또는 변이체 CD86 폴리펩타이드에 또는 두 가지 모두에 부착될 수 있다.

[0316] [0312] 일부 구체예에서, 상기 모이어티는 표적화 모이어티, 소분자 약물 (500 달톤 몰 질량 미만의 비-폴리펩타이드 약물), 독소, 세포증식 억제제, 세포독성 물질, 면역억제제, 진단 목적에 적합한 방사능 물질, 치료 목적의 방사능 금속 이온, 전구약물-활성화 효소, 생물학적 반감기를 증가시키는 물질, 또는 진단 물질 또는 검출 가능한 물질일 수 있다.

[0317] [0313] 일부 구체예에서 이펙터 모이어티는 치료제, 예컨대 세포독성, 세포증식억제 또는 그 밖에 어떤 치료적 이점을 제공하는 암 치료제이다. 일부 구체예에서, 이펙터 모이어티는 세포 표면 항원, 예컨대 종양 세포 표면의 항원을 표적화하는 물질과 같은 표적화 모이어티 또는 물질이다. 일부 구체예에서, 이펙터 모이어티는 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 생성할 수 있는 표지이다. 일부 구체예에서, 이펙터 모이어티는 독소이다. 일부 구체예에서, 이펙터 모이어티는 단백질, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 나노입자이다.

[0318] [0314] 일부 구체예에서, 동일하거나 상이할 수 있는 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 이펙터 모이어티들이 변이체 폴리펩타이드 또는 단백질에 컨주게이트, 연결 또는 융합되어 IgSF 컨주게이트를 형성한다. 일부 구체예에서, 이러한 이펙터 모이어티들은 공지기술 및 후술되는 다양한 분자생물학적 또는 화학적 컨주게이션 및 결합 방법을 이용함으로써 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질에 부착될 수 있다. 일부 구체예에서, 링커들 예컨대 펩타이드 링커들, 절단가능 링커들, 비-절단가능 링커들 또는 컨주게이션 반응에 도움이 되는 링커들을 이용하여 이펙터 모이어티들을 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질에 연결 또는 컨주게이트시킬 수 있다.

[0319] [0315] 일부 구체예에서, IgSF 컨주게이트는 다음 성분들: (단백질 또는 폴리펩타이드), $(L)_q$ 및 (이펙터 모이어티) $_m$ 을 포함하되 여기서, 상기 단백질 또는 폴리펩타이드는 설명된 바와 같은 하나 이상의 동족 카운터 구조 리간드와 결합할 수 있는 임의의 설명된 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질이고; L은 단백질 또는 폴리펩타이드를 모이어티에 연결하기 위한 링커; m은 적어도 1; q는 0 또는 그 이상이며; 결과적인 IgSF 컨주게이트는 하나 이상의 카운터 구조 리간드에 결합하는 것이다. 특정 구체예에서, m은 1 내지 4이고 q는 0 내지 8이다.

[0320] [0316] 일부 구체예에서, 예를 들어 변이체 폴리 펩타이드 또는 면역조절 단백질을 특정 세포에 표적화 전달하기 위해, 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 물질과 컨주게이션된, 본 발명에서 제공되는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 포함하는 IgSF 컨주게이트가 제공된다. 일부 구체예에서, 표적화 물질은 대상체 내 정

상 세포/조직 및/또는 종양 세포/종양 상에 존재하는 분자를 위치 결정하고 이에 결합하는 능력을 갖는 분자(들)이다. 달리 설명해서, 표적화 물질을 포함하는 IgSF 컨주게이트는 종양 세포와 같은 세포 상에 존재하는, 리간드에 (직접 또는 간접적으로) 결합할 수 있다. 사용이 고려되는 본 발명의 표적화 물질에는 표적 세포 또는 분자의 성분에 결합할 수 있는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 압타머, 기타 리간드, 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0321] [0317] 일부 구체예에서, 표적화 물질은 대상체에게 투여된 후 종양 세포(들)에 결합하거나 종양 세포(들) 부근 (예를 들어, 종양 혈관계 또는 종양 미세 환경)에 결합 할 수 있다. 표적화 물질은 암세포 표면의 수용체 또는 리간드에 결합할 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 비암성 세포 또는 조직에 특이적인 표적화 물질이 선택 된다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 예를 들어, 표적화 물질은 특정 세포 또는 조직에 보통 존재하는 분자에 특 이적일 수 있다. 또한, 일부 구체예에서, 동일한 분자가 정상 세포 및 암 세포에 존재할 수 있다. 다양한 세포 성분 및 분자가 알려져 있다. 예를 들어, 만일 표적화 물질이 EGFR에 특이적일 경우, 결과적인 IgSF 컨주게이트 는 EGFR을 발현하는 정상적인 피부 표피 세포뿐만 아니라, EGFR을 발현하는 발현하는 표적 암 세포도 표적할 수 있다. 그러므로, 일부 구체예에서, 본 발명의 IgSF 컨주게이트는 2 개의 별도 메카니즘(표적화 암세포 및 비-암 세포)에 의해 작동가능하다.

[0322] [0318] 본 발명의 다양한 측면에서, 본 발명의 IgSF 컨주게이트는 세포 성분, 예컨대 종양 항원, 세균 항원, 바이러스 항원, 미코플라스마 항원, 진균 항원, 프리온 항원, 기생충으로부터의 항원에 결합/표적화할 수 있는 표 적화 물질을 포함한다. 일부 태양에서, 세포 성분, 항원 또는 분자는 각각 표적화 물질에 대한 소망되는 표적을 의미하는 것으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 표적화 물질은 비제한적인 예로서 하기에 예 시된 성분들, 즉: 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB-1, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, EGFR 리간드 패밀리; 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR) 패밀리, IGF-결합 단백질 (IGFBPs), IGFR 리간드 패 밀리; 혈소판 유도된 성장 인자 수용체 (PDGFR) 패밀리, PDGFR 리간드 패밀리; 섬유아세포 성장 인자 수용체 (FGFR) 패밀리, FGFR 리간드 패밀리, 혈관내피 성장 인자 수용체 (VEGFR) 패밀리, VEGF 패밀리; HGF 수용체 패 밀리; TRK 수용체 패밀리; 에프린 (EPH) 수용체 패밀리; AXL 수용체 패밀리; 백혈구 티로신 키나아제 (LTK) 수 용체 패밀리; TIE 수용체 패밀리, 안지오프이에틴 1,2; 수용체 티로신 키나아제-유사 오픈 수용체 (ROR) 수용체 패밀리, 예컨대 ROR1; CD171 (L1CAM); B7-H6 (NCR3LG1); CD80, 종양 글리코실화 항원, 예컨대 sTn 또는 Tn, 예 컨대 MUC1의 sTn Ag; LHR (LHCGR); 포스포티딜세린, 디스코이딘 도메인 수용체 (DDR) 패밀리; RET 수용체 패밀 리; KLG 수용체 패밀리; RYK 수용체 패밀리; MuSK 수용체 패밀리; 트랜스포닝 성장 인자- α (TGF- α) 수용체, TGF- β ; 사이토카인 수용체, 클래스 I (헤마토프이에틴 패밀리) 및 Class II (인터페론/IL-10 패밀리) 수용체, 종양괴사인자 (TNF) 수용체 수퍼패밀리 (TNFRSF), 사멸 수용체 패밀리; 고환암 (CT) 항원, 계통-특이 항원, 분 화 항원, 알파-액티닌-4, ARTC1, 브레이크포인 클러스터 영역-아벨손 (Bcr-abl) 융합 산물, B-RAF, 카스파제-5 (CASP-5), 카스파제-8 (CASP-8), β -카테닌 (CTNNB1), 세포 분열주기 27 (CDC27), 사이클린-의존성 키나아제 4 (CDK4), CDKN2A, COA-1, dek-can 융합 단백질, EFTUD-2, 연장 인자 2 (ELF2), Ets 변이체 유전자 6/급성 골수 성 백혈병 1 유전자 ETS (ETC6-AML1) 융합 단백질, 피브로넥틴(FN), 예컨대 피브로넥틴의 엑스트라도메인 A (EDA), GPNMB, 저밀도 지질수용체/GDP-L 푸코스: β -D-갈락토스 2- α -L-푸코실트랜스퍼라제 (LDLR/FUT) 융합 단백질, HLA-A2. HLA-A2 유전자 내 α 2-도메인의 α -헬릭스의 잔기 170에서의 아르기닌에서 이소류신으로의 교 환 (HLA-A*201-R170I), HLA-A1 1, 열충격 단백질 70-2 돌연변이된 (HSP70-2M), K1AA0205, MART2, 유비퀴틴스 돌연변이 흑색종 1, 2, 3 (MUM-I, 2, 3), 전립선 산 포스포타제(PAP), 네오-PAP, 미오신 클래스 I, NFYC, OGT, OS-9, pm1-RAR알파 융합 단백질, PRDX5, PTPRK, K-ras (KRAS2), N-ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 또는-SSX2 융합 단백질, 트리오세포스페이트 이소머라제, BAGE, BAGK-1, BAGE-2,3,4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V (이상 N-아세틸 글루코사미닐 트랜스퍼라제 V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM-HN-I, LAGE, LAGE-I, 흑색종 상의 CTL-인식된 항원 (CAMEL), MAGE-A1 (MAGE-I), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-AI 1, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, 뮤신 1 (MUC1), MART-1/Melan-A (MLANA), gp100, gp100/Pmel17 (SILV), 티로시나 제 (TYR), TRP-I, HAGE, NA-88, NY-ESO-I, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-1,2,3,4, TRP2-INT2, 배아 암종 항원 (CEA), 칼리크레인 4, 포유글로빈-A(mammaglobin-A), OAI, 전립선 특이 항원 (PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, 아디포필린, 흑색종 2에 부재하는 인터페론 유도성 단백질 (AIM-2), BING-4, CPSF, 사이클린 D1, 상피 세포 부 착 분자 (Ep-CAM), EphA3, 섬유아세포 성장 인자-5 (FGF-5), 당단백질 250 (gp250), EGFR (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), 인터류킨 13 수용체 α 2 사슬 (IL13R α 2), IL-6 수용체, 장내 카르복실 에스테라제 (iCE), 알파-피토 (feto) 단백질 (AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53 (TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE-I, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, 서바이빈 (BIRC5), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 텔로머라제, 윌름 종양 유전자(WT1), SYCP1,

BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1, CTAGE-I, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY-I, SPO1 1, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, 면역글로불린 이디오타입, Bence-Jones 단백질, 에스트로겐 수용체 (ER), 안드로겐 수용체 (AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, 암 항원 72-4 (CA 72-4), 암 항원 15-3 (CA 15-3), 암 항원 27-29 (CA 27-29), 암 항원 125 (CA 125), 암 항원 19-9 (CA 19-9), β -인간 융모성 고나도트로핀, β -2 마이크로글로불린, 편평세포 암종항원, 뉴런-특이적 에놀라제, 열충격 단백질 gp96, GM2, 사르그라모스틴(sargramostim), CTLA-4, 707 알라닌 프롤린 (707-AP), T 세포 4에 의해 인식된 선암종 항원 (ART-4), 암배아 항원 캡타이드-1 (CAP-I), 칼슘-활성화된 클로라이드 채널-2 (CLCA2), 사이클로필린 B (Cyp-B), 인간 인장 고리 종양(signet ring tumor)-2 (HST-2), 인간 유두종 바이러스 (HPV) 단백질 (HPV-E6, HPV-E7, 메이저 또는 마이너 캡시드 항원, 기타), 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 단백질 (EBV 잠재 막 단백질-LMP1, LMP2; 기타), B형 또는 C형 간염 바이러스 단백질, 및 HIV 단백질에 특이적이거나 또는 이들 성분들과 결합한다.

[0323] [0319] 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는 그의 표적화 물질을 통해, 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 세포 성분과 결합함으로써, 면역반응의 조절(예컨대 (예컨대, 공동-자극 분자의 활성화 또는 면역 세포 활성화 네거티브 조절 분자의 억제에 의함), 생존 시그널 (예컨대, 성장 인자 또는 사이토카인 또는 호르몬 수용체 길항제)의 억제, 사멸 시그널 및/또는 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성을 통한 면역-매개된 세포독성의 활성화를 통해 표적화된 세포의 살해를 촉진한다. 이러한 IgSF 컨쥬게이트는 IgSF 컨쥬게이트의 수용체-매개 엔도시토시스를 통해 종양 표적에 컨쥬게이트된 이펙터 모이어티의 전달을 용이하게하는 것과 같이 종양 세포를 예방, 감소 또는 제거하기 위한 몇 가지 메커니즘을 통해 기능하거나; 또는 이러한 컨쥬게이트는 면역 세포 (예를 들어, NK 세포, 단핵 세포/대식세포, 수지상 세포, T 세포, B 세포)를 모집하고, 결합시키고, 및/또는 활성화시킬 수 있다. 또한, 어떤 경우에는 상기 경로 중 하나 이상이 본 발명의 하나 이상의 IgSF 컨쥬게이트의 투여시 작용할 수 있다.

[0324] [0320] 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는, 그의 표적화 물질을 통해, 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 세포 성분에 결합하는 등 국소화함으로써, 종양 근방에서 면역반응의 세포들을 조절한다. 일부 구체예에서, 표적화 물질은 종양 표적에 대한 컨쥬게이트된 IgSF (예컨대 vIgD)의 전달을 용이화시켜, 그의 동족 결합 파트너와 상호작용하여 동족 결합 파트너를 산생하는 면역 세포 (예를 들어, NK 세포, 단핵구/대식세포, 수지상 세포, T 세포)의 시그널링을 변경시킨다.

[0325] [0321] 일부 구체예에서, 표적화 물질은 면역글로불린이다. 본 발명에서, 용어 "면역글로불린"은 천연 또는 인공의 일가 또는 다가 항체를 포함하며, 이의 비제한적인 예로는 폴리클로날, 모노클로날, 다중특이, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 단일 사슬 Fv (scFv); 항-이디오타입 (항-Id) 항체, (예컨대, 본 발명 항체에 대한 항-Id 항체를 포함한다), 및 전술한 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 들 수 있다. 본 명세서에서 "항체"라 함은 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예컨대, 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 가리킨다. 본 발명의 면역글로불린 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 종류(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다.

[0326] [0322] 일부 구체예에서, 그의 항체 표적화 모이어티를 통한 IgSF 컨쥬게이트는 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 세포 성분과 결합함으로써, 면역반응의 조절(예컨대 (예컨대, 공동-자극 분자의 활성화 또는 면역 세포 활성화 네거티브 조절 분자의 억제에 의함), 생존 시그널 (예컨대, 성장 인자 또는 사이토카인 또는 호르몬 수용체 길항제)의 억제, 사멸 시그널 및/또는 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성을 통한 면역-매개된 세포독성의 활성화를 통해 표적화된 세포의 세포자멸사를 촉진한다. 이러한 IgSF 컨쥬게이트는 예컨대 IgSF 컨쥬게이트의 수용체-매개 엔도시토시스를 통해 종양 표적에 컨쥬게이트된 이펙터 모이어티의 전달을 용이하게하는 것과 같이 종양 세포를 예방, 감소 또는 제거하기 위한 몇 가지 메커니즘을 통해 기능하거나; 또는 이러한 컨쥬게이트는 면역 세포 (예를 들어, NK 세포, 단핵 세포/대식세포, 수지상 세포, T 세포, B 세포)를 모집하고, 결합시키고, 및/또는 활성화시킬 수 있다.

[0327] [0323] 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는, 그의 항체 표적화 모이어티를 통해, 종양 세포, 종양 혈관계 또는 종양 미세환경의 세포 성분에 결합함으로써 면역 반응을 조절할 것이다(예컨대, 공동-자극 분자의 활성화 또는 면역 세포 활성화의 네거티브 조절 분자의 억제에 의함). 일부 구체예에서, 이러한 컨쥬게이트는 면역 세포 (예컨대 NK 세포, 단핵구/대식세포, 수지상 세포, T 세포, B 세포)를 인식, 결합 및/또는 조절(예컨대 억제 또는 활성화)할 수 있다.

- [0328] [0324] 본 발명의 항체 표적화 모이어티들은 비제한적인 예로서 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단일-사슬 Fvs (scFv), 단일-사슬 항체, 다이설파이드-연결된 Fvs (sdFv) 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편을 포함한다. 단일-사슬 항체를 비롯한 항원-결합 항체 단편은, 가변 영역(들)을 단독으로 또는 다음의 것들 전체 또는 일부와의 조합으로서 포함할 수 있다: 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인. 또한 본 발명에는 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인과 가변 영역(들)과의 임의의 조합 역시도 포함하는 항원-결합 단편도 포함된다. 또한 본 발명에는 Fc 단편, 항원-Fc 융합 단백질, 및 Fc-표적화 모이어티 컨쥬게이트 또는 융합 산물 (Fc-펩타이드, Fc-압타머)도 제공된다. 본 발명의 항체 표적화 모이어티들은 조류 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물로부터 기원할 수 있다. 일 측면에서, 항체 표적화 모이어티들은 인간, 쥐(예컨대, 마우스 및 래트), 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말 또는 닭의 것일 수 있다. 또한 이러한 항체들은 동물 항체의 인간화 또는 키메라 버전일 수 있다. 본 발명의 항체 표적화 모이어티들은 단일특이, 이중특이, 삼중특히 또는 그 보다 더 많은 멀티특이적일 수 있다.
- [0329] [0325] 다양한 구체예에서, 항체/표적화 모이어티는 Fc (항체 내)와 Fc 수용체 (면역 세포 상) 간의 상호작용을 통해 그리고 본 발명에서 제공된 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트된 변이체 폴리펩타이드를 통해 면역 세포 (예컨대 NK 세포, 단핵구/대식세포, 수지상 세포)를 모집, 결합 및/또는 활성화시킨다. 일부 구체예에서, 항체/표적화 모이어티는 종양 물질을 인식 또는 결합하여 본 발명에 제공된 컨쥬게이트된 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 통해 종양 세포에 국소화하여 종양 근방의 면역 세포를 조절하는 것을 용이하게 한다.
- [0330] [0326] IgSF 컨쥬게이트에 통합될 수 있는 항체들의 비제한적인 예로는 퍼투주맵(Perjeta®), 세톡시맵 (IMC-C225; Erbitux®), 트라스투주맵(Herceptin®), 리툭시맵(Rituxan®; Mabra®), 베바시주맵(Avastin®), 알렘투주맵(Campath®; Campath-1H®; Mabcampath®), 파니투무맵(ABX-EGF; Vectibix®), 라니비주맵(Lucentis®), 이브리투모맵, 이브리투모맵 티옥세탄, (Zevalin®), 토시투모맵, 요오드 I 131 토시투모맵 (BEXXAR®), 카투막소맵(Removab®), 겐투주맵, 겐투주맵 오조가미신(Mylotarg®), 아바타셉트(CTLA-4-Ig; Oncia®), 벨라타셉트(L104EA29YIg; LEA29Y; LEA), 이필리무맵(MDX-010; MDX-101), 트레멜리무맵 (티실리무맵; CP-675,206), PRS-010, PRS-050, 아플리베르셉트(VEGF Trap, AVE005), 벨로식시맵(M200), F200, MORAb-009, SS1P (CAT-5001), 시주투무맵 (IMC-A12), 마투주맵(EMD72000), 니모투주맵 (h-R3), 잘루투무맵(HuMax-EGFR), 네시투무맵 IMC-11F8, mAb806/ch806, Sym004, mAb-425, 파노렉스®로 이루어진 군으로부터 선택되는 (17-1A) (쥐의 모노클로날 항체); 파노렉스®로 이루어진 군으로부터 선택되는 (17-1A) (키메라 쥐 모노클로날 항체); IDEC-Y2B8 (쥐의, 항-CD20 Mab); BEC2 (항-이디오타입 Mab, GD 에피토프를 모방) (BCG와 함께); 온콜림(Lym-1 모노클로날 항체); SMART MI95 Ab, 인간화 13' I LYM-I (Oncolym), 오바렉스 (B43.13, 항-이디오타입 마우스 Mab); MDX-210 (인간화 항-HER-2 이중특이 항체); 선암종 상의 EGP40 (17-1A) 전이암(pancarcinoma) 항원에 결합하는 3622W94 Mab; 항-VEGF, 제나팍스(SMART 항-Tac (IL-2 수용체); SMART MI95 Ab, 인간화 Ab, 인간화됨); MDX-210 (인간화 항-HER-2 이중특이 항체); MDX-447 (인간화 항-EGF 수용체 이중특이 항체); NovoMab-G2 (전이암 특이 Ab); TNT (히스톤 항원에 대한 키메라 Mab); TNT (히스톤 항원에 대한 키메라 Mab); 글리오맵-H (모노클론 s-인간화 Abs); GNI-250 Mab; EMD-72000 (키메라-EGF 길항제); LymphoCide (인간화 LL2 항체); 및 MDX-260 이중특이, 표적 GD-2, ANA Ab, SMART ID10 Ab, SMART ABL 364 Ab 또는 ImmurAIT-CEA를 들 수 있다. 전술한 목록에 의해 설명되는 바와 같이, 특정 표적 에피토프에 대한 항체를 만드는 것이 통상적이다.
- [0331] [0327] 일부 구체예에서, 융합 분자를 포함, 제공된 컨쥬게이트의 항체 또는 항원-결합 단편은, 세톡시맵, 파니투무맵, 잘루투무맵, 니모투주맵, 트라스투주맵, 아도-트라스투주맵 엠탄신, 토시투모맵(Bexxar®), 리툭시맵(Rituxan, Mabthera), 이브리투모맵 티옥세탄 (Zevalin), 다클리주맵 (Zenapax), 겐투주맵(Mylotarg), 알렘투주맵, CEA-scan Fab 단편, OC125 모노클로날 항체, ab75705, B72.3, 베바시주맵 (Avastin®), 아파티닙, 악시티닙, 보스티닙, 카보잔티닙, 세리티닙, 크리조티닙, 다브라페닙, 다사티닙, 디누톡시맵(UnituxinTM), 엘로티닙, 에베롤리무스, 이부리티닙, 이마티닙, 라파티닙, 렌바티닙, 닐로티닙, 올라파립, 올라라투맵(LartruvoTM), 팔보시클립, 파조파닙, 퍼투주맵(Perjeta®), 라무시루맵(Cyramza®), 레고라페닙, 록솔리티닙, 소라페닙, 수니티닙, 템시롤리무스, 트라메티닙, 반데타닙, 베무라페닙, 비스모데길, 바실릭시맵, 이필리무맵, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, MPDL3280A, 피딜리주맵(CT-011), AMP-224, MSB001078C, 또는 MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, 아테졸리무맵, 아벨루맵 또는 두르발루맵 또는 그의 항원-결합 단편이다. 융합 분자를 비롯하여, 제공된 컨쥬게이트의 일부 항체 또는 항원-결합 단편은, 퍼투주맵(Perjeta®), 파니투무맵 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 항체 표적화 모이어티는 전장 항체, 또는 Fc 도메인을 함유하는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 예컨대 항체의 Fc 부분의 N-말단에 컨쥬게이션함으로써,

항체 표적화 모이어티의 Fc 부분에 컨쥬게이트된다.

[0332]

[0328] 일부 구체예에서, vIgD는 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 N-또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 연결은 펩타이드 링커를 경유하여, 예컨대 전술한 임의 방법에 의해 수행가능하다. 일부 구체예에서, 링커는 클로닝에 의해 및/또는 제한 부위로부터 도입된 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 제한 부위에 의해 도입된 추가 아미노산을 양 말단에 포함할 수 있다. 예를 들어, 링커는 제한 부위 AFEI의 사용에 의해 도입되는 SA(1-문자 아미노산 코드)와 같은 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 도 18A-18C는 예시적인 배열을 나타낸다. 일부 구체예에서, 항체 컨쥬게이트는 세포 내 항체의 중쇄 및 경쇄의 공동-발현에 의해 생산될 수 있다.

[0333]

[0329] 일부 구체예에서, HER2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 IgSF 컨쥬게이트 내로 혼입될 수 있다. IgSF 컨쥬게이트 내로 혼입될 수 있는 HER2 항체의 예로는 퍼투주맵(Perjeta®) 및 트라즈투주맵과 같은 항체를 들 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, vIgD는 항-HER2 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 N- 또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 항-HER2 항체는 퍼투주맵 (Perjeta®)이다. 항-HER2 항체 퍼투주맵의 예시적인 경쇄 및 중쇄는 각각 SEQ ID NO: 341 및 340에 제시되어 있다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 퍼투주맵의 경쇄 및/또는 중쇄의 N- 또는 C-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 342의 V_H 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 343의 V_L 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 344의 V_H 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 345의 V_L 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 342에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 341에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 340에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 343에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 344에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 341에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 340에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 345에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 342의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 341의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 340의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 343의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 344의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 341의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 퍼투주맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 340의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 345의 경쇄 서열을 포함한다.

[0334]

[0330] 일부 구체예에서, EGFR (HER1) 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 IgSF 컨쥬게이트에 통합될 수 있다. IgSF 컨쥬게이트에 통합가능한 EGFR 항체의 비제한적인 예로는 파니투무맵 및 세톡시맵과 같은 항체를 들 수 있다. 일부 구체예에서, vIgD는 항-EGFR 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 N- 또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 항-EGFR 항체는 파니투무맵이다. 일부 구체예에서, 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드는 파니투무맵의 경쇄 및/또는 중쇄의 N- 또는 C-말단에 연결된다. 항-EGFR 항체 파니투무맵의 예시적인 경쇄 및 중쇄가 각각 SEQ ID NO: 347 및 346으로서 제시된다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 348의 V_H 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 349의 V_L 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 350의 V_H 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 351의 V_L 서열을 포함하거나 갖는다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 348에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 347에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 346에

대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 349에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 350에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 347에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 346에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 351에 대해 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 348의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 347의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 346의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 349의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 350의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 347의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 파니투무맵을 포함하는 컨쥬게이트는 SEQ ID NO: 346의 중쇄 서열 및 SEQ ID NO: 351의 경쇄 서열을 포함한다.

[0335] [0331] 본 발명의 일 측면에서, 표적화 물질은 압타머 분자이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 압타머는 표적화 물질로서 기능하는 핵산을 포함한다. 다양한 구체예에서 본 발명의 IgSF 컨쥬게이트는 종양 세포, 종양 혈관계, 및/또는 종양 미세환경 상의 분자에 특이적인 압타머를 포함한다. 일부 구체예에서, 압타머 자체는 표적화 모듈(서열)에 더해, 생물학적 활성 서열을 포함할 수 있고, 여기서 상기 생물학적 활성 서열은 표적 세포에 면역 반응을 유도할 수 있다. 달리 설명하면, 이러한 압타머 분자는 이중 용도 물질이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IgSF 컨쥬게이트는 항체에 대한 압타머의 컨쥬게이트를 포함하며 여기서 상기 압타머 및 항체는 종양 세포, 종양 혈관계, 종양 미세환경 상의 분리된 분자, 및/또는 면역 세포에 대한 결합에 특이적이다

[0336] [0332] 용어 "압타머"는 특정 분자에 대한 특이적 결합 특성에 기초하여 선택된 DNA, RNA 또는 펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 압타머(들)은 본 발명에 설명된 바와 같이, 종양 세포, 종양 혈관계, 종양 미세환경, 및/또는 면역 세포 내 특정 유전자 또는 유전자 산물의 결합에 대해 선택될 수 있고, 여기서 이러한 선택은 공지기술의 방법 및 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법에 의해 수행된다.

[0337] [0333] 본 발명의 일부 태양에서 표적화 물질은 펩타이드이다. 예를 들어, 본 발명에 제공된 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 암 또는 종양 세포의 성분과 결합가능한 펩타이드에 컨쥬게이트될 수 있다. 따라서, 본 발명의 이러한 IgSF 컨쥬게이트는 종양 세포, 종양 혈관계의 세포 성분, 및/또는 종양 미세환경의 성분에 결합하는 펩타이드 표적화 물질을 포함한다. 일부 구체예에서, 표적화 물질 펩타이드는 인테그린의 길항제 또는 작용제일 수 있다. 알파 및 베타 서브유닛을 포함하는 인테그린에는 통상의 기술자에게 잘 알려진 수 많은 종류가 있다.

[0338] [0334] 일 구체예에서, 표적화 물질은 V β 3이다. 인테그린 V β 3은 다양한 세포에서 발현되며 파골 세포와 뼈 매트릭스의 접착, 혈관 평활근 세포의 이동 및 혈관 신생을 비롯하여 생물학적으로 관련된 여러 과정을 중재하는 것으로 나타났다. 인테그린을 위한 적절한 표적화 분자로는 RGD 펩타이드 또는 펩타이드 모방체(peptidomimetics) 및 비-RGD 펩타이드 또는 펩타이드 모방체(예컨대 미국특허 Nos. 5,767,071 및 5,780,426 참조), 그 밖의 인테그린 예컨대 V β i (VLA-4), V4-P7 (예컨대, 미국특허 No. 6,365,619; Chang et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159-163 (2002); Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133-136 (2002) 참조), 등을 들 수 있다.

[0339] [0335] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질과 치료제를 포함하는 IgSF 컨쥬게이트가 제공된다. 일부 구체예에서, 치료제의 예로는, 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 들 수 있다 (Rowland 외, Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187, 1986). 일부 구체예에서, 치료제는 세포내 활성을 갖는다. 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는 내면화되고 치료제는 세포의 단백질 합성을 차단하여, 세포 사멸을 유도하는 세포독소이다. 일부 구체예에서, 치료제는 리보솜-불활성화 활성을 갖는 폴리펩타이드 포함 세포독소, 예를 들어, 젤로닌, 부가닌, 사포린, 리신, 리신 A 사슬, 브리오딘, 디프테리아 독소, 레스트리노신, 슈도모나스 내독소 A 및 그의 변이체이다. 치료제가 리보솜-불활성화 활성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 세포독소인 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는 그 단백질이 세포에 세포독성적이기 위해서 표적 세포에 대한 결합시 내면화되어야 한다.

[0340] [0336] 일부 구체예에서, 독소와 컨쥬게이트된, 본 발명에 따른 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 포함하는 IgSF 컨쥬게이트가 제공된다. 일부 구체예에서, 독소는 예컨대 디프테리아 독소와 같은 세균성 독소,

리신과 같은 식물성 독소, 소분자 독소 예컨대 젤다나마이신(Mandler 외, J.Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581 (2000); Mandler 외, Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler 외, Bioconjugate Chem. 13:786-791 (2002)), 메이탄시노이드 (EP 1391213; Liu 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)), 및 칼리케아마이신 (Lode 외, Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman 외, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993))이다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 억제제를 비롯한 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 발휘한다.

[0341] [0337] 일부 구체예에서, 검출가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 생성할 수 있는 표지와 컨쥬게이션된, 본 발명에서 제공된 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 포함하는 IgSF 컨쥬게이트가 제공된다. 이들 IgSF 컨쥬게이트는 예컨대 생체내에서 암을 검출하는 것과 같은 연고 또는 진단 용도로 사용될 수 있다. 표지는 종기로는 검출가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 생성할 수 있는 것이 바람직하다. 예를 들어, 표지는 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I와 같은 방사능-불투과형 또는 방사능동위원소; 형광(플루오로포어) 또는 화학발광(크로모포어) 화합물, 예컨대 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린; 알칼린 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 호스라디쉬 퍼옥사이드와 같은 효소; 조영제; 또는 금속 이온일 수 있다. 일부 구체예에서, 표지는 신티그래프 연구를 위한 방사능 원자, 예컨대 ⁹⁹Tc 또는 ¹²³I, 또는 핵자기공명(NMR) 영상화(자기공명영상화, MRI라고도 알려짐)를 위한 스핀 표지, 예컨대 지르코늄-89, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 붐소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철일 수 있다. 지르코늄-89는 다양한 금속 킬레이트화제와 복합체를 형성하여 예컨대 PET 영상화를 위해 항체에 컨쥬게이트될 수 있다 (WO 2011/056983). 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트는 간접적으로 검출가능하다. 예를 들어, IgSF 컨쥬게이트에 특이적이고 검출가능한 표지를 함유하는 이차 항체를 이용하여 IgSF 컨쥬게이트를 검출할 수 있다.

[0342] [0338] IgSF 컨쥬게이트는 공지 기술 방법을 이용하여 만들 수 있다. 예컨대, 본 발명에 그 내용 전체가 참조 병합된 WO 2009/067800, WO 2011/133886, 및 미국특허 출원공개 No. 2014322129 참조.

[0343] [0339] IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 이펙터 모이어티와 연계 또는 연결시킬 수 있는 임의의 수단에 의해 이펙터 모이어티에 "부착(attached to)"될 수 있다. 예를 들어, IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 화학 또는 재조합 수단에 의해 이펙터 모이어티에 부착될 수 있다. 융합체 또는 컨쥬게이트를 제조하기 위한 화학적 수단은 기술 분야에 알려져 있으며 IgSF 컨쥬게이트를 제조하는데 이용될 수 있다. 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질과 이펙터 모이어티를 컨쥬게이트하는데 사용되는 방법은 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질이 그들의 하나 이상의 카운터 구조 리간드와 결합하는 능력을 간섭함이 없이, 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 이펙터 모이어티에 연결시킬 수 있어야 한다.

[0344] [0340] IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 이펙터 모이어티에 간접적으로 연결될 수 있다. 예컨대, IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 여러가지 종류 중 한 종류의 이펙터 모이어티를 함유하는 리포솜에 직접 연결될 수 있다. 이펙터 모이어티(들) 및/또는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 고체 표면에 결합될 수도 있다.

[0345] [0341] 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질 및 이펙터 모이어티는 두 가지 모두 단백질이며 공지 기술을 이용하여 컨쥬게이션될 수 있다. 이들 두 단백질을 컨쥬게이트시킬 수 있는 크로스링커들이 수백여종이나 존재한다 (예를 들어 "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking," 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor 참조). 크로스링커는 일반적으로 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질 및/또는 이펙터 모이어티 상에 삽입되거나 또는 이용가능한 반응성 관능기에 기초해서 선택된다. 또한, 반응성 기가 없을 경우, 광활성화가능한 크로스링커를 사용할 수 있다. 특정 예에서, 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질과 이펙터 모이어티 사이에 스페이서를 포함시키는 것이 요망될 수 있다. 기술분야에 알려진 가교제로는 호모이끼능성 물질; 글루타르알데히드, 디메틸아디피테이트 및 비스(디아조벤지딘) 및 헤테로이끼능성 물질; m 말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 및 설폰-m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드를 들 수 있다.

[0346] [0342] 일부 구체예에서, IgSF 컨쥬게이트의 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 이펙터 모이어티의 화학적 결합을 위한 특이적 잔기에 의해 조작될 수 있다. 기술분야에 공지인 분자의 화학적 부착에 사용되는 특이적 잔기의 예로는 리신 및 시스테인을 들 수 있다. 크로스링커는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질 상에 삽입되고, 이펙터 모이어티 상에서 이용가능한 반응성 관능기에 기초하여 선택된다.

[0347] [0343] IgSF 컨쥬게이트는 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수도 있다. 이 경우 변이체 폴리펩타이드 또는

면역조절 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 이펙터 모이어티를 인코딩하는 DNA 서열에 융합시켜, 키메라 DNA 분자를 결과시킨다. 이 키메라 DNA 서열은 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포 내로 형질감염된다. 융합 단백질은 공지기술에 따라 포 배양체로부터 회수되어 정제될 수 있다.

[0348] [0344] 표지인 이펙터 모이어티를 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질에 결합시키는 예로는 다음 문헌에 설명된 방법들이 포함된다: Hunter, 외, Nature 144:945 (1962); David, 외, Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, 외, J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982); Wensel 및 Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983); 및 Colcher 외, "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802-16 (1986).

[0349] [0345] 방사능-또는 그 밖의 표지들을 공지 방식으로 컨쥬게이트 내에 통합시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 펩타이드는 예를 들어, 수소 대신 불소-19를 포함하는 적절한 아미노산 전구체를 이용하는 화학적 아미노삽입에 의해 합성되거나 또는 생물합성될 수 있다. 99Tc 또는 123I, 186Re, 188Re 및 111In 등의 표지를 펩타이드 내 시스테인 잔기를 통해 결합시킬 수 있다. 이트륨-90을 리신 잔기를 통해 부착시킬 수 있다. IODOGEN 방법 (Fraker 외, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978))을 이용하여 요오드-123을 통합시킬 수 있다. 문헌 "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)에는 그 밖의 방법들이 자세히 설명되어 있다.

[0350] [0346] 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질과 세포독성 물질과의 컨쥬게이트는 다양한 이기능성 단백질 커플링 물질, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일)헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스(p-디아조늄벤조일)-테틸렌디아민), 디이소시아테이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디아소시아테이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta 외, Science 238:1098 (1987)에 설명된 방법으로 만들 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 tn아민헨타아세트산 (MX-DTPA)은 방사능 뉴클레오타이드를 항체에 컨쥬게이트시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 참조: 예컨대, W094/11026. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 해주는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커 (Chari 외, Cancer Research 52:127-131 (1992); 미국특허 No. 5,208,020)를 이용할 수 있다.

[0351] [0347] 본 발명의 IgSF 컨쥬게이트가 명백히 고려될 수 있으나 크로스-링커 시약을 이용하여 제조된 약물 컨쥬게이트에 한정되지 않는다: 상업적으로 구입가능한 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)(예컨대, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 참조: 페이지 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[0352] E. 막관통 및 분비가능한 면역조절 단백질 및 조작된 세포

[0353] [0348] 본 발명에 따라 면역조절 변이체 CD86 폴리펩타이드 (또는 "조작된 세포")를 발현하는 조작된 세포들이 제공된다. 일부 구체예에서, 발현된 면역조절 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 단백질이고 및 표면 발현된다. 일부 구체예에서, 발현된 면역조절 변이체 CD86 폴리펩타이드는 발현되어 세포로부터 분비된다.

[0354] 1. 막관통 면역조절 단백질

[0355] [0349] 일부 구체예에서, 변이체 CD86을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드는 막 결합 단백질일 수 있다. 이하에서 더욱 자세히 설명되는 바와 같이, 면역조절 폴리펩타이드는 변이체 CD86을 포함하는 막관통 면역조절 폴리펩타이드일 수 있으며 여기에는: 적어도 하나의 친화성 변형된 IgSF 도메인 (IgV 또는 IgC)을 함유하는 엑토도메인, 막관통 도메인 및, 선택적으로 세포질 도메인이 포함된다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 림프구 (예컨대 T 세포 또는 NK 세포) 또는 항원 제시 세포의 표면을 비롯하여, 포유동물 세포와 같은 면역 세포의 표면에서 발현될 수 있다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은, 예컨대: T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포 (또는 세포독성 T 림프구 또는 CTL), 내추럴 킬러 T-세포, 조절 T-세포, 메모리 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포와 같은, 포유동물 T-세포의 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 포유동물 세포는 항원 제시 세포

(APC)이다. 일반적으로, 그러나 배타적이지는 않지만, 엑토도메인 (또는 "세포외 도메인")은 본 발명의 변이체 CD86의 하나 이상의 아미노산 변이(예컨대 아미노산 치환)를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 일부 구체예에서 막관통 단백질은 본 발명의 변이체 CD86의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 엑토도메인을 포함할 것이다.

- [0356] [0350] 일부 구체예에서, 조작된 세포들은 막관통 단백질과 같은 막 단백질일 수 있는 막관통 면역조절 폴리펩타이드 (TIP)인 변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현한다. 전형적인 구체예에서, 막 단백질의 엑토도메인은 본 발명에서 제공된 변이체 CD86의 세포외 도메인 또는 그의 IgSF 도메인을 포함하되 적어도 하나의 igSF 도메인에는 하나 이상의 아미노산 치환이 함유된 것이다. 본원에서 제공된 막관통 면역조절 단백질은 엑토도메인에 링크된 막관통 도메인을 추가로 함유한다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 세포 상에서의 세포 표면 발현을 위해 인코딩된 단백질을 결과시킨다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 엑토도메인에 직접 링크된다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 하나 이상의 링커 또는 스페이서를 통해 엑토도메인에 간접 링크된다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 류신 및 발린과 같은 소수성 아미노산 잔기들을 주로 함유한다.
- [0357] [0351] 일부 구체예에서, 조작된 T 세포와 같은 조작된 세포의 표면에서 TIPs가 발현되도록 하기 위해 전장 막관통 고정(anchor) 도메인이 사용될 수 있다. 간단하게, 이것은 천연 IgSF 단백질 (예컨대 CD86)과 유사한 방식으로 친화성 변형되어(예컨대 CD86 또는 다른 천연 IgSF 단백질), 제1 막 근위(proximal) 도메인 서열에 간단히 융합되어 있는 특정한 천연 단백질로부터 유래할 수 있다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 SEQ ID NO:2에 제시된 아미노산 서열들에 함유된 막관통 도메인과 같은, 대응하는 야생형 또는 변형되지 않은 IgSF 멤버의 막관통 도메인을 포함한다(표 2 참조). 일부 구체예에서, 막 결합 형태는 SEQ ID NO:2의 잔기 248-268에 대응하는 것과 같이, 대응하는 야생형 또는 비변형 폴리펩타이드의 막관통 도메인을 포함한다.
- [0358] [0352] 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 천연 CD86의 막관통 도메인이 아닌 비-천연 막관통 도메인이다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 막-결합되거나 또는 막관통 단백질인 또 다른 비-CD86 패밀리의 멤버 폴리펩타이드로부터의 막관통 도메인으로부터 유래한다. 일부 구체예에서는, T 세포 상의 다른 단백질로부터의 막관통 고정 도메인이 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 CD8로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 스페이서 도메인 역할을 하는 CD8의 세포외 부분을 추가로 함유할 수 있다. 예시적인 CD8 유래된 막관통 도메인이 SEQ ID NO: 281, 282, 또는 283 또는 CD8 막관통 도메인을 함유하는 그의 일부에 제시되어 있다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 합성 막관통 도메인이다.
- [0359] [0353] 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 막관통 도메인에 링크된 세포질 시그널링 도메인과 같은 엔도도메인을 추가로 함유한다. 일부 구체예에서, 세포질 시그널링 도메인은 세포 시그널링을 유도한다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질의 엔도도메인은 SEQ ID NO:2, 예컨대 SEQ ID NO:2의 아미노산 269-329에 제시된 아미노산 서열에 함유된 세포질 도메인과 같은, 대응하는 야생형 또는 변형되지 않은 폴리펩타이드의 세포질 도메인을 포함한다 (표 2 참조).
- [0360] [0354] 일부 구체예에서, 변이체 CD86이거나 이를 포함하는 제공된 막관통 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 56에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 설명된 바와 같은 적어도 하나의 친화성-변형된 CD86 IgSF 도메인 및 막관통 도메인을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 설명된 바와 같이, IgSF 도메인 (예컨대 IgV 도메인)에 하나 이상의 임의의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 설명된 바와 같이 세포질 도메인을 더 포함할 수 있다.
- [0361] [0355] 본 발명에 따라, CD86 막관통 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서 CD86 TIP은 SEQ ID NO: 233에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, CD86 TIP은 엑토도메인 (세포외 부분) 또는 그의 IgSF (예컨대 IgV) 도메인 또는 그의 특이적 결합 부분에서 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대 치환)을 함유하는 변이체 CD86 TIP이다. 예시적인 아미노산 변형 (예컨대 치환)은 섹션 II에 설명된 임의의 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 TIP은 SEQ ID NOS: 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 또는 241 중 어느 하나에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 TIP은 SEQ ID NOS: 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 또는 241에 제시된 서열을 갖는다.
- [0362] [0356] 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 시그널 펩타이드를 더 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열에 포함된 것과 같은, 야생형 IgSF 멤버의 천연 시그널 펩타이드이다 (예컨대 표 2 참조).

- [0363] [0357] 이러한 막관통 면역조절 단백질들을 인코딩하는 핵산 분자도 제공된다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NOS: 56에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내고, 설명된 바와 같은 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인, 및 선택적으로 세포질 도메인을 함유하는 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 시그널 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 대응하는 야생형 IgSF 멤버의 천연 시그널 펩타이드이다 (예컨대 표 2 참조). 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 표 4에 제시된 바와 같은, 이중 시그널 펩타이드이다.
- [0364] [0358] 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질의 엔도도메인이 적어도 하나의 ITAM (면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프)-함유 시그널링 도메인을 함유하는 세포질 시그널링 도메인을 함유하는 것인 CAR-관련 막관통 면역조절 단백질이 제공된다. ITAM은 T-세포 수용체 시그널 형질도입에 관여하는 CD3-제타 사슬("CD3-z")에 포함된, 면역 세포의 시그널 형질도입에 관여하는 수 개의 단백질 시그널링 도메인에서 발견되는 보존적 모티프이다. 일부 구체예에서, 엔도도메인은 CD3-제타 시그널링 도메인에 포함된다. 일부 구체예에서, CD3-제타 시그널링 도메인은 SEQ ID NO: 284에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 284에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 T 세포 시그널링 활성을 유지하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, CAR-관련 막관통 면역조절 단백질의 엔도도메인은 T-세포의 면역조절 반응을 추가로 조절하기 위해 공동자극 시그널링 도메인을 더 함유한다. 일부 구체예에서, 공동자극 시그널링 도메인은 CD28, ICOS, 4-1BB 또는 OX40이다. 일부 구체예에서, 공동자극 시그널링 도메인은 CD28 또는 4-1BB로부터 유래되고 SEQ ID NOS: 285-288에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 285-288에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 T 세포 공동자극 시그널링 활성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, CAR-관련 막관통 면역조절 단백질은 친화성 변형된 IgSF 도메인이 동족 결합 파트너 또는 카운터 구조물에 결합시 T 세포 시그널링을 자극하는 CARs의 속성을 갖는다. 일부 구체예에서, 친화성-변형된 IgSF 도메인의 그의 카운터 구조물에 대한 특이적 결합에 의해, 세포독성, 증식 또는 사이토카인 생산의 변화에 의해 반영되는 바와 같은 T-세포 활성의 면역학적 활성의 변화가 일어날 수 있다.
- [0365] [0359] 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 세포질 시그널링을 매개할 수 있는 엔도도메인을 함유하지 않는다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 야생형 또는 변형되지 않은 폴리펩타이드의 시그널 형질도입 메커니즘을 결여하며 따라서 그 자체는 세포 시그널링을 유지하지 않는다. 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 SEQ ID NOS: 2에 제시된 아미노산 서열에 함유된 세포질 시그널링 도메인과 같은, 대응하는 야생형 또는 변형되지 않은 폴리펩타이드의 세포내(세포질) 도메인 또는 세포내 도메인의 일부를 결여한다 (표 2 참조). 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 IgSF 패밀리에 (예컨대 PD-1 또는 TIGIT)의 억제 수용체를 비롯한, 특정한 억제 수용체에 함유된 것과 같은 ITIM (면역수용체 티로신-기반 억제 모티프)을 함유하지 않는다. 따라서, 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질은 설명된 것과 같이 엑토도메인 및 막관통 도메인만을 함유한다.
- [0366] **2. 분비된 면역조절 단백질 및 조작된 세포들**
- [0367] [0360] 일부 구체예에서, 설명된 바와 같은 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 함유하는 CD86 변이체 면역조절 폴리펩타이드는 예컨대 세포에서 발현되는 때, 분비가능하다. 이러한 변이체 CD86 면역조절 단백질은 막관통 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 면역조절 단백질은 반감기 연장 모이어티 (예컨대 Fc 도메인 또는 멀티머화 도메인)에 컨쥬게이트되지 않는다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 면역조절 단백질은 시그널 펩타이드, 예컨대 항체 시그널 펩타이드 또는 세포 외부의 도메인을 획득하기 위한 다른 효과적인 시그널 서열을 포함한다. 면역조절 단백질이 시그널 펩타이드를 포함하고 조작된 세포에 의해 발현될 경우, 시그널 펩타이드는 면역조절 단백질로 하여금 조작된 세포에 의해 분비하게 한다. 일반적으로, 시그널 펩타이드 또는 시그널 펩타이드의 일부는 분비와 함께 면역조절 단백질로부터 절단된다. 면역조절 단백질은 핵산 (발현 벡터의 일부일 수 있음)에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 세포 (예컨대, 면역 세포, 예를 들어 일차 면역 세포)에 의해 발현 및 분비된다.
- [0368] [0361] 따라서, 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드를 더 포함하는 변이체 CD86 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따라 시그널 펩타이드를 인코딩하는 분비 서열에 작동적으로 연결된 변이체 CD86 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0369] [0362] 시그널 펩타이드는 세포로부터 면역조절 단백질의 분비를 시그널링하는 면역조절 단백질의 N-말단 상의

서열이다. 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 약 5 내지 약 40 아미노산 길이 (예컨대 약 5 내지 약 7, 약 7 내지 약 10, 약 10 내지 약 15, 약 15 내지 약 20, 약 20 내지 약 25, 또는 약 25 내지 약 30, 약 30 내지 약 35, 또는 약 35 내지 약 40 아미노산 길이)이다.

[0370] [0363] 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 대응하는 야생형 CD86으로부터의 천연 시그널 펩타이드이다 (표 2 참조). 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 비-천연 시그널 펩타이드이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 비-천연 시그널 펩타이드는 대응하는 야생형 CD86으로부터의 돌연변이 천연 시그널 펩타이드이고, 하나 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 이상)의 치환체 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 비-천연 시그널 펩타이드는 야생형 IgSF 패밀리를 포함하는 IgSF 패밀리로부터의 패밀리를 포함하는 시그널 펩타이드 또는 그의 돌연변이이다. 일부 구체예에서, 비-천연 시그널 펩타이드는 야생형 IgSF 패밀리를 포함하는 IgSF 패밀리로부터의 패밀리를 포함하는 시그널 펩타이드 또는 그의 돌연변이이다. 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드는 비-IgSF 단백질 패밀리로부터의 시그널 펩타이드 또는 그의 돌연변이, 예컨대 면역글로불린 (예컨대 IgG 중쇄 또는 IgG-카와 경쇄)으로부터의 시그널 펩타이드, 사이토카인 (예컨대 인터류킨-2 (IL-2), 또는 CD33), 혈청 알부민 단백질 (예컨대 HSA 또는 알부민), 인간 아주로시딘 프리단백질 시그널 서열, 루시페라제, 트립시노젠 (예컨대 키모트립시노젠 또는 트립시노젠) 또는 세포로부터 단백질을 효과적으로 분비할 수 있는 기타 시그널 펩타이드이다. 예시적인 시그널 펩타이드가 표 4에 설명되어 있다.

표 4. 예시적인 시그널 펩타이드		
SEQ ID NO	시그널 펩타이드	펩타이드 서열
289	CD33 시그널 펩타이드	MPLLLLPLWAGALA
290	IgG 카와 경쇄:	MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC
291	HSA 시그널 펩타이드	MKWVTFISLLFLFSSAYS
292	Ig 카와 경쇄	MDMRAPAGIFGLLVLPGYRS
293	인간 아주로시딘 예비단백질 시그널 서열	MTRLTVLALLAGLLASSRA
294	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MELGLSWIFLLAILKGVQC
295	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MELGLRWVFLVAILEGVQC
296	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
297	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MDWTWRILFLVAAATGAHS
298	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MDWTWRFLFVAAATGVQS
299	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
300	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
301	IgG 중쇄 시그널 펩타이드	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS
302	IgG 카와 경쇄 시그널 서열:	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC
303	IgG 카와 경쇄 시그널 서열:	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
304	Gaussia 루시페라제	MGVKVLFALICIAVAEA
305	인간 알부민	MKWVTFISLLFLFSSAYS
306	인간 키모트립시노젠	MAFLWLLSCWALLGTTFG
307	인간 인터류킨-2	MQLLSIALILALV
308	인간 트립시노젠-2	MNLLLLTFVAAAVA

[0371] [0364] 분비가능한 변이체 CD86 면역조절 단백질의 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 발현될 경우 시그널 펩타이드를 포함하고, 시그널 펩타이드 (또는 그의 일부)는 분비시 면역조절 단백질로부터 절단된다.

[0373] [0365] 일부 구체예에서, 조작된 세포들은 세포로부터 분비된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 이러한 변이체 CD86 폴리펩타이드는 분비를 위해 시그널 서열의 작동가능한 조절 하에서 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 일부 구체예에서, 인코딩된 면역조절 단백질은 세포로부터 발현될 때 분비된다. 일부 구체예에서, 핵산 분자에 의해 인코딩된 면역조절 단백질은 막관통 도메인을 함유하지 않는다. 일부 구체예에서, 핵산 분자에 의해 인코딩된 면역조절 단백질은 반감기 연장 모이어티(예컨대 Fc 도메인 또는 멀티머화 도메인)를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 핵산 분자에 의해 인코딩된 면역조절 단백질은 시그널 펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자에 의해 인코딩된 면역조절 단백질은 시그널 펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 핵산은 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된 분비 또는 시그널 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함함으로써 해서, 면역조절 단백질의 분비를 가능케 한다.

[0374] 3. 세포 및 세포의 조작

[0375] [0366] 본원에서 제공된 면역조절 폴리펩타이드 중 임의의 것을 발현하는 조작된 세포가 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 제공된 막관통 면역조절 폴리펩타이드 중 임의의 것을 그들의 표면에서 발현한다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 단백질의 분비에 적합한 조건 하에서 세포로부터 면역조절 단백질을 발현 및

분비할 수 있거나 또는 분비할 수 있다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 림프구 예컨대 종양 침윤 림프구 (TIL), T-세포 또는 NK 세포 또는 골수 세포에서 발견된다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 항원 제시 세포 (APC)이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 조작된 포유동물 T-세포 또는 조작된 포유동물 항원 제시 세포 (APC)이다. 일부 구체예에서, 조작된 T 세포 또는 APC는 인간 또는 쥐 세포이다.

[0376] [0367] 일부 구체예에서, 조작된 T-세포의 비제한적인 예로는, T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포 (또는 세포독성 T 림프구 또는 CTL), 내츨러 킬러 T-세포, 조절 T-세포, 메모리 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 조작된 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+이다. MHC의 시그널에 더해, 조작된 T-세포 역시도 공동-자극 시그널을 필요한다. 일부 구체예에서, 조작된 T 세포는 또한, 경우에 따라, 이전에 논의된 바와 같은 막 결합 형태로 발현되는 변이체 CD86 막관통 면역조절 폴리펩타이드에 의해 제공되는 억제 시그널에 의해 조절될 수 있다.

[0377] [0368] 일부 구체예에서, 조작된 APC에는, 예를 들어, 세포성 및 비세포성 (예컨대, 생물분해가능한 폴리머 미립자) aAPC를 모두 포함하는 인공 APC (aAPCs) 뿐만 아니라, MHC II 발현 APCs 예컨대 대식세포, B 세포, 및 수지상 세포가 포함된다. 인공 APCs (aAPCs)는 T 세포에 대해 항원을 제시하고 T 세포를 활성화시킨다는 점에서 APCs와 유사한 방식으로 작용가능한 APCs의 합성 버전이다. 항원 제시는 MHC (클래스 I 또는 클래스 II)에 의해 수행된다. 일부 구체예에서, aAPC와 같은 조작된 APC에서, MHC 상에 로딩된 항원은, 일부 구체예에서, 종양 특이 항원 또는 종양 관련 항원이다. MHC 상에 로딩된 항원은 T 세포의 T-세포 수용체 (TCR)에 의해 인식되며, 몇몇 경우, CTLA-4, CD28, 또는 본 발명에 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드에 의해 인식되는 다른 분자들을 발현할 수 있다. aAPC를 조작하는데 사용가능한 물질로는 다음을 들 수 있다: 폴리(글리콜산), 폴리(락틱-코-글리콜산), 철-산화물, 리포솜, 지질 이중층, 세파로스 및 폴리스티렌.

[0378] [0369] 일부 구체예에서 세포 aAPC는 입양 세포 요법에 이용되는 TIP 및 TCR 작용제를 함유하도록 조작될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포 aAPC는 예컨대 환자에게 재도입을 위해 이틀테면 투여 전, 인간 세포의 생체의 팽창에 사용되는 TIP 및 TCR 작용제를 함유하도록 조작될 수 있다. 일부 태양에서, aAPC는 적어도 하나의 항-CD3 항체 클론, 예컨대 OKT3 및/또는 UCHL1의 발현을 포함할 수 있다. 일부 태양에서, aAPCs는 불활성화(예컨대 조사)될 수 있다. 일부 구체예에서, TIP는 Ttpvh 상에서 동족 결합 파트너에 대해 결합 친화성을 나타내는 임의의 변이체 IgSF 도메인을 포함할 수 있다.

[0379] [0370] 일부 구체예에서, 막관통 면역조절 단백질 또는 분비가능한 면역조절 단백질과 같은 본 발명에서 제공된 면역조절 단백질은 항원-결합 수용체, 예컨대 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 세포 내에서 공동발현되거나 또는 이들 세포 내로 조작된다. 일부 구체예에서, 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포는 암, 염증성 및 자가면역 질환 또는 바이러스 감염과 관련된 목적 항원을 인식한다. 특정 구체예에서, 항원-결합 수용체는 종양 특이 항원 또는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 모이어티를 함유한다. 일부 구체예에서, 조작된 T-세포는 항원, 예컨대 종양 특이 항원 또는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인 (예컨대 scFv)을 함유하는 CAR (키메라 항원 수용체) T-세포이다. 일부 구체예에서, TIP 단백질은 조작된 T-세포 수용체 세포에서 발현되고 조작된 키메라 항원 수용체 세포에서 발현된다. 이러한 구체예에서, 조작된 세포는 TIP 및 CAR 또는 TCR을 공동-발현한다. 일부 구체예에서, SIP 단백질은 조작된 T-세포 수용체 세포 또는 조작된 키메라 항원 수용체 세포에서 발현된다. 이러한 구체예에서, 조작된 세포는 SIP 및 CAR 또는 TCR을 공동-발현한다.

[0380] [0371] 키메라 항원 수용체(CAR)는 항원이 결합된 후 T 세포에 활성화 시그널을 유도 또는 매개할 수 있는 세포 내 시그널링 영역(엑토도메인), 막관통 도메인 및 항원-결합 도메인(엑토도메인)을 포함하는 재조합 수용체이다. 일부 예에서, CAR-발현 세포는 활성화 도메인 및 일부 경우에서, 공동자극 도메인을 포함하는 세포 내 시그널링 부위에 연결된 특정 종양 항원에 대해 특이성을 갖는 세포외 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 발현하도록 조작된다. 공동자극 도메인은 예컨대, CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, 유도성 T 세포 공동자극자(ICOS)로부터 유래할 수 있다. 활성화 도메인은 예컨대, CD3, 이틀테면 CD3 제타, 엡실론, 델타, 감마, 등으로부터 유래할 수 있다. 특정 구체예에서, CAR은 2, 3, 4개 또는 그 이상의 공동자극 도메인을 갖도록 설계된다. CAR scFv는 질병 또는 병태와 관련된 세포에서 발현된 항원, 예를 들어 종양 항원, 예를 들어 특정 유형의 공격적인 유방암의 발달 및 진행에 있어 어떤 역할을 하는 것으로 나타난, HER2를 표적화하도록 설계될 수 있다.

[0381] [0372] 일부 태양에서, 항원-결합 도메인은 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 이틀테면 단일 사슬 단편(scFv)이다. 일부 구체예에서, 항원은 종양 또는 암 세포에서 발현된다. 예시적인 항원은 HER2이다. 예시적인 CAR은 항-HER2 CAR, 이틀테면 항-HER2 scFv를 함유하는 CAR이다. 기타 예시적인 CAR에는 include 항-CD19 CAR, 항-BCMA

CAR, 항-CD22 CARs 및 종양-관련 항원에 특이적인 다른 CAR이 포함된다. 일부 구체예에서, CAR은 스페이서, 막관통 도메인, 및 ITAM 시그널링 도메인, 이를테면 CD3-제타 시그널링 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 도메인 또는 영역을 더 함유한다. 일부 구체예에서, CAR은 공동자극 시그널링 도메인을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 스페이서 및 막관통 도메인은 SEQ ID NO: 281, 282, 또는 283에 제시된 예시적인 서열 또는 SEQ ID NO: 281, 282, 또는 283에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열과 같이 CD8로부터 유래된 힌지 및 막관통 도메인이다. 일부 구체예에서, 엔도도메인은 CD3-제타 시그널링 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, CD3-제타 시그널링 도메인은 SEQ ID NO: 284에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 284에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 나타내고 T 세포 시그널링 활성을 보유하는 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, CAR의 엔도도메인은 T 세포의 면역조절 반응을 더 조절하기 위해 공동자극 시그널링 도메인 또는 영역을 더 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 공동자극 시그널링 도메인은 CD28, ICOS, 4-1BB 또는 OX40의 공동자극 영역이거나 또는 이를 포함하거나, 또는 공동자극 영역으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 공동자극 시그널링 도메인은 CD28 또는 4-1BB로부터 유래하고 SEQ ID NOS: 285-288에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 285-288에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 T 세포 공동자극 시그널링 활성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0382] [0373] 일부 구체예에서, CAR을 인코딩하는 작제물은 자가-절단성(self-cleaving) 펩타이드 서열에 의해 CAR로부터 분리된, 예컨대 검출가능한 단백질과 같은 마커 등의 제2 단백질을 더 인코딩한다. 일부 구체예에서, 자가-절단성 펩타이드 서열은 F2A, T2A, E2A 또는 P2A 자가-절단성 펩타이드이다. T2A 자가-절단성 펩타이드의 예시적인 서열이 SEQ ID NOS: 309, 310, 311 중 어느 하나에 제시되거나 또는 SEQ ID NOS: 309, 310, 311 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열에 제시되어 있다. 일부 구체예에서, T2A는 SEQ ID NO: 311에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 SEQ ID NO: 311에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 인코딩된다. P2A 자가-절단성 펩타이드의 예시적인 서열이 SEQ ID NO: 243 또는 SEQ ID NOS: 243에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열에 제시되어 있다. 일부 경우에서, 핵산 작제물은 두 개 이상의 P2A 자가-절단성 펩타이드(이를테면 P2A1 및 P2A2)를 인코딩하고 여기서 뉴클레오타이드 서열 P2A1 및 P2A2 각각은 SEQ ID NO: 243에 제시된 P2A를 인코딩하되, 뉴클레오타이드 서열은 서열간 재조합을 회피하기 위해 서로 다를 수 있다.

[0383] [0374] 일부 구체예에서, 마커는 검출가능한 단백질, 이를테면 형광 단백질, 예컨대 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 청색 형광 단백질(BFP)이다. 형광 단백질 마커의 예시적인 서열이 SEQ ID NO: 313, 312, 244-246 또는 SEQ ID NO: 313, 312, 244-246에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열에 제시되어 있다.

[0384] [0374] 일부 구체예에서, CAR은 항-HER scFv, CD8 힌지 영역, 및 4-1BB 및 CD3-제타 시그널링 도메인으로부터 유래된 막관통 시그널링 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, CAR은 트라스투주맙의 가변 중쇄 및 경쇄를 함유하는 scFv를 포함한다.

[0385] [0375] 또 다른 구체예에서, 조작된 T-세포는 재조합 또는 조작된 TCR을 비롯한 TCR을 갖는다. 일부 구체예에서, TCR은 천연 TCR일 수 있다. 통상의 기술자라면 일반적으로 천연 포유동물 T-세포 수용체가 항원 특이적 인식 및 결합과 연루된 알파 및 베타 사슬(또는 감마 및 델타 사슬)을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 일부 구체예에서, TCR은 변형된 조작된 TCR이다. 일부 구체예에서, 조작된 T 세포의 TCR은 APC에 의해 제시된 종양 관련되거나 종양 특이적인 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, TCR은 HPV16 E6 펩타이드(E6 TCR)이다. 일부 구체예에서, TCR은 HPV16 E7 펩타이드(E7 TCR)이다. 예시적인 HPV TCR은 국제 공개된 PCT App1. WO2015009606 또는 WO2015184228에 설명되니 것들을 포함한다.

[0386] [0377] 일부 구체예에서, 면역조절 폴리펩타이드, 예컨대 막관통 면역조절 폴리펩타이드 또는 분비가능한 면역조절 폴리펩타이드는, 재조합 숙주 세포의 경우 사용되는 것과 같은 다양한 전략에 의해, 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포 또는 조작된 APC 내로 통합될 수 있다. DNA 작제물을 일차 T 세포 내로 도입하기 위한 다양한 방법이 기술분야에 알려져 있다. 일부 구체예에서, 바이러스 형질도입 또는 플라스미드 전기천공이 사용된다. 전형적인 구체예에서, 발현 벡터. 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자는 발현된 막관통 면역조절 단백질을 세포막에 국소화시키거나 또는 분비시키는 시그널 펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 막관

통 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산을 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 내로 서브-클로닝하여, 숙주 포유동물 세포에서 발현시킨다. 발현 벡터는 포유동물 숙주 세포 내로 삽입될 수 있고, 숙주 세포 배양 조건 하에서, 면역조절 단백질을 표면 상에서 발현되거나 또는 분비된다.

[0387] [0378] 예시적인 한 가지 예에서, 일차 T-세포는 생체외에서 정제되어(CD4 세포 또는 CD8+ 세포 또는 양자 모두) 다양한 TCR/CD28 작용제, 예컨대 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드로 구성된 활성화 프로토콜에 의해 자극될 수 있다. 2일 또는 3일 활성화 프로세스 후, 면역조절 폴리펩타이드를 함유하는 재조합 발현 벡터를 표준 렌티 바이러스 또는 레트로바이러스 형질도입 프로토콜 또는 플라스미드 전기천공 전략을 통해 일차 T 세포 내로 안정하게 도입시킬 수 있다. 세포들을 예컨대 변이체 CD86을 포함하는 천연 부모 분자 및 폴리펩타이드와 교차-반응하는 항체 또는 항-에피토프 태그를 이용하는 유세포 분석법에 의해, 면역조절 폴리펩타이드 발현에 대해 모니터링할 수 있다. 면역조절 폴리펩타이드를 발현하는 T-세포들은 항-에피토프 태그 항체를 이용한 소팅을 통해 농축되거나 또는 용도에 따라 고발현 또는 저발현을 위해 농축될 수 있다.

[0388] [0379] 면역조절 폴리펩타이드 발현시, 조작된 T-세포를 다양한 수단에 의해 적절한 기능에 대해 분석할 수 있다. 조작된 CAR 또는 TCR 공동-발현을 분석하여 조작된 T 세포의 이 부분이 면역조절 단백질의 발현에 의해 유의적으로 영향을 받지 않았음을 입증할 수 있다. 일단 분석되면, 표준 시험관내 세포독성, 증식 또는 사이토카인 분석(예컨대, IFN-감마, IL-2, TNF α 발현)을 이용하여, 조작된 T-세포의 기능을 평가할 수 있다. 예시적인 표준 엔드포인트는 종양 세포주의 용해 백분율, 조작된 T-세포의 증식 또는 배양 상등액 중 IFN-감마 단백질 발현이다. 대조군 작제물에 비해 종양 세포주의 통계적으로 유의한 증가된 용해, 조작된 T-세포의 증가된 증식 또는 증가된 IFN-감마 발현을 야기하는 조작된 작제물을 선택할 수 있다. 또한, 조작되지 않은, 예컨대 천연 일차 또는 내인성 T-세포 역시도 동일한 시험관내 분석으로 처리하여, 조작된 T-세포와 같은 조작된 세포에서 발현되는 면역조절 폴리펩타이드 작제물의 활성을 조절하는 능력, 예컨대 일부 사례에서 바이스텐더, 천연 T-세포에서 이펙터 기능을 활성화 및 생성하는 능력을 측정할 수 있다. CD25, CD69, 또는 CD44와 같은 활성화 또는 분화 마커의 증가된 발현이 내인성 T 세포에서 모니터링될 수 있고, 증가된 증식 및/또는 사이토카인 생산은 조작된 T 세포에서 발현된 면역조절 단백질의 목적하는 활성을 가리키는 것일 수 있다.

[0389] [0380] 일부 구체예에서, 유사한 분석법을 이용하여 CAR 또는 TCR을 단독으로 함유하는 조작된 T 세포의 기능과 CAR 또는 TCR 및 TIP 작제물을 함유하는 것들의 기능을 비교할 수 있다. 전형적으로, 이러한 시험관내 분석법은 동족체 CAR 또는 TCR 항원을 함유하는 "종양" 세포주 및 조작된 T 세포를 배양체에 다양한 비율로 플레이팅함으로써 수행된다. 표준 종말점은 종양 세포의 용해 백분율, 조작된 T 세포의 증식 또는 배양 상등액 중의 IFN-감마 생산이다. 통계적으로 유의하게 증가된 종양 세포주의 용해, 조작된 T 세포의 증가된 증식, 또는 동일한 TCR 또는 CAR 작제물 단독으로 증가된 IFN-감마 생산을 위한 조작된 면역조절 단백질이 선택될 수 있다. 조작된 인간 T 세포는 마우스 T, NK 및 B 세포가 결핍된 NSG 균주와 같은 면역저하(immunocompromised) 마우스에서 분석될 수 있다. CAR 또는 TCR이 이중 이식물의 표적 카운터-구조에 결합하고 TIP 친화성 변형된 IgSF 도메인과 공동-발현되는 조작된 인간 T 세포는 이중 이식과 비교하여 상이한 세포 수 및 비율로 생체 내에서 입양전달될 수 있다. 일반적인 구체예에서, 이중 이식편을 쥐 모델에 도입한 다음 며칠 후에 조작된 T 세포를 도입한다. 면역조절 단백질을 포함하는 조작된 T 세포를, CAR 또는 TCR만을 단독 함유 하는 조작된 T 세포와 비교하여 증가된 생존, 종양 제거 또는 확장된 조작된 T 세포 수에 대해 분석할 수 있다. 시험관내 분석에서와 같이, 내인성, 천연 (즉, 비-조작된) 인간 T 세포는 그 집단에서 성공적인 에피토프 확산을 찾아보기 위해 공동-입양전달되어, 보다 나은 생존 또는 종양 제거를 결과시킨다.

[0390] [0381] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 단백질을 발현하는 제공된 조작된 T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 면역조절 단백질(예를 들어, TIP)로 조작되지 않은 참조 세포와 비교하여 하나 이상의 개선된 특성 또는 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 참조 T 세포, 참조 CAR-조작된 T 세포 또는 참조 TCR-조작된 T 세포와 같은 참조 세포는 유사한 생체의 절차에 의해 생성 또는 조작되었지만 면역 조절 단백질을 발현하지 않거나 면역 조절 단백질을 발현하도록 조작되지 않은 세포이다. 일부 구체예에서, 특성 또는 활성은 T-세포 기능과 관련되거나 관련이 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 특성 또는 활성은 세포 증식, 세포독성 활성, 사이토카인 생산(예: IFN-감마, IL-2 또는 TNF-알파), 및/또는 하나 이상의 활성화 마커 (예컨대, CD69 또는 CD25)의 발현을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 활성 또는 특성은 참조 세포 또는 참조 세포 조성물에 비해 적어도 약 1.2배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.5배, 3.0배, 4.0배, 5.0배 이상 증가된다.

[0391] F. 다양한 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질을 발현하는 감염 물질

[0392] [0382] 또한, 본원에 기재된 분비성 또는 막관통 면역조절 단백질을 포함하는 CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은

임의의 변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 함유하는 감염 물질이 제공된다. 일부 구체예에서, 이러한 감염 물질은 CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은 본원에 기술된 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 대상체 내 표적 세포, 예컨대 대상체 내 면역 세포 및/또는 항원 제시 세포 (APC) 또는 종양 세포에 전달할 수 있다. 또한 이러한 감염 물질에 함유된 핵산, 및/또는 그러한 감염 물질의 생성 또는 변형을 위한 핵산, 예컨대 이러한 감염 물질을 함유하는 벡터 및/또는 플라스미드, 및 조성물도 제공된다.

[0393] [0383] 일부 구체예에서, 감염 물질은 미생물이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 바이러스 또는 세균이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 바이러스이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 세균이다. 일부 구체예에서, 이러한 감염 물질은 본원에 기재된 분비성 또는 막관통 면역조절 단백질을 포함하는 CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은 임의의 변이체 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 전달할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 감염 물질에 의해 감염되거나 접촉된 대상체의 세포는 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 세포 표면에 발현시키거나 분비할 수 있다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 또한 세포 및/또는 대상체 내 환경에 다른 치료제 또는 다른 치료제를 인코딩하는 핵산을 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 감염 물질에 의해 전달가능한 다른 치료제는 사이토카인 또는 다른 면역조절 분자를 포함한다.

[0394] [0384] 일부 구체예에서, 감염 물질, 예컨대, 바이러스 또는 세균은 본원에 설명된, 분비성 또는 막관통 면역조절 단백질을 비롯하여, CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은, 임의의 변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 대상체 내 세포와 접촉 및/또는 감염에 의해, 상기 세포는 감염 물질에 함유된 핵산 서열에 의해 인코딩된, 분비성 또는 막관통 면역조절 단백질을 비롯한, CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은, 변이체 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 대상체로부터의 세포와 생체외 접촉될 수 있다.

[0395] [0385] 일부 구체예에서, 감염 물질에 의해 감염된 세포에 의해 발현되는, 막관통 면역조절 단백질을 비롯한 CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은 변이체 폴리펩타이드는 막관통 단백질이고 표면 발현된다. 일부 구체예에서, 변이체 폴리펩타이드, 예컨대 감염 물질에 의해 감염된 세포에 의해 발현된 분비가능한 면역조절 단백질을 비롯하여 CD86 vIgD 폴리펩타이드는, 발현되어 세포로부터 분비된다. 막관통 면역조절 단백질 또는 분비된 면역조절 단백질은 설명된 임의의 것일 수 있다.

[0396] [0386] 일부 구체예에서, 감염 물질에 의해 표적화된 대상체 내 세포에는 종양 세포, 면역 세포, 및/또는 항원-제시 세포 (APC)가 포함된다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 종양 미세환경 (TME) 내 세포를 표적화한다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 분비성 또는 막관통 면역조절 단백질을 비롯하여, CD86 vIgD 폴리펩타이드와 같은 변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을, 목적하는 효과, 예컨대 면역조절 및/또는 특이적인 세포-매개된 면역 반응, 예컨대 CD4 및/또는 CD8 T 세포 반응 (여기서 상기 CD8 T 세포 반응은 세포독성 T 세포 (CTL) 반응을 포함할 수 있음)을 유도 및/또는 개시하는 적절한 세포(예를 들어, APC, 예컨대 수지상 세포와 같이, 그 세포 표면에서 펩타이드/MHC 복합체를 나타내는 세포) 또는 조직 (예컨대, 림프구 조직)으로 전달한다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 APC, 예컨대 수지상 세포 (DC)를 표적으로 한다. 일부 구체예에서, 본원에 설명된 감염 물질에 의해 전달되는 핵산 분자는 예컨대 프로모터와 같은 조절 요소, 특정 표적 세포에서, 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열을 포함한다.

[0397] [0387] 일부 구체예에서, 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 감염 물질은 예컨대, 사이토카인, 전구약물 전환 효소, 세포독소 및/또는 검출가능한 유전자 산물과 같이, 하나 이상의 부가적인 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열도 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 감염 물질은 항암 바이러스이고 상기 바이러스는 부가적인 치료적 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다 (참조: 예컨대 Cancer 9:64-71; Garcia-Aragoncillo 외, (2010) Curr Opin Mol r 12:403-411; 미국특허 Nos. 7,588,767, 7,588,771, 7,662,398 및 7,754,221 및 미국특허 Publ. Nos. 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 및 2011/0064650 참조). 일부 구체예에서, 부가적인 유전자 산물은 면역 반응을 개시 또는 촉진 또는 조절할 수 있는 유전자 산물 또는 표적 세포 (예컨대, 종양 세포)의 사멸을 결과시킬 수 있는 치료적 유전자 산물일 수 있다 (예컨대, 사이토카인). 예시적인 유전자 산물은 또한 항암제, 항대사제, 항혈관형성 제, 면역조절 분자, 면역 체크포인트 억제제, 항체, 사이토카인, 성장 인자, 항원, 세포독성 유전자 산물, 프로-아포토시스 산물, 항-아포토시스 유전자 산물, 세포 매트릭스 분해 유전자, 조직 재생 또는 인간 체세포를 다능성으로 재 프로그래밍하기 위한 유전자, 및 본원에 기술되거나 당업자에게 공지된 다른 유전자를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 추가의 유전자 산물은 파립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)이다.

[0398]

1. 바이러스

[0399]

[0388] 일부 구체예에서, 감염 물질은 바이러스이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 항암 바이러스, 또는 면역 세포와 같은 특정 세포를 표적화하는 바이러스이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 대상체 내 종양 세포 및/또는 암 세포를 표적화한다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 면역 세포 또는 항원-제시 세포 (APC)를 표적화한다.

[0400]

[0389] 일부 구체예에서, 감염 물질은 항암 바이러스이다. 항암 바이러스는 종양 세포에 축적되어 종양 세포에서 복제되는 바이러스이다. 세포에서의 복제 및 본원에 기술된 변이체 면역조절 변이체 면역조절 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산의 선택적 전달에 의해, 종양 세포가 용해되고 종양이 수축되어 제거될 수 있다. 종양 용해성 바이러스는 또한 광범위한 숙주 및 세포 유형 범위를 가질 수 있다. 예를 들어, 항암 바이러스는 종양 및/또는 전이를 포함하는 면역특발성 세포 또는 면역특발성 조직에 축적될 수 있고, 또한 상처 조직 및 세포를 포함하여, 본원에 기재된 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 광범위한 세포 유형에서 전달 및 발현시킬 수 있다. 종양용해(oncolytic) 바이러스는 또한 종양 세포 특이적 방식으로 복제되어, 종양세포 용해 및 효율적인 종양 퇴화를 야기할 수도 있다.

[0401]

[0390] 예시적인 항암 바이러스로는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 단순포진 바이러스, 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 파보바이러스, 홍역 바이러스, 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 콕사키 바이러스 및 백시니아 바이러스를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 항암 바이러스는 고형 종양은 특이적으로 콜로니화할 수 있지만, 다른 장기는 감염시키지 않아, 본원에 설명된 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 그러한 고형 종양에 전달하기 위한 감염 물질로서 사용가능하다.

[0402]

[0391] 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산을 전달하는데 사용가능한 종양분해 바이러스는, 기술분야에 알려진 임의의 것일 수 있고 예컨대 수포성 구내염 바이러스가 이에 포함된다. 예컨대, 미국특허 Nos. 7,731,974, 7,153,510, 6,653,103 및 미국특허 Pub. Nos. 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 및 EP Pat. Nos. 1385466, 1606411 및 1520175; 단순포진 바이러스, (예컨대, 미국특허 Nos. 7,897,146, 7,731,952, 7,550,296, 7,537,924, 6,723,316, 6,428,968 및 미국특허 Pub. Nos., 2014/0154216, 2011/0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894, 2004/0009604, 2004/0063094, 국제특허공개 Nos., WO 2007/052029, WO 1999/038955; 레트로바이러스, 참조: 예컨대, 미국특허 Nos. 6,689,871, 6,635,472, 5,851,529, 5,716,826, 5,716,613 및 미국특허 Pub. No. 20110212530; 백시니아 바이러스, 참조, 예컨대, 2016/0339066, 및 아데노-관련 바이러스, 예컨대, 미국특허 Nos. 8,007,780, 7,968,340, 7,943,374, 7,906,111, 7,927,585, 7,811,814, 7,662,627, 7,241,447, 7,238,526, 7,172,893, 7,033,826, 7,001,765, 6,897,045, 및 6,632,670 참조.

[0403]

[0392] 종양 용해성 바이러스는 또한 병독성을 약화시키고, 그의 안전성 프로파일을 향상시키며, 종양 특이성을 향상시키도록 유전적으로 변형된 바이러스를 포함하며, 이들은 또한 세포 독소, 사이토카인, 전구약물 전환 효소 등의 추가 유전자를 갖춤으로써 해서 바이러스의 전반적인 효능이 증강된다(참조: 예컨대, Kirn 외, (2009) Nat Rev Cancer 9:64-71; Garcia-Aragoncillo 외, (2010) Curr Opin Mol r 12:403-411; 참조 미국특허 Nos. 7,588,767, 7,588,771, 7,662,398 및 7,754,221 및 미국특허 Publ. Nos. 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 및 2011/0064650). 일부 구체예에서, 항암 바이러스는 암 세포에서 선택적으로 복제됨으로써 해서 항암이 되도록 변형된 것들일 수도 있다. 예를 들어, 항암 바이러스는 종양 치료법 및 유전자 치료법으로 변형된 방향성을 갖도록 조작된 아데노바이러스이다. 이러한 예로는 ONYX-015, H101 및 Ad5ΔCR (Hallden and Portella (2012) Expert Opin r Targets, 16 : 945-58) 및 TNFerade (McLoughlin 외 (2005) Ann. Surg. Oncol., 12 : 825-30), 또는 조건부로 복제가 가능한 아데노 바이러스 Oncorine®를 들 수 있다.

[0404]

[0393] 일부 구체예에서, 감염 물질은 변형된 단순포진 바이러스이다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 본원에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질과 같은, 임의의 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 함유하도록 변형된, Talimogene laherparepvec의 변형된 버전이다. (T-Vec, Imlygic 또는 OncoVex GM-CSF로도 알려짐). 일부 구체예에서, 감염 물질은 예컨대, WO 2007/052029, WO 1999/038955, US 2004/0063094, US 2014/0154216에 설명되어 있는 변형된 단순포진 바이러스, 또는 그의 변이체이다.

[0405]

[0394] 일부 구체예에서, 감염 물질은 바이러스가 투여된 대상체에서 특정한 세포 유형을 표적화하는 바이러스, 예컨대 면역 세포 또는 항원-제시 세포 (APCs)를 표적화하는 바이러스이다. 수지상 세포 (DCs)는 면역 반응의 개시 및 제어에 필수적인 APC이다. DC는 항원을 포획 및 프로세싱할 수 있고, 말초에서 임파선 기관으로 이동하

여 주요조직적합 복합체 (MHC)-제한된 방식으로 휴지 T 세포에 항원을 제시할 수 있다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 DC에서 발현을 위한 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산을 전달하도록 DC를 특이적으로 표적화할 수 있는 바이러스이다. 일부 구체예에서, 바이러스는 렌티바이러스 또는 그의 변이체 또는 유도체, 예컨대 통합-결합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구체예에서, 바이러스는 DC와 같은 세포 표면 마커 수치상 세포-특이적 세포간 부착 분자-3 포획(grabbing) 비-인테그린 (DC-SIGN)을 발현하는 세포에 효과적으로 결합하여 생산적으로 감염시키기 위해 슈도타이프된 렌티바이러스이다. 일부 구체예에서, 바이러스는 WO 2013/149167에 설명된 것과 같은, 신드비스 바이러스 E2 당단백질 또는 그의 변형된 형태에 의해 슈도타이프된 렌티바이러스이다. 일부 구체예에서, 바이러스는 DC에 관심 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산)의 전달 및 발현을 허용한다. 일부 구체예에서, 바이러스는 WO 2008/011636 또는 US 2011/0064763, Tareen et al. (2014) Mol. r., 22:575-587에 기재된 것들, 또는 그의 변이체를 포함한다. 수치상 세포-지향된 벡터 플랫폼의 예는 ZVexTM이다.

2. 세균(Bacteria)

[0395] 일부 구체예에서, 감염 물질은 세균이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 세균은 본 명세서에 설명된 변이체 면역조절 폴리펩타이드, 예컨대 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산을 종양 세포, 면역 세포, 항원-제시 세포 및/또는 식세포 등 대상체 내 표적 세포에 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 세균은 변이체 면역조절 폴리펩타이드의 발현을 위한 환경에서 표적 특이 세포로의 표적화 및/또는 변이체 면역조절 폴리펩타이드의 발현 및/또는 분비를 위해, 종양 미세환경(TME)과 같은, 대상체 내 특이적 환경으로 바람직하게 표적화될 수 있다.

[0396] 일부 구체예에서, 세균은 플라스미드 DNA의 세균-매개 전달을 통해 핵산을 포유동물 세포에 전달한다 (세균감염(bactofection)이라고도 함). 예를 들어, 일부 구체예에서, 유전자 물질의 전달은 표적 세포로의 세균 전체의 유입을 통해 달성된다. 일부 구체예에서, 자발적 또는 유도된 세균 용해(bacterial lysis)는 후속적인 진핵세포 발현을 위한 플라스미드 방출로 이어질 수 있다. 일부 구체예에서, 세균은 핵산을 비-식세포성 포유동물 세포(예컨대 종양 세포), 및/또는 식세포, 컨대 특정 면역 세포 및/또는 APC로 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 세균에 의해 전달된 핵산은 발현을 위한 대상체의 세포핵으로 전달될 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산은 특정 숙주 세포에서, 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 작동가능하게 연결된 서열, 예컨대 프로모터 또는 인핸서와 같은 조절 요소의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열도 포함한다. 일부 구체예에서, 세균인 감염 물질은 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산을, 예컨대, 표적 세포에 의한 번역을 위해 표적 세포의 세포질에 전달된 미리 만들어진 번역-능력 RNA와 같은 RNA의 형태로 전달할 수 있다.

[0397] 일부 구체예에서, 세균은 예컨대 종양 세포와 같은 표적 세포를 복제 및 용해시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 세균은 핵산 서열 및/또는 유전자 산물을 함유하거나 및/또는 표적 세포의 세포질에 방출할 수 있으므로, 종양 세포와 같은 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 예컨대, 종양 미세환경 (TME)과 같은 대상체 내의 특정 환경에서 특이적으로 복제할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 세균은 혐기성 또는 저산소 미세환경에서 특이적으로 복제가능하다. 일부 구체예에서, 특정 환경에 존재하는 조건 또는 인자들, 예컨대 TME 내의 세포에 의해 생산되는 아스파테이트, 세린, 시트레이트, 리보스 또는 갈락토스는 그 환경으로 세균을 유인하는 화학유인제로서 작용할 수 있다. 일부 구체예에서, 세균은 예컨대, TME와 같은 환경에서 본 발명의 면역조절 단백질을 발현 및/또는 분비할 수 있다.

[0398] 일부 구체예에서, 감염 물질은 리스테리아 종, 비피도박테리움 종, 대장균 종, 클로스트리듐 종, 살모넬라 종, 시겔라 종, 비브리오 종 또는 예르시니아 종인 세균이다. 일부 구체예에서, 세균은 리스테리아 모노시토겐스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 콜레라스위스, 대장균, 비브리오 콜레라, 클로스트리듐 퍼프린젠스, 클로스트리듐 부티리쿰, 클로스트리듐 노비이, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 비피도박테리움 인판티스, 비피도박테리움 롱엄 및 비피도박테리움 아돌레센티스 중 하나 이상으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 세균은 조작된 세균이다. 일부 구체예에서, 세균은 예컨대 문헌 [Seow 및 Wood (2009) Molecular rapy 17(5):767-777; Baban 외 (2010) Bioengineered Bugs 1:6, 385-394; Patyar 외 (2010) J Biomed Sci 17:21; Tangney 외 (2010) Bioengineered Bugs 1:4, 284-287; van Pijkeren 외 (2010) Hum Gene r. 21(4):405-416; WO 2012/149364; WO 2014/198002; US 9103831; US 9453227; US 2014/0186401; US 2004/0146488; US 2011/0293705; US 2015/0359909 및 EP 3020816]에 설명된 것과 같은 조작된 세균이다. 세균은 본원에서 제공된 변이체 면역조절 폴리펩타이드, 컨주게이트 및/또는 융합체를 인코딩하는 핵산 서열을 대상체에 전달하도록, 및/또는 이러한 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 대상체에서 발현하도록 변형될 수 있다.

- [0411] **G. 폴리펩타이드 또는 세포 생산을 위한 핵산, 벡터 및 방법**
- [0412] [0399] 본 발명에 따라 본 발명에서 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 폴리펩타이드의 다양한 임의의 구체예들을 인코딩하는, "핵산"이라 통칭되는 단리된 핵산 또는 재조합 핵산이 제공된다. 일부 구체예에서, 본 발명에서 제공된 핵산은 후술하는 것들을 비롯하여, 본 발명에서 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 폴리펩타이드의 재조합적 생산(예컨대, 발현)에 유용하다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 핵산은 후술하는 것들을 비롯하여, 본 발명에서 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 폴리펩타이드를 세포, 예컨대 조작된 세포, 예컨대 면역 세포, 또는 감염 물질 세포에서 발현하는데 유용하다. 본 발명에 따라 제공되는 핵산은 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있고, 여기에는 mRNA, cRNA, 재조합 또는 합성 RNA 및 DNA, 및 cDNA가 포함된다. 본원에서 제공된 핵산은 일반적으로 DNA 분자이고 대체로 이중-가닥 DNA 분자이다. 그러나, 단일-가닥 DNA, 단일-가닥 RNA, 이중-가닥 RNA 및 하이브리드 DNA/RNA 핵산 또는 본 발명의 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이의 조합 역시도 제공된다.
- [0413] [0400] 또한 본원에서 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 폴리펩타이드를 생산하는데 유용한 재조합 발현 벡터 및 재조합 숙주 세포도 제공된다.
- [0414] [0401] 또한 제공된 면역조절 폴리펩타이드 중 어느 하나, 예컨대 막관통 면역조절 폴리펩타이드 또는 분비가능한 면역조절 폴리펩타이드 중 어느 하나를 함유하는 조작된 세포, 예컨대 조작된 면역 세포도 제공된다.
- [0415] [0402] 또한 제공된 면역조절 폴리펩타이드 중 어느 하나, 예컨대 막관통 면역조절 폴리펩타이드 또는 분비가능한 면역조절 폴리펩타이드 중 어느 하나를 함유하는 감염 물질, 예컨대 세균 또는 바이러스 세포도 제공된다.
- [0416] [0403] 전술한 임의의 구체예에서, 본 발명에 제공된 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산은 재조합 DNA 및 클로닝 기술을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 이를 위해, 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 작제한다. 이러한 DNA 분자를 제조하는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 펩타이드를 코딩하는 서열을 적절한 제한 효소를 이용하여 DNA로부터 잘라낼 수 있다. 별법으로, DNA 분자는 포스포르아미다이트법과 같은 화학 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 또한, 이러한 기술들을 조합 사용할 수도 있다. 일부 사례에서, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통해 재조합 또는 합성 핵산을 생성할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 설명에 따라 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인 및 일부 구체예에서, 시그널 펩타이드, 막관통 도메인 및/또는 엔도도메인을 함유하는 하나 이상의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 삽입물이 생성될 수 있다. 이 DNA 삽입물은 당업자에게 공지된 바와 같이 적절한 형질도입/형질감염 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 또한, 이들 핵산 분자를 함유하는 발현 벡터도 제공된다.
- [0417] [0404] 일부 구체예에서, 발현 벡터는 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 적절한 세포내에서 면역조절 단백질을 발현할 수 있다. 일부 태양에서, 핵산 분자 또는 발현 벡터는 적절한 발현 조저러 서열에 작동적으로 연결된 면역조절 단백질을 인코딩하는 DNA 분자를 포함한다. DNA 분자 벡터 내 삽입 전 또는 후에 이러한 작동 연결을 수행하는 방법은 잘 알려져 있다. 발현 조절 서열에는 프로모터, 액티베이터, 인핸서, 오퍼레이터, 리보솜 결합 부위, 개시 시그널, 종결 시그널, 캡(cap) 시그널, 폴리아데닐화 시그널 및 전사 또는 번역 제어와 관련된 시그널이 포함된다.
- [0418] [0405] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질의 발현은 발현을 제어 또는 조절하기 위해 프로모터 또는 인핸서에 의해 조절된다. 프로모터는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자의 일부분에 작동적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 프로모터는 구성적 활성 프로모터(constitutively active promotor)이다(예컨대 조직-특이적인 구성적 활성 프로모터 또는 그 밖의 구성 프로모터). 일부 구체예에서, 프로모터는 유도 물질(예컨대 T 세포 활성화 시그널)에 대해 응답할 수 있는 유도성 프로모터이다.
- [0419] [0406] 일부 구체예에서, 구성 프로모터는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자에 작동적으로 연결된다. 대표적인 구성 프로모터에는 SV(Simian vacuolating) 바이러스 40 (SV40) 프로모터, CMV 프로모터, UbC 프로모터 및 EF-1 알파 프로모터가 포함된다. 일부 구체예에서, 구성 프로모터는 조직 특이적이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 프로모터는 면역 세포, 림프구 또는 T 세포와 같은 특정 조직에서 면역조절 단백질의 구성적 발현을 허용한다. 예시적인 조직 특이적 프로모터는 미국특허 No. 5,998,205에 설명되어 있고, 예를 들어, 태아(feto)단백질, DF3, 티로시나제, CEA, 계면활성제 단백질, 및 ErbB2 프로모터가 이에 포함된다.
- [0420] [0407] 일부 구체예에서, 유도가능한 프로모터는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자에 작동적으로 연결되어 적절한 전사 인두서의 존재 또는 부재를 조절함으로써 핵산의 발현을 제어할 수 있

다. 예를 들어, 프로모터는 예컨대 공개된 테트라사이클린-조절된 시스템 또는 기타 조절가능한 시스템 (예컨대 공개된 국제 PCT Appl. No. WO 01/30843)에서와 같은 조절된 프로모터 및 전사인자 발현 시스템일 수 있어, 인코딩된 폴리펩타이드의 발현을 제어하는 것이 가능하다. 예시적인 조절가능한 프로모터 시스템은 예를 들어, Clontech사 (Palo Alto, CA)로부터 입수가 가능한 Tet-On (및 Tet-Off) 시스템이다. 이 프로모터 시스템은 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 예컨대 독시사이클린에 의해 조절되는 형질전환 유전자의 조절된 발현을 허용한다. 다른 조절 가능한 프로모터 시스템이 공지되어 있다 (예를 들어, 리간드 결합 도메인 및 전사 조절 도메인 (예컨대 호르몬 수용체의 도메인)을 함유하는 유전자 스위치에 대해 설명하고 있는, 공개된 미국특허출원 No. 2002-0168714, 명칭: "단일 사슬, 모노머, 리간드 의존성 폴리펩타이드 스위치를 이용한 유전자 발현의 조절" 참조).

[0421] [0408] 일부 구체예에서, 프로모터는 T-세포 활성화 시그널링에 반응하는 요소에 반응성이다. 오로지 예시 목적의 일부 구체예에서, 조작된 T 세포는 면역조절 단백질 및 상기 면역조절 단백질의 발현을 제어하기 위해 작동적으로 연결된 프로모터를 인코딩하는 발현 벡터를 포함한다. 조작된 T 세포는 예컨대 조작된 T 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 통한 시그널링에 의해 활성화되고, 그에 의해 반응성 프로모터를 통한 면역조절 단백질의 발현 및 분비가 촉발된다.

[0422] [0409] 일부 구체예에서, 유도성 프로모터는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자에 작동적으로 연결되어 상기 면역조절 단백질이 활성화된 T-세포의 핵 인자(NFAT) 또는 활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄 인핸서 (NF- κ B)에 응답하여 발현된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 유도성 프로모터는 NFAT 또는 NF- κ B에 대한 결합 부위를 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 프로모터는 NFAT 또는 NF- κ B 프로모터 또는 그의 기능성 변이체이다. 그러므로, 일부 구체예에서, 핵산은 면역조절 단백질의 발현 조절을 가능하게 하면서 면역조절 단백질의 독성을 감소 또는 제거할 수도 있다. 특히, 본 발명의 핵산을 포함하는 조작된 면역 세포는 그 세포 (예컨대, 세포에 의해 발현된 T-세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR))가 항원에 의해 특이적으로 자극되거나 및/또는 그 세포(예컨대, 세포의 칼슘 시그널링 경로)가 예컨대 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA: phorbol myristate 아세테이트)/이오노마이신에 의해 비-특이적으로 자극되는 경우에만 면역조절 단백질을 발현 및 분비한다. 따라서, 면역조절 단백질의 일부 사례에서의 발현 및 분비는 오로지 필요한 때와 장소 (예컨대, 감염 질환-유발 물질의 존재, 암, 또는 종양 부위)에서만 일어나도록 조절될 수 있으므로, 바람직하지 못한 면역조절 단백질 상호작용을 감소 또는 회피할 수 있다.

[0423] [0410] 일부 구체예에서, 본 명세서에 설명된 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산은 NFAT 프로모터, NF- κ B 프로모터, 또는 그의 기능성 변이체를 인코딩하는 적절한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 명세서에서 "NFAT 프로모터"라 함은 최소 프로모터에 연결된 하나 이상의 NFAT 응답 요소를 가리킨다. "NF- κ B 프로모터"는 최소 프로모터에 연결된 하나 이상의 NF- κ B 응답성 요소를 가리킨다. 일부 구체예에서, 어떤 유전자의 최소 프로모터는 최소 인간 IL-2 프로모터 또는 CMV 프로모터이다. NFAT 응답성 요소들(responsive elements)은, 예컨대, NFAT1, NFAT2, NFAT3, 및/또는 NFAT4 응답성 요소를 포함할 수 있다. NFAT 프로모터, NF- κ B 프로모터, 그의 기능성 변이체들은 결합 모티프를 임의의 수, 예컨대 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개 또는 최대 12개까지 포함할 수 있다.

[0424] [0411] DNA 분자를 갖는 결과적인 재조합 발현 벡터를 이용하여 적절한 숙주를 형질전환한다. 이 형질전환은 기술분야에 공지인 방법을 이용하여 수행가능하다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 핵산은 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된 분비 또는 시그널 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하여, 결과적인 가용성 면역조절 폴리펩타이드를 배양 배지, 숙주 세포, 또는 숙주 세포 페리플라즈م(periplasm)으로부터 회수할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 적절한 발현 조절 시그널은 면역조절 폴리펩타이드의 막 발현을 허용한다. 또한, 상업적으로 입수가 가능한 키트 및 계약 제조사를 이용하여 본원에서 제공된 조작된 세포 또는 재조합 숙주 세포를 제조할 수 있다.

[0425] [0412] 일부 구체예에서, DNA 분자를 갖는 결과적인 발현 벡터를 이용하여 적절한 세포를 형질전환, 예컨대 형질도입한다. 도입은 공지 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 예시적인 방법에는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 바이러스를 경유하거나, 형질도입, 트랜스포존 및 전기천공을 포함하여, 수용체들을 인코딩하는 핵산을 전달하기 위한 방법들이 포함된다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구체예에서, 핵산은 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 형질도입 방법에 의해 세포 내로 전달된다.

[0426] [0413] 포유동물 T-세포 또는 APC를 포함하여, 공개적으로 입수 가능한 다수의 공지된 포유동물 숙주 세포 중

임의의 것을 폴리펩타이드 또는 조작된 세포의 제조에 사용할 수 있다. 세포의 선택은 당해 기술 분야에서 인정되는 다수의 인자에 의존한다. 여기에는 예를 들어, 선택된 발현 벡터와의 호환성, DNA 분자에 의해 인코딩된 펩타이드의 독성, 형질전환 속도, 펩타이드 회수 용이성, 발현 특성, 생물-안전성 및 비용 등이 포함된다. 이러한 인자들의 균형은 모든 세포가 특정 DNA 서열의 발현에 동등하게 효과적일 수는 없다는 이해와 맞물려야 한다.

[0427] [0414] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 이를테면 효모 세포 또는 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 또는 HEK293 세포와 같은 포유동물 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 현탁 세포이고 폴리펩타이드는 배양된 현탁 CHO 세포, 예컨대 CHO-S 세포와 같은 배양 현탁액에서 조작되거나 생성된다. 일부 예에서, 세포주는 DG44 및 DUXB11과 같은 DHFR이 결핍된(DHFR-) CHO 세포주이다. 일부 구체예에서, 세포는 예컨대 CHO-S 세포, CHOK1 SV 세포, 및 CHOZN((R)) GS-/- 세포와 같이 글루타민 신타제(GS)를 결여한다. 일부 구체예에서, CHO 세포, 이를테면 현탁 CHO 세포는s, CHO-S-2H2 세포, CHO-S-클론 14 세포, 또는 ExpiCHO-S 세포일 수 있다.

[0428] [0415] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 예컨대 효모 세포, 또는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 또는 HEK293 세포 등의 포유동물 세포와 같은 다양한 진핵 세포일 수 있다. 숙주 세포는 또한 예컨대 대장균(E. coli)과 같은 원핵세포일 수도 있다. 형질전환된 재조합 숙주를 폴리펩타이드 발현 조건에서 배양한 다음 정제하여 가용성 단백질을 얻는다. 재조합 숙주 세포는 바람직한 폴리펩타이드가 발현되도록 통상적인 발효 조건에서 배양할 수 있다. 이러한 발효 조건은 기술분야에 잘 알려져 있다. 마지막으로, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 황산 암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 친 화성 크로마토 그래피를 비롯한, 당업계에 널리 공지된 다수의 방법 중 임의의 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다, 단백질 재폴딩(refolding) 단계는 필요에 따라 성숙한 단백질의 구성을 완료하는 데 사용할 수 있다. 최종적으로, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)가 최종 정제 단계에서 사용될 수 있다.

[0429] [0416] 일부 구체예에서, 세포는 면역 세포, 예컨대 조작된 세포를 제조하는 것과 관련된 전술한 임의의 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 조작된 세포는 1차 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 있어 자가(autologous)인 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이체(allogeneic)인 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 예컨대 백혈구 치환에 의해 대상체로부터 수득되고, 면역조절 폴리펩타이드, 예컨대 막관통 면역조절 폴리펩타이드 또는 분비가능한 면역조절 폴리펩타이드의 발현을 위해 생체외에서 형질전환된다.

[0430] [0417] 또한 본 발명에 따라 본 발명에 설명된 감염 물질에 함유된 임의의 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산도 제공된다. 일부 구체예에서, 감염 물질은 핵산을 대상체 내 세포에 전달하거나, 및/또는 인코딩된 변이체 폴리펩타이드를 세포에서 발현시킨다. 또한 이러한 감염 물질을 생성, 생산 또는 변형하는데 사용되는 핵산도 제공된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본 발명에 따라 감염 물질의 생성, 대상체 내 세포로의 전달 및/또는 대상체 내 세포에서의 변이체 면역조절 폴리펩타이드의 발현을 위해, 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 함유하는 벡터 및/또는 플라스미드도 제공된다.

[0431] [0418] 일부 구체예에서, 제공된 핵산은 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 재조합 바이러스 또는 세균성 벡터이다. 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 표적 세포에 의한 발현을 위해 대상체 내 표적 세포에 전달될 핵산 서열 및/또는 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 감염 물질을 생산하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 발현 벡터이다. 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 표적 세포에서 감염 물질의 생성 및/또는 생산 및 발현에 필요한 적절한 서열을 포함한다.

[0432] [0419] 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 플라스미드 또는 코스미드이다. 본 발명에 설명된 것과 같은 변이체 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 플라스미드 또는 코스미드는 공지기술에 따라 쉽게 작제할 수 있다 감염 물질의 생성을 위해, 벡터 또는 게놈을 플라스미드 형태로 작제한 다음 패키징 또는 프로듀서 세포주 또는 숙주 세균에 형질감염시킬 수 있다. 재조합 벡터는 임의의 공지 재조합 기술으로 이용하여 생성 가능하다. 일부 구체예에서, 벡터는 원핵생물 복제 원점 및/또는 원핵생물 시스템에서의 증식 및/또는 선택에 대한 약물 내성과 같은 검출가능하거나 선택가능한 마커를 부여하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0433] [0420] 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 바이러스 벡터이다. 예시적인 재조합 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터 게놈, 폭스바이러스 벡터 게놈, 백시니아 바이러스 벡터 게놈, 아데노바이러스 벡터 게놈, 아데노바이러스-관련 바이러스 벡터 게놈, 헤르페스 바이러스 벡터 게놈, 및 알파 바이러스 벡터 게놈을 포함한다. 바이러스 벡터는 살아있거나, 약독화되거나, 복제 조건적 또는 복제 결핍적, 비-병원성(결여), 복제 경쟁 바이러스 벡터일

수 있고 및/또는 예컨대 본 발명에서 제공된 변이체 면역조절 폴리펩타이드와 같은 이중 유전자 산물을 발현하도록 변형된다. 바이러스 생성을 n이한 벡터 역시도 바이러스의 약화를 변경하기 위해 변형될 수 있고 여기에는 전사 또는 번역 로드를 증가 또는 감소시키는 방법이 포함된다.

[0434] [0421] 사용가능한 예시적인 바이러스 벡터로는 변형된 백시니아 바이러스 벡터 (예컨대, Guerra 외, J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia 외, AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445-47 (1992); Gheradi 외, J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr 외, Infection 3:6-14 (1975); Hu 외, J. Virol. 75: 10300-308 (2001); 미국특허 Nos. 5,698,530, 6,998,252, 5,443,964, 7,247,615 및 7,368,116 참조); 아데노바이러스 벡터 또는 아데노바이러스-관련 바이러스 벡터 (예컨대, Molin 외, J. Virol. 72:8358-61 (1998); Narumi 외, Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998); Mercier 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); 미국특허 Nos. 6,143,290; 6,596,535; 6,855,317; 6,936,257; 7,125,717; 7,378,087; 7,550,296 참조); 쥐의 백혈병 바이러스(MuLV)에 기초한 것, 기본 원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 에코트로픽(ecotropic) 레트로바이러스es, 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이의 조합을 비롯한 레트로바이러스 벡터 (예컨대, Buchscher 외, J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann 외, J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt 외, Virology 176:58-59 (1990); Wilson 외, J. Virol. 63:2374-78 (1989); Miller 외, J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller 외, Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta 외, Hum. Gene r. 2:215 (1991) 참조); 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1), HIV-2, 고양이의 면역결핍 바이러스 (FIV), 말의 감염성 빈혈 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 및 마에디/비스나(maedi/visna) 바이러스에 기초한 것과 같은 렌티바이러스 벡터 (예컨대, Pfeifer 외, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey 외, J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi 외, J. Virol. 72:8150, 1998; Philpott 및 Thrasher, Human Gene rapy 18:483, 2007; Engelman 외, J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale 외, Mol. rapy, 13: 1121, 2006; Brown 외, J. Virol. 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams 외, J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell 외, J. Virol. 70:5288, 1996 참조) 또는 이들의 임의의 변이체, 및/또는 전술한 임의의 바이러스를 생성하는데 사용가능한 벡터를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 패키징 세포주에서와 같이 RNA 바이러스에 대한 경우처럼, 바이러스 게놈의 발현을 조절할 수 있는 프로모터 또는 인핸서 서열과 같은 조절 사열을 포함할 수 있다 (예컨대, 미국특허 Nos.5,385,839 및 5,168,062 참조).

[0435] [0422] 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 발현 벡터, 예컨대, 표적 세포, 예컨대, 대상체 내 세포, 예컨대, 종양 세포, 면역 세포 및/또는 APC 내로 전달될 때 인코딩된 유전자 산물의 발현을 허용하는 발현 벡터이다. 일부 구체예에서, 감염 물질에 함유된 재조합 발현 벡터는 대상체 내 표적 세포에서 면역조절 단백질을, 상기 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 발현할 수 있다.

[0436] [0423] 일부 태양에서, 핵산 또는 발현 벡터는 적절한 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 벡터 내로의 삽입 전 또는 후에, 이 작동가능한 연결에 영향을 미치는 방법은 잘 알려져 있다. 발현 조절 서열의 예로는 프로모터, 액티베이터, 인핸서, 오퍼레이터, 리보솜 결합 부위, 개시 시그널, 종결 시그널, 캡 시그널, 폴리아데닐화 시그널 및 전사와 번역의 조절과 관련된 기타 시그널을 들 수 있다. 프로모터는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 일부에 작동적으로 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 프로모터는 표적 세포 내의 구성적으로 활성적인 프로모터이다 (예컨대 조직-특이적인 구성적으로 활성인 프로모터 또는 그 밖의 구성 프로모터). 예를 들어, 재조합 발현 벡터는 또한 림프구 조직-특이적 전사 조절 요소 (TRE) 예컨대 B 림프구, T 림프구, 또는 수지상 세포 특이적 TRE이다. 림프구 조직 특이적 TRE는 기술분야에 알려져 있다 (예컨대, Thompson 외, Mol. Cell. Biol. 12:1043-53 (1992); Todd 외, J. Exp. Med. 177:1663-74 (1993); Penix 외, J. Exp. Med. 178:1483-96 (1993) 참조). 일부 구체예에서, 프로모터는 유도 물질(예컨대 T 세포 활성화 시그널)에 응답할 수 있는 유도성 프로모터이다. 일부 구체예에서, 대상체 내 표적 세포, 예컨대, 종양 세포, 면역 세포 및/또는 APC에 전달된 핵산은 전술한 임의의 조절 요소에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0437] [0424] 일부 구체예에서, 벡터 세균성 벡터, 예컨대 세균성 플라스미드 또는 코스미드이다. 일부 구체예에서, 세균성 벡터는 포유동물 세포에 대한 플라스미드 DNA의 세균-매개 전달을 통해 표적 세포, 예컨대, 종양 세포, 면역 세포 및/또는 APCs에 전달된다(세균감염(bactofection)이라고도 함). 일부 구체예에서, 전달된 세균성 벡터는 표적 세포 내에서의 발현을 위해 적절한 발현 조절 서열, 예컨대 전술한 바와 같은 프로모터 서열 및/또는 인핸서 서열, 또는 임의의 조절 서열도 함유한다. 일부 구체예에서, 세균성 벡터는 감염 물질, 예컨대, 세균에서, 인코딩된 변이체 폴리펩타이드의 발현 및/또는 분비를 위한 적절한 발현 조절 서열을 함유한다.

- [0438] [0425] 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 합성법에 의해서도 만들어질 수 있다. 고상 합성법이 개별적인 펩타이드를 만드는 바람직한 기술인데 이는 이 기술이 소형 펩타이드 제조시 비용면에서 가장 효율적인 방법이기 때문이다. 예컨대, 잘 알려진 고상 합성 기술에는 보호기, 링커, 및 고상 지지체의 사용, 그리고 특이적인 보호 및 탈보호 반응 조건, 링커 절단 조건, 스캐빈저의 사용, 및 고상 펩타이드 합성의 기타 측면을 이용하는 것이 포함된다. 이어서 펩타이드를 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩타이드 내로 조립할 수 있다.
- [0439] **IV. 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질의 활성 면역 조절 평가 방법**
- [0440] [0426] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 CD86 폴리펩타이드(전장 및/또는 특이적 결합 단편 또는 컨쥬게이트, 적층 구축물 또는 이의 융합체 또는 조작된 세포)는 T 세포 활성화를 조절하는 면역조절 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, CD86 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변형 CD86 대조군과 비교하여 T 세포 분석에서 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현과 같은 사이토카인 생산을 조절한다. 일부 경우에, 발현 세포 활성의 조절은 대조군 CD86에 비해 T 세포에 의한 또는 T 세포로부터의 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현과 같은 사이토카인 생산을 증가 또는 감소시킬 수 있다. IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현과 같은 특이적 결합 및 사이토카인 생성물을 결정하기 위한 분석은 당업계에 잘 알려져 있으며 배양 상등액에서 사이토카인 수준을 측정하는 MLR(혼합 림프구 반응) 분석(Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56), SEB(staphylococcal enterotoxin B) T 세포 자극 분석(Wang et al., 암 Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56), 및 항-CD3 T 세포 자극 분석(Li 및 Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104)을 포함한다.
- [0441] [0427] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 야생형 CD86 대조군에 대한 1차 T-세포 분석에서, IFN-감마(인터페론-감마), TNF α 또는 IL-2 발현과 같은 사이토카인 생산을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 활성은 변이체 CD86 폴리펩타이드가 길항제 활성을 위한 형태로 제공되는지 또는 작용제 활성을 위한 형태로 제공되는지에 따라 달라질 수 있다. 당업자는 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현의 증가 또는 감소를 결정하는 데 사용되는 1차 T-세포 분석의 다양한 형식이 존재한다는 것을 인식할 것이다.
- [0442] [0428] 1차 T-세포 분석에서 IFN-감마, TNF α , 또는 IL-2 발현을 증가 또는 감소시키는 변이체 CD86의 능력을 분석하는데, 혼합 림프구 반응(MLR) 분석을 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 길항제 형태, 예를 들어 가용성 형태, 예를 들어 변이체 CD86-Fc 또는 분비성 면역조절 단백질로 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 CD28의 활성을 차단하고, 이로 인해, 분석에서 IFN-감마, TNF알파, 또는 IL-2의 감소된 생산에 의해 관찰되는 바와 같이 분석에서 MLR 활성을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 종양-국소화 모이어티를 함유하는 국소화 vIgD 적층체 또는 컨쥬게이트와 같은 작용제 형태로 제공되는 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질 또는 제공된 바와 같은 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포는 CD28의 활성을 자극하고 그에 따라, 증가된 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 생산에 의해 입증되는 것과 같이 MLR 활성을 증가시킬 수 있다.
- [0443] [0429] 별법으로, 1차 T-세포 분석에서 IFN-감마 또는 IL-2 발현의 증가 또는 감소를 조절하는 변이체 CD86의 능력을 분석하는데 있어, 공동-고정 분석이 사용될 수 있다. 공동-고정 분석에서는, 항-CD3 항체에 의해 일부 구체예에서 제공된, TCR 시그널을, 공동-고정된 CD86과 함께 사용하여 CD86 비변형 또는 야생형 대조군에 상대적인 IFN-감마 발현 또는 IL-2 발현의 증가 또는 감소 능력을 탐지한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질, 예컨대 공동-고정된 변이체 CD86 (예컨대, CD86-Fc)은, 공동-고정 분석에서 IFN-감마 생성을 증가시킨다.
- [0444] [0430] 일부 구체예에서, IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현의 증가 또는 감소를 조절하는 변이체 CD86의 능력을 분석하는데 있어서 T 세포 리포터 분석법이 이용가능하다. 일부 구체예에서, T 세포는 Jurkat T 세포주이거나 또는 T 세포주로부터 유래한다. 리포터 분석에 있어서, 리포터 세포주(예컨대 Jurkat 리포터 세포) 역시 변이체 IgSF 도메인 폴리펩타이드의 동족 결합 파트너인 억제 수용체, 예컨대 CTLA-4를 과발현하도록 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, 리포터 T 세포는 또한 리포터에 작동가능하게 연결된 T 세포 활성화에 반응성인 유도가능한 프로모터를 함유하는 리포터 작제물도 함유한다. 일부 구체예에서, 리포터는 형광 또는 발광 리포터이다. 일부 구체예에서, 리포터는 루시페라제이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 CD3 시그널링이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 NFAT 프로모터이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 공동자극 시그널링, 예컨대 CD28 공동자극 시그널링에 반응한다. 일부 구체예에서, 프로모터는 IL-2 프로모터이다.
- [0445] [0431] 리포터 분석 관점에서, 리포터 세포주는 예컨대 CD86과 같은 야생형 리간드를 발현하는 항원 제시 세포(APCs)와 공동-인큐베이션함으로써 자극된다. 일부 구체예에서, APC는 인공 APC이다. 인공 APC는 당업자에게 잘 알려져 있다. 일부 구체예에서, 인공 APC는 하나 이상의 포유동물 세포주, 이를테면 K562, CHO 또는 293 세포로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 인공 APC는 항-CD3 항체 및 일부 경우 공동자극 리간드를 발현하도록 조작된

다. 일부 구체예에서, 인공 APC는 변이체 IgSF 도메인 폴리펩타이드의 동족 결합 파트너를 과잉발현하도록 생성된다. 예를 들어, 변이체 CD86의 경우, 리포터 세포주(예컨대 리포터 세포)는 리간드 CD28을 과잉발현하도록 생성된다. 일부 구체예에서, Jurkat 리포터 세포는 변이체 IgSF 도메인 분자 또는 면역조절 단백질, 예컨대, 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질의 존재 하에 과발현하는 인공 APC와 함께 공동-인큐베이션된다. 일부 구체예에서, 리포터 발현은 예컨대 세포의 발광 또는 형광을 탐지함으로써 모니터링된다. 동족 결합 파트너의 작용제 또는 길항제(차단) 활성이 모니터링될 수 있다.

[0446] [0432] 통상의 기술자에게는 적절한 대조군의 사용에 관하여 알려져 있지만, 전술한 구체예에서, 대조군은 전형적으로, 그 변이체 CD86이 유래 또는 발달된 동일한 포유동물 종으로부터의 천연 PD-L1 이소폼의 야생형과 같은, 비변형 CD86의 사용을 포함한다. 일부 구체예에서, 야생형 또는 천연 CD86은 변이체와 동일한 형태 또는 대응하는 형태이다. 예컨대, 변이체 CD86이 Fc 단백질에 융합된 변이체 ECD를 함유하는 가용성 형태이면, 대조군은 Fc 단백질에 융합된 변이체 CD86의 야생형 또는 천연 ECD를 함유하는 가용성 형태이다.

[0447] [0433] 일부 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 야생형 또는 비변형 PD-L1 대조군에 비해 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현 (즉, 단백질 발현)을 적어도: 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 증가시킨다. 또 다른 구체예에서, 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 야생형 또는 비변형 CD86 대조군에 비해 IFN-감마, TNF α 또는 IL-2 발현 (즉 단백질 발현)을 적어도: 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 감소시킨다. 일부 구체예에서, 야생형 CD86 대조군은 야생형 쥐의 CD86 서열이 변경된 변이체 CD86에 대해 전형적으로 사용되는 쥐의 CD86이다. 일부 구체예에서, 야생형 CD86 대조군은 SEQ ID NO: 2, 또는 SEQ ID NO: 122 또는 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 CD86 서열과 같은 대응하는 야생형 인간 CD86의 그것과는 변경된 서열을 갖는 변이체 CD86에 전형적으로 사용되는 것과 같은 인간 CD86이다.

[0448] V. 의약 제형

[0449] [0434] 본원에 따라 본 명세서에 설명된 임의의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트, 조작된 세포 또는 감염 물질을 함유하는 조성물이 제공된다. 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 의약 조성물은 예컨대 조성물의 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 멸균성, 안정성, 용해 속도 또는 방출 속도, 흡착성 또는 침투성을 변형, 유지 또는 보존하기 위한 부형제를 1종 이상 포함할 수 있다. 일부 태양에서, 통상의 기술자는 세포를 함유하는 의약 조성물과 단백질을 함유하는 의약 조성물이 상이하다는 것을 이해할 것이다.

[0450] [0435] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 분말, 캡슐 또는 정제와 같은 고체이다. 예를 들어, 의약 조성물의 성분들은 동결건조될 수 있다. 일부 구체예에서, 고체 의약 조성물은 투여 전에 액체에 용해 또는 재조성된다.

[0451] [0436] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 액체, 예를 들어 수용액(예컨대 생리식염수 또는 링거액)에 용해된 변이체 CD86 폴리펩타이드이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 8.5 (예컨대 약 4.0 내지 약 5.0, 약 4.5 내지 약 5.5, 약 5.0 내지 약 6.0, 약 5.5 내지 약 6.5, 약 6.0 내지 약 7.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 약 7.0 내지 약 8.0, 또는 약 7.5 내지 약 8.5)이다.

[0452] [0437] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제, 예컨대 충전제, 바인더, 피복제, 보존제, 윤활제, 향료, 감미료, 색소, 용매, 완충제, 킬레이트화제 또는 안정화제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 충전제의 예로는 셀룰로스, 이염기성 인산칼슘, 탄산칼슘, 미정질 셀룰로스, 수크로스, 락토스, 글루코스, 만니톨, 소르비톨, 말톨, 예비호화 전분, 옥수수 전분 또는 감자 전분을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 바인더의 예로는 폴리비닐피롤리돈, 전분, 락토스, 자일리톨, 소르비톨, 말티톨, 젤라틴, 수크로스, 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 또는 셀룰로스를 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 피복제의 예로는 히드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 셀라, 옥수수 단백질 제인 또는 젤라틴을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 봉피제의 예로는 폴리비닐피롤리돈, 카복시메틸 셀룰로스, 또는 글리콜산나트륨 전분을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 윤활제의 예로는 폴리에틸렌 글리콜, 스테아르산 마그네슘 또는 스테아르산을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 보존제의 예로는 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산 또는 소르브산을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 감미료의 예로는 수크로스, 사카린, 아스파탐, 또는 소르비톨을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 완충제의 예로는 카보네이트, 시트레이트, 글루코네이트, 아세테이트, 포스페이트 또는 타르트레이트를 들 수 있다.

[0453] [0438] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 주사가능한 마이크로스피어, 생체-침식성 입자, 폴리머 화합물(폴리락

트산, 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜과 같이, 제품의 지속 방출 또는 조절 방출을 위한 물질을 더 포함한다.

[0454] [0439] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 멸균된 것이다. 멸균은 멸균 여과막 또는 주사를 통해 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 이 방법을 이용한 멸균은 동결건조 전 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조 형태 또는 용액으로 보관될 수 있다. 이에 더해, 비경구용 조성물은 일반적으로 예컨대 피하주사용침에 의해 침투가능한 스토퍼를 구비한 정맥 용액 백 또는 바이알과 같이, 멸균 액세스 포트를 갖는 용기 내로 투입된다.

[0455] [0440] 일부 구체예에서, 본 발명에 따라 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포를 비롯한, 막관통 면역조절 단백질을 함유하는 의약 조성물이 제공된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물 및 제형은 1종 이상의 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충된 식염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 황산화제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타치온; 아즈반트 (예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 종기로는 정맥 투여용으로 조성되는 것이 바람직하다.

[0456] [0441] 이러한 제형은 예컨대 정맥 주입에 적합한 형태일 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 체내 어느 조직, 장기 또는 신체 부분으로부터의 관심 세포를 체내 다른 조직, 장기 또는 신체 부분으로 전달 또는 운반하는데 관련된 약학적으로 허용가능한 물질, 조성물, 또는 비히클일 수 있다. 예를 들어, 담체는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 재료, 또는 이의 조합일 수 있다. 담체의 각 성분은 체내 다른 성분들과 공용성(compatible)이어야 한다는 점에서 "약학적으로 허용가능"하여야 한다. 담체는 또한 그것과 마주치게 되는 체내의 어느 조직, 장기 또는 신체 일부와의 접촉에도 적합하여야 하며, 이는 담체가 그의 치료적 장점을 과도하게 상회하는 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성과 같은 위험성 또는 이들의 임의의 조합을 지니는 아니됨을 의미한다.

[0457] [0442] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서 대상체는 인간 환자이다. 일반적으로, 의약 조성물의 투여량 및 투여 경로는 표준 의약 실무에 따라 대상체의 크기와 상태에 따라 결정한다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 투여량은 세포 배양 분석을 통해 또는 마우스, 래트, 토끼, 개, 돼지 또는 원숭이와 같은 동물 모델에서 초기에 평가될 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데도 이용될 수 있다. 이러한 정보는 다시 인간에 사용되기에 유용한 투여량과 투여 경로를 결정하는데 이용될 수 있다. 정확한 투여량은 치료를 요하는 대상체와 관련된 여러 인자들을 고려하여 결정된다. 투여량 및 투여의 제반사항은 활성 화합물을 충분한 수준으로 제공하고 목적하는 효과를 유지하도록 조정된다. 고려하여야 할 인자에는 대상체의 질병 상태의 위중도, 전반적인 건강 상태, 연령, 체중 및 성별, 투여 시기 및 투여 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 치료법에 대한 응답성이 포함된다.

[0458] [0443] 장기적으로 작용하는 의약 조성물을, 특정 제형의 반감기 및 소거율에 따라 3 내지 4일마다, 매주, 또는 2주마다 투여할 수 있다. 투여 빈도는 사용된 제형 내 분자들의 약력학적 파라미터에 따라 달라진다. 전형적으로, 조성물은 소망되는 효과가 투여량에 의해 달성될 때까지 투여된다. 조성물은 따라서 경시적으로 단회 투여 또는 다회 투여(동일 또는 상이한 농도/투여량으로)를 통해 투여되거나 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 또한 적절한 투여량의 강화가 일상적으로 이루어진다. 적절한 투여량은 적절한 투여량-반응 데이터를 사용함으로써 확인할 수 있다. 예컨대 T 세포 활성화 또는 증식, 사이토카인 합성 또는 생산(예컨대, TNF- α , IFN- γ , IL-2의 생산), 다양한 활성화 마커(예컨대, CD25, IL-2 수용체)의 유도, 염증, 관절 부종 또는 압통, C-반응성 단백질의 혈청 수준, 항-콜라겐 항체 생산, 및/또는 T 세포-의존성 항체 응답성(들)을 비롯한, 치료 효과를 가늠하기 위한 몇몇 바이오마커 또는 생리 마커를 모니터링할 수 있다.

[0459] [0444] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 대상체에게 경구, 경피(transdermally), 흡입, 정맥내, 동맥내, 근육내, 상처부위로의 직접 적용, 외과수술 부위로의 적용, 복강내, 좌약, 피하, 피내, 경피(transcutaneously), 분무, 흉강내, 뇌실내(intraventricularly), 관절내, 안내 또는 척수강내(intraspinally)를 비롯한 임의의 경로를 통해 대상체에게 투여된다.

[0460] [0445] 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여량은 단일 투여량 또는 반복 투여량이다. 일부 구체예에서, 상기 투여량은 대상체에게 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 4회 또는 그 이상 주어진단다. 일부 구체예에서는, 1주일에 약 1회 이상(예컨대 약 2 또는 more, 약 3회 이상, 약 4회 이상, 약 5회 이상, 약 6회 이상, 또는 약 7회 이상) 투여된다. 일부 구체예에서, 수일, 수주일, 수개월 또는 수년의 기간에 걸쳐 복수회로 투여된다. 일부 구체예에서, 치료 코스는 약 1회 이상의 투여 (예컨대 약 2회 이상의 투여, 약 3회 이상의 투여, 약 4회 이상의

투여, 약 5회 이상의 투여, 약 7회 이상의 투여, 약 10회 이상의 투여, 약 15회 이상의 투여, 약 25회 이상의 투여, 약 40회 이상의 투여, 약 50회 이상의 투여, 또는 약 100회 이상의 투여)이다.

[0461]

[0446] 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여량은 대상체 체중 1 kg 당 약 1 μg 이상의 단백질(예컨대 대상체 체중 1 kg 당 약 2 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 5 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 10 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 25 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 50 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 100 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 250 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 500 μg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 1 mg 이상의 단백질, 대상체 체중 1 kg 당 약 2 mg 이상의 단백질, 또는 대상체 체중 1 kg 당 약 5 mg 이상의 단백질)이다.

[0462]

[0447] 일부 구체예에서, 치료량의 세포 조성물이 투여된다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 정확한 투여량은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 정도 또는 전이, 및 환자(대상체)의 상태 등 개체 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 일반적으로, 조작된 세포 예컨대 본 발명에 설명된 바와 같은 T 세포를 포함하는 의약 조성물은 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중 (이들 범위 사이의 모든 정수값을 포함함)의 투여량으로 투여될 수 있다. 조작된 세포 조성물 예컨대 T 세포 조성물 역시도 이러한 투여량 범위로 다회 투여될 수 있다. 세포들은 면역요법에 일반적으로 알려져 있는 주입 기술을 사용함으로써 투여할 수 있다 (예컨대, Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988 참조). 이 기술 분야의 통상의 기술자라면 질병의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 그에 따라 치료 방법을 조정함으로써 특정 환자에 대한 최적 투여량 및 처치 방법을 쉽게 결정할 수 있다.

[0463]

[0448] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 면역조절 변이체 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 감염 물질을 함유한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 치료에 적합한 대상체에게 투여하는데 적합한 감염 물질의 용량을 함유한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 바이러스인 감염 물질을 약 1×10^5 내지 약 1×10^{12} 플라크-형성 단위(pfu), 1×10^6 내지 1×10^{10} pfu, 또는 1×10^7 내지 1×10^{10} pfu, 이를테면 적어도 또는 적어도 약 또는 약 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 pfu 또는 약 1×10^{10} pfu의 단위 또는 복수회 투여량으로 함유한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 바이러스를 약 10^5 내지 약 10^{10} pfu/mL, 예컨대, 5×10^6 내지 5×10^9 또는 1×10^7 내지 1×10^9 pfu/mL, 이를테면 적어도 또는 적어도 약 또는 약 10^6 pfu/mL, 10^7 pfu/mL, 10^8 pfu/mL 또는 10^9 pfu/mL의 농도로 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 세균인 감염 물질을 약 1×10^3 내지 약 1×10^9 콜로니-형성 단위(cfu), 1×10^4 내지 1×10^9 cfu, 또는 1×10^5 내지 1×10^7 cfu, 이를테면 적어도 또는 적어도 약 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 또는 1×10^9 cfu의 단위 또는 복수회 투여량으로 함유한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 세균을 약 10^3 내지 약 10^8 cfu/mL, 예컨대, 5×10^5 내지 5×10^7 또는 1×10^6 내지 1×10^7 cfu/mL, 이를테면 적어도 또는 적어도 약 또는 약 10^5 cfu/mL, 10^6 cfu/mL, 10^7 cfu/mL 또는 10^8 cfu/mL의 농도로 함유할 수 있다.

[0464]

[0449] 본 발명의 치료 조성물의 투여가, 바람직하지 못한 면역 반응을 매개하거나 또는 매개할 수 있는 면역 세포를 제거, 격리 또는 불활성화시키거나; 보호적 면역 반응을 매개하거나 또는 매개할 수 있는 면역 세포를 유도, 생성 또는 턴온시키거나; 면역 세포의 물리적 또는 기능적 특징을 변화시키거나; 또는 이러한 효과들의 조합에 의해 면역학적 활성을 충분히 조절할 수 있는지를 알아보기 위한 다양한 수단이 알려져 있다. 이러한 면역학적 활성 조절의 측정 사례에는 면역세포 집단의 존부 검사(유세포분석법, 면역조직화학법, 조직학, 전자현미경, 폴리머라제 연쇄반응(PCR)을 이용); 시그널에 반응하여 증식 또는 분열하는 능력 또는 이에 대한 내성을 비롯한 면역 세포의 기능적 능력의 측정 (예컨대 항-CD3 항체, 항-T 세포수용체 항체, 항-CD28 항체, 칼슘 이노노포어, PMA (포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트), 펩타이드 또는 단백질 항원이 로딩된 항원제시세포를 이용한 자극 후 T 세포 증식 분석법 및 3H-티미딘 인코포레이션에 기초한 펄스분석; B 세포 증식 분석법); 다른 세포를 살해 또는 용해시키는 능력의 측정(예컨대 세포독성 T 세포 분석법); 사이토카인, 케모카인, 세포 표면 분자, 항체 및 세포의 기타 생성물의 측정(예컨대, 유세포 분석법, 효소-결합 면역흡착 분석법, 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 마이크로어레이 분석법, 면역침전 분석법); 면역 세포 내 시그널링 경로 또는 면역 세포의 활성화의 생화학적 마커의 측정(예컨대, 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화의 면역침전 분석법 및 웨스턴 블롯, 폴리펩타이드 절단, 및 단백질 복합체의 형성 또는 해리; 단백질 어레이 분석법; DNA 전사, DNA 어레이 또는 분해성

(subtractive) 혼성화); 아포토시스, 괴사, 또는 기타 메카니즘에 의한 세포 사멸의 측정(예컨대, 어넥신 V 염색, TUNEL 분석법, DNA 래더링을 측정하기 위한 겔 전기영동법, 조직학; 형광발생 카스파제 분석법, 카스파제 기질의 웨스턴 블롯 분석법); 면역 세포에 의해 생산된 유전자, 단백질 및 기타 분자의 측정(예컨대 노던 블롯 분석법, 폴리머라제 연쇄반응, DNA 마이크로어레이, 단백질 마이크로어레이, 2-차원 겔 전기영동, 웨스턴 블롯 분석법, 효소결합 면역흡착분석법, 유세포 분석법); 및 자가면역, 신경퇴행성 및 자가 단백질 또는 자가 폴리펩타이드와 연관된 기타 질환의 개선과 같은 임상적 증상 또는 결과의 측정(임상 점수, 부가적 치료의 사용에 대한 필요성, 기능 상태, 조영 연구), 예컨대 다발경화증의 경우 재발률 또는 질병 위중도의 측정(통상의 기술자에게 알려진 임상 점수를 이용), I형 당뇨병의 경우 혈당 측정 또는 류마티스성 관절염의 경우 관절 염증을 측정하는 것을 들 수 있다.

[0465] **VI. 제조 물품 및 키트**

[0466] [0450] 또한 본 발명에서 설명된 의약 조성물이 적절히 포장된 제조 물품도 제공된다. 본 발명에 설명된 조성물(예컨대 안과용 조성물)에 적합한 포장의 예로는 바이알(예컨대 밀봉 바이알), 베셀, 앰플, 보틀, 단지, 유연성 포장(예컨대 밀봉 마일러 또는 비닐백) 등을 들 수 있다. 이러한 제조 물품은 추가로 멸균 및/또는 밀봉될 수 있다.

[0467] [0451] 또한 본원에 따라 본원에 설명된 의약 조성물 (또는 제조 물품)을 포함하는 키트 역시도 제공되며, 이것은 예컨대 본원에 설명된 용도와 같은, 조성물의 사용 방법에 대한 지침(들)을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 설명된 키트는 또한 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 포장 삽입물을 비롯하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 그 밖의 물질을, 본원에 설명된 임의의 방법을 수행하기 위한 지침과 함께 포함할 수도 있다.

[0468] **VII. 치료 적용(rapeutical Applications)**

[0469] [0452] 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드 면역조절 단백질, 조작된 세포 또는 감염 물질을 함유하는 제공된 의약 조성물을 이용하여, 인간 환자와 같은 대상체에서 질병 또는 병태의 치료와 관련한 면역반응을 조절하기 위한 방법이 제공된다. 본원에 설명된 의약 조성물(본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트, 및 조작된 세포를 포함하는 의약 조성물을 포함한다)은 질병 치료와 같은 다양한 치료 용도에 이용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서 의약 조성물은 포유동물에서의 염증 또는 자가면역 질환, 암, 장기이식, 바이러스 감염 및/또는 세균 감염을 치료하는데 이용된다. 의약 조성물은 질병 치료를 위해 면역 반응을 조절(예컨대 증가 또는 감소)할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 포맷으로 변이체 CD86 폴리펩타이드를 이용하여 수행된다. 이러한 일부 태양에서, 면역 반응 증가는 종양 또는 암과 같은 대상체의 질병 또는 병태를 치료한다. 일부 구체예에서, 이 방법은 대상체에서 면역 반응을 감소시키는 포맷으로 변이체 CD86 폴리펩타이드를 이용하여 수행된다. 이러한 측면에서, 면역 반응을 감소시키면 대상체에서 자가면역 질환과 같은 염증성 질환 또는 병태와 같은 질병 또는 병태가 치료된다.

[0470] [0453] 일부 구체예에서, 제공된 방법은 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트, 조작된 세포 및 감염 물질의 치료적 투여에 적용가능하다. 소망되는 면역 반응의 조절 유형, 예컨대 증가 또는 감소 유형에 맞추어 적절한 포맷을 선택하는 것은 제공된 개시 내용에 비추어, 통상의 기술자의 기술 수준 범위 내이다.

[0471] [0454] 일부 구체예에서, 면역 반응을 자극 또는 증가시키는 본원에 제공된 의약 조성물이 투여되며, 이것은 예컨대 암, 바이러스 감염 또는 세균 감염 치료시 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 그의 동족 결합 파트너 CD28의 작용제 활성을 나타내고/나타내거나 CD28을 통한 공동자극 시그널링을 자극하거나 개시하는 형식으로 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유한다. 이러한 치료적 적용과 관련하여 사용하기 위한 CD86 폴리펩타이드의 예시적인 형식의 예로는 면역조절 단백질, 또는 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 종양 항원에 결합하는 그의 IgSF 도메인 또는 변이체(예컨대 Nkp30 또는 친화성-변형된 변이체) ("종양-국소화 IgSF 도메인이라고도 칭함)의 "적층체(stack)", 종양-표적화 모이어티 (종양-국소화 모이어티라고도 칭함)에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유하는 컨쥬게이트, 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포, 또는 감염된 세포 (예컨대 종양 세포 또는 APC, 예컨대 수지상 세포)에서 막관통 면역조절 단백질을 발현시키기 위한 것과 같은, 막관통 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 감염 물질을 들 수 있다.

[0472] [0455] 면역 반응을 조절하는 제공된 방법은 종양 또는 암과 같은 질병 또는 병태를 치료하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 의약 조성물을 이용하여 포유동물의 암 세포(예컨대 인간의 암 세포)의 성장을 억제할 수 있다. 암 치료 방법은 본원에 설명된 임의의 의약 조성물의 유효량을 암에 걸린 대상체에 투여하는 것을 포

함할 수 있다. 의약 조성물의 유효량을 투여하여 생체내, 또는 생체외에서 암, 인간 암 세포의 성장을 억제, 중단 또는 역전시킬 수 있다. 인간 환자의 생체의 치료에서, 암세포를 함유하는 조직 또는 유체를 체외에서 처리한 다음 상기 조직 또는 유체를환자 내로 재도입한다. 일부 구체예에서, 암은 환자에게 치료 조성물을 투여함으로써 인간 환자에서 생체내 치료된다. 따라서, 본 발명은 대조군을 이용한 치료에 비해 종양 진행을 억제, 중단 또는 역전시키거나 무진행 생존(즉 환자의 치료 도중 및 치료 후 환자 상태가 악화되지 않고 암에 걸린 채로 생존하는 기간) 또는 전체적인 생존("생존율이라고도 칭함; 즉 암으로 진단되거나 암 치료를 받은 후 일정 기간 동안 생존한 치료 그룹 또는 연구 그룹 내 환자들의 백분율)을 통계적으로 유의하게 증가시키는 생체외 및 생체내 방법을 제공한다.

[0473] [0456] 본원에 설명된 의약 조성물 및 치료방법에 의해 치료가능한 암의 예로는 흑색종, 방광암, 혈액학적 종양(백혈병, 림프종, 골수종), 간암, 뇌암, 신장암, 유방암, 췌장암(선암종), 대장암, 폐암(소세포 폐암 및 비소세포 폐암), 비장암, 흉선 또는 혈액 세포의 암(즉, 백혈병), 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁암, 위암, 근골격계 암, 두경부암, 위장관암, 생식 세포 암, 또는 내분비 및 신경분비 암을 들 수 있다. 일부 구체예에서, 암은 유잉 육종이다. 일부 구체예에서, 암은 흑색종, 폐암, 방광암, 및 혈액학적 종양으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 암은 림프종, 림프성 백혈병, 골수성 백혈병, 자궁경부암, 신경아세포종, 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서 암은 유방암이다.

[0474] [0457] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 단일 요법 (즉, 단일 약제로서) 또는 조합 요법 (즉, 화학 요법 약물, 암 백신, 또는 면역 체크포인트 억제제와의 조합)으로서 투여된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 방사선 요법으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 일부 태양에서, 면역 체크포인트 억제제는 니볼루맙, 트레멜리무맙, 펌브롤리주맙, 이필리무맙 등이다.

[0475] [0458] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 면역 반응을 억제하는데, 이것은 염증 또는 자가면역 질환 또는 장기이식 치료시 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 그의 동족 결합 파트너 CD28의 길항제 활성을 나타내거나 및/또는 CD28을 통해 억제 공동자극 시그널링을 억제 또는 차단하는 포맷으로 변이체 CD86 폴리펩타이드를 함유한다. 이러한 치료 용도와 관련하여 사용하기 위한 CD86 폴리펩타이드의 예시적인 포맷의 예에는, 가용성인 변이체 CD86 폴리펩타이드(예컨대 변이체 CD86-Fc 융합 단백질), 면역조절 단백질 또는 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 또 다른 IgSF 도메인(Fc 융합체인 그의 가용성 형태 포함)의 "적층체", 분비가능한 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포, 또는 감염된 세포(예컨대 종양 세포 또는 APC, 예컨대 수지상 세포)에서 분비가능한 면역조절 단백질의 발현 및 분비를 위한 것과 같은, 분비가능한 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 감염 물질이 포함된다.

[0476] [0459] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 변이체 CD86 폴리펩타이드를, 그의 동족 결합 파트너 CD28의 작용 활성을 나타내고/나타내거나 CD28을 통한 공동자극 시그널링을 촉진하는 형식으로 함유한다. 이러한 치료 적용과 관련하여 사용되기 위한 CD86 폴리펩타이드의 예시적인 형식으로는 예를 들어, 막관통 면역조절 폴리펩타이드인 변이체 CD86 폴리펩타이드, 막관통 면역조절 폴리펩타이드를 발현하는 조작된 세포, 또는 감염된 세포(예를 들어, T 세포, APC, 예를 들어, 수지상 세포) 상에서 막관통 면역조절 단백질을 발현하기 위한 것과 같은, 막관통 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 감염 물질을 들 수 있다.

[0477] [0460] 일부 구체예에서, 염증 또는 자가면역 질환은 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증성 위장관 질환, 염증성 안질환, 염증성 신경 질환, 염증성 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질환이다.

[0478] [0461] 일부 구체예에서, 본원의 의약 조성물에 의해 치료될 수 있는 염증 또는 자가면역 질환은 에디슨병, 알레르기, 탈모증, 알츠하이머, 항-호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 강직성 척추염, 항인지질 증후군 (휴증후군), 천식, 죽상동맥경화증, 류마티스성 관절염, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이질환, 자가면역 림프구증식 증후군, 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 무정자증, 베체트병, 버거병, 수포성 천포창, 심근병증, 심혈관 질환, 셀리악 스프루/셀리악 병, 만성피로 면역부전 증후군(CFIDS), 만성특발성 다발신경염, 만성염증성 탈수초증, 다발성 신경병증(CIDP), 만성 재발 성 다발성 신경병증 (길랭-바레 증후군), 척크-스트라우스 증후군 (CSS), 간질성 천포창, 저온응집소병(CAD), COPD (만성폐쇄성 폐질환), CREST 증후군, 크론병, 피부염, 포진피부염, 피부근육염, 당뇨병, 원반 낭창, 습진, 증식물집표피박리증, 필수 혼합형 저온 글로불린혈증, 예반 증후군, 외전 발작, 섬유근통, 굿파스처 증후군, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판 감소증 자반병 ITP), IgA 신증, 면역중식성 질환 또는 장애, 염증성 장질환 (IBD), 간질성 폐질환, 청소년 관절염, 청소년 특발성 관절염 (JIA), 가와사키병, 램버트-이튼 근무력 증후군, 편평태선,

루푸스 신장염, 림프구성 리포피시티스, 메니에르병, 밀러 피쉬 증후군/급성 파종뇌척수염 (EMR), 혼합 연결조직 질환, 다발경화증(MS), 근육 류마티즘, 근육통성 뇌척수염 (ME), 중증 근무력증, 눈의 염증, 낙엽천포창, 보통천포창, 악성빈혈, 결절다발동맥염, 다발연골염, 다분비성 증후군(히타커 증후군), 류마티스성 다발근육통, 다발근육염, 프라이머리 아감마글루블린혈증, 일차담관경화증/자가면역 담도감염병증, 건선, 건선 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군/반응성 관절염, 재협착, 류마티스성 발열, 류마티스 질환, 사코이드증, 슈미트 증후군, 공피증, 췌그렌 증후군, 강직증후군, 전신홍반루푸스(SLE), 전신 공피증, 타카야스 관절염, 일시적 관절염/자이언트 세포 동맥염, 갑상선염, I형 당뇨병, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 백반증, 간질성 장질환 또는 베게너 육아종증이다. 일부 구체예에서, 염증 또는 자가면역 질환은 간질성 장질환, 이식, 크론병, 궤양성 대장염, 다발경화증, 천식, 류마티스성 관절염 및 건선으로부터 선택된다.

[0479] [0462] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 자가면역 상태를 조절하기 위해 투여된다. 예를 들어, 공여자로부터의 조직, 세포 또는 장기이식을 수혜자가 거부하는 것을 억제하는 방법에 있어서 면역 반응을 억제하는 것이 이로울 수 있다. 그러므로, 일부 구체예에서, 본원에 설명된 의약 조성물은 이식편 대 숙주 질환(GVHD)과 같은 이식편-관련 또는 이식 관련 질병 또는 장애를 제한 또는 예방하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 이식 또는 식립된(transplanted, grafted) 골수, 장기, 피부, 신경, 아일렛 또는 실질 세포(parenchymal cells)의 자가면역 거부를 억제하는데 이용된다.

[0480] [0463] 본원에 설명된 조작된 세포를 포함하는 의약 조성물 및 방법은 입양 세포 전달 용도에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 조작된 세포를 포함하는 세포 조성물은 예를 들어 포유동물의 암 치료 또는 다른 구체예에서 자가면역 질환의 치료에 대한 면역요법 접근에서 면역학적 활성을 조절하는 관련 방법에 사용될 수 있다. 사용된 방법은 일반적으로 친화성 변형된 IgSF 도메인의 특이적 결합 및 포유동물 세포의 면역학적 활성의 조절을 허용하는 조건 하에서 포유동물 세포와 본 발명의 TIP를 접촉시키는 방법을 포함한다. 일부 구체예에서, 면역 세포 (예컨대 종양 침윤 림프구 (TIL), T-세포 (CD8+ 또는 CD4+ T-세포 포함), 또는 APC)를 조작하여 본 발명에 설명된 가용성 변이체 CD86 폴리펩타이드, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트 및/또는 막 단백질로서 발현시킨다. 이어서 조작된 세포를 APC, 제2 림프구 또는 종양 세포와 같이, 면역활성 조절이 요망되는 포유동물 세포와, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 상기 포유동물 세포에서 친화성 변형된 IgSF 도메인의 카운터-구조에 대한 특이적 결합을 허용하는 조건 하에서 접촉시킴으로써 면역학적 활성을 상기 포유동물 세포에서 조절할 수 있다. 세포는 생체내 또는 생체외에서 접촉될 수 있다.

[0481] [0464] 일부 구체예에서, 조작된 세포는 자가(autologous) 세포이다. 또 다른 구체예에서, 세포는 동종이체이다. 일부 구체예에서, 세포는 그것이 분리되었던 포유동물 내로 재주입되는 조작된 자가 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 포유동물 내로 주입되는 조작된 동종이체 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 환자의 혈액 또는 종양으로부터 수확되어, 폴리펩타이드를 발현하도록 조작되고(예컨대 본원에 설명된 변이체 CD86 폴리펩타이드, 면역조절 단백질, 또는 컨쥬게이트), 시험관내 배양 시스템에서 증식된 다음(예를 들어 세포 자극에 의해), 종양 파괴를 매개하도록 환자에게 재주입된다. 일부 구체예에서, 이러한 방법은 입양세포 전달에 의해 수행되는데 이 방법에서는 TIP를 발현하는 세포(예컨대 T-세포)를 환자에게 재주입한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 치료 조성물 및 방법은 림프종, 림프성 백혈병, 골수성 백혈병, 자궁내막암, 신경모세포종, 또는 다발성 골수종과 같은 암에 걸린 포유동물 환자를 치료하는데 사용된다.

[0482] [0465] 일부 구체예에서, 제공된 방법은 치료 적용이 지시되는 질병 또는 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하기 위한 것이다. 경우에 따라, 치료를 위한 대상체는 예컨대 제공된 변이체 CD86 폴리펩타이드들, 면역조절 단백질, 컨쥬게이트s, 조작된 세포 또는 감염 물질 중 어느 하나로 치료하는 것을 포함하여, 임의의 제공된 방법에 따른 치료를 위해 대상체를 식별 또는 선택하거나 또는 치료 안정성을 결정하는 등 하나 이상의 특징이나 파라미터에 기초하여 치료 전에 선택될 수 있다.

[0483] VIII. 예시적인 구체예

[0484] [0466] 제공된 구체예에는 다음이 포함된다:

[0485] 1. 세포의 도메인 또는 IgV 도메인을 함유하는 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편이 제공되며, 여기서, 상기 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 제시된 위치를 참조로, 비변형 CD86 또는 그의 특이적 결합 단편의 13, 18, 25, 28, 33, 38, 39, 40, 43, 45, 52, 53, 60, 68, 71, 77, 79, 80, 82, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 97, 102, 104, 113, 114, 123, 128, 129, 132, 133, 137, 141, 143, 144, 148, 153, 154, 158, 170, 172, 175, 178, 180, 181, 183, 185, 192, 193, 196, 197, 198, 205, 206, 207, 212, 215, 216, 222, 223, 또는 224로부터 선택된 위치(들)에 대응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인,

변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편.

- [0486] 2. 구체예 1에 있어서, 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0487] 3. 구체예 1 또는 구체예 2에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 포유동물 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0488] 4. 구체예 3에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0489] 5. 구체예 1-4 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 인간 CD86의 세포외 도메인을 포함하고, 하나 이상의 아미노산 변형은 비변형 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 하나 이상의 잔기에 존재하는 것인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0490] 6. 구체예 1-5 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:29에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함하는 그의 일부를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0491] 7. 구체예 1-6 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:29에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0492] 8. 구체예 6에 있어서, 그의 일부는 IgV 도메인의 아미노산 잔기 33-131 또는 24-134 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0493] 9. 구체예 1-6 및 8 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 123에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 123에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 함유하는 그의 일부를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0494] 10. 구체예 1-6 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:123에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0495] 11. 구체예 1-6, 8 및 9 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO: 122에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 122에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0496] 12. 구체예 1-6, 8, 9 및 11 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 비변형 CD86은 SEQ ID NO:122에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0497] 13. 구체예 1-12 중 어느 하나의 구체예에 있어서:
- [0498] 특이적 결합 단편은 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 95개 또는 그 이상의 아미노산 길이를 가지거나; 또는 특이적 결합 단편은 SEQ ID NO:2의 잔기 33-131로서 제시된 IgV 도메인의 길이의 적어도 80% 길이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0499] 14. 구체예 1-13 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 변형, 선택적으로 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0500] 15. 구체예 1-14 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 A13V, Q18K, Q25L, S28G, F33I, E38V, N39D, L40M, L40S, N43K, V45I, F52L, D53G, M60K, D68N, T71A, L77P, I79N, K80E, K80M, K80R, K82T, Q86K, Q86R, I88F, I88T, I89V, H90 L, H90Y, K92I, K93T, M97L, Q102H, N104S, F113S, S114G, N123D, V128A, Y129N, L132M, T133A, I137T, P141A, P143H, K144E, V148D, K153E, K153R, N154D, E158G, V170D, E172G, D175E, I178T, L180S, S181P, S183P, P185S, T192N, I193V, I196V, L197M, E198D, L205S, S206T, S207P, E212V, D215V, P216H, H222T 또는 I223F, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0501] 16. 구체예 1-15 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V,

Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S, E38V/S114G/P143H, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, K80M/I88T, K92I/F113S, M60K/H90L, Q25L/F33I/H90L, Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T, Q25L/H90L, Q25L/H90L/P185S, Q25L/H90L/P185S/P224L, Q25L/H90L/S179R, Q25L/H90Y/S181P/I193V, Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P, Q25L/Q86R/H90L/K93T, 또는 S28G/H90Y로부터 선택되는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

- [0502] 17. 구체예 1-14 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및/또는 위치 90에 존재하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0503] 18. 구체예 1-14 및 17 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L, H90Y, 또는 H90L을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0504] 19. 구체예 1-14 및 17 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 위치 25 및 위치 90에서의 변형을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0505] 20. 구체예 19에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Q25L/H90Y 또는 Q25L/H90L로부터 선택되는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0506] 21. 구체예 1-20 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Q25L/T71A/H90Y, Q25L/D53G/E212V, Q25L/H90L, N43K/I79N/H90L/I178T/E198D, A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T, Q25L/Q86R/H90L/K93T/L132M/V148D/S181P/P216H, Q25L/F33I/H90Y/V128A/P141A/E158G/S181P, Q25L/N39D/K80R/Q86R/I88F/H90L/K93T/N123D/N154D, Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V, Q25L/Q86R/H90L/N104S, Q25L/L40M/H90L/L180S/S183P, Q18K/Q25L/F33I/L40S/H90L, Q25L/Q86K/H90L/I137T/S181P, Q25L/L77P/H90Y/K153R/V170D/S181P, Q25L/S28G/F33I/F52L/H90L/Q102H/I178T, Q25L/F33I/H90L/K144E/L180S, Q25L/F33I/H90L/K153E/E172G/T192N, Q25L/F33I/Q86R/H90Y/D175E/I196V/E198D, Q25L/V45I/D68N/H90L/S183P/L205S/E212X, H90Y/L180S, H90Y/Y129N, I89V/H90L/I193V, K80E/H90Y/H222T/I223F/P224L, M60K/H90L; Q25L/F33I/H90L; Q25L/F33I/Q86R/H90L/K93T; Q25L/H90L; Q25L/H90L/P185S; Q25L/H90L/P185S/P224L; Q25L/H90L/S179R; Q25L/H90Y/S181P/I193V; Q25L/K82T/H90L/T152S/S207P; Q25L/Q86R/H90L/K93T, S28G/H90Y, A13V/Q25L/H90L, Q25L/H90L/K93T/M97L, Q25L/Q86R/H90L 또는 I89V/H90L로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0507] 22. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0508] 23. 구체예 1-22 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0509] 24. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0510] 25. 구체예 1-21 및 24 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0511] 26. 구체예 1-21 및 24 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0512] 27. 구체예 1-21 및 26 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/Q86R/H90L/N104S를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0513] 28. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0514] 29. 구체예 1-21 및 28 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 I89V/H90L/I193V를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.

- [0515] 30. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 M60K/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0516] 31. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/ F33I/H90L을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0517] 32. 구체예 1-21 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형 Q25L/ H90L/P185S를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0518] 33. 구체예 1-32 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:29에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0519] 34. 구체예 1-33 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD28의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 증가된 친화성으로 특이적으로 결합하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0520] 35. 구체예 34에 있어서, 결합 친화성은 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 5.0배, 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 60배, 적어도 약 70배, 적어도 약 80배, 적어도 약 90배, 적어도 약 100배, 또는 적어도 약 125배 증가된 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0521] 36. 구체예 1-35 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86이 동일한 엑토도메인에 대해 결합하는 것보다 감소된 친화성으로 특이적으로 결합하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0522] 37. 구체예 36에 있어서, 감소된 결합 친화성은 적어도 약 1.2배, 적어도 약 1.4배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 1.75배, 적어도 약 2.0배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3.0배, 적어도 약 4.0배, 또는 적어도 약 5.0배 감소된 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0523] 38. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CTLA-4의 엑토도메인에 대해, 비변형 CD86의 동일한 엑토도메인에 대한 결합과 동일 또는 유사한 결합 친화성으로 특이적으로 결합하며, 선택적으로 상기 동일 또는 유사한 결합 친화성은 비변형 CD86의 결합 친화성의 약 90% 내지 120%인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0524] 39. 구체예 1-38 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 완전한 세포외 도메인을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0525] 40. 구체예 1-39 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편 및 SEQ ID NOS: 85-121 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0526] 41. 구체예 1-40 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 대해 95% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그의 특이적 결합 단편, SEQ ID NOS: 141-177 중 어느 하나에 제시된 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0527] 42. 구체예 34-41 중 어느 하나의 구체예에 있어서, CD28은 인간 CD28인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0528] 43. 구체예 34-42 중 어느 하나의 구체예에 있어서, CTLA-4는 인간 CTLA-4인 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0529] 44. 구체예 1-43 중 어느 하나의 구체예에 있어서 가용성 단백질인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0530] 45. 구체예 1-44 중 어느 하나의 구체예에 있어서:
- [0531] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 CD86 막관통 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 결여하고/결여하거나;
- [0532] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 세포 표면에서 발현되지 못하는 것인 변이체 CD86 폴리펩타이드.

- [0533] 46. 구체에 1-45 중 어느 하나의 구체에 있어서, 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0534] 47. 구체에 46에 있어서, 멀티머화 도메인은 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체인 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0535] 48. 구체에 1-47 중 어느 하나의 구체에 있어서 이펙터 기능이 감소된 Fc 도메인 또는 그의 변이체에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0536] 49. 구체에 47 또는 구체에 48에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1이거나 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0537] 50. 구체에 47-49 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0538] 51. 구체에 47-50 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0539] 52. 구체에 47-50 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 각각 EU 넘버링 기준으로 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, N297G, V302C 및 K447del로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 함유하는 변이체 IgG1 Fc 도메인인, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0540] 53. 구체에 47-50 및 52 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 아미노산 변형 L234A/L235E/G237A를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0541] 54. 구체에 47-50, 52 및 53 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 C220S를 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0542] 55. 구체에 47-50 및 52-54 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 EU 넘버링 기준으로 아미노산 변형 K447del을 포함하는 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0543] 56. 구체에 47-50 및 52-55 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형을 하나 이상 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0544] 57. 구체에 47-50 및 52-56 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0545] 58. 구체에 47-57 중 어느 하나의 구체에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커, 선택적으로 G4S 링커를 통해 간접적으로 멀티머화 도메인 또는 Fc에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0546] 59. 구체에 1-43 중 어느 하나의 구체에 있어서, 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 더 포함하는 막관통 면역조절 단백질이고, 선택적으로 상기 막관통 도메인은 변이체 CD86 폴리펩타이드의 세포외 도메인 (ECD) 또는 그의 특이적 결합 단편에 직접 또는 간접적으로 연결된, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0547] 60. 구체에 59에 있어서, 막관통 도메인은 SEQ ID NO:2의 잔기 248-268로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:2의 잔기 248-268에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0548] 61. 구체에 59 또는 구체에 60에 있어서, 세포질 도메인을 더 포함하고, 선택적으로 상기 세포질 도메인은 직접 또는 간접적으로 막관통 도메인에 연결된, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0549] 62. 구체에 61에 있어서, 세포질 도메인은 천연 CD86 세포질 도메인이거나 이를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0550] 63. 구체에 61 또는 구체에 62에 있어서, 세포질 도메인은 SEQ ID NO:2의 잔기 269-329로서 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:2의 잔기 269-329에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 나타내는 그의 기능성 변이체를 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.
- [0551] 64. 구체에 61에 있어서, 세포질 도메인은 ITAM 시그널링 모티프를 포함하고/포함하거나 또는 CD3 제타의 세포

내 시그널링 도메인을 포함하는, 변이체 CD86 폴리펩타이드.

- [0552] 65. 구체에 59 또는 구체에 60에 있어서, 폴리펩타이드는 세포질 시그널링 도메인을 함유하지 않고/않거나 세포 상에서 발현될 때 세포내 시그널을 매개하거나 조절할 수 없는, 변이체 CD86 폴리펩타이드
- [0553] 66. 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체에 기재된 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 구체에 1-58 중 어느 하나의 구체에 기재된 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질.
- [0554] 67. 구체에 66에 있어서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 링커를 통해 간접적으로 연결된 면역조절 단백질.
- [0555] 68. 구체에 66 또는 구체에 67에 있어서, 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 각각 멀티머화 도메인에 연결됨으로 해서, 면역조절 단백질은 제1 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머인 면역조절 단백질.
- [0556] 69. 구체에 68에 있어서, 멀티머는 다이머, 선택적으로 호모다이머인 면역조절 단백질.
- [0557] 70. 구체에 66-69 중 어느 하나의 구체에 있어서, 제1 변이체 CD86 폴리펩타이드 및 제2 변이체 CD86 폴리펩타이드는 동일한 것인 면역조절 단백질.
- [0558] 71. IgSF 패밀리 멤버의 면역글로불린 슈퍼패밀리 (IgSF) 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된, 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체에 기재된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0559] 72. 구체에 71에 있어서, IgSF 도메인은 친화성-변형된 IgSF 도메인이고, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인 면역조절 단백질.
- [0560] 73. 구체에 72에 있어서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 결합하는 것에 비해 변경된 결합을 나타내는 친화성 변형된 IgSF 도메인인, 면역조절 단백질.
- [0561] 74. 구체에 73에 있어서, IgSF 도메인은 그의 동족 결합 파트너(들) 중 하나 이상에 대해, IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인이 동일한 하나 이상의 동족 결합 파트너(들)에 대해 결합하는 것에 비해 증가된 결합을 나타내는 친화성 변형된 IgSF 도메인인, 면역조절 단백질.
- [0562] 75. 구체에 71-74 중 어느 하나의 구체에 있어서, 제2 폴리펩타이드의 IgSF 도메인은 종양 상에 발현하는 리간드에 결합하거나 또는 종양 상에 발현하는 리간드에 결합하는 종양-국소화 모이어티 또는 염증 환경과 관련된 세포 또는 조직에 결합하는 염증성-국소화 모이어티인, 면역조절 단백질.
- [0563] 76. 구체에 75에 있어서, 리간드는 B7H6인 면역조절 폴리펩타이드.
- [0564] 77. 구체에 75 또는 구체에 76에 있어서, IgSF 도메인은 Nkp30으로부터 유래하는 것인 면역조절 폴리펩타이드.
- [0565] 78. 구체에 71-77 중 어느 하나의 구체에 있어서 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 제2 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0566] 79. 구체에 71-78 중 어느 하나의 구체에 있어서, IgSF 패밀리 멤버의 IgSF 도메인 또는 그의 친화성-변형된 IgSF 도메인을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 더 포함하되, 상기 친화성-변형된 IgSF 도메인은 IgSF 패밀리 멤버의 비변형 또는 야생형 IgSF 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 것인, 면역조절 단백질.
- [0567] 80. 구체에 79에 있어서:
- [0568] 제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 동일하거나; 또는
- [0569] 제3 폴리펩타이드는 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드와 상이한 것인, 면역조절 단백질.
- [0570] 81. 구체에 79 또는 구체에 80에 있어서, 면역조절 단백질은 변이체 CD86 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드 및/또는 제3 폴리펩타이드 중 적어도 하나에 연결된 멀티머화 도메인을 더 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0571] 82. 구체에 68-70, 78 및 81 중 어느 하나의 구체에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 도메인이고, 선택적으로 상기 면역글로불린 단백질은 인간이거나 및/또는 Fc 영역은 인간인 면역조절 단백질.
- [0572] 83. 구체에 82에 있어서, Fc 도메인은 IgG1, IgG2 또는 IgG4, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인 면역조

절 단백질.

- [0573] 84. 구체에 83에 있어서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 선택적으로 인간 IgG1, 또는 이펙터 기능이 감소된 그의 변이체인 면역조절 단백질.
- [0574] 85. 구체에 82-84 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 229에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는, 면역조절 단백질
- [0575] 86. 구체에 82-85 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 229에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0576] 87. 구체에 84 또는 구체에 85에 있어서, Fc 도메인은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1이고 하나 이상의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, 또는 N297G로부터 선택되되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.
- [0577] 88. 구체에 87, Fc 도메인은 아미노산 치환 N297G, 아미노산 치환 R292C/N297G/V302C, 또는 아미노산 치환 L234A/L235E/G237A를 포함하되, 상기 각 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.
- [0578] 89. 구체에 87 또는 구체에 88에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 더 포함하되, 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인, 면역조절 단백질.
- [0579] 90. 구체에 87-89 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 것인, 면역조절 단백질.
- [0580] 91. 구체에 84, 85 및 87-90 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 230에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내고 인간 IgG1에 비해 SEQ ID NO: 230에 제시된 각 아미노산 변형 중 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0581] 92. 구체에 84, 85 및 87-91 중 어느 하나의 구체에 있어서, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 230에 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함하는, 면역조절 단백질.
- [0582] 93. 세포 표면의 분자에 특이적으로 결합하는 표적화 모이어티에 연결된 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체의 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는, 컨쥬게이트.
- [0583] 94. 구체에 93에 있어서, 세포는 면역 세포이거나 또는 종양 세포인 컨쥬게이트.
- [0584] 95. 구체에 93 또는 구체에 94에 있어서, 모이어티는 단백질, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 나노입자인 컨쥬게이트
- [0585] 96. 구체에 93-95 중 어느 하나의 구체에 있어서, 모이어티는 항체 또는 항원-결합 단편인 컨쥬게이트.
- [0586] 97. 구체에 93-96 중 어느 하나의 구체에 있어서 융합 단백질인 컨쥬게이트.
- [0587] 98. 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체에 66-92 중 어느 하나의 구체의 면역조절 단백질 또는 구체에 93-97 중 어느 하나의 구체의 융합 단백질인 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산 분자(들).
- [0588] 99. 구체에 98에 있어서, 합성 핵산인 핵산 분자.
- [0589] 100. 구체에 98 또는 구체에 99에 있어서, cDNA인 핵산 분자.
- [0590] 101. 구체에 98-100 중 어느 하나의 구체의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.
- [0591] 102. 구체에 101에 있어서, 발현 벡터인 벡터.
- [0592] 103. 구체에 101 또는 구체에 102에 있어서, 벡터는 포유동물 발현 벡터 또는 바이러스 벡터인 벡터.
- [0593] 104. 구체에 101-103 중 어느 하나의 구체의 벡터를 포함하는, 세포.
- [0594] 105. 구체에 104에 있어서, 포유동물 세포인 세포.
- [0595] 106. 구체에 104 또는 구체에 105에 있어서, 인간 세포인 세포.

- [0596] 107. 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 단백질의 제조 방법으로서, 구체예 98-100 중 어느 하나의 구체예의 핵산 분자 또는 구체예 101-103 중 어느 하나의 구체예의 벡터를, 단백질이 세포에서 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법.
- [0597] 108. 구체예 107에 있어서, 세포로부터 단백질 분리하거나 정제하는 것을 더 포함하는 방법.
- [0598] 109. 변이체 CD86 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 조작하는 방법으로서, 상기 방법은 구체예 1-65 중 어느 하나의 구체예의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체예 66-92 중 어느 하나의 구체예의 면역조절 단백질 또는 구체예 93-97 중 어느 하나의 구체예의 융합 단백질인 컨주게이트를 인코딩하는 핵산 분자를, 폴리펩타이드가 세포에서 발현되는 조건 하에 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법.
- [0599] 110. 구체예 1-65 중 어느 하나의 구체예의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체예 66-92 중 어느 하나의 구체예의 면역조절 단백질 또는 구체예 93-97 중 어느 하나의 구체예의 융합 단백질인 컨주게이트, 구체예 98-100 중 어느 하나의 구체예의 핵산 분자 또는 구체예 101-103 중 어느 하나의 구체예의 벡터를 포함하는, 조작된 세포.
- [0600] 111. 구체예 110에 있어서:
- [0601] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 포함하거나 또는 구체예 59-65 중 어느 하나의 구체예의 막관통 면역조절 단백질이고; 및/또는
- [0602] 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 단백질은 세포 표면에서 발현되는 것인, 조작된 세포.
- [0603] 112. 구체예 110에 있어서:
- [0604] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 포함하지 않거나 및/또는 세포 표면에서 발현되지 않고; 및/또는
- [0605] 변이체 CD86 폴리펩타이드는 조작된 세포로부터 분리될 수 있는 것인, 조작된 세포.
- [0606] 113. 구체예 110 또는 구체예 112에 있어서:
- [0607] 단백질은 세포질 시그널링 도메인 또는 막관통 도메인을 포함하지 않거나 및/또는 세포 표면에서 발현되지 않고; 및/또는
- [0608] 단백질은 발현시 조작된 세포로부터 분리될 수 있는 것인, 조작된 세포.
- [0609] 114. 구체예 110-113 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 세포는 면역 세포인, 조작된 세포.
- [0610] 115. 구체예 114에 있어서, 면역 세포는 림프구인, 조작된 세포.
- [0611] 116. 구체예 115에 있어서, 림프구는 T 세포인, 조작된 세포.
- [0612] 117. 구체예 116에 있어서, T 세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포인, 조작된 세포.
- [0613] 118. 구체예 116 또는 구체예 117에 있어서, T 세포는 조절 T 세포 (Treg)인, 조작된 세포.
- [0614] 119. 구체예 110-118 중 어느 하나의 구체예에 있어서 1차 세포인, 조작된 세포.
- [0615] 120. 구체예 110-119 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 세포는 포유동물 세포인, 조작된 세포.
- [0616] 121. 구체예 110-120 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 세포는 인간 세포인, 조작된 세포.
- [0617] 122. 구체예 110-121 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 더 포함하는, 조작된 세포.
- [0618] 123. 구체예 110-121 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 더 포함하는, 조작된 세포.
- [0619] 124. 구체예 1-65 중 어느 하나의 구체예의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체예 66-92 중 어느 하나의 구체예의 면역조절 단백질 또는 구체예 93-97 중 어느 하나의 구체예의 융합 단백질인 컨주게이트, 구체예 98-100 중 어느 하나의 구체예의 핵산 분자 또는 구체예 101-103 중 어느 하나의 구체예의 벡터를 포함하는, 조작된 세포. 감염 물질.
- [0620] 125. 구체예 124에 있어서, 감염 물질은 세균 또는 바이러스인, 감염 물질.
- [0621] 126. 구체예 125에 있어서, 감염 물질은 바이러스이고 바이러스는 종양분해 바이러스인, 감염 물질.
- [0622] 127. 구체예 1-65 중 어느 하나의 구체예의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체예 66-92 중 어느 하나의 구체예의

면역조절 단백질 또는 구체에 93-97 중 어느 하나의 구체의 융합 단백질인 컨쥬게이트, 구체에 110-123 중 어느 하나의 구체의 조작된 세포 또는 구체에 124-126 중 어느 하나의 구체의 감염 물질을 포함하는, 의약 조성물.

- [0623] 128. 구체에 127에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 의약 조성물.
- [0624] 129. 구체에 127 또는 구체에 128에 있어서, 의약 조성물은 멸균된 것인, 의약 조성물.
- [0625] 130. 구체에 127-129 중 어느 하나의 구체의 의약 조성물을 바이알 또는 용기에 포함하는 제조 물품.
- [0626] 131. 구체에 130에 있어서, 바이알 또는 용기는 밀봉된, 제조 물품.
- [0627] 132. 구체에 127-129 중 어느 하나의 구체의 의약 조성물 또는 구체에 131 또는 구체에 132의 제조 물품 및 사용 지침을 포함하는 키트.
- [0628] 133. 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체에 66-92 중 어느 하나의 구체의 면역조절 단백질 또는 구체에 93-97 중 어느 하나의 구체의 융합 단백질인 컨쥬게이트, 구체에 110-123 중 어느 하나의 구체의 조작된 세포, 구체에 124-126 중 어느 하나의 구체의 감염 물질, 또는 구체에 127-129 중 어느 하나의 구체의 의약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0629] 134. 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 구체에 110-123 중 어느 하나의 구체의 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0630] 135. 구체에 134에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가인 방법.
- [0631] 136. 구체에 134에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계인 방법.
- [0632] 137. 구체에 133-136 중 어느 하나의 구체에 있어서, 면역 반응의 조절은 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법.
- [0633] 138. 질병 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 구체에 1-65 중 어느 하나의 구체의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 구체에 66-92 중 어느 하나의 구체의 면역조절 단백질 또는 구체에 93-97 중 어느 하나의 구체의 융합 단백질인 컨쥬게이트, 구체에 110-123 중 어느 하나의 구체의 조작된 세포, 구체에 124-126 중 어느 하나의 구체의 감염 물질, 또는 구체에 127-129 중 어느 하나의 구체의 의약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0634] 139. 질병 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 구체에 110-123 중 어느 하나의 구체의 조작된 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0635] 140. 구체에 139에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가인, 방법.
- [0636] 141. 구체에 139에 있어서, 조작된 세포는 대상체에 대해 동종이계인, 방법.
- [0637] 142. 구체에 133-141 중 어느 하나의 구체에 있어서, 면역 반응은 대상체에서 증가된 방법.
- [0638] 143. 구체에 133, 137, 138 및 142 중 어느 하나의 구체에 있어서, 종양-국소화 모이어티에 연결된 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 면역조절 단백질 또는 컨쥬게이트를 대상체에 투여하는 방법.
- [0639] 144. 구체에 143에 있어서, 종양-국소화 모이어티는 종양 항원을 인식하는 결합 분자이거나 또는 이를 포함하는, 방법.
- [0640] 145. 구체에 144에 있어서, 결합 분자는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 야생형 IgSF 도메인 또는 그의 변이체를 포함하는, 방법.
- [0641] 146. 구체에 133 및 137-145 중 어느 하나의 구체에 있어서, 구체에 71-90 중 어느 하나의 구체의 면역조절 단백질 또는 구체에 93-97 중 어느 하나의 구체의 컨쥬게이트를 포함하는 의약 조성물을 대상체에 투여하는, 방법.
- [0642] 147. 구체에 133-142 중 어느 하나의 구체에 있어서, 막관통 면역조절 단백질인 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포를 대상체에 투여하되, 선택적으로, 상기 조작된 세포는 구체에 110, 111 및 114-123의 조작된 세포인, 방법.

- [0643] 148. 구체예 147에 있어서, 막관통 면역조절 단백질은 구체예 59-65 중 어느 하나의 구체예의 막관통 면역조절 단백질인, 방법.
- [0644] 149. 구체예 137-148 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 질병 또는 병태는 종양 또는 암인, 방법.
- [0645] 150. 구체예 137-149 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 질병 또는 병태는 흑색종, 폐암, 방광암, 혈액암, 간암, 뇌암, 신장암, 유방암, 췌장암, 대장암, 비장암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁암, 위암종, 근골격계암, 두경부암, 위장암, 생식세포암, 또는 내분비 및 신경내분비암으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0646] 151. 구체예 133-141 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 면역 반응이 감소되는 방법.
- [0647] 152. 구체예 133, 137, 138 및 151 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 가용성인 변이체 CD86 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 대상체에 투여하는 방법.
- [0648] 153. 구체예 152에 있어서, 가용성 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 Fc 융합 단백질인 방법.
- [0649] 154. 구체예 133, 137, 138 및 151-153 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 구체예 1-58 중 어느 하나의 구체예의 변이체 CD86 폴리펩타이드, 또는 구체예 66-74 및 78-91 중 어느 하나의 구체예의 면역조절 단백질을 포함하는 의약 조성물을 대상체에 투여하는 방법.
- [0650] 155. 구체예 133, 137, 138 및 151 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 분비가능한 변이체 CD86 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포를 대상체에 투여하되, 선택적으로 여기서 상기 조작된 세포는 구체예 110 및 112-123 중 어느 하나의 구체예의 조작된 세포인 방법.
- [0651] 156. 구체예 133, 137, 138 및 151-155 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 질병 또는 병태는 염증성 또는 자가면역 질병 또는 병태인 방법.
- [0652] 157. 구체예 133, 137, 138 및 151-155 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 질병 또는 병태는 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증성 위장관 질환, 염증성 안 질환, 염증성 신경 질환, 염증성 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질병인 방법.
- [0653] 158. 구체예 156 또는 구체예 157에 있어서, 질병 또는 병태는 염증성 장질환, 이식, 크론씨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스성 관절염 또는 건선으로부터 선택되는 방법.
- [0654] **IX. 실시예**
- [0655] [0467] 다음 실시예들은 설명 목적을 위해 제시된 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다.
- [0656] **실시예 1**
- [0657] **CD86 IgSF 도메인의 돌연변이 DNA 작제물의 제조**
- [0658] [0468] 실시예 1은 효모 디스플레이 라이브러리로서의 효모 표면에서의 번역 및 발현을 위한 인간 CD86 IgSF 도메인의 돌연변이체 DNA 작제물의 생성, 효모 내로 DNA 라이브러리의 도입, 및 CD86의 친화성-변형된 변이체를 발현하는 효모 세포의 선택을 설명한다.
- [0659] [0469] 작제물은 다음과 같이, "CD86 ECD (24-247)"로 명명된 세포의 도메인(ECD; UniProt Accession No. P42081에 제시된 대응하는 잔기 24-247)을 함유하는 SEQ ID NO: 29에 제시된 야생형 인간 CD86 서열에 기초하여 생성되었다:
- [0660] CD86 ECD (24-247) (SEQ ID NO: 29):
- [0661] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSLVFVWQDQENLVNEVYLGKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHHKPTGMIRIHQ MNSLSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTNMTIFCILETDKTRL LSSPFSIELEDPQPPPDHIP
- [0662] [0470] 무작위 DNA 라이브러리를 구성하여 SEQ ID NO: 29에 기재된 CD86의 ECD 변이체를 확인하였다. 야생형 ECD 도메인을 인코딩하는 DNA를, CD86 ECD N-말단이 효모 표면 고정 도메인 Sag1(효모 α -융집소의 C-말단 도메인)에 배치되고 인-프레임 HA 융합 태그 N-말단이 CD86 ECD 서열에, 그리고 c-Myc 융합 태그 C-말단이 CD86 ECD 서열에 배치된 변형된 효모 발현 벡터 PBYS03(Life Technologies USA)의 BamHI과 KpnI 사이에 클로닝하였다. 이 벡터에서의 발현은 유도성 gal-1 프로모터에서 구동된다. 올바른 DNA 서열의 검증 및 효모 표면 상의 야생형 CD86 ECD 단백질의 적절한 디스플레이 후, 야생형 DNA 작제물을 오류가 발생하기 쉬운 PCR의 주형으로 사용하여

CD86 ECD 서열에 걸쳐 무작위 돌연변이를 도입하였다. 오류가 발생하기 쉬운 PCR 후, 돌연변이된 CD86 ECD DNA를 겔 정제한 다음, 대규모 효모 일렉트로포레이션 제조를 위해 pBYDS03에서 BamHI의 상류 서열 및 KpnI의 하류 서열과 상동인 40 bp 중첩 영역을 함유하는 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 겔-정제되고 돌연변이된 CD86 ECD DNA 삽입물을 멸균 탈이온수에 재현탁시켰다.

[0663] [0471] 돌연변이된 CD86 라이브러리 DNA를 2500V에서 BTX ECM399 일렉트로포레이션 시스템을 사용한 일렉트로포레이션에 의해 BamHI 및 KpnI 분해된 pBYDS03 벡터 DNA와 함께 전기천공-적격 BJ5464 효모 세포(ATCC)에 삽입하였다. 라이브러리 크기는 SCD-Leu 한천 플레이트 상에 새로 회수된 세포의 회석물을 플레이트한 다음 플레이트 당 적어도 50 개의 콜로니를 생성한 플레이트로부터의 단일 콜로니 수로부터 라이브러리 크기를 외삽함으로써 결정되었다. 일렉트로포레이션된 배양물의 나머지를 포화될 때까지 SCD-Leu 선택 배지에서 선별 성장시켰다. 이 배양물로부터의 세포들을 동일한 배지 내로 1/100로 1회 더 계대 배양하고, 포화될 때까지 성장시켜 형질전환되지 않은 세포의 분획을 최소화하고 2 이상의 라이브러리 변이체를 함유할 수 있는 세포로부터의 플라스미드를 분리하였다. 라이브러리 다양성을 유지하기 위해, 계산된 라이브러리 크기보다 적어도 10배 더 많은 세포를 함유한 집종물을 이용하여 이 서브클로닝 단계를 수행하였다. 제2 포화 배양체로부터의 세포들을 재현탁하고 -80℃에서 보관하였다(냉동 라이브러리 스톱).

[0664] [0472] 라이브러리로부터의 세포들을 개별 라이브러리 스톱으로부터 해동시켜 밤새 성장시켰다. 다음 날 세포들을 갈락토스를 함유하는 유도 배지(SCDG-Leu 배지)에 재현탁하고 30℃에서 밤새 성장시켜 효모 세포 표면에서 라이브러리 단백질의 발현을 유도하였다. SCDG-Leu 유도 배지 1 리터는 물에 용해된 5.4 그램 Na₂HPO₄, 8.56 그램 NaH₂PO₄·H₂O, 20 그램 갈락토스, 2.0 그램 텍스트로스, 6.7 그램 효모 질소 베이스, 및 류신이 없는 1.6 그램의 효소 합성 드롭 아웃 보충물을 함유하였으며 0.22 μm 막 필터 장치를 통해 멸균하였다.

[0665] [0473] 10X 유도된 라이브러리 세포를 CD28-Fc가 로딩된 단백질 A 자기 비드(New England Biolabs, USA)를 사용하여 1회 분류하여 비결합제를 감소시키고 외인성 재조합 카운터-구조 단백질에 결합하는 능력을 갖는 모든 CD86 ECD 변이체를 풍부화시켰다. 이어서, CD28-Fc(20nM, 1nM 또는 250pM)의 농도를 저감시키면서 단백질 염색 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의한 3회의 양성 CD28 선택을 통해, 개선된 결합제를 나타낸 효모 세포의 분획을 풍부화하였다. 자기 비드 농축 및 유세포 분석에 의한 선택은 기본적으로 문헌에 설명된 바와 같이 수행하였다 [Miller K.D. et al., Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008]. 히트는 위에서 설명한 3차 양성 선택 효모 세포 아웃풋으로부터 선택되었다.

[0666] [0474] 무작위 돌연변이유발의 제2 사이클은 CD28 양성 선택된 세포의 세 번째 라운드로부터의 효모 세포 아웃풋으로부터 수행되었다. 전술한 바와 같이 CD28-Fc의 농도를 저감시키면서 3 라운드의 FAC 양성 선택 후에 추가 히트를 선택하였다. CD28-Fc 양성 선택의 세 번째 라운드로부터의 효모 세포 아웃풋으로부터, CTLA-4의 추가 음성 FACS 선택을, 100nM CTLA-4 Fc로 단백질 염색한 후에 수행하였다.

[0667] [0475] 선택된 FACS 아웃풋으로부터의 삽입물을 개별 클론의 서열 분석을 위해 Fc 융합 벡터로 서브클로닝하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같이 선택 과정에 걸쳐 풍부화된 변이체 아미노산의 빈도에 기초하여 단백질 생산 및 결합 및 기능적 활성 스크리닝을 위해 히트를 선택하였다.

[0668] 실시예 2

[0669] 선택 아웃풋을 Fc-융합체 및 다양한 면역조절 단백질 형식으로 재포맷

[0670] [0476] 실시예 1에서 선택된 예시적인 히트는 Fc 분자에 융합된 친화성 변형된(변이체) CD86을 함유하는 면역조절 단백질로서 재포맷되었다.

[0671] [0477] 선택된 CD86 FACS 소트로부터의 아웃풋 세포 풀을 SCD-Leu 선택 배지에서 최종 밀도로 성장시키고 플라스미드 DNA를 효모 플라스미드 DNA 분리 키트(Zymoresearch, USA)를 사용하여 분리하였다. Fc 융합체의 생성을 위해, Fc 영역을 인코딩 및 인-프레임하는 AfeI 및 BamHI 절단된 Fc 융합 벡터로 양쪽 말단에 40bp 상동성 영역을 함유하는 프라이머로 PCR 증폭하여 시험관내 재조합을 수행하였다. Gibson Assembly Master Mix(New England Biolabs). 제조업체의 지침에 따라 열 충격 변형을 위해 E. coli 균주 NEB5alpha(New England Biolabs, USA)에 Gibson Assembly 반응을 추가하였다.

[0672] [0478] 형질전환 반응물의 회석액을 100μg/mL 카르베니실린(Teknova, USA)을 함유하는 LB-한천에 플레이트하여 선택을 위한 단일 콜로니를 분리하였다. 일반적으로, 각 형질전환에서 최대 96개의 콜로니를 96웰 플레이트에서 100 μg/mL 카르베니실린(Teknova cat # L8112)을 함유하는 LB-배지에서 37 °C에서 밤새 포화 상태로 성장시키고

각 웰의 작은 분취량을 모든 클론에서의 돌연변이(들)을 식별하기 위해, DNA 시퀀싱을 위해 제출하였다.

[0673] [0479] 관심 관심 클론의 서열 분석 및 동정 후, MidiPlus 키트(Qiagen)를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조하였다.

[0674] [0480] 인코딩된 DNA는 하기와 같이 친화성-변형된(변이체) CD86 Fc 융합 단백질을 생성하였다: 변이체 CD86 도메인, 이어서 7개 아미노산의 링커(GSGGGGS), 이어서 면역글로불린 단백질용 Eu Index 넘버링 시스템에 의한 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유하는 SEQ ID NO: 230에 제시된 인간 IgG1 무이펙터 Fc 서열. 작제물은 시스테인과 공유 결합을 형성할 수 있는 항체 경쇄를 포함하지 않기 때문에 인간 IgG1 Fc 역시도 면역글로불린 단백질에 대한 Eu 인덱스 Index 넘버링 시스템에 의해 위치 220에서 시스테인 잔기의 세린 잔기로의 교체(C220S)를 함유하였다(SEQ ID NO: 299에 제시된 야생형 또는 비변형 Fc를 참조로 위치 5(C5S)에 해당함). Fc 영역은 또한 SEQ ID NO: 229에 제시된 야생형 인간 IgG1 불변 영역 유전자에서 정상적으로 인코딩되는 위치 447(야생형 또는 비변형 Fc의 위치 232에 상응)에서 C-말단 라이신을 결여하였다(K447del로 표시됨).

[0675] SEQ ID NO: 230

[0676] EPKSSDKTHTCPPCAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0677] [0481] Expi293 발현 시스템(Invitrogen, USA)을 사용하여 현탁 적응된 인간 배아 신장(HEK) 293 세포로부터 제조한 변이체 Fc 융합 단백질을 생산하였다. 상등액을 수확하고 Fc 단백질을 Mab SelectSure 상에서 포획하였다. (GE Healthcare 카탈로그 번호 17543801) 50mM 아세트이트 pH 3.6을 사용하여 컬럼에서 단백질을 용리시켰다. MabSelect Sure 용리액을 모으고 pH를 pH 5.0을 초과하도록 조정한다. 그런 다음 이 물질을 Preparative SEC 컬럼에서 연마하여 고도로 정제된 모노머 물질을 생성하였다. 이 물질은 10mM 아세트이트, 9% 수크로스 pH 5.0으로 완충액 교체하였다. (A5Su) 단백질 순도를 분석 SEC에 의해 평가한다. 재료를 바이알에 담아 -80 °C에서 보관한다.

[0678] **실시예 3**

[0679] **친화성-성숙된 IgSF 도메인-함유 분자의 세포-발현된 카운트 구조물에 대한 결합 평가**

[0680] [0482] 이 실시예는 동족 결합 파트너에 대한 CD86 도메인 변이체 면역조절 단백질의 특이성 및 친화도를 평가하기 위한, 상기 실시예로부터 정제된 단백질의 Fc-융합 결합 연구를 설명한다.

[0681] [0483] 전술한 CD86 도메인 변이체의 CD28에 대한 결합을 Jurkat 세포를 사용하여 또는 CTLA-4에 대한 결합을 CTLA-4(CHO/CTLA-4)를 안정적으로 발현하도록 형질도입된 차이니스 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포를 사용하여 분석하였다. 유세포 분석에 의한 염색을 위해, 대략 100,000개의 리간드-발현 세포를 다양한 농도의 각 후보 CD86 변이체 Fc 융합 단백질과 함께 인큐베이션하였다. 대조군은 야생형 CD86("Wt CD86-Fc")의 세포외 도메인(ECD) 및 Fc 단독 대조군을 포함하였다. 결합을 평가하기 위해 세포를 항-인간 Fc 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)로 염색하고, 샘플을 LSRII(BD Biosciences, Inc., USA) 유세포 분석기에서 분석하였다.

[0682] [0484] FlowJo Version 10 (FlowJo Version 10, USA)을 이용하여 평균 형광 강도(MFI)를 계산하고 야생형 CD86 ECD-Fc 대조군의 결합과 비교하였다. CD28- 또는 CTLA-4-발현 세포에 대한 11 nM의 예시적인 시험된 변이체 CD86 ECD-Fc 융합 분자의 결합에 대한 결합 연구 결과가 표 E1에 제시되어 있다. 이 표는 또한 상기 기재된 스크리닝에서 선택된 변이체 CD86의 ECD에서의 아미노산 치환도 나타낸다. 표에서, ECD 도메인에서의 예시적인 아미노산 치환 및 삽입은 SEQ ID NO: 29에 제시된 각각의 참조 비변형된 성숙한 CD86 세포외 도메인(ECD) 서열 내의 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치 번호로 지정된다. 아미노산 위치는 중간에 표시되며 해당 비변형(예컨대 야생형) 아미노산은 번호 앞에, 그리고 확인된 변이체 아미노산 치환은 번호 뒤에 표시된다. 컬럼 2는 변이체 ECD-Fc 융합 분자에 함유된 각각의 변이체 ECD 도메인에 대한 SEQ ID NO 식별자를 제시한다.

[0683] [0485] 표 E1에 나타난 바와 같이, 이러한 선택에 의해 CD28에 대한 증가된 결합을 나타내도록 친화도-변형된 다수의 CD86 IgSF(예를 들어, ECD) 도메인 변이체가 식별되었다. 선택된 변이체는 일부 경우에 CTLA4에 대한 변경된(예컨대 감소된) 결합을 나타냈다.

표 E1: CD86 ECD 변이체의 동족 결합 파트너에 대한 결합					
돌연변이	SEQ ID NO (ECD)	Jurkat 세포(11nM)에서 CD28 에 대한 결합		CHO/CTLA4 형질감염주에 대한 결합 (11nM)	
		MFI	WT CD86 ECD 에 대한 폴드 증가	MFI	WT CD86 ECD 에 대한 폴드 증가
Q25L, T71A, H90Y	85	4062	286.1	20435	1.0
Q25L, D53G, E212V	86	166	11.7	23346	1.2
Q25L, H90L	87	3464	243.9	16961	0.8
N43K, I79N, H90L, I178T, E198D	88	11.6	0.8	13204	0.7
A13V, Q25L, H90L, S181P, L197M, S206T	89	2235	157.4	18271	0.9
Q25L, Q86R, H90L, K93T, L132M, V148D, S181P, P216H	90	1639	115.4	21502	1.1
Q25L, F33I, H90Y, V128A, P141A, E158G, S181P	91	1445	101.8	17459	0.9
Q25L, N39D, K80R, Q86R, I88F, H90L, K93T, N123D, N154D	92	1928	135.8	19889	1.0
Q25L, H90L, K93T, M97L, T133A, S181P, D215V	93	373	26.3	17275	0.9
Q25L, Q86R, H90L, N104S	94	3834	270.0	19636	1.0
Q25L, L40M, H90L, L180S, S183P	95	2482	174.8	19802	1.0
Q18K, Q25L, F33I, L40S, H90L	96	3781	266.3	18971	0.9
Q25L, Q86K, H90L, I137T, S181P	97	387	27.3	19575	1.0
Q25L, L77P, H90Y, K153R, V170D, S181P	98	15.7	1.1	18797	0.9
Q25L, S28G, F33I, F52L, H90L	99	749	52.7	21177	1.0

[0684]

Q102H, I178T					
Q25L, F33I, H90L, K144E, L180S	100	1636	115.2	23546	1.2
Q25L, F33I, H90L, K153E, E172G, T192N	101	13.2	0.9	8657	0.4
Q25L, F33I, Q86R, H90Y, D175E, I196V, E198D	102	528	37.2	22641	1.1
Q25L, V45I, D68N, H90L, S183P, L205S	103	466	32.8	17446	0.9
E38V, S114G, P143H	104	단백질 없음			
H90Y, L180S	105	11.4	0.8	6078	0.3
H90Y, Y129N	106	154	10.8	17640	0.9
I89V, H90L, I193V	107	1248	87.9	22070	1.1
K80E, H90Y, H222T, I223F, P224L	108	단백질 없음			
K80M, I88T	109	1966	138.5	18532	0.9
K92I, F113S	110	369	26.0	20421	1.0
M60K, H90L	111	1049	73.9	17319	0.9
Q25L, F33I, H90L	112	115	8.1	20888	1.0
Q25L, F33I, Q86R, H90L, K93T	113	1316	92.7	14705	0.7
Q25L, H90L	114	1810	127.5	21873	1.1
Q25L, H90L, P185S	115	135	9.5	18546	0.9
Q25L, H90L, P185S, P224L	116	11.9	0.8	9355	0.5
Q25L, H90L, S179R	117	2397	168.8	23282	1.1
Q25L, H90Y, S181P, I193V	118	256	18.0	16648	0.8
Q25L, K82T, H90L, T152S, S207P	119	1027	72.3	18161	0.9
Q25L, Q86R, H90L, K93T	120	1500	105.6	19777	1.0
S28G, H90Y	121	단백질 없음			
CD86 WT ECD-Fc	29	14.2	1.0	20294	1.0
Fc 단독 대조군	230	11.4	0.8	32.9	0.0

실시예 4

CD86 IgV-Fc 면역조절 단백질의 생성 및 결합 활성

[0486] 실시예 1-3에서 확인 및 생성된 예시적인 CD86 ECD 변이체를 분자의 유일한 IgSF 도메인으로서는 IgV 도메인을 함유하는 면역조절 단백질로 전환시켰다. 생성된 변이체 IgV 작제물은 다음과 같이 "CD86 IgV (24-134)"로서 명명된, IgV 도메인(UniProt Accession No. P42081에 제시된 잔기 24-134에 대응)을 함유하는 SEQ ID NO: 123에 제시된 야생형 인간 CD86 서열에 기초한다:

CD86 IgV (24-134) (SEQ ID NO: 123):

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKPTGMIRIHQMNSELSVLA

[0487] 변이체 CD86 IgV 분자를 실시예 2에 기재된 바와 같이 Fc 융합 단백질로서 포맷하고, 실시예 3에 기재된 바와 같이 CD28 또는 CTLA-4에 대한 결합에 대해 시험하였다. 예시적인 시험된 변이체 CD86 IgV-Fc 융합 분자 25 nM의 CD28- 또는 CTLA-4-발현 세포에 대한 결합 연구 결과를 표 E2에 나타내었다. 표에서, ECD 도메인에서의 예시적인 아미노산 치환 및 삽입은 SEQ ID NO: 29에 제시된 각각의 참조 비변형된 성숙한 CD86 세포외 도메인(ECD) 서열 내의 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치 번호로 지정된다. 아미노산 위치는 중간에 표시되며 해당 비변형(예컨대 야생형) 아미노산은 번호 앞에, 그리고 확인된 변이체 아미노산 치환은 번호 뒤에 표시된다. 컬럼 2는 변이체 IgV-Fc 융합체 분자에 함유된 각각의 변이체 IgV 도메인에 대한 SEQ ID NO 식별자를 제시한다.

표 E2: CD86 IgV 변이체의 동족 결합 파트너에 대한 결합					
돌연변이 s	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat 세포 (25nM)에서 CD28에 대한 결합		CHO/CTLA4 형질감염주에 대한 결합 (25nM)	
		MFI	WT CD86 ECD에 대한 폴드 증가	MFI	WT CD86 ECD에 대한 폴드 증가
A13V, Q25L, H90L	124	1370	111.4	3980	1.0
Q25L, H90L, K93T, M97L	125	1425	115.9	4239	1.1
Q25L, Q86R, H90L	126	1569	127.6	4940	1.3
I89V, H90L	127	213	17.3	1660	0.4
M60K, H90L	128	20	1.6	134	0.0
Q25L, F33I, H90L	129	1383	112.4	5901	1.5
Q25L, H90L	130	1194	97.1	3587	0.9
WT CD86 IgV-Fc	123	12.3	1.0	87	0.0
WT CD86 ECD-Fc	29	12.3	1.0	3951	1.0
Fc 대조군	230	10.5	0.9	35.9	0.0

실시예 5

Jurkat/IL2 리포터 분석을 사용한 친화성-성숙된 CD86 IgSF 도메인-함유 분자의 생물활성 평가

[0488] 이 실시예는 CD28 공동자극을 위한 CD86 도메인 변이체 면역조절 단백질의 생물활성을 평가하기 위한 Jurkat/IL2 리포터 분석에 관한 것이다.

[0489] 분석 전날, 분석 플레이트를 준비하였다. 분석 플레이트를 준비하기 위해 PBS에서 10nM 항-CD3 항체(클론 OKT3; BioLegend, 카탈로그 번호 317315)를 적정치(titration)의 CD86-Fc 변이체(농도 범위 200nM에서 12pM) 또는 대조군 단백질(WT CD86-Fc 및 Fc 대조군)과 조합시켰다. 100 μ L/웰의 OKT3 + CD86-Fc를 흰색의 평평한 바닥 96웰 플레이트(Costar)에 분주하였다. 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하여 항체 및 CD86-Fc 변이체 단백질이 플레이트 표면에 부착되도록 하였다. 다음날, 분석 플레이트의 웰을 분석 전에 150 μ L PBS로 2회 세척하였다.

[0490] 분석 당일, IL-2-루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포를 계수하고 분석 완충액에 1×10^6 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 그런 다음 100 μ L/웰의 Jurkat 세포 현탁액을 분석 플레이트에 첨가하였다.

[0491] 분석 플레이트를 짧게 회전시키고(1200 RPM에서 10초), 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 5시간 인큐베이션 후, 플레이트를 제거하고 15분 동안 실온으로 평형화시켰다. 100 μ L의 Bio-Glo(Promega)를 분석 플레이트에 첨가하고 오비탈 진탕기에 10분 동안 두었다. BioTek Cytation 3 발광계를 사용하여 웰 통합 시간당 1초로 발광도를 측정하였다.

[0492] 각각의 변이체 CD86 ECD-Fc 및 변이체 CD86 IgV-Fc에 대해 평균 상대 발광 값을 구하고 야생형 CD86 ECD-Fc 단백질과 비교하여 각 변이체에 대해 IL-2 리포터 시그널의 배수 증가를 계산하였다. 50 nM 농도에 대한 결과를 아래 표 E3(CD86 ECD-Fc) 또는 표 E4(CD86 IgV-Fc)에 나타내었다. 나타난 바와 같이, 예시적인 변이체 CD86 ECD-Fc 또는 변이체 CD86 IgV-Fc 분자를 IL-2-루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포와 공동-배양하자, WT CD86 ECD-Fc 또는 Fc-단독 음성 대조군에 비해, 증가된 CD28 공동자극(즉, 작용성 agonism)이 결과되었다.

표 E3: 루시페라제 활성 (CD86 ECD 변이체)			
돌연변이	SEQ ID NO (ECD)	Jurkat/IL2 루시페라제 분석 (10 nM OKT3 + 50 nM CD86 ECD-Fc)	
		상대 발광 단위 (RLU)	WT CD86 ECD에 대한 폴드 증가
A13V, Q25L, H90L, S181P, L197M, S206T	89	1125	8.5
Q25L, H90L, K93T, M97L, T133A, S181P, D215V	93	997	7.6
Q25L, Q86R, H90L, N104S	94	717	5.4
I89V, H90L, I193V	107	218	1.7
M60K, H90L	111	202	1.5
Q25L, F33I, H90L	112	428	3.2
Q25L, H90L, P185S	113	416	3.2
WT CD86 ECD-Fc	29	132	1.0
Fc 대조군	230	112	0.8

표 E4: 루시페라제 활성 (CD86 IgV 변이체)			
돌연변이	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/IL2 루시페라제 분석 (10 nM OKT3 + 50 nM CD86 IgV-Fc)	
		상대 발광 강도 (RLU)	WT CD86 ECD에 대한 폴드 증가
A13V, Q25L, H90L	124	719	5.4
Q25L, H90L, K93T, M97L	125	406	3.1
Q25L, Q86R, H90L	126	800	6.1
I89V, H90L	127	562	4.3
M60K, H90L	128	818	6.2
Q25L, F33I, H90L	129	1137	8.6
Q25L, H90L	130	691	5.2
WT CD86 ECD-Fc	29	132	1.0
Fc 대조군	230	112	0.8

실시예 6

막관통 면역조절 단백질 및 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 세포의 생성 및 평가

[0493] 이 실시예는 인간 T 세포에서 예시적인 제조합 HPV16 E6-특이적 T 세포 수용체(TCR) 또는 항-HER2 CAR을 갖는 변이체 CD86 IgSF 도메인-함유 막관통 면역조절 단백질(TIP)의 발현을 설명한다. CD86-TIP는 친화성-변형된 ECD 도메인을 갖고 또한 SEQ ID NO: 2의 잔기 248-268 및 269-329에 각각 상응하는 야생형 CD86 막관통 도메인 및 세포질 도메인도 포함하였다. 예시적인 TIP에는 Q25L/Q86R/H90L/N104S (SEQ ID NO:94), I89V/H90L/I193V (SEQ ID NO:107) 또는 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V (SEQ ID NO:93)에 해당하는 아미노산 돌연변이를 포함하는 CD86 TIP가 포함되었으며, 여기서 돌연변이의 넘버링은 SEQ ID NO: 29에 제시된 CD86 세포의 도메인의 위치를 기준으로 한다.

[0494] TIP를 인코딩하는 핵산 분자를, T 세포를 형질도입하는 데 사용된 렌티바이러스 벡터에 개별적으로 클로닝하였다. 간단히 말해서, 핵산 서열을 함유하는 렌티바이러스 입자를, HEK293 세포를 벡터 및 렌티바이러스 패키징 구성물로 공동-형질감염시킨 후에 생산하였다. 렌티바이러스 입자를 배양 배지로 수집하였다. EasySep™ Human T Cell Isolation Kit를 사용하여 정상 혈액 기증자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 인간 Pan T 세포를 분리하였다. pan T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 자기 비드 및 IL-2와 함께 6시간 동안 배양한 다음, MHC 클래스 I 제시된 HPV16 E6 펩타이드를 인식하는 예시적인 TCR(E6 TCR) 또는 항-HER2 CAR의 발현을 위해 TIP 렌티바이러스 및 렌티바이러스로 공동-형질도입하였다. 공동-형질도입을 위해, 렌티바이러스를 폴리브렌의 존재하에

1:1 비로 형질도입시켰다. 형질도입은 30 °C에서 30분 동안 1000xG에서 스핀팩션을 사용하여 수행하였다.

[0706] [0495] 렌티바이러스를 제거하고 다음날 새로운 IL-2 함유 배지로 교체하였다. 배양 배지를 2일마다 신선한 IL-2로 교체하고 형질도입된 T 세포를 10일 동안 확장시켰다. 배양 10일 후, 조작된 세포는 하기에 기술된 바와 같이 활성을 위해 접근되었다. 대조군으로서, 활성을 WT CD86 TIP(SEQ ID NO:2), CAR 또는 TCR만으로 형질도입된 대조군 T 세포 또는 모의(mock) 형질도입된 T 세포와 비교하였다.

[0707] A. CD86 TIPs/TCR 조작된 T 세포

[0708] [0496] 배양 10일 후, CD86 TIP 및 E6 TCR로 공동-형질도입되거나, 또는 대조군 TCR 단독, TIP 단독 또는 모의(mock) 형질도입된 T 세포를 표적 배양 배지에서 사이토카인의 양을 측정하는 MAGPIX® Luminex를 이용하여 표적 항원-발현 세포와 공동-배양 시킨 후, 사이토카인 생산에 대해 분석하였다. HLA-A2+ HPV+ 표적 세포주(SCC152)를 웰당 40,000개 세포에서 시작하여 4점 적정을 위해 1:2 희석으로 적정한 96웰 플레이트에 접종하였다. 표적 세포를 6시간 동안 배양하여 단일 세포층을 형성하였다. 형질도입 또는 대조군 T 세포를 웰당 40,000개의 세포로 웰에 첨가하고 추가로 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 수집하고 MAGPIX®로 분석하였다. 결과를 pg/mL 단위의 사이토카인 생산의 미가공(raw) 값으로 표시 및 기록하였다. 도 1A는 변이체 CD86 TIPs를 공동-발현하는 조작된 세포로부터 인터페론-감마, IL-2 및 TNF α의 방출을 나타내며, 표적 세포 수에 대한 pg/mL로 플롯팅하였다. 오차 막대는 3중 웰의 표준 편차를 나타낸다. CD86 TIP를 공동-발현하는 E6 TCR-발현 세포에서 증가된 사이토카인 생산이 관찰되었다. WT CD86 TIP와 비교하여 예시적인 변이체 CD86 TIP로 공동-형질도입된 세포에서 더 큰 사이토카인 생산이 관찰되었다. 표 E5는 TCR을 단독으로 발현하거나 표시된 바와 같은 야생형 또는 변이체 CD86 TIP와 조합하여 발현하는 조작된 세포의 24시간 인큐베이션 후 상등액에서 검출된 IFNγ의 예시적인 미가공 값을 나타낸다.

표 E5: IFNγ 사이토카인 생산 (pg/mL)						
돌연변이	SEQ ID NO (CD86 ECD)	표적 세포 #				
		0	5000	10000	20000	40000
TCR 단독		1.2	1.8	2.0	3.5	24.5
WT CD86 및 TCR	29	1.2	1.4	2.9	7.5	44.7
A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M, S206T (CD86 ECD) 및 TCR	89	1.2	2.3	3.1	11.1	56.2
Q25L/90L/93T/97L/133A/S181P/ 215V (CD86 ECD) 및 TCR	93	1.2	1.6	2.9	17.3	93.0
Q25L/Q86R/H90L/N104S (CD86 ECD) 및 TCR	94	1.2	2.6	5.7	49.5	162.2
I89V/H90L/I193V (CD86 ECD) 및 TCR	107	1.3	2.0	2.7	10.6	82.2
M60K/H90L (CD86 ECD) 및 TCR	111	1.4	2.1	3.8	7.9	31.3
Q25L/F33I/H90L (CD86 ECD) 및 TCR	112	1.2	1.5	2.4	10.4	36.3
Q25L/H90L/P185S (CD86 ECD) 및 TCR	115	1.1	1.7	3.4	11.5	74.6
Q25L/H90L/S179R (CD86 ECD) 및 TCR	117	1.3	1.4	2.0	10.2	102.4

[0709] [0497] 형질도입된 세포를 또한 CTV(Cell Trace Violet) 표지하고 적정된 양의 SCC152 표적 세포와 함께 인큐베이션하였으며 TCR+CD4+(도 1B) 또는 TCR+CD8+(도 1C) T 세포에서 3일 후에 증식에 대해 평가하였다. % 분열이 3중 웰의 +/- 표준 편차로 표시된다. 도 1B-1C에 나타낸 바와 같이, 변이체 CD86 TIPs를 공동-발현한 조작된 세

포는 대조군 또는 야생형 CD86 TIP를 발현하는 세포와 비교하여 표적 SCC-152 세포주에 대한 반응으로 증가된 증식을 나타냈다.

[0711] [0498] 조작된 T 세포의 세포독성 활성을 평가하기 위해, HLA-A2+ HPV+ 종양 표적 세포주 SCC-152를 반딧불이 루시페라제의 발현을 구동하는, 구성적으로 활성인 발현 벡터를 인코딩하는 바이러스로 안정적으로 형질도입하였다. 형질도입된 T 세포 또는 대조군 T 세포를 다양한 수로 접종하여 이펙터 대 표적 비(E:T 비)의 범위를 제공하였다. T 세포를 표적 세포와 함께 37 °C에서 4일 동안 인큐베이션하고 루시페라제 활성을 측정하였다. 퍼센트 살해를 다음 공식: % 살해 = (1-(T 세포 + 표적 내 루시페라제 시그널/표적 세포 단독으로부터의 루시페라제 시그널))*100에 의해 계산하고, E:T 비에 대해 플롯팅하였다. 도 1D에 도시된 바와 같이, CD86 TIP를 공동-발현하는 조작된 세포에서 살해가 관찰되었으며, TCR만 발현하는 T 세포에서는 살해가 거의 검출되지 않았다. WT CD86 TIP의 공동-발현과 비교하여, 변이체 CD86 TIP의 공동-발현은 E6 TCR-발현 T 세포에 의한 살해 활성을 실질적으로 향상시켰다. 3중 웰의 +/- 표준 편차로 데이터를 나타냈다.

[0712] B. CD86 TIP/CAR 조작된 T 세포

[0713] [0499] 세포독성 활성을 평가하기 위해, 조작된 세포를 높은 수준(NCI-N87) 또는 낮은 수준(SCC-152)의 HER2 항원을 발현하는 표적 세포와 함께 인큐베이션하였다(도 2A). 상기 설명과 유사하게, 반딧불이 루시페라제의 발현을 구동하는 구성적 활성 발현 벡터를 인코딩하는 바이러스로 표적 세포를 안정적으로 형질도입하고, 세포독성 활성을 평가하였다. 항-HER2 CAR 형질도입된 T 세포를 다양한 수로 접종하여 이펙터 대 표적 비(E:T 비)의 범위를 제공하였다. T 세포를 표적 세포 NCI-N87 또는 SCC-152와 함께 37°C에서 배양하고 24시간 후 루시페라제 활성을 측정하여 살해 활성을 평가하였다. 퍼센트 살해를 다음 공식: % 살해 = (1-(T 세포 + 표적의 루시페라제 시그널/ 표적 세포 단독의 루시페라제 시그널))*100에 따라 구하고, E:T 비에 대해 플롯팅하였다.

[0714] [0500] 도 도 2B 및 2C에 도시된 바와 같이, 변이체 CD86 TIP의 발현은 고향원(도 2B) 또는 저항원(도 2C)을 발현하는 표적 세포의 항-HER2 CAR-T 세포 살해를 증가시켰다. 3중 웰의 +/- 표준 편차로 데이터를 나타냈다.

[0715] 실시예 7

[0716] 상이한 친화성-변형된 도메인을 포함하는 CD86 적층 분자의 생성 및 평가

[0717] [0501] CD28에 대한 증가된 결합을 위해 친화성-변형된 실시예 1-4에 기재된 선택된 변이체 CD86 분자를 이용하여 종양 국소화 도메인("L"로 표시됨)으로서 변이체 Nkp30 IgV 도메인을 갖는 "적층" Fc 융합 분자를 생성하였다. B7-H6에 대한 증가된 결합 친화성을 위해 Nkp30 변이체를 코딩하는 돌연변이된 DNA를 함유하는 효모 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 예시적인 변이체 Nkp30를 동정하였다. 재조합 B7H6.Fc(rB7H6.Fc)로 염색하여 FACS 스크리닝을 2회 실시한 후, 16.6nM rB7H6.Fc로 염색했을 때 MFI 값이 533인 결과를 얻은 반면, 모 Nkp30 균주 MFI는 동일한 농도의 rB7H6.Fc로 염색했을 때 90으로 측정되었다(6배 개선). 동정된 Nkp30 변이체 중에는 SEQ ID NO: 54에 제시된 위치에 상응하는 Nkp30 세포외 도메인의 위치를 참조로, 돌연변이 L30V/A60V/S64P/S86G(SEQ ID NO: 231)를 함유하는 변이체가 있었다. 생성된 CD86-Nkp30 적층 작제물을 결합 및 활성에 대해 평가하였다.

[0718] A. CD86-Nkp30 적층 작제물의 생성

[0719] [0502] Gibson 어셈블리 키트(New England Biolabs, USA)를 이용하는 표준 Gibson 어셈블리에 의해 Fc에 대한 융합이 가능한 포맷으로 적층체를 인코딩한 유전자블록Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 또는 PCR 산물을 조합시킴으로써 적층 작제물을 만들었다. 적층체는 인간 IgG1 무이펙터(effectorless) Fc 서열(예를 들어, SEQ ID NO: 230에 제시됨)과의 융합에 의해 2개의 동일한 폴리펩타이드를 함유하는 호모다imer 포맷으로 생성되었다. 모든 적층체의 인코딩 핵산 분자는 다음과 같이 설계된 단백질을 암호화하도록 생성되었다: 제1 변이체 CD86 ECD 또는 IgV, 이어서 3개의 GGGGS(G4S) 모티프로 구성된 15개 아미노산 링커(SEQ ID NO: 224), 변이체 Nkp30 IgV 도메인, 이어서 GSGGGGS 링커(SEQ ID NO: 222), 이어서 상기 기재된 바와 같은 SEQ ID NO: 230에 제시된 인간 IgG1 무이펙터 Fc 서열.

[0720] [0503] Fc 융합 단백질을 인코딩하는 발현 작제물을 Expi293 HEK293 세포(예를 들어, Invitrogen) 내로 형질감염시켰다. 상등액을 수확하고 AKTA 단백질 정제 시스템을 사용하여 단백질 A 컬럼에서 단백질을 포획하고 용리하였다.

표 E5: CD86-NKp30 적층체		
적층 작제물의 SEQ ID NO	적층 작제물의 IgSF 성분	
	CD86	NKp30
135	CD86 ECD: Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V (SEQ ID NO: 93 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 231
136	CD86 ECD Q25L/Q86R/H90L/N104S (SEQ ID NO: 94 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 231
137	CD86 ECD M60K/H90L (SEQ ID NO: 111 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 231
138	CD86 ECD I89V/H90L/I193V (SEQ ID NO: 107 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 231
139	CD86 ECD Q25L/H90L/S179R (SEQ ID NO: 117 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 231
140	CD86 IgV Q25L, Q86R, H90L, N104S (SEQ ID NO: 150 에 제시된 IgV)	SEQ ID NO: 231

B. 결합

[0504] CD28을 발현하는 Jurkat/IL-2 세포 및 CTLA-4를 발현하도록 형질도입된 CHO 세포를 사용하여 적층 작제물의 변이체 CD86 도메인의 동족 결합 파트너 CD28 및 CTLA-4에 대한 결합을 시험하였다. 세포를 표 E5에 제시된 예시적 작제물의 다양한 농도(100,000pM 내지 98pM, 6점, 1:4 희석 시리즈)와 함께 인큐베이션하였다. 비교를 위해, 실시예 2 및 표 E1에 기재된 바와 같은 다수의 예시적인 변이체 CD86-Fc 작제물 및 무이펙터 Fc 단독(SEQ ID NO: 230)의 결합 역시도 시험하였다. 결합은 항-Fc 항체-PE를 사용하여 유세포 분석에 의해 평가되었고 평균 형광 강도(MFI)가 결정되었다.

[0505] 도 10에 도시된 바와 같이, 예시적인 NKp30-CD86 적층 작제물은 예시적인 변이체 CD86-Fc 구축물 및 Fc 단독과 비교하여 CD28 및 CTLA-4에 대한 결합을 유지한다. 적층 작제물은 일반적으로 상응하는 변이체 CD86 vIgD-Fc 작제물보다 덜 잘 결합되지만, 모든 적층 작제물에 대해 CD28 및 CTLA-4에 대한 결합이, 특히 SEQ ID NO: 135에 제시된 적층 작제물에 대해 특히 높은 결합으로 관찰되었다.

C. T 세포 공동자극

[0506] 예시적인 변이체 NKp30-CD86 적층 작제물을 공동고정 분석에서 1차 T 세포를 공동자극하는 능력에 대해 평가하였다. 평평한 바닥 96웰 플레이트를 PBS에 희석된 5nM 항-인간 CD3(OKT3) 및 40nM B7H6으로 코팅하고 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 플레이트를 멸균 PBS로 3회 행구고 1×10^5 CFSE-표지된 인간 Pan T 세포를 각 웰에 첨가하였다. T 세포를 100 nM, 8.333 nM, 또는 0.694 nM의 예시적인 NKp30-CD86 적층 작제물과 함께 72시간 동안 인큐베이션하였다(표 E5 참조). 비교를 위해, SEQ ID NO: 93에 의해 제시된 예시적인 변이체 CD86(실시예 4에 기재된 바와 같이 Fc 융합체로서 생성됨), SEQ ID NO: 231에 의해 제시된 예시적인 변이체 NKp30(실시예 4에 기재된 바와 같은 Fc 융합체로서 생성됨) 및 무이펙터 Fc 단독(SEQ ID NO: 230)도 시험하였다. 실험은 삼중으로 수행되었다.

[0507] 1차 T 세포에 대한 적층 작제물의 결합을 항-Fc 항체-PE로 염색한 후 유세포 분석에 의해 결정하고 평균 형광 강도(MFI)를 구하였다. T 세포 증식을 CFSE 염료 희석액의 유세포 분석 측정에 의해 평가하고 증식 퍼센트를 구하였다. 도 11A는 1차 인간 CD4+ T 세포에 대한 예시적인 적층 작제물의 결합을 나타낸다. 도 11B에 도시된 바와 같이, 예시적인 변이체 CD86-Fc, 예시적인 변이체 NKp30-Fc, 및 Fc 단독에 비해, 각 농도에서 예시적인 적층 작제물과의 인큐베이션은 T 세포 증식을 유도하였다. CD8+ T 세포에 대해서도 유사한 결합 및 증식 결과가 관찰되었다.

[0508] T 세포 사이토카인 생산을 평가하기 위해, 24시간의 인큐베이션 후에 상등액을 수확하고 IL-2 농도를 ELISA에 의해 결정하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 예시적인 적층 작제물과의 인큐베이션은 예시적인 변이체 CD86-Fc 및 Fc 단독과 비교하여 IL-2 생산을 증가시켰다.

[0509] 이와 함께 상기 결과는 적층 작제물이 1차 T 세포에 결합할 수 있고 공동자극을 제공할 수 있음을 입증한다. 적층 작제물 활성이 NKp30의 동족 결합 파트너인 B7H6의 존재에 의존하는지 여부를 평가하기 위해 별도의 공동고정화 실험을 위에서 설명한 대로 수행하였으며, 단, 플레이트는 항-CD3(OKT3)으로만 코팅시켰다. 도 13은 B7H6의 부재 하에 예시적인 적층 작제물(100nM)과 함께 인큐베이션된 1차 T 세포가, B7H6의 존재 하에 인큐베이

선된 경우에 비해 감소된 CD4+ T 세포 증식 활성을 초래하였음을 보여준다. CD8+ T 세포에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다. 이러한 데이터는 CD86-NKp30 적층 작제물의 공동자극 활성이 B7H6 의존적임을 나타낸다.

[0730] 실시예 8

[0731] 변이체 PD-1 분자 및 변이체 CD86 분자를 포함하는 적층 분자의 생성

[0510] 친화성-변형된 실시예 1-5에 기술된 예시적인 변이체 CD86 분자를 사용하여, PD-L1에 대해 증가된 결합으로 친화성-변형된 예시적인 변이체 PD-1 IgSF 도메인을 갖는 "적층" Fc 융합 분자를 생성하였다(예를 들어, SEQ ID NO:315에 제시됨). 표 E18에 설명된 바와 같이 CD28에 대해 증가된 결합을 위해 친화성-변형된 IgV 도메인 또는 CD86 ECD 도메인 또는 야생형 CD86 세포의 도메인(ECD; SEQ ID NO: 29), 야생형 CD86 IgV 도메인(SEQ ID NO: 123)을 포함하였다.

[0733] Gibson 어셈블리 키트(New England Biolabs, USA)를 이용하는 표준 Gibson 어셈블리에 의해 Fc에 대한 융합이 가능한 포맷으로 적층체를 인코딩한 CD86 및 PD-1 서열의 중첩 PCR을 통해 적층 작제물을 얻었다. 모든 적층체의 인코딩 핵산 분자는 다음과 같이 설계된 단백질을 인코딩하도록 생성되었다: 제1 야생형 또는 변이체 CD86 ECD 또는 IgV 도메인, 이어서 3개의 GGGGS(G4S) 모티프로 구성된 15개 아미노산 링커(SEQ ID NO: 224), 변이체 PD-1 도메인, 이어서 GSGGGGS 링커(SEQ ID NO: 222), 이어서 앞서 기술된 바와 같이 SEQ ID NO: 230에 제시된 인간 IgG1 이펙터리스 Fc 서열.

[0734] 표 E6은 예시적인 생성된 CD86-PD-1 적층체를 제시한다.

표 E6: CD86-PD-1 적층체		
적층 작제물의 SEQ ID NO	적층 작제물의 IgSF 성분	
	CD86	PD-1
316	WT CD86 ECD (ECD set forth in SEQ ID NO: 29 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 315
317	CD86 ECD: A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T (SEQ ID NO: 89 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 315
318	CD86 ECD: Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V (SEQ ID NO: 93 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 315
319	CD86 ECD: Q25L/Q86R/H90L/N104S (SEQ ID NO: 94 에 제시된 ECD)	SEQ ID NO: 315
320	CD86 IgV 도메인 (SEQ ID NO: 123 에 제시된 IgV)	SEQ ID NO: 315
321	CD86 IgV: A13V/Q25L/H90L/S181P/L197M/S206T (SEQ ID NO: 145 에 제시된 IgV)	SEQ ID NO: 315
322	CD86 IgV: Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V (SEQ ID NO: 149 에 제시된 IgV)	SEQ ID NO: 315
323	CD86 IgV: Q25L/Q86R/H90L/N104S (SEQ ID NO: 150 에 제시된 IgV)	SEQ ID NO: 315

[0735] 실시예 9

[0736] 변이체 PD-1 분자 및 변이체 CD86 분자를 포함하는 적층된 분자의 결합 및 활성 평가

[0512] 야생형 CD86 세포의 도메인 (ECD; 예컨대 SEQ ID NO: 29), 야생형 CD86 IgV 도메인 (예컨대 SEQ ID NO: 123), 또는 변이체 CD86 IgSF 도메인 (ECD, 예컨대 SEQ ID NO: 89 또는 93 또는 94; 또는 IgV, 예컨대 SEQ ID NO: 145, 149 또는 150)을 갖는 변이체 PD-1 IgSF 도메인 (예컨대 SEQ ID NO:315)을 함유하는, 예시적인 적층 작제물들을 실시예 8에 실질적으로 설명된 바와 같이 만들고, 결합 및 활성에 대해 평가하였다.

[0739] A. 결합

[0513] 동족 결합 파트너에 대한 결합을 평가하기 위해, huCTLA, huCD28 및 huPD-L1 전장 포유동물 단백질을 발

현하도록 세포를 형질도입하였다. 세포를 표 E6에 제시된 다양한농도(0.1nM 내지 100nM)의 예시적 작제물과 함께 인큐베이션하였다. 비교를 위해 야생형 CD80-Fc의 결합도 테스트하였다. PD-L1에 대한 결합은 항-PD-1 항체(임핀지 및 아테졸리주맙)와도 비교하였다. Fc 단독 분자 역시도 대조군으로서 시험하였다. 유세포 분석에 의해 결합을 평가하고 평균 형광 강도(MFI)를 구하였다.

[0741] [0514] 도 4A-6B에 도시된 바와 같이, 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물은 개별 야생형 또는 변이체 IgSF 도메인만을 함유하는 분자와 비교하여, CTLA-4, CD28 및 PD-L1에 대한 결합을 유지한다. 돌연변이 Q25L/H90L/K93T/M97L/T133A/S181P/D215V를 IgV (SEQ ID NO:149, 예컨대 SEQ ID NO:322에 제시된 적층체) 또는 ECD (SEQ ID NO:93, 예컨대 SEQ ID NO:318에 제시된 적층체)에 함유하는 적층 작제물들은, 개별적인 야생형 또는 변이체 IgSF 도메인만을 함유하는 분자에 비해, CTLA-4 (도 4A), CD28 (도 5A) 및 PD-L1 (도 6A)에 대한 결합력을 유지한다. 돌연변이 Q25L/Q86R/H90L/N104S를 IgV (SEQ ID NO:150, 예컨대 SEQ ID NO:323에 제시된 적층체) 또는 ECD (SEQ ID NO:94, 예컨대 SEQ ID NO:319에 제시된 적층체)에 함유하는 적층 작제물들은 CTLA-4(도 4B), CD28 (도 5B) 및 PD-L1 (도 6B)에 대한 결합을 유지한다.

[0742] B. PD-L1-의존성 CD28 공동자극

[0743] [0515] 예시적인 변이체 적층 작제물을 PD-1을 발현하는 Jurkat/IL-2 리포터 세포를 사용하여 CD28의 PD-L1 의존성 공동자극을 전달하는 능력에 대해 평가하였다. K562/OKT3/PD-L1 또는 K562/OKT3 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 20,000개 세포/웰로 플레이팅하고 0.01 nM 내지 100 nM의 다양한 양의 예시적인 변이체 적층 작제물과 사전 인큐베이션하였다. Fc 단독 분자도 대조군으로 시험하였다. IL-2-루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포를 웰당 총 100,000개의 세포로 첨가하여, 각 웰이 K562:Jurkat 세포의 최종 비 1:5를 갖도록 하였다. Jurkat 세포, K562 세포 및 예시적인 적층 작제물을 섞서 37도에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 100 μ L의 세포 용해물 및 루시페라제 기질 용액(BioGlo luciferase 시약, Promega)을 각 웰에 첨가하고 발광도를 측정하였다.

[0744] [0516] 도 7A에 도시된 바와 같이, PD-L1의 부재 하에 예시적인 변이체 적층 작제물의 첨가는 공동-자극 시그널을 전혀 또는 거의 나타내지 않았는데, 이는 적층 단백질을 함유하는 PD-1/CD86이 CD28을 통한 공동자극 시그널을 유도하기 위해 PD-L1 결합을 필요로 한다는 관찰과 일치한다. 도 7B에 도시된 바와 같이, PD-L1의 존재 하에, ECD 및 IgV 예시적인 변이체 적층 작제물 양자 모두를 첨가하자, IL-2 발광 상대 발광 단위 (RLU)에 의해 측정된 바와 같이 CD28 의존성 발광 활성이 작용되었다. 공동자극 수준은 변이체 분자의 CD28 및/또는 PD-L1 결합 친화성과 상관관계가 있었다. 이 결과는 PD-L1-의존성 CD28-매개 공동자극을 나타내는 변이체 PD-1-함유 적층 면역조절 단백질의 활성과 일치한다.

[0745] C.T 세포 반응

[0746] [0517] 거대세포바이러스(CMV) 항원-특이적 기능 분석을 이용하여 T 세포 반응에 대한 예시적인 변이체 적층 분자의 효과를 평가하였다.

[0747] [0518] CMV 혈청양성 공여자로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 해동하고 CMV 용해물을 시험된 예시적인 변이체 적층 작제물(100,000 pM에서 46 pM으로 1:3 희석액으로 희석)의 존재 하에 1 μ g/mL 내지 250,000/웰 PBMC로 첨가하였다. Fc 단독 분자도 대조군으로서 시험하였다. ELISA에 의해 IL-2를 분석하기 위해 인큐베이션 후 48시간에 상등액을 수집하고, ELISA에 의해 IFN γ 를 분석하기 위해 인큐베이션 후 96시간에 상등액을 수집하였다.

[0748] [0519] 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물은 IL-2 생산(도 8) 및 IFN γ 생산(도 9)에서 농도 의존적 증가를 나타내었다. PD1-CD86 적층 작제물은 PD-L1 대조군 항체(아테졸리주맙) 또는 개별 변이체 PD1 IgV-Fc 분자보다 더 큰 정도로 사이토카인 생성을 자극하였다. PD1-CD86 적층 작제물 역시도 야생형 CD86 ECD-Fc 또는 개별 변이체 CD86 ECD-Fc 분자보다 더 큰 정도로 사이토카인의 생산을 자극하였다.

[0749] [0520] 이들 결과는 PD-L1 의존적 방식으로 CD28을 자극하는 공동자극 효과를 나타내는 PD1-CD86 적층 분자와 일치한다. 이들 결과는 CD28에 대해 낮은 검출가능한 결합을 갖는 것으로 관찰된 야생형 CD86 ECD를 함유하는 적층 작제물을 비롯하여, 상기 실시예 18.B에 나타낸 바와 같이 Jurkat 세포 상의 CD28에 대한 다양한 결합 정도를 갖는 구축물에 대해 관찰되었다.

[0750] **실시예 10**

[0751] 변이체 PD-1 분자 및 변이체 CD86 분자를 포함하는 포맷된 적층 분자의 결합 및 활성의 생성 및 평가

[0752] [0521] 실시예 1-5 및 실시예 8에 각각 기재된 바와 같이 친화성-변형된 예시적인 변이체 CD86 분자 및 예시적인 변이체 PD-1 분자를 사용하여 "적층" Fc 융합 분자를 생성하였다. 생성된 CD86-PD1 적층 작제물을 결합 및 활성에 대해 평가하였다.

[0753] A. CD86-PD-1 적층 작제물의 생성

[0754] [0522] Gibson 어셈블리 키트 (New England Biolabs, USA)를 이용하는 표준 Gibson 어셈블리에 의해, Fc에 대해 융합가능한 포맷으로 적층체를 인코딩한 유전자블록(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 및 PCR 산물을 조합함으로써 적층물을 생성하였다. 적층 작제물은 인간 IgG1 무이펙터 Fc 서열(예를 들어, SEQ ID NO: 230에 기재됨)과의 융합에 의해 2개의 동일한 폴리펩타이드를 함유하는 호모다이머 포맷을 가졌다. 별법으로, 적층 작제물은 하나의 폴리펩타이드는 "노브" Fc 서브유닛(SEQ ID NO: 346)에 융합되고 제2의 폴리펩타이드는 "홀" Fc 서브유닛(SEQ ID NO: 347)에 융합된, 헤테로다이머의 두 개의 상이한 개별 사슬들의 결합을 촉진하기 위한 "노브-인트루-홀" Fc 조작에 의해, 헤테로다이머 포맷을 가졌다.

[0755] [0523] Fc 융합 단백질을 인코딩하는 발현 작제물을 Expi293 HEK293 세포(예컨대 Invitrogen)에 형질도입하였다. 상등액을 수집하고 단백질을 포획하여 AKTA 단백질 정제 시스템을 이용하여 단백질 A 컬럼으로부터 용리하였다.

[0756] [0524] 표 E7은 예시적으로 생성된 PD-1-CD86 적층체 및 포맷을 제시한다. 도 14A 내지 도 14D는 예시적인 포맷된 적층 작제물의 구조를 도시한다.

표 E7: 포맷된 예시적인 CD86-PD1 적층체						
예시적인 포맷 (FIG)	적층 작제물의 SEQ ID NOs	도메인 1	링커	도메인 2	링커	도메인 3
도 14A	326	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 230)	4 개의 GGGGS (G4S) motifs (SEQ ID NO: 224)	변이체 CD86 ECD (SEQ ID NO: 94)
	326	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 230)	4 개의 GGGGS (G4S) 모티프 (SEQ ID NO: 224)	변이체 CD86 ECD (SEQ ID NO: 94)
도 14A	327	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 230)	4 개의 GGGGS (G4S) 모티프 (SEQ ID NO: 224)	변이체 CD86 IgV (SEQ ID NO: 150)
	327	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 230)	4 개의 GGGGS (G4S) 모티프 (SEQ ID NO: 224)	변이체 CD86 IgV (SEQ ID NO: 150)
도 14B	328	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S 링커 (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 324)	-	-
	329	변이체 CD86 IgV (SEQ ID NO: 150)	GSG4S 링커 (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 325)	-	-
도 14C	328	변이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S 링커 (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 324)	-	-

[0757]

		NO: 315)	(SEQ ID NO: 222)	324)		
	330	Fc (SEQ ID NO: 325)	4 개의 GGGGS (G4S) 모티프 (SEQ ID NO: 224)	면이체 CD86 IgV (SEQ ID NO: 150)	-	-
	328	면이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S 링커 (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 324)	-	-
도 14D	331	면이체 PD1 ECD (SEQ ID NO: 315)	GSG4S 링커 (SEQ ID NO: 222)	Fc (SEQ ID NO: 325)	4 개의 GGGGS (G4S) 모티프 (SEQ ID NO: 224)	면이체 CD86 IgV (SEQ ID NO: 150)

[0758]

[0759]

B. 결합

[0760]

[0525] 결합 활성을 평가하기 위해, 예시적인 포맷된 적층 작제물을 CD86의 동족 결합 파트너인 CD28을 발현하는 Jurkat 세포 및 PD-1의 동족 결합 파트너인 PDL1을 발현하도록 형질도입된 K562 세포와 함께 인큐베이션하였다. 세포(50,000개 세포/웰)를 다양한 농도(시작 농도 100nM, 8개의 연속 1:4 희석액 적정됨)로, 표 E7에 제시된 포맷된 적층 작제물과 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 50 μ L 항-Fc 항체-PE로 30분 동안 재현탁하였다. 유세포 분석에 의해 결합을 평가하고 평균 형광 강도(MFI)를 구하였다.

[0761]

[0526] 도 15A 및 15B에 도시된 바와 같이, 예시적인 PD-1-CD86 적층 작제물 포맷은 포맷되지 않은 예시적인 변이체 대조군 적층체와 비교하여, PDL1 및 CD28에 대한 결합을 유지한다. 이러한 데이터는 서로 다른 적층된 분자 포맷이 동족 결합 파트너에 대한 결합 활성을 유지함을 가리킨다.

[0762]

C. T 세포 공동자극

[0763]

[0527] 예시적인 적층 작제물이 T 세포의 표적-특이적 공동자극을 유도할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 공동자극을 측정하기 위한 T 세포 리포터 라인을 포함하는 형질감염된 세포 시스템을 사용하였다. IL-2 프로모터 루시페라제 리포터를 포함하고 PD1을 발현하거나 발현하지 않는 Jurkat 세포를 사용하여 공동자극 기능을 평가하였다. Jurkat 세포를 자극하기 위해 K562 세포를 인공 항원 제시 세포로서 사용하도록 조작하였다. 구체적으로, K562 세포를, PDL1 발현을 지시하는 별도의 렌티바이러스로 형질도입하거나 형질도입하지 않고, 항-CD3 항체 OKT3의 단일 사슬 Fv 버전을 인코딩하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. 표면 PDL1 발현이 있거나 없는 세포 표면 항-CD3 단일 사슬 Fv(OKT3)를 나타내는 K562 세포를 2×10^4 세포/웰로 배양 배지에 플레이팅하였다. 표적 세포를 37°C에서 예시적인 PD1-CD86 적층 작제물(8회 연속으로 2nM로부터 적정, 1:3 희석)과 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. IL-2-루시페라제 리포터 유전자(Promega)를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포를 1×10^5 세포/웰로 추가하여 최종 부피/웰을 100 μ L로 만든다. 예시적인 적층 작제물의 존재 또는 부재하에 표적 및 Jurkat 세포를 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 인큐베이터에서 제거하고 15분 동안 실온에 적응시켰다. 100 μ L의 세포 용해물 및 루시페라제 기질 용액(BioGlo 루시페라제 시약, Promega)을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 오비탈 진탕기에서 10분 동안 인큐베이션하였다. Cytation 3 이미징 판독기(BioTek Instruments)를 사용하여 웰 통합 시간당 1초로 발광성을 측정하였다. 각 테스트 샘플에 대해 상대 발광 값(RLU)을 구하고 보고하였다.

[0764]

[0528] 도 16A 및 16B에 도시된 바와 같이, 예시적인 적층 작제물과의 인큐베이션은, T 세포가 PD1+인지 또는 PD1-인지 여부에 관계없이, PDL1+ K562/OKT3 세포의 존재 하에 T 세포에 공동자극을 제공하였다. 이러한 결과는 적층 작제물이 강력한 체크포인트 차단이 있는 경우에도 T 세포 공동자극 시그널을 전달할 수 있음을 시사한다.

[0765]

D. 사이토카인 생산

[0766]

[0529] T 세포에서 사이토카인 생산을 촉진하는 예시적인 CD86-PD-1 적층 작제물(표 E7 참조)의 능력을 평가하

기 위해, PD-L1(SCC152 PDL1+)을 발현하는 것으로 알려진 HLA-A2+ HPV+ 표적 세포주들, 다양한 농도의 예시적인 포맷된 적층체의 존재 하에 예시적인 재조합 HPV16 E6-특이적 T 세포 수용체(TCR)를 발현하도록 형질도입된 T 세포와 함께 공동 배양하였다. SCC152 PDL1+ 세포를 배양 배지와 함께 40,000개 세포/웰로 96-웰 플레이트에 접종하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 다양한 농도의 예시적인 포맷된 적층 작제물(0.666 nM, 5-점 적정 동안 1:3 희석으로 적정) 및 재조합 HPV16 E6-특이적 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 40,000개의 T 세포를 각 웰에 첨가하였다. 비교를 위해, 세포를 CD28 및 PD-L1에 결합하는 것으로 알려진 변이체 CD80 IgV-Fc 융합 단백질과 함께 모의 형질도입된 T 세포(모의)와 함께 인큐베이션하거나(모의(mock)), 포맷된 적층 작제물의 부재 하에 인큐베이션하였다(단백질 없음). 플레이트를 37℃에서 인큐베이션하고, 인큐베이션 24시간 후에 상등액을 수집하여 분비된 사이토카인, 예를 들어, IFN γ , IL-2, TNF α 에 대해 시험하였다.

[0767] [0530] 도 17A에 도시된 바와 같이, 포맷된 CD86-PD-1 적층 작제물은 대조군에 비해 24시간에 더 높은 수준의 IFN γ , IL-2 및 TNF α 사이토카인 생산을 유도하였다. 이러한 데이터는 포맷된 CD86-PD-1 적층 작제물이 표적 특이적 T 세포에서 공동자극 및 사이토카인 생산을 촉진한다는 것을 가리킨다.

[0768] E. 세포독성 활성

[0769] [0531] 예시적인 CD86-PD-1 적층 작제물(표 E7 참조)을 T 세포 세포독성 활성을 촉진하는 능력에 대해 평가하였다. HLA-A2+ HPV+ 표적 세포주 SCC152 PDL1+를 배양 배지와 함께 웰당 20,000개의 세포로 96-웰 플레이트에 접종하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 배양 배지를 폐기하고 100 μ L의 루시페린과 함께 37℃에서 10분간 세포를 배양하였다. 다양한 농도의 예시적인 포맷된 적층 작제물(0.666 nM, 5-점 적정 동안 1:3 희석으로 적정) 및 예시적인 재조합 HPV16 E6-특이적 T 세포 수용체(TCR)로 형질도입된 20,000개의 T 세포를 각 웰에 첨가하고 37℃에서 10분간 인큐베이션한 다음 30초간 원심분리(1300 rpm)하였다. 비교를 위해 세포를 CD28 및 PD-L1에 결합하는 것으로 알려진 변이체 CD80 IgV-Fc 융합 단백질, 모의 형질도입된 T 세포(모의)와 함께, 또는 포맷된 적층 작제물 부재 하에(단백질 없음) 인큐베이션하였다. 플레이트를 37℃에서 인큐베이션하고 24시간, 48시간 및 72시간 인큐베이션 후 상대 발광 값(RLU)을 구하였다.

[0770] [0532] 도 17B는 각 농도에서 24, 48 및 72시간에 RLU로 측정된 세포 살해를 보여준다. CD86-PD-1 적층 작제물은 대조군과 비교하여 제24시간에 T 세포 세포독성 활성을 증진시켰다. 이들 데이터는 CD86-PD-1 적층 작제물이 T 세포를 공동자극하여 T 세포 세포독성 활성을 유도할 수 있음을 뒷받침한다.

[0771] 실시예 11

[0772] 컨쥬게이트 HER2 및 EGFR 표적화 항체의 결합 및 공동자극 기능 평가

[0773] [0533] 예시적인 변이체 CD86 IgV 분자를 HER2 및 EGFR 표적화 항체에 컨쥬게이션시켜 컨쥬게이트(융합 단백질)를 형성하였다. SEQ ID NO: 150에 의해 제시된 변이체 CD86 IgV 도메인을 G4S 링커를 개재하여 HER2 표적화 항체 퍼투주맵 또는 EGFR 표적화 항체 파니투무맵의 경쇄 또는 중쇄의 아미노 또는 카르복실 말단에 융합시켰다(표 E8 참조). 컨쥬게이트(융합 단백질)의 예시적인 구성을 도 18에 나타내었다. 도 19A 내지 도 19B에 도시된 각각의 작제물을 코딩하는 DNA를 HEK-293 세포에 형질감염시키고 분비된 단백질을 단백질 A 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 이어서 생성된 컨쥬게이트 단백질을 적절한 결합 특성의 보유에 대해 평가하였다.

표 E8: 예시적인 CD86-항체 컨주게이트 및 대조군 항체		
설명	중쇄 (HC) SEQ ID NO	경쇄 (LC) SEQ ID NO
퍼투주맵	340	341
CD86-HC 퍼투주맵	342	341
CD86-LC 퍼투주맵	340	343
HC-CD86 퍼투주맵	344	341
LC-CD86 퍼투주맵	340	345
파니투무맵	346	347
CD86-HC 파니투무맵	348	347
CD86-LC 파니투무맵	346	349
HC-CD86 파니투무맵	350	347
LC-CD86 파니투무맵	346	351
대조군 항체		
라무시루맵	352	353

[0774]

[0775]

[0776]

A. 결합

[0534] HER2에 결합하는 예시적인 퍼투주맵-CD86 컨주게이트(융합 단백질)의 능력을 평가하기 위해, SCC-152 세포를 다양한 농도의 예시적인 컨주게이트(표 E8 참조), 퍼투주맵 또는 대조군 항체(라무시루맵)와 함께 인큐베이션하였다. SCC152 세포(50,000개 세포/웰)를 다양한 농도(출발 농도 33nM, 9개의 연속 1:3 희석액 적정)의 표 E8에 제시된 CD86 항체 컨주게이트(융합 단백질)와 함께 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 50 μ L 항-Fc 항체-PE로 30분 동안 재현탁하였다. 유세포 분석에 의해 결합을 평가하고 중앙 형광 강도(MFI)를 구하였다. 도 19A에 도시된 바와 같이, 컨주게이트는 HER2에 대한 결합을 유지하였다.

[0777]

[0535] EGFR에 결합하는 예시적인 파니투무맵-CD86 컨주게이트의 능력을 평가하기 위해, EGFR을 발현하도록 형질도입된 CHO 세포를 다양한 농도의 예시적인 컨주게이트(표 E8 참조), 파니투무맵 또는 대조군 항체(라무시루맵)와 함께 인큐베이션하였다. CHO-EGFR 세포(50,000개 세포/웰)를 다양한 농도(출발 농도 33nM, 9개의 연속 1:3 희석액 적정)의 표 E8에 제시된 CD86 항체 융합 컨주게이트 작제물과 함께 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 50 μ L 항-Fc 항체-PE로 30분 동안 재현탁하였다. 유세포 분석에 의해 결합을 평가하고 중앙 형광 강도(MFI)를 구하였다. 도 19B에 도시된 바와 같이, 컨주게이트는 EGFR에 대한 결합을 유지하였다.

[0778]

B. T 세포 공동자극

[0779]

[0536] 예시적인 컨주게이트(융합 단백질)가 T 세포의 표적-특이적 공동자극을 유도할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, IL-2 프로모터 루시페라제 리포터를 갖는 Jurkat 세포를 포함하는 형질감염된 세포 시스템을 사용하여 공동자극 기능을 평가하였다. Jurkat 세포를 자극하기 위해, HPV 바이러스 단백질을 구성적으로 발현하는 표적 SCC-152 세포를, 2×10^4 세포/웰로 배양 배지에 플레이팅하였다. 표적 세포를 37°C에서 CD86 항체 융합 컨주게이트(8회 연속으로 2nM에서 적정, 1:4 희석)와 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. IL-2-루시페라제 리포터 유전자(Promega)를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포를 1×10^5 세포/웰로 첨가하여 웰당 최종 부피를 100 μ L로 만든다. 예시적인 컨주게이트의 존재 또는 부재하에 표적 및 Jurkat 세포를 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 인큐베이터에서 제거하고 15분 동안 실온에 적응시켰다. 100 μ L의 세포 용해물 및 루시페라제 기질 용액(BioGlo 루시페라제 시약, Promega)을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 오비탈 진탕기에서 10분 동안 인큐베이션하였다. Cytation 3 이미징 판독기(BioTek Instruments)를 사용하여 웰 통합 시간당 1초로 발광성을 측정하였

다. 상대 발광 값(RLU)을 각 테스트 샘플에 대해 구하고 이를 보고하였다.

[0780] [0537] SCC-152 세포를 다양한 농도의 컨쥬게이트 또는 대조군 항체의 존재 또는 부재 하에 HPV 펩타이드 E6에 특이적인 TCR로 형질도입된 Jurkat IL2 리porter 세포주와 공동-배양하였다. 도 20A 및 20B에 도시된 바와 같이, RLU 측정 결과 T 세포가 대조군 항체와 비교하여 컨쥬게이트의 존재 하에 증가된 공동자극을 경험한 것으로 나타났다.

[0781] C. 세포독성 활성

[0782] [0538] 예시적인 컨쥬게이트를 T 세포 세포독성 활성을 촉진하는 능력에 대해 평가하였다. 표적 세포주 SCC-152를 배양 배지와 함께 웰당 20,000개의 세포로 96-웰 플레이트에 접종하고 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 배양 배지를 폐기하고 100 µL의 루시페린과 함께 세포를 37 °C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. E6 TCR로 형질도입된 20,000개의 1차 인간 T 세포를 2nM의 예시적 컨쥬게이트의 존재 하에 다양한 이펙터 대 표적 비(E:T)로 각 웰에 첨가하고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션한 후 30초간 원심분리(1300rpm)하였다. 비교를 위해, 세포를 퍼투주맵 단독, 파니투무맵 단독, 대조군 항체 라무시루맵(모의)과 함께, 또는 단백질 부재하에 인큐베이션하였다. 플레이트를 37 °C에서 인큐베이션하고 24시간 인큐베이션 후 표적 세포 살해 백분율을 구하였다.

[0783] [0539] 도 21A 및 21B는 예시적인 컨쥬게이트의 존재 하에 각 E:T에서 24시간 후 세포 살해 퍼센트의 최소 증가를 입증한다.

[0784] C. 사이토카인 생산

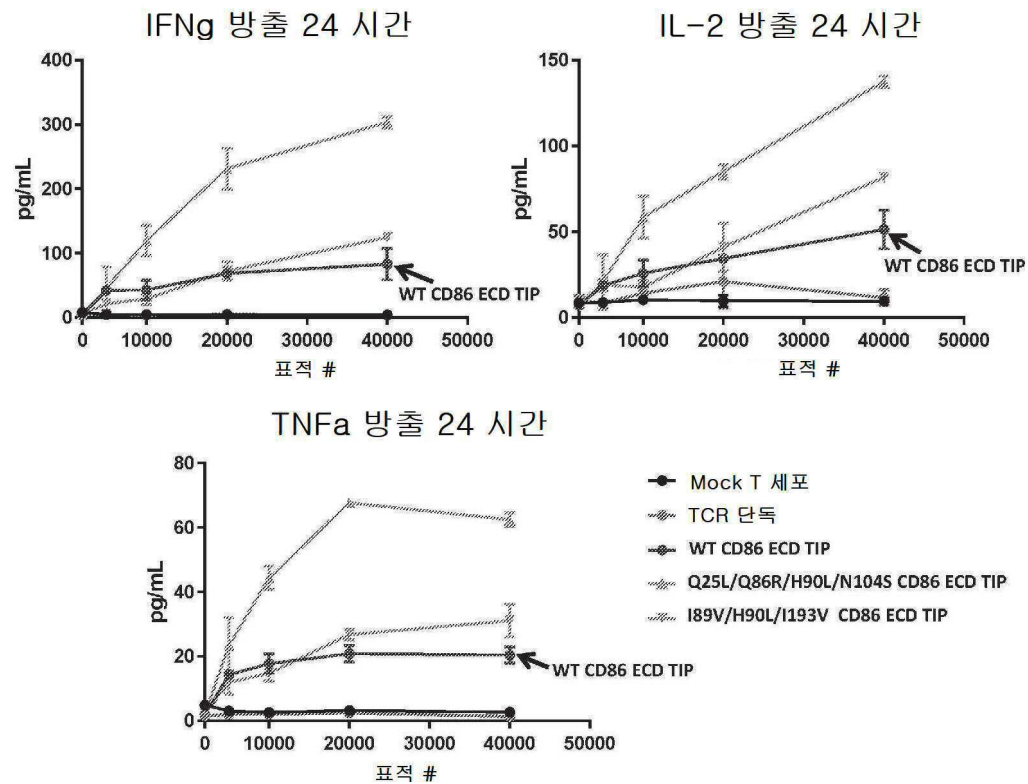
[0785] [0540] T 세포에서 사이토카인 생산을 촉진하는 예시적인 컨쥬게이트의 능력을 평가하기 위해, SCC-152 세포를 다양한 농도의 예시적인 컨쥬게이트(표 E8 참조)의 존재 하에 E6 TCR (3 공여자)로 형질도입된 1차 인간 T 세포와 함께 공동-배양하였다. SCC-152 세포를 배양 배지와 함께 40,000개 세포/웰로 96-웰 플레이트에 접종하고 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 다양한 농도의 예시적인 컨쥬게이트 및 40,000개 T 세포를 각 웰에 첨가하였다. 비교를 위해 세포를 퍼투주맵 단독, 파니투무맵 단독, 대조군 항체 라무시루맵(모의)과 함께 또는 단백질 부재하에 인큐베이션하였다. 플레이트를 37°C에서 인큐베이션하고, 인큐베이션 24시간 후에 상등액을 수집하여 분비된 사이토카인, 예를 들어, IFN γ , IL-2, TNF α 에 대해 시험하였다.

[0786] [0541] 도 22A 및 22B는 각 공여자에 대한 IFN γ , IL-2 및 TNF α 의 농도를 나타낸다. 도시된 바와 같이, CD86-항체 컨쥬게이트는 항체 단독 대조군과 비교하여 증진된 사이토카인 생산을 나타내는 세포를 결과시켰다. 이들 데이터는 컨쥬게이트가 T 세포에서 공동자극 및 사이토카인 생산을 촉진할 수 있음을 입증한다.

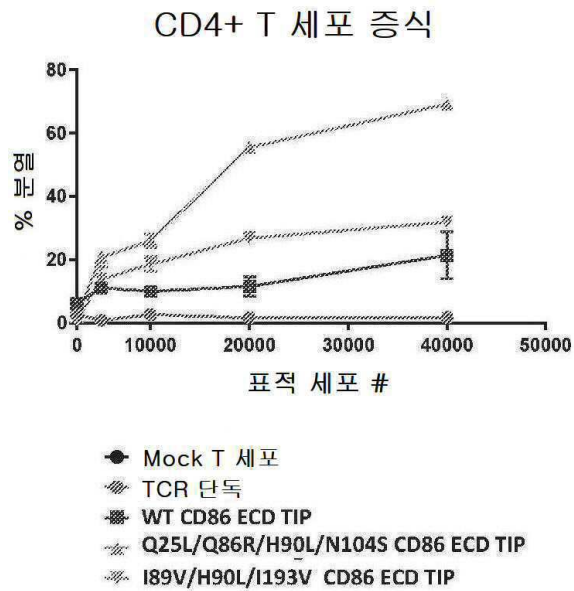
[0787] [0542] 본 발명은 예를 들어 본 발명의 다양한 측면을 설명하기 위해 제공된, 특정 개시된 구체예들로 그 범위가 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 설명된 조성물과 방법에 대한 다양한 변형이 가능하다는 것은 본 명세서의 설명과 교시 내용으로부터 자명하다. 이러한 변형은 본 발명의 진정한 범위와 정신을 벗어나지 않고 실시될 수 있으며 본 명세서의 개시 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

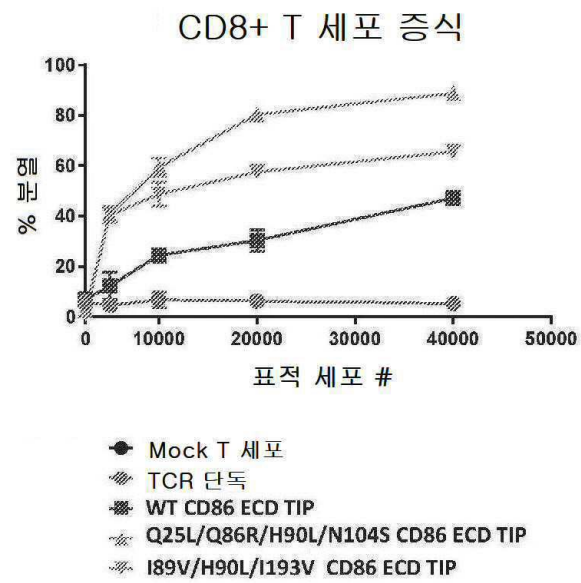
도면1a



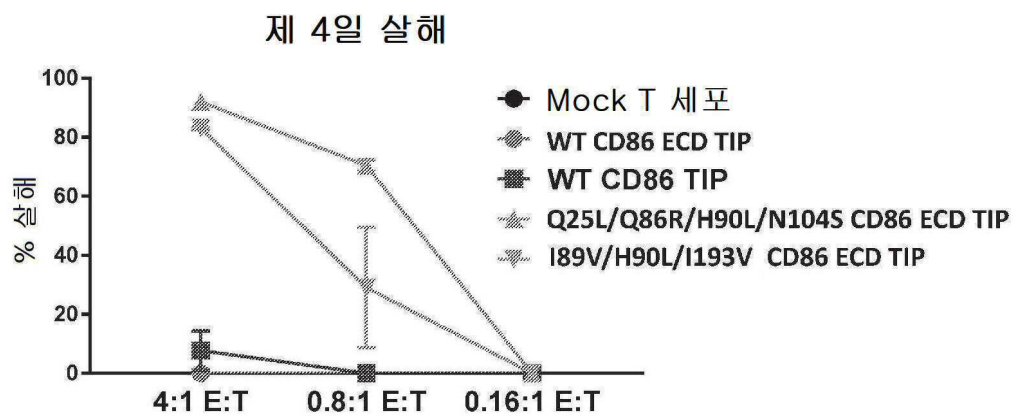
도면1b



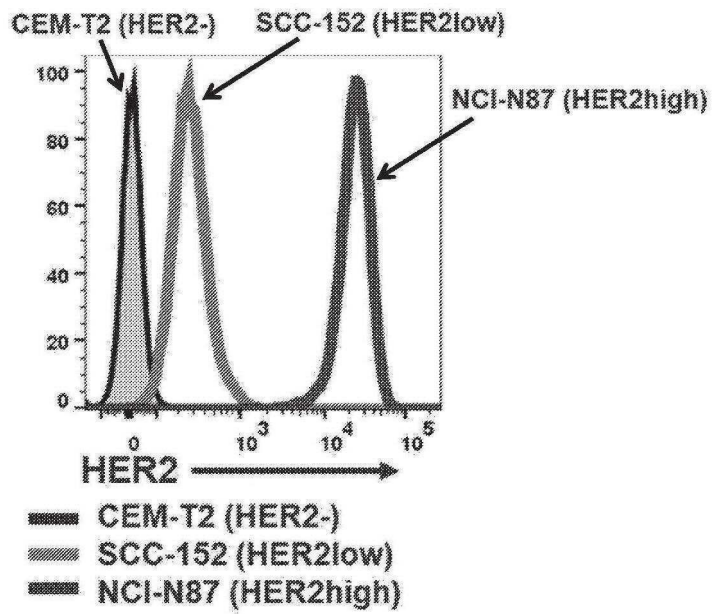
도면1c



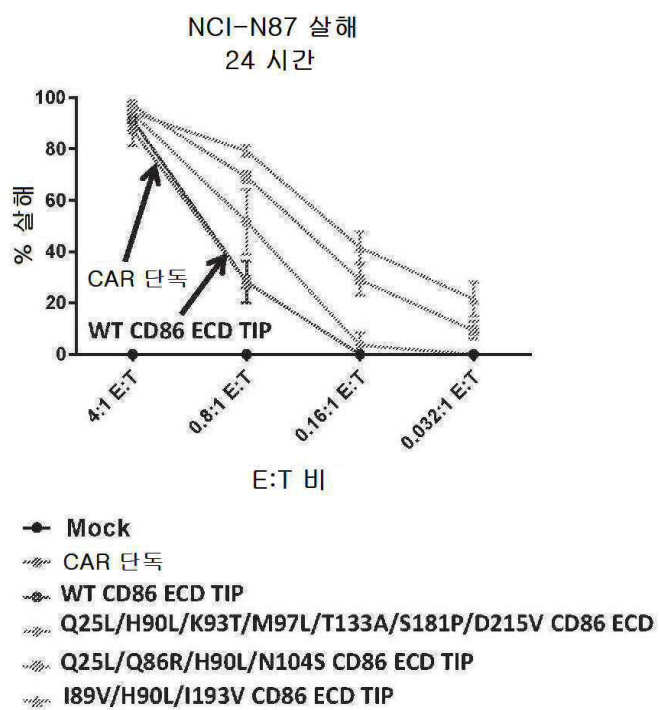
도면1d



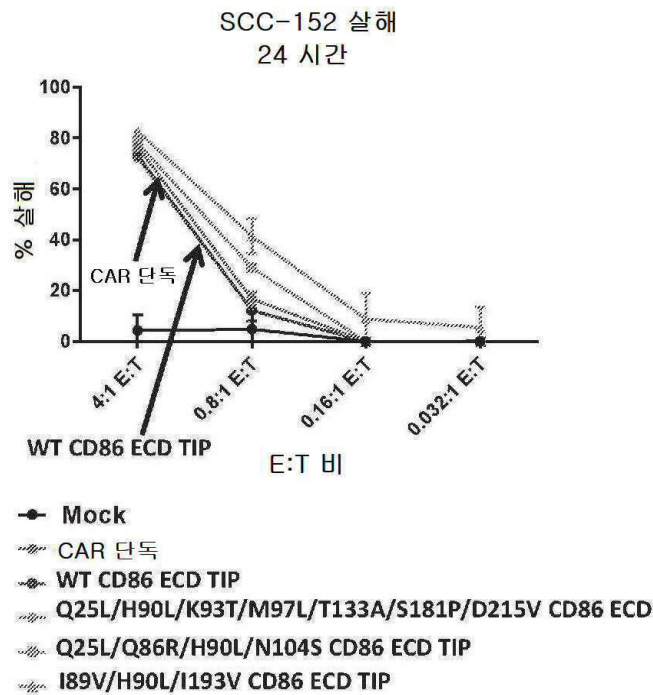
도면2a



도면2b



도면2c



도면3

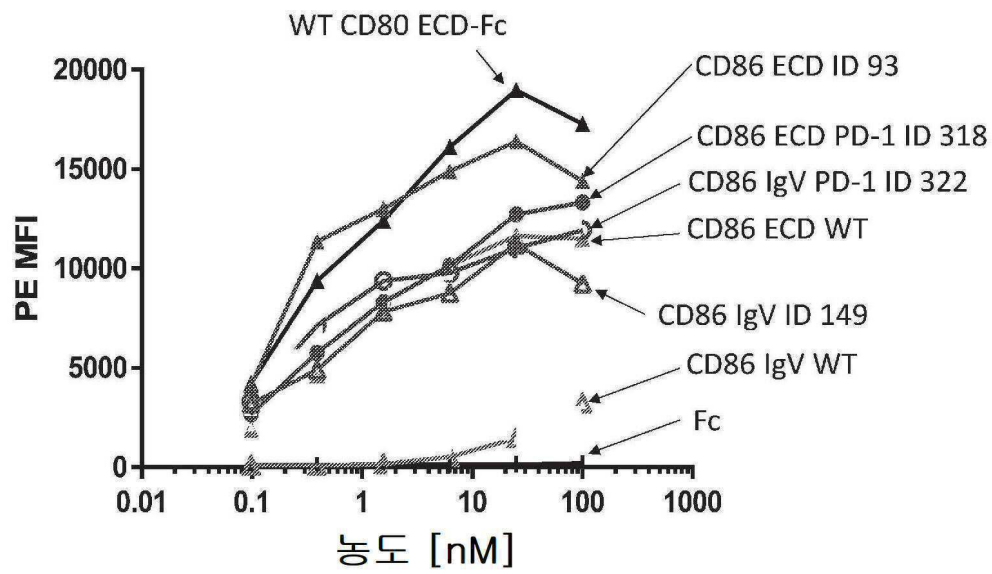
SEQ ID NO: 29	APLKIQAYFNETADLPQCFANSQNSLSSELVVEWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVHVKYM	60
SEQ ID NO: 122	-----NETADLPQCFANSQNSLSSELVVEWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVHVKYM	51

SEQ ID NO: 29	GRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKFTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVP	120
SEQ ID NO: 122	GRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKFTGMIRIHQMNSELS-----	99

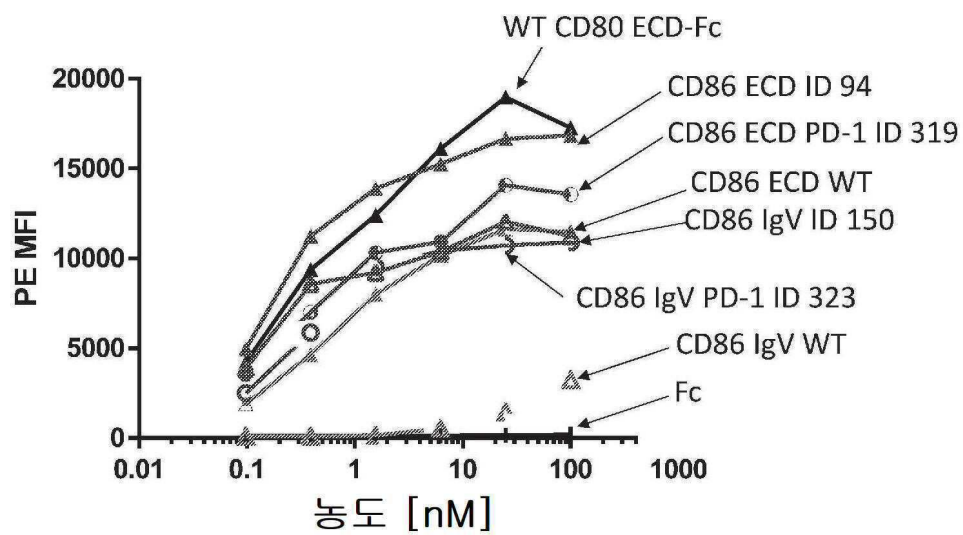
SEQ ID NO: 29	ISNITENVYINLTCSSIHGYFEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGMQKSQDNVTELYDVSISL	180
SEQ ID NO: 122	-----	99

SEQ ID NO: 29	SVSEFDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPPDHIP	224
SEQ ID NO: 122	-----	99

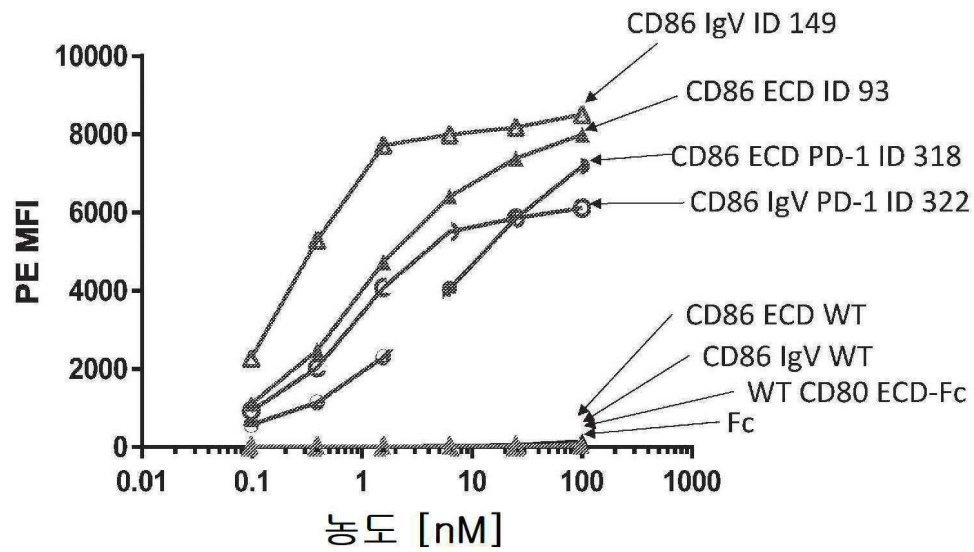
도면4a



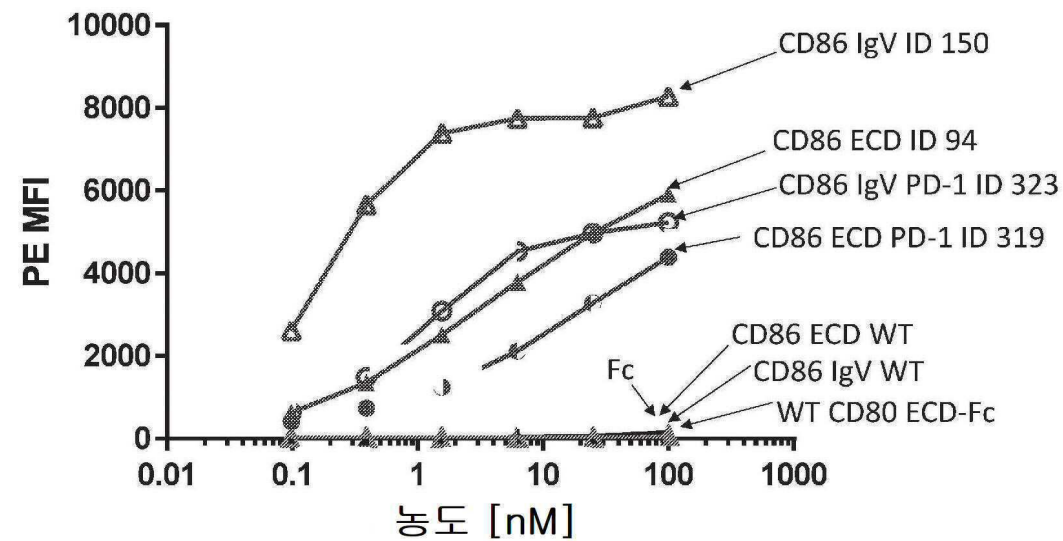
도면4b



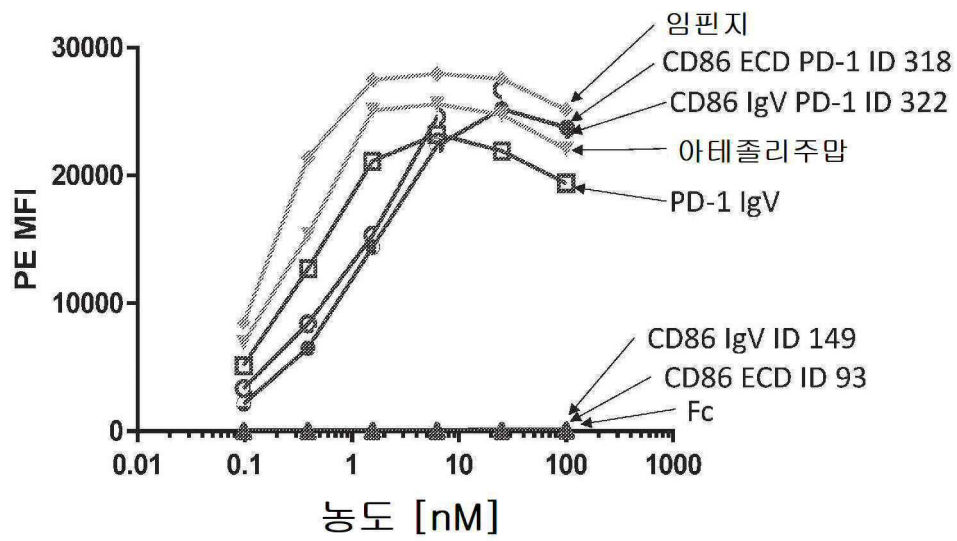
도면5a



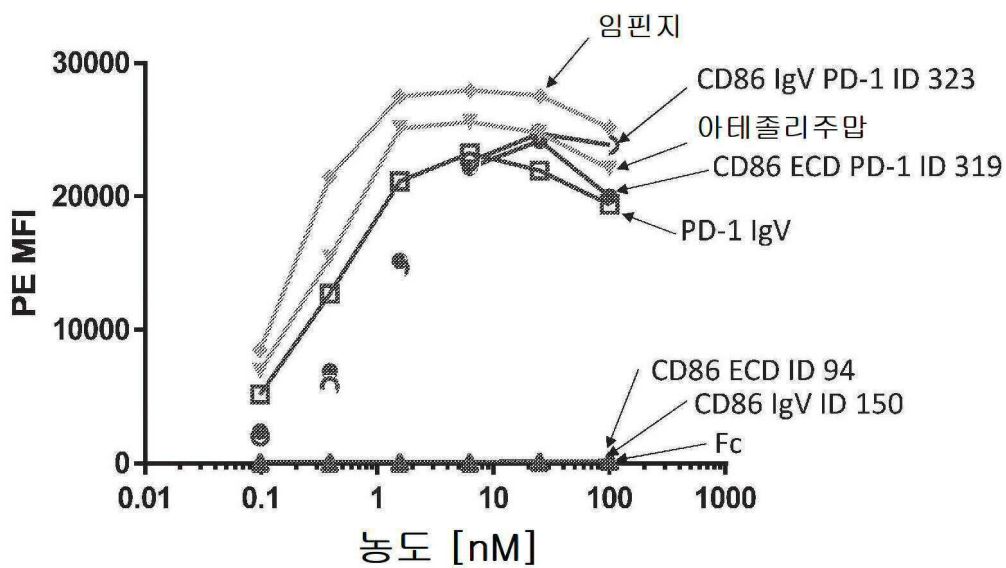
도면5b



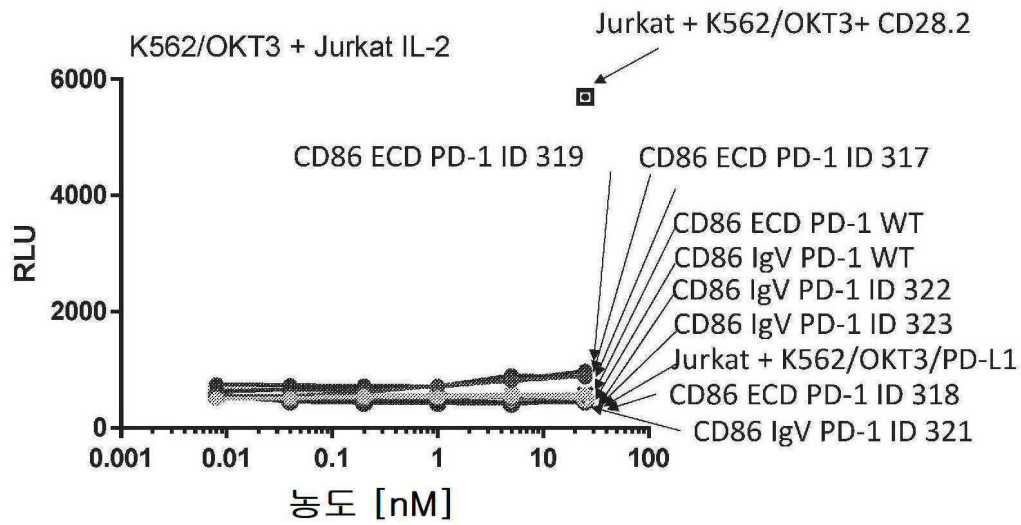
도면6a



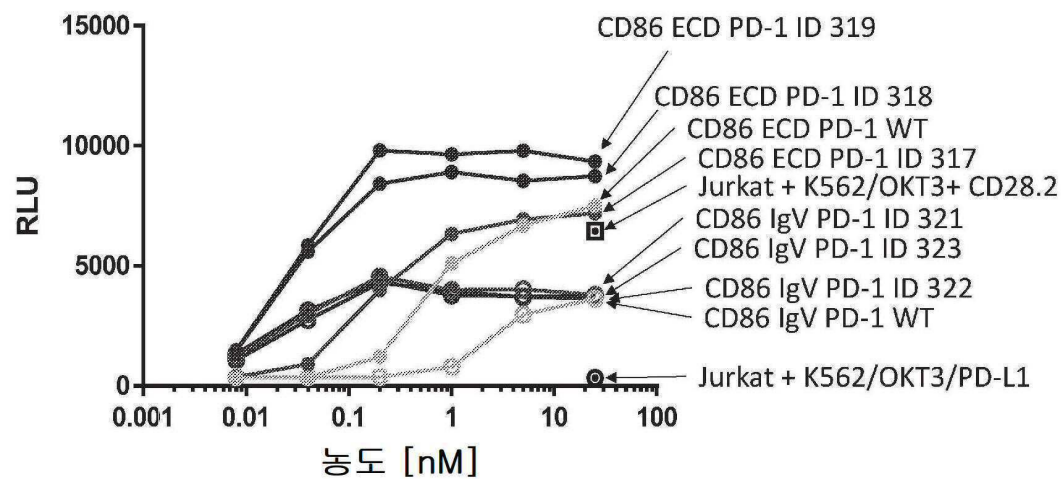
도면6b



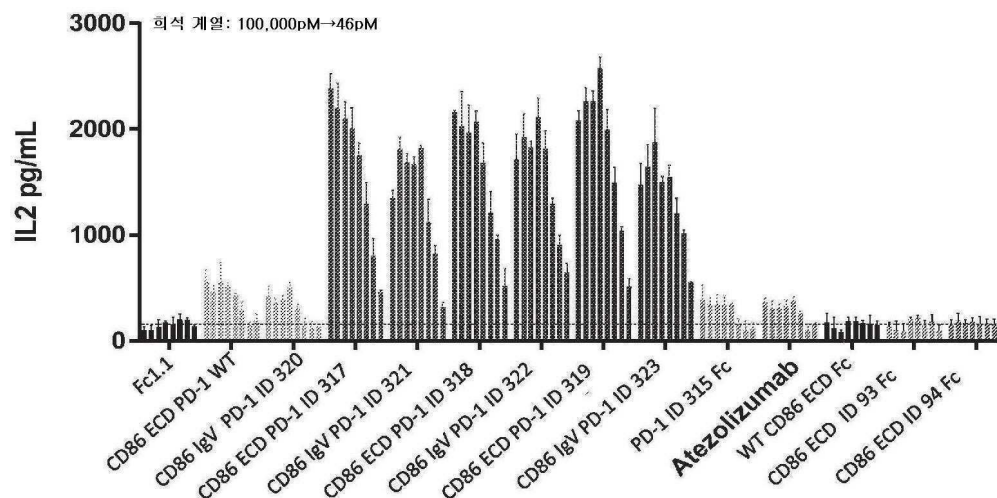
도면7a



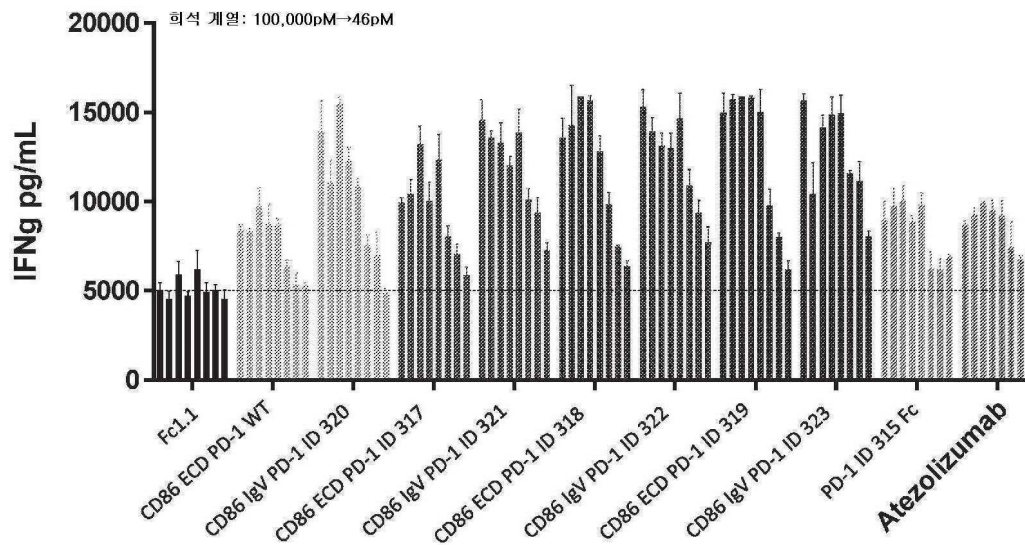
도면7b



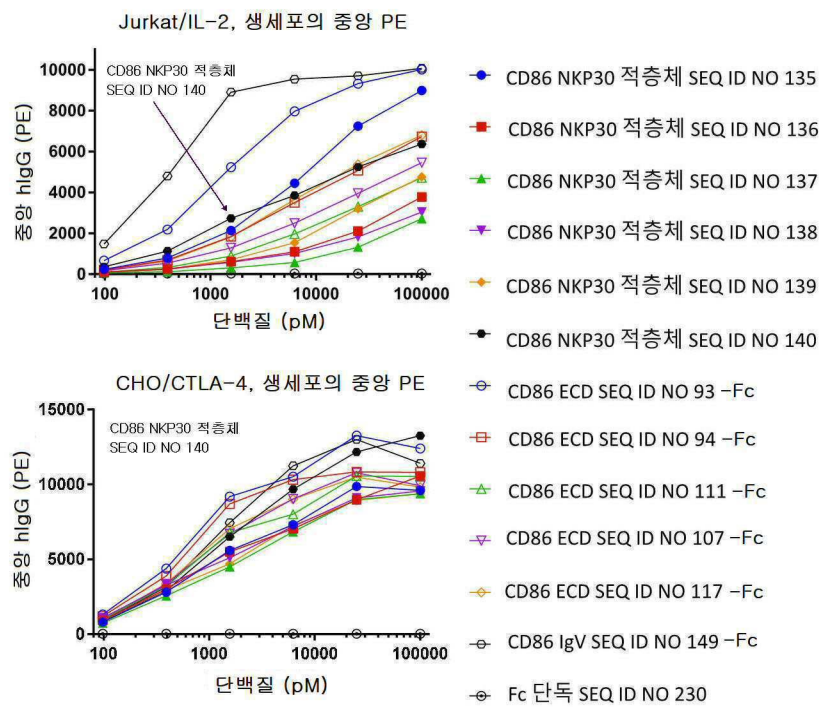
도면8



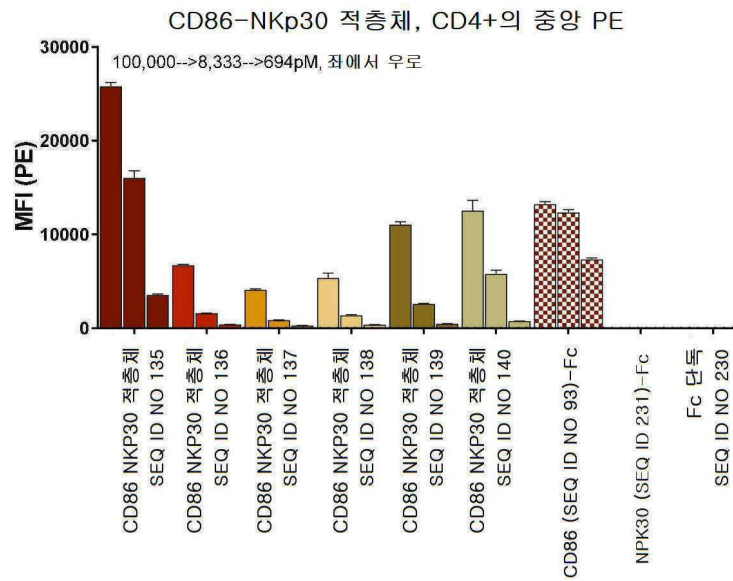
도면9



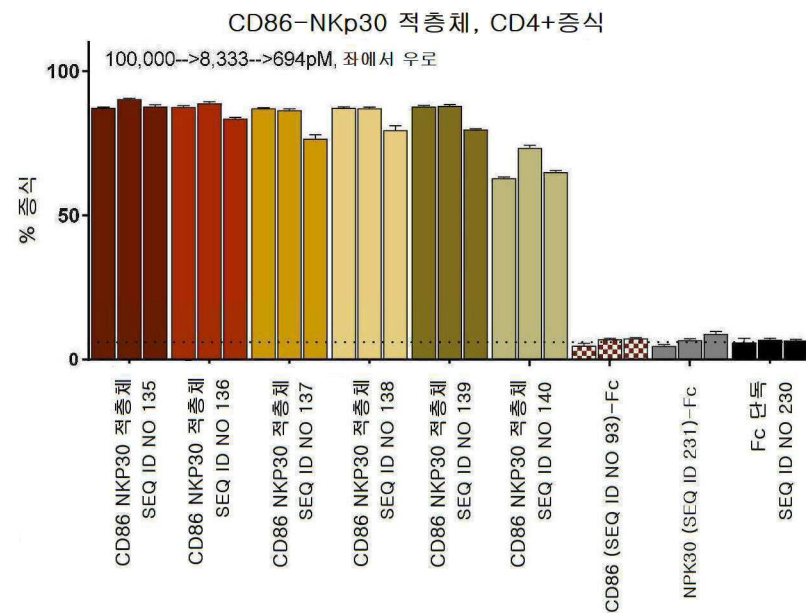
도면10



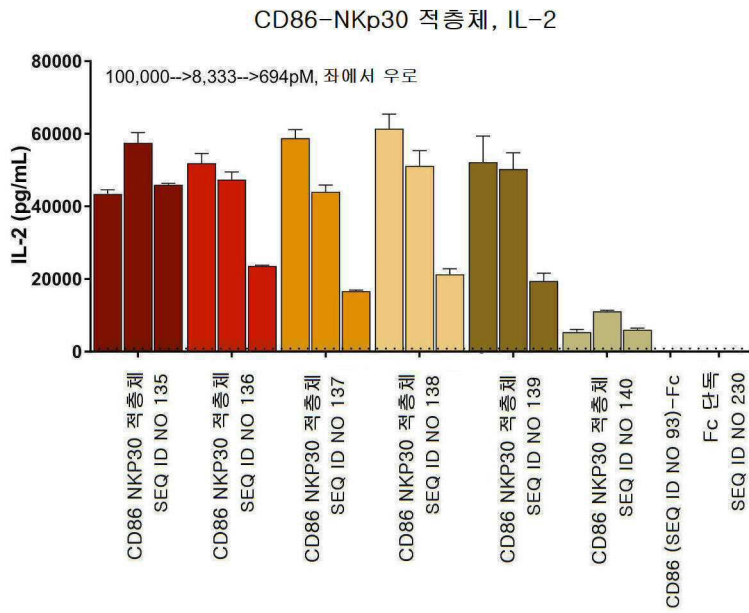
도면11a



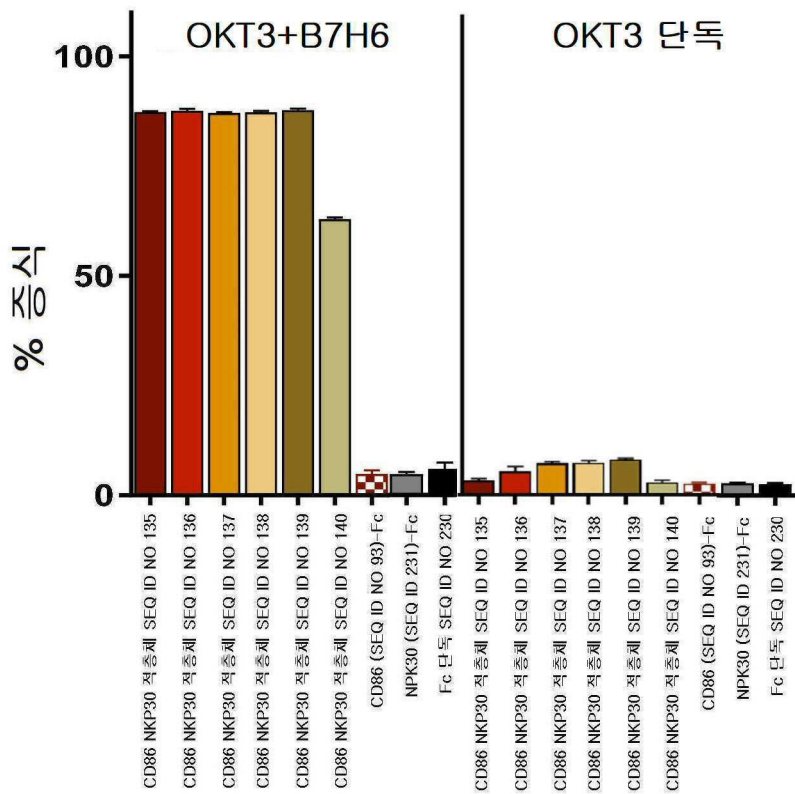
도면11b



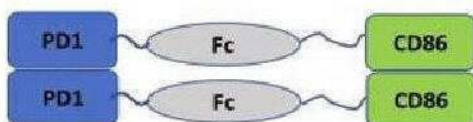
도면12



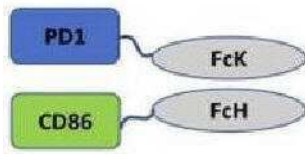
도면13



도면14a



도면14b



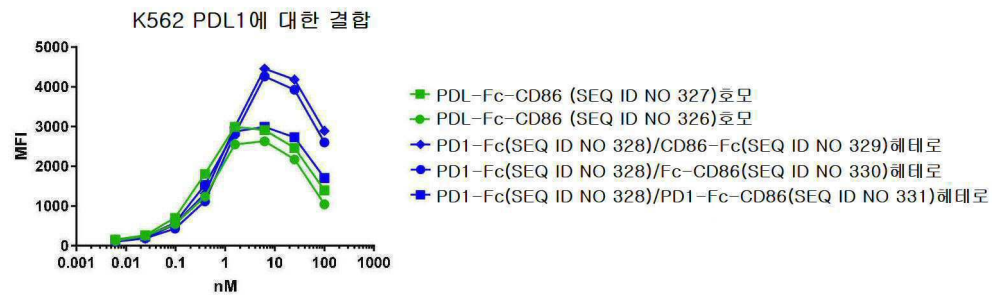
도면14c



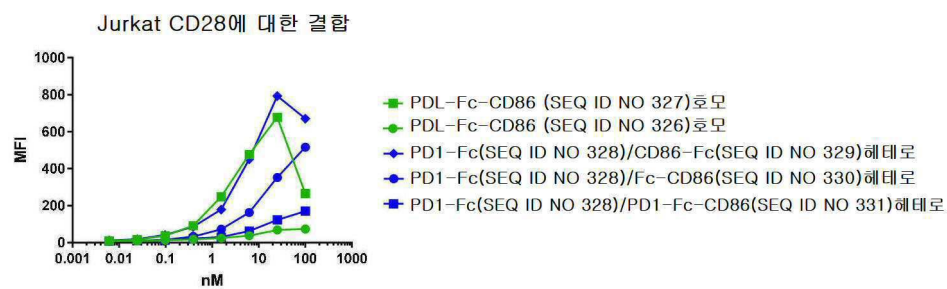
도면14d



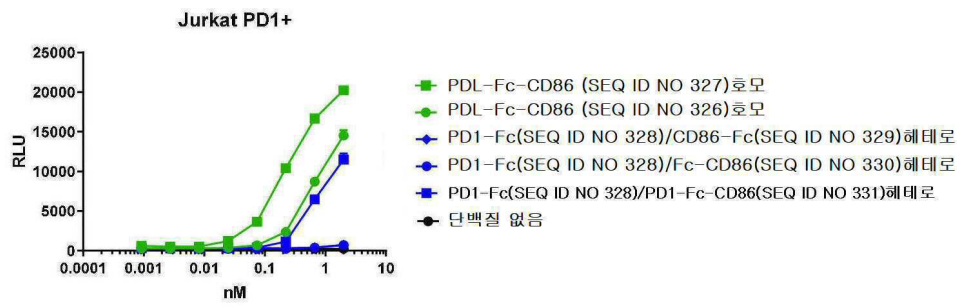
도면15a



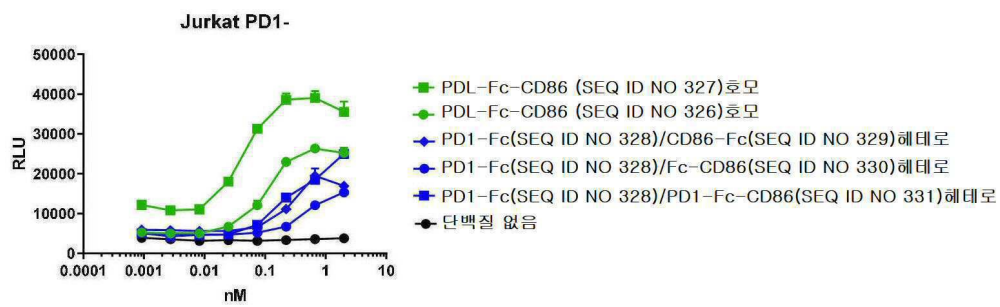
도면15b



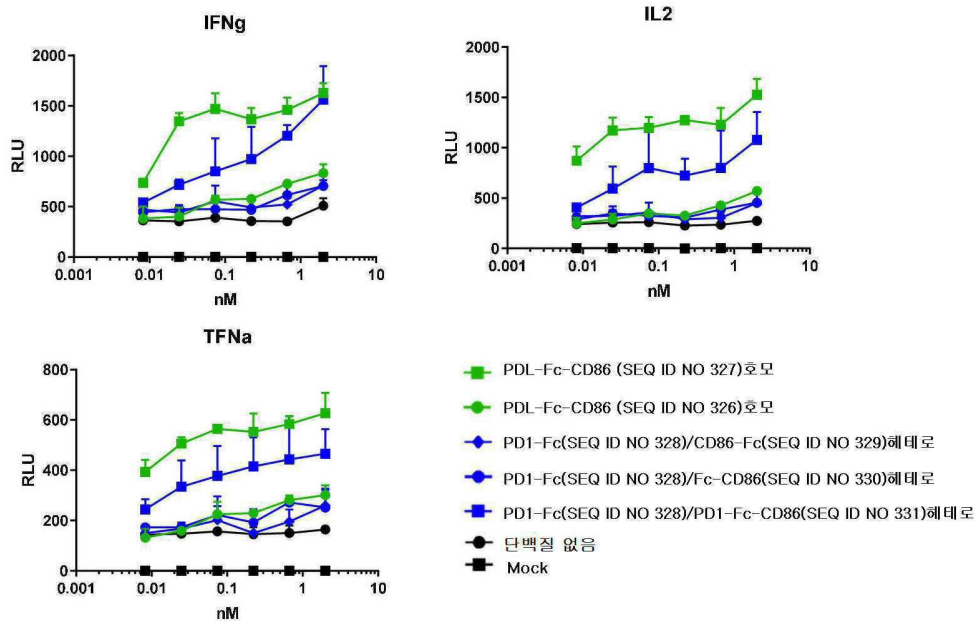
도면16a



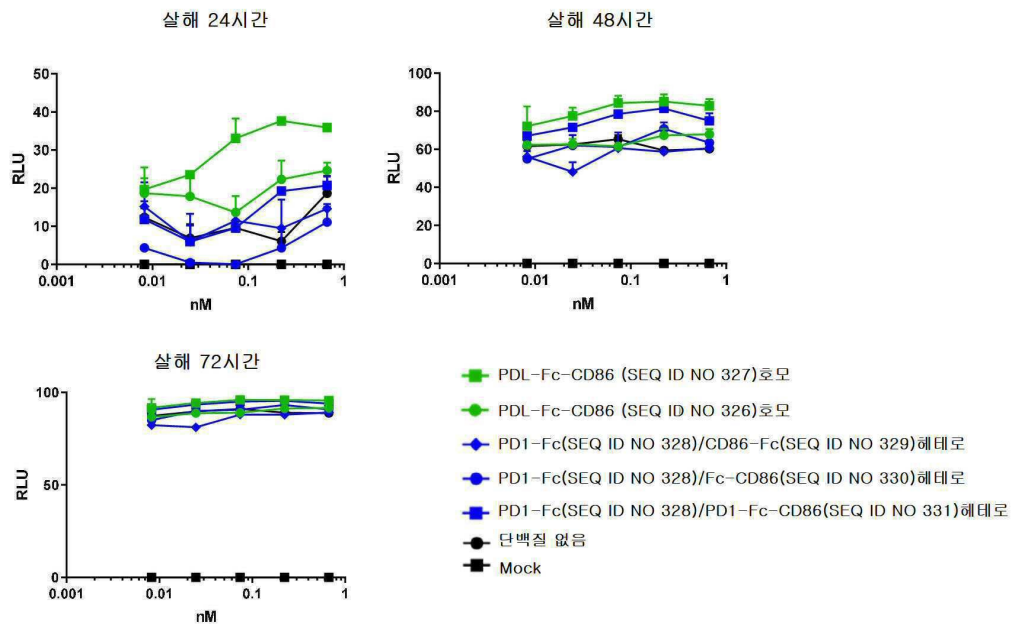
도면16b



도면17a



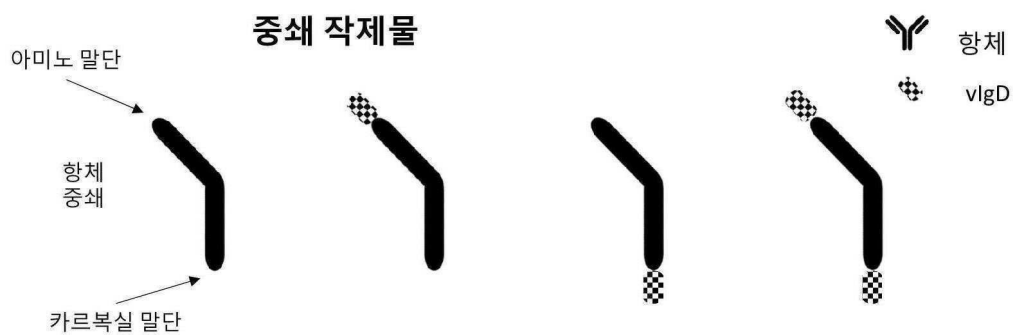
도면17b



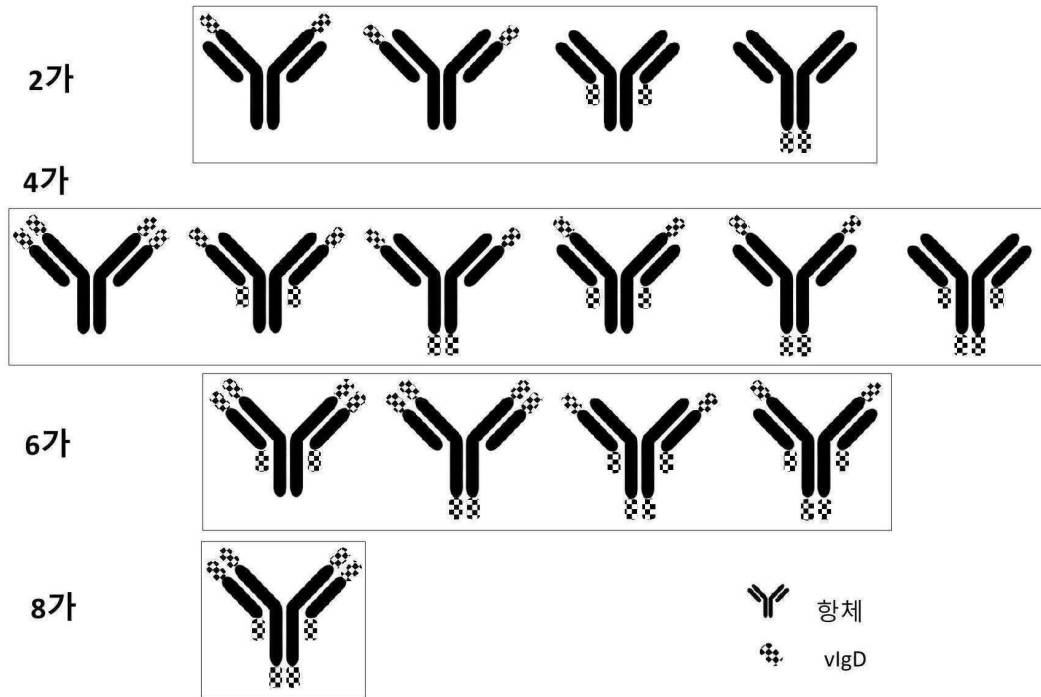
도면18a



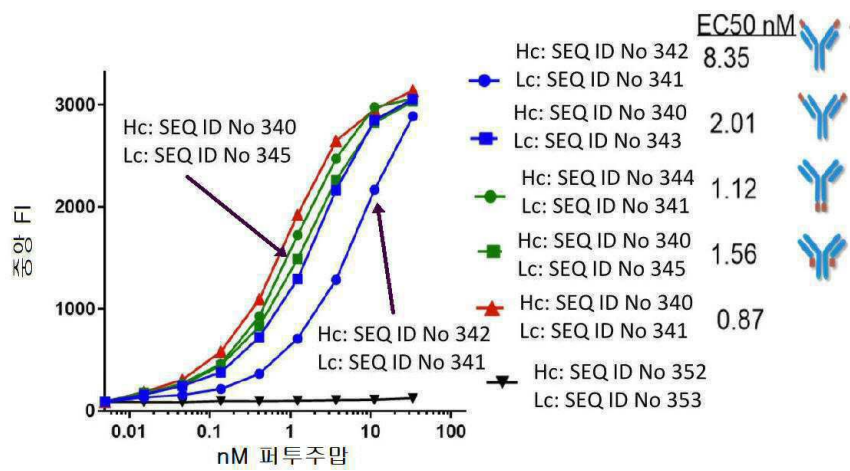
도면18b



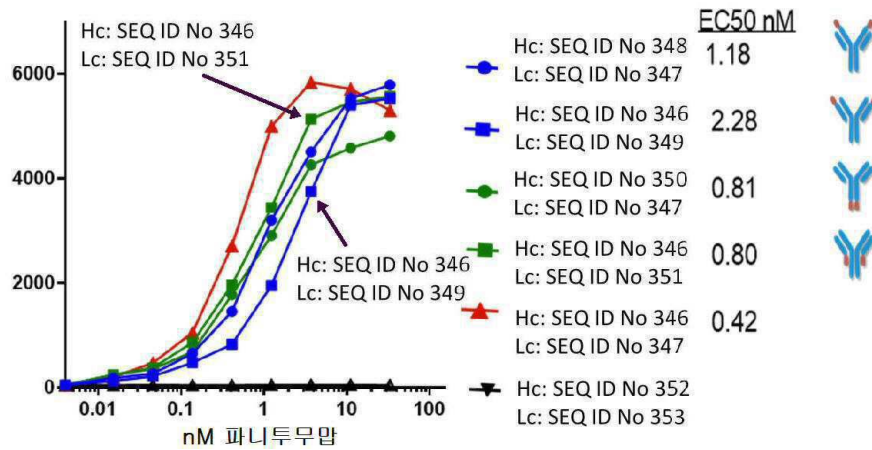
도면18c



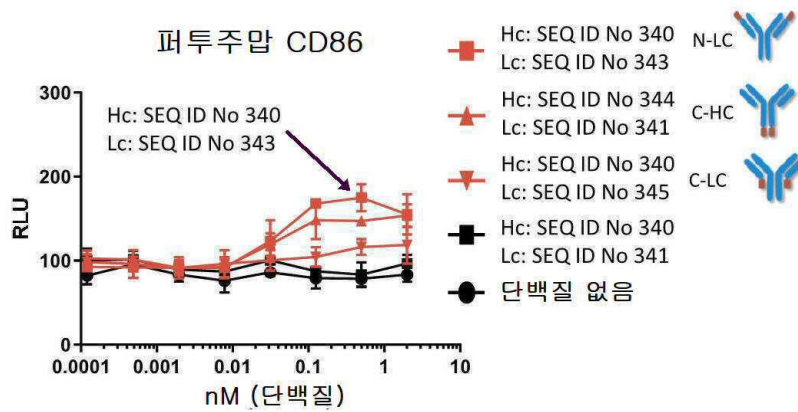
도면19a



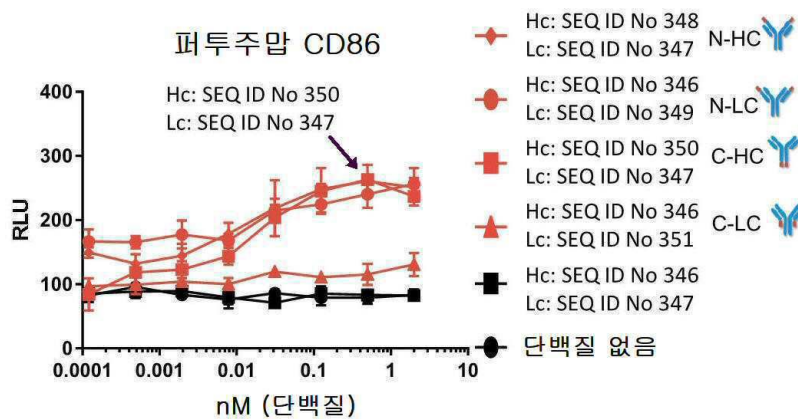
도면19b



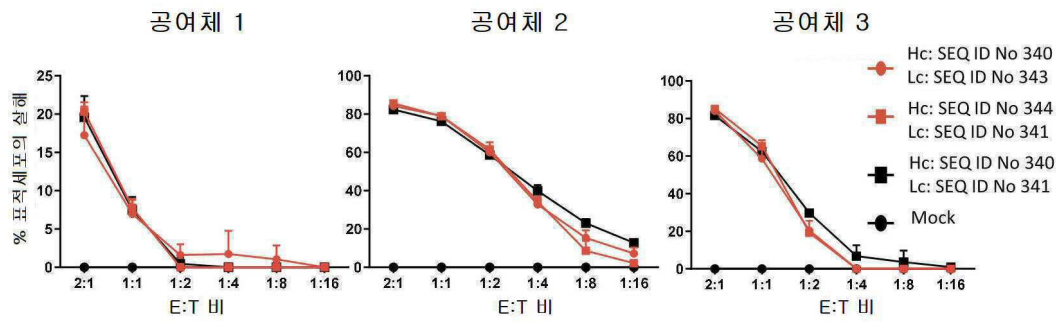
도면20a



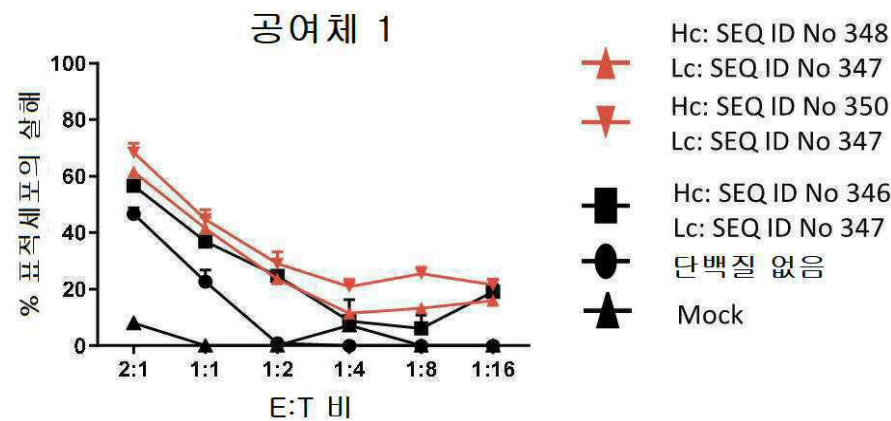
도면20b



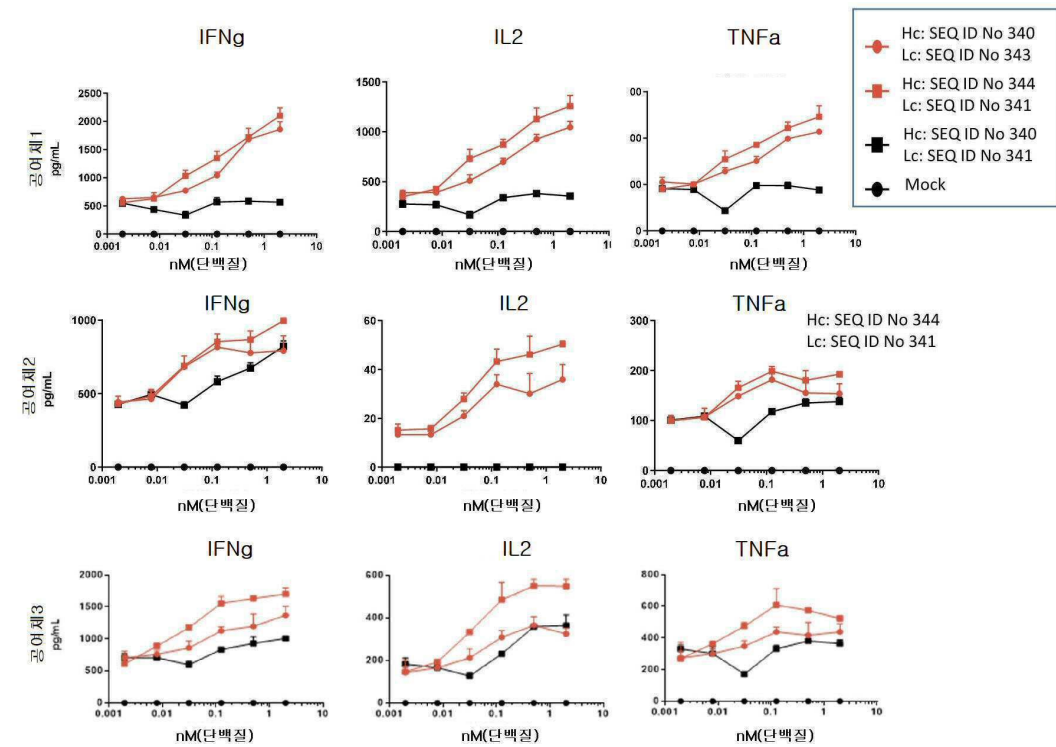
도면21a



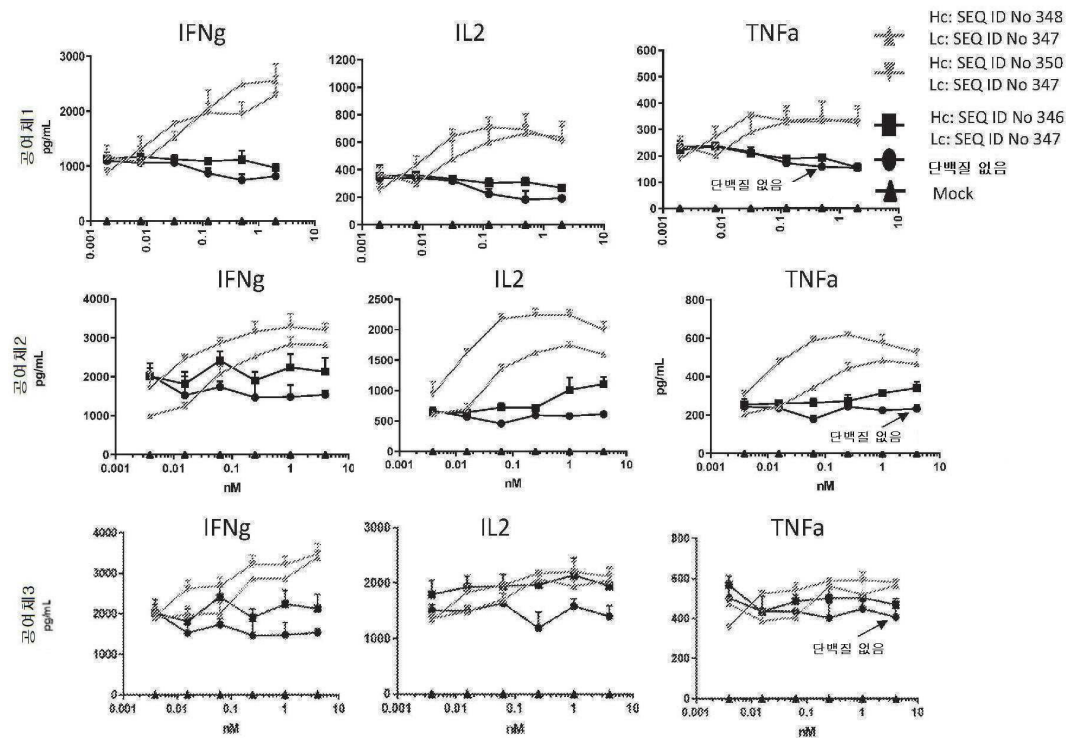
도면21b



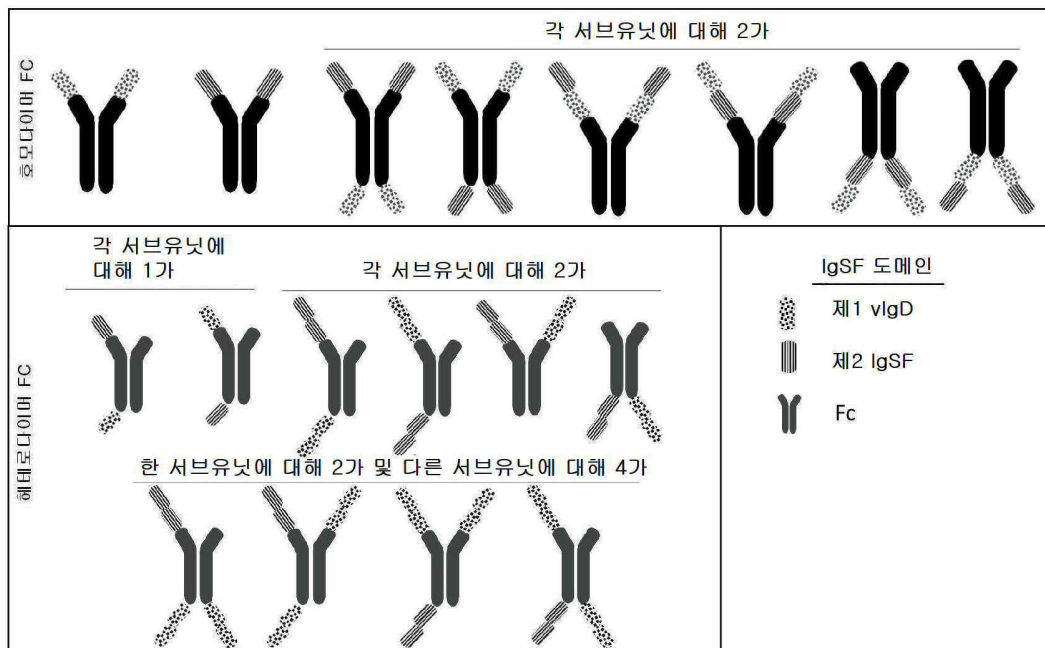
도면22a



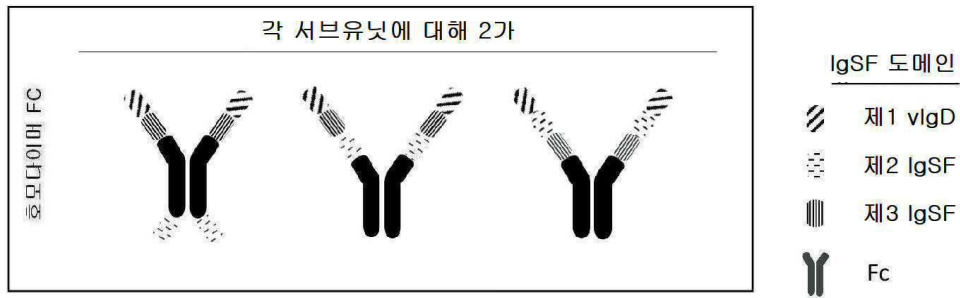
도면22b



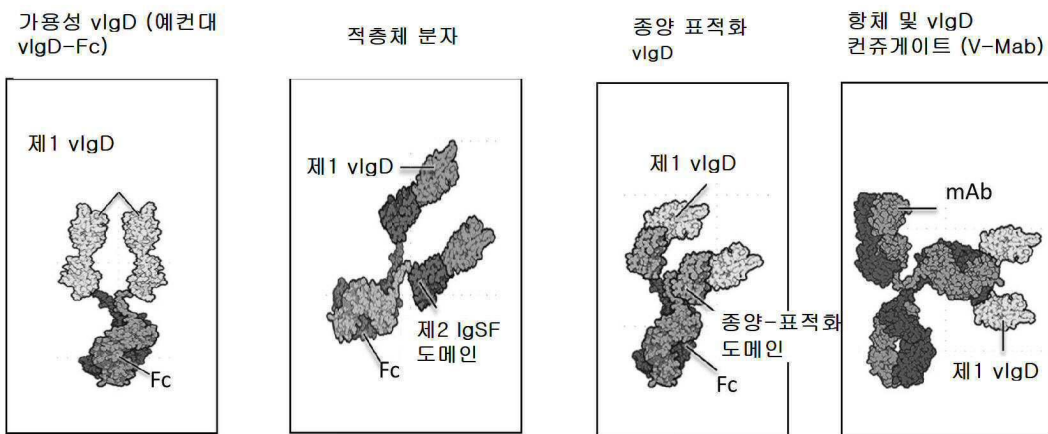
도면23a



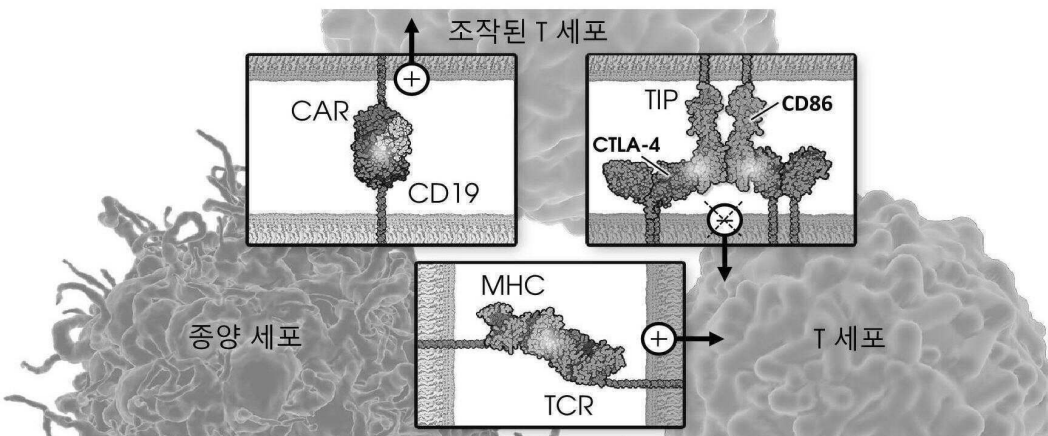
도면23b



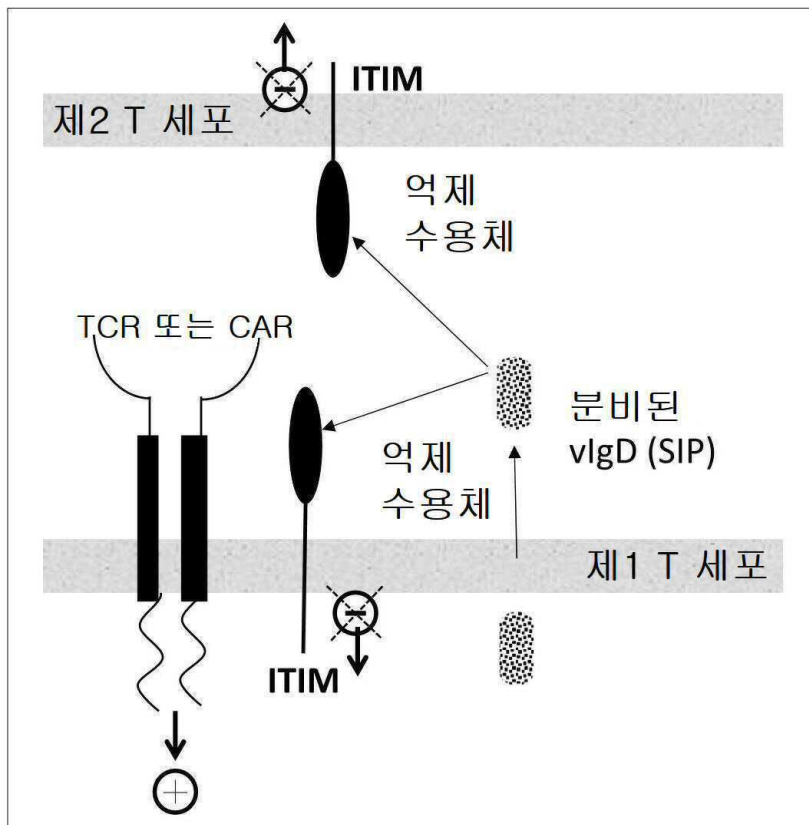
도면24a



도면24b



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Alpine Immune Sciences, Inc.

SWANSON, Ryan

<120> CD86 VARIANT IMMUNOMODULATORY PROTEINS

AND USES THEREOF

<130> 76161-20028.40

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/774,131

<151> 2018-11-30

<150> US 62/862,001

<151> 2019-06-14

<160> 353

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD80(B7-1)

<400> 1

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

1 5 10 15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys

20 25 30
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu

35 40 45
Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile

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

65 70 75 80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

85 90 95
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly

100 105 110
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

115 120 125
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr

130 135 140
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile

145 150 155 160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

165 170 175
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp

180 185 190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

195 200 205
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg

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

260 265 270
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD86(B7-2)

<400> 2

Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30

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

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
100 105 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
115 120 125

Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
130 135 140

Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145 150 155 160

His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
165 170 175

Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
180 185 190

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

Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220

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

Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
245 250 255

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
260 265 270

Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
275 280 285

Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
290 295 300

Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
305 310 315 320

Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
325

<210> 3

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD274 (PD-L1, B7-H1)

<400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

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

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 4

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PDCD1LG2(PD-L2, CD273)

<400> 4

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125

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

130 135 140
 Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

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

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

 <210> 5
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)

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

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
65 70 75 80

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

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
100 105 110

Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val
115 120 125

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser
130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser
145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp
165 170 175

Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn
180 185 190

Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr
195 200 205

Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln
210 215 220

Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp
225 230 235 240

Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
245 250 255

Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala
260 265 270

Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly
275 280 285

Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val

290 295 300
 <210> 6
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CD276(B7-H3)
 <400> 6

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

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

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

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

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu

195 200 205

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

210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr

275 280 285

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

290 295 300

Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val

340 345 350

Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu

355 360 365

Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser

370 375 380

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln

385 390 395 400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu

405 410 415

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

420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp

435 440 445
Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro

450 455 460
Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu

465 470 475 480
Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys

485 490 495
Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly

500 505 510
Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp

515 520 525
Asp Gly Gln Glu Ile Ala

530

<210> 7

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> VTCN1(B7-H4)

<400> 7

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile

1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser

20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val

65 70 75 80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met

85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn

100 105 110

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

115 120 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu

130 135 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn

145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln

165 170 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser

180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met

195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser

210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val

225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser

245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu

260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys

275 280

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<400> 8

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

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

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

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

195 200 205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 9

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CTLA4

<400> 9

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210	215	220													
<210> 10															
<211> 288															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<220>															
<223> PDCD1(PD-1)															
<400> 10															
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> 11

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICOS

<400> 11

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15

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

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95

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

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

<210> 12

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BTLA(CD272)

<400> 12

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

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

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

<210> 13

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD4

<400> 13

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile

85 90 95

Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu

100 105 110

Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn

115 120 125

Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu

130 135 140

Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly

145 150 155 160

Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu

165 170 175

Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp

225 230 235 240
 Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245 250 255
 Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260 265 270
 Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu

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

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

 405 410 415
 Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met
 420 425 430
 Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro
 435 440 445
 His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
 450 455
 <210> 14
 <211> 235
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD8A(CD8-alpha)

<400> 14

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

180 185 190

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

195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser

210 215 220
 Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 225 230 235
 <210> 15
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CD8B(CD8-beta)
 <400> 15
 Met Arg Pro Arg Leu Trp Leu Leu Leu Ala Ala Gln Leu Thr Val Leu

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

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

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

Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His
180 185 190
Leu Cys Cys Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe
195 200 205
Tyr Lys
210
<210> 16
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> LAG3
<400> 16
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys

145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175

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

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

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

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

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430

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

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 17

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAVCR2(TIM-3)

<400> 17

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
35 40 45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
50 55 60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser

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

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

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

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

 275 280 285
 Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
 290 295 300
 <210> 18
 <211> 526

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CEACAM1

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly

50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val

65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser

85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val

100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp

115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu

130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr

165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln

180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn

195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn

210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285

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

 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415

 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 450 455 460

Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
465 470 475 480

Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
485 490 495

Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
500 505 510

Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
515 520 525

<210> 19

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TIGIT

<400> 19

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> 20

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PVR(CD155)

<400> 20

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu

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

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly

100 105 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe

115 120 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys

130 135 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro

145 150 155 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln

165 170 175

Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val

180 185 190

Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu

195 200 205

Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu

210 215 220

His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val

225 230 235 240

Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr

245 250 255

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

260 265 270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro

275 280 285

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

290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala

305 310 315 320

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

His Ser Gly Ile Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala

385 390 395 400
Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
 405 410 415
Arg

<210> 21

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<223> PVRL2(CD112)

<400> 21

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro

1 5 10 15
Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305 310 315 320

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

325 330 335
Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
355 360 365

Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
370 375 380

Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
385 390 395 400

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415

Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430

Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445

Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460

Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480

Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
485 490 495

Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile
500 505 510

Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
515 520 525

Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
530 535

<210> 22

<211> 336

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD226

<400> 22

Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu His Val Tyr Arg Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Ser Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val

35 40 45

Glu Trp Phe Lys Ile Gly Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser

50 55 60

Pro Thr His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr

65 70 75 80

Phe Leu Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Pro Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp

115 120 125

Ser Phe Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn Ser His Ile Val Ser Glu Pro

130 135 140

Gly Lys Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val

145 150 155 160

Gln Ala Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu

165 170 175

Thr Tyr Cys Asn Leu Val His Gly Arg Asn Phe Thr Ser Lys Phe Pro

180 185 190

Arg Gln Ile Val Ser Asn Cys Ser His Gly Arg Trp Ser Val Ile Val

195 200 205

Ile Pro Asp Val Thr Val Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Tyr Leu

210 215 220

Gln Ala Ser Ala Gly Glu Asn Glu Thr Phe Val Met Arg Leu Thr Val

225 230 235 240
 Ala Glu Gly Lys Thr Asp Asn Gln Tyr Thr Leu Phe Val Ala Gly Gly

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

 305 310 315 320
 Ile Tyr Val Asn Tyr Pro Thr Phe Ser Arg Arg Pro Lys Thr Arg Val
 325 330 335
 <210> 23
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CD2
 <400> 23
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

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

85	90	95
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr		
100	105	110
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu		
115	120	125
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu		
130	135	140
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln		
145	150	155
160		
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp		
165	170	175
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val		
180	185	190
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu		
195	200	205
Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met		
210	215	220
Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln		
225	230	235
240		
Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val		
245	250	255
Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr		
260	265	270
Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Pro Gly His		
275	280	285
Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Val		
290	295	300
Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val		
305	310	315
320		
His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys		
325	330	335

Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn
 340 345 350

<210> 24

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD160

<400> 24

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

50 55 60

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

115 120 125

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

Ala Leu Gln Ala

180

<210> 25

<

211> 278

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200

<400> 25

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

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

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50 55 60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65 70 75 80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

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

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn Gly Thr

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

245 250 255
 Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu Ser Gln
 260 265 270

Gly Val Gln Lys Met Thr

275

<210> 26

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200R1(CD200R)

<400> 26

Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Phe Leu Val Ala Ala Ser Ser Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys

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

85

90

95

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

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

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

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

<210> 27

<211> 201

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC R3 (NKp30)

<400> 27

Met Ala Trp Met Leu Leu Leu Ile Leu Ile Met Val His Pro Gly Ser

1 5 10 15
Cys Ala Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly

20 25 30
Ser Ser Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu

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

50 55 60
Glu Val Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu

65 70 75 80
Ala Ser Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg

85 90 95
Asp Val Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val

100 105 110
Leu Gly Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu

115 120 125
Lys Glu His Pro Gln Leu Gly Ala Gly Thr Val Leu Leu Leu Arg Ala

130 135 140
Gly Phe Tyr Ala Val Ser Phe Leu Ser Val Ala Val Gly Ser Thr Val

145 150 155 160
Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys Leu Thr Trp Lys Gly Pro Arg Arg Gln Leu

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

180 185 190
His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly

195 200

<210> 28

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD80(B7-1) ECD

<400> 28

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

85 90 95

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

100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys

115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr

165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn

180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

195					200					205					
<210> 29															
<211> 224															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<220>															
<223> CD86 ECD (24-247)															
<400> 29															
Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Gln	Ala	Tyr	Phe	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro
1				5					10					15	
Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val
			20					25					30		
Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly
		35					40					45			
Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Gly	Arg	Thr	Ser
	50						55				60				
Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile	Lys
65					70					75					80
Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	His	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly
				85					90					95	
Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Asn
			100					105					110		
Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Val	Pro	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn	Val
		115						120				125			
Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ser	Ile	His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Lys
	130					135				140					
Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Tyr	Asp
145				150					155						160
Gly	Val	Met	Gln	Lys	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Thr	Glu	Leu	Tyr	Asp	Val
			165					170					175		
Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Ser	Asn	Met	Thr
			180					185					190		

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220

<210> 30

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD274 (PD-L1, B7-H1) ECD

<400> 30

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

50 55 60

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

115 120 125

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

165 170 175
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr

180 185 190
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile

195 200 205
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg

210 215 220

<210> 31

<211> 201

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PDCD1LG2(PD-L2, CD273) ECD

<400> 31

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln

65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu

85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu

100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn

130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr
 195 200
 <210> 32
 <211> 238
 <212> PRT
 <213>
 > Homo sapiens
 <220>
 <223> ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2) ECD
 <400> 32
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60
 Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
 85 90 95
 Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100 105 110
 Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro

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

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

<210> 33

<211> 438

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD276(B7-H3) ECD

<400> 33

Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1 5 10 15
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
50 55 60
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

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

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

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

 Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly
 260 265 270
 Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp
 275 280 285
 Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val
 290 295 300
 Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
 305 310 315 320

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

325 330 335
 Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr
 340 345 350
 Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp
 355 360 365
 Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln
 370 375 380

 Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val
 385 390 395 400
 Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val
 405 410 415
 Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met
 420 425 430
 Thr Phe Pro Pro Glu Ala
 435
 <210> 34
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

 <223> VTCN1(B7-H4) ECD
 <400> 34
 Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys
 20 25 30
 Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu
 35 40 45
 Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp
 50 55 60

 Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe
 65 70 75 80

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

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

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

<210> 35

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 ECD

<400> 35

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn

1 5 10 15
Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
20 25 30
Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys

35 40 45
 Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
 85 90 95
 Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
 100 105 110
 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro
 130

<210> 36

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CTLA4 ECD

<400> 36

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

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

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr

100

105

110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115

120

125

<210> 37

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PDCD1(PD-1) ECD

<400> 37

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> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ICOS ECD

<400> 38

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
20 25 30

Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His
50 55 60

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
65 70 75 80

His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro
85 90 95

Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu
100 105 110

Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys
115 120

<210> 39

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BTLA(CD272) ECD

<400> 39

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His
1 5 10 15

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

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

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

<210> 40

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD4 ECD

<400> 40

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys

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

65 70 75 80
Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
100 105 110

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

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
165 170 175

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu
180 185 190

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr
195 200 205

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys
210 215 220

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
225 230 235 240

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His
245 250 255

Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu
260 265 270

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
275 280 285

Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu
290 295 300

Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu
305 310 315 320

Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu
325 330 335

Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln

340 345 350
Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro

355 360 365

Val Gln Pro

370

<210> 41

<211> 161

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD8A(CD8-alpha) ECD

<400> 41

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

1 5 10 15
Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

20 25 30
Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe

35 40 45
Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp

50 55 60
Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr

65 70 75 80
Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala

85 90 95
Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110
Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

130 135 140
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp

<210> 42

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD8B(CD8-beta) ECD

<400> 42

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val

1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr

20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe

35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val

50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr

115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly

130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro

145

<210

> 43

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> LAG3 ECD

<400> 43

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro

35 40 45

Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg

115 120 125

Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr

130 135 140

Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn

145 150 155 160

Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg

165 170 175

Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His

180 185 190

Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser

195 200 205

Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser

210 215 220

Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
225 230 235 240
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
245 250 255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
260 265 270
Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
275 280 285
Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
290 295 300
Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
305 310 315 320
Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
325 330 335
Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
340 345 350
Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
355 360 365
Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
370 375 380
Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
385 390 395 400
Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
405 410 415
Leu Pro Ala Gly His Leu
420
<210> 44
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> HAVCR2(TIM-3) ECD

<400> 44

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro

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

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

130 135 140
Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160
Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175
Thr Ile Arg Ile Gly
180

<210> 45

<211> 394

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CEACAM1 ECD

<400> 45

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu

1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser

20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr

35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg

50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln

65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala

115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp

130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr

165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser

180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile

195 200 205

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

210 215 220

Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn

225 230 235 240

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

245 250 255
Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr

260 265 270
Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser

275 280 285
Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr

290 295 300
Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly

305 310 315 320
Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu

325 330 335
Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val

340 345 350
Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile

355 360 365
Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala

370 375 380
Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly

385 390

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TIGIT ECD

<400> 46

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> 47

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PVR(CD155) ECD

<400> 47

Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln

1

5

10

15

Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln

20

25

30

Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg

35

40

45

His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu

85

90

95

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

100

105

110

Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr

115 120 125
Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala

130 135 140
Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His

145 150 155 160
Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu

165 170 175
Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser

180 185 190
Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe

195 200 205
Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro

210 215 220
Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn

225 230 235 240
Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly

245 250 255
Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala

260 265 270
Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr

275 280 285
Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu

290 295 300
Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Ile

305 310 315 320
Ser Arg Asn

<210> 48

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PVRL2(CD112) ECD

<400> 48

Gln Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu

20 25 30

Tyr Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His

35 40 45

Gln Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu

85 90 95

His Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala

100 105 110

Thr Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr

165 170 175

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

180 185 190

Thr Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys

195 200 205

Val Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu

210 215 220

Ser Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn

225 230 235 240

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

245 250 255

Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gly Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn

305 310 315 320

Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly

325

<210> 49

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD226 ECD

<400> 49

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

1 5 10 15

Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val Glu Trp

20 25 30

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

35 40 45

His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg Asn Ala

65 70 75 80

Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro

85 90 95

Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp Ser Phe

100 105 110

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

115 120 125

Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val Gln Ala

130 135 140

Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu Thr Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Val Thr Val Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Tyr Leu Gln Ala

195 200 205

Ser Ala Gly Glu Asn Glu Thr Phe Val Met Arg Leu Thr Val Ala Glu

210 215 220

Gly Lys Thr Asp Asn Gln Tyr Thr Leu Phe Val Ala

225 230 235

<210> 50

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD2 ECD

<400> 50

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp

1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp

20 25 30

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

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

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
 180 185

<210> 51

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD160 ECD

<400> 51

Ile Asn Ile Thr Ser Ser Ala Ser Gln Glu Gly Thr Arg Leu Asn Leu
 1 5 10 15
 Ile Cys Thr Val Trp His Lys Lys Glu Glu Ala Glu Gly Phe Val Val
 20 25 30

Phe Leu Cys Lys Asp Arg Ser Gly Asp Cys Ser Pro Glu Thr Ser Leu

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

Leu Gln Gly His Phe Phe Ser Ile Leu Phe Thr Glu Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Val Thr Gly Leu Lys Gln Arg Gln His Leu Glu Phe Ser His Asn
 115 120 125
 Glu Gly Thr Leu Ser
 130

<210> 52

<211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200 ECD

<400> 52

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro
 1 5 10 15

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

Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe
 85 90 95

Gly Phe Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln
100 105 110

Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile
115 120 125

Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val
130 135 140

Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn
145 150 155 160

Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn
165 170 175

Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val
180 185 190

Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly
195 200

<210> 53

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD200R1(CD200R) ECD

<400> 53

Met Asp Glu Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val Leu Ala Glu
1 5 10 15

Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala Val Leu Cys
20 25 30

Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr Trp Glu Ile
35 40 45

Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg Lys Glu Thr
50 55 60

Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile Thr Trp Val
65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro Asp Gly Asn
 100 105 110
 Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Thr

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

180 185 190
 Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro Val Pro Gly
 195 200 205
 Ala Lys Lys Ser Ala Lys Leu
 210 215

<210> 54

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC R3 (NKp30) ECD

<400> 54

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile

20 25 30
 Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45
 Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
 50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly

85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
 100 105 110

His Pro Gln Leu Gly
 115

<210> 55

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD80(B7-1)

<400> 55

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60

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

85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn

130 135 140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr

165 170 175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn

180 185 190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

195 200 205
Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly Ile Phe

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

225 230 235 240
Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val

245 250

<210> 56

<211> 306

<212> PRT

<213> Hoo sapiens

<220>

<223> Mature CD86(B7-2)

<400> 56

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65						70						75						80	
Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	His	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly				
					85					90					95				
Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Asn				
					100					105					110				
Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Val	Pro	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn	Val				
					115					120					125				
Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ser	Ile	His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Lys				
130					135					140									
Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Tyr	Asp				
145					150					155					160				
Gly	Val	Met	Gln	Lys	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Thr	Glu	Leu	Tyr	Asp	Val				
					165					170					175				
Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Ser	Asn	Met	Thr				
180					185					190									
Ile	Phe	Cys	Ile	Leu	Glu	Thr	Asp	Lys	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro				
195					200					205									
Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	His	Ile	Pro				
210					215					220									
Trp	Ile	Thr	Ala	Val	Leu	Pro	Thr	Val	Ile	Ile	Cys	Val	Met	Val	Phe				
225					230					235					240				
Cys	Leu	Ile	Leu	Trp	Lys	Trp	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Pro	Arg	Asn	Ser				
					245					250					255				
Tyr	Lys	Cys	Gly	Thr	Asn	Thr	Met	Glu	Arg	Glu	Glu	Ser	Glu	Gln	Thr				
260					265					270									
Lys	Lys	Arg	Glu	Lys	Ile	His	Ile	Pro	Glu	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Gln				
275					280					285									
Arg	Val	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Ser	Asp	Thr				
290					295					300									
Cys	Phe																		
305																			

<210> 57

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD274 (PD-L1, B7-H1)

<400> 57

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

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile

195	200	205	
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val			
210	215	220	
Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile			
225	230	235	240
Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile			
245	250	255	
Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr			
260	265	270	

<210> 58

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mature PDCD1LG2(PD-L2, CD273)

<400> 58

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

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

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly

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

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

 Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala Ile
 245 250

 <210> 59
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Mature ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)
 <400> 59
 Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

 35 40 45
 Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
 50 55 60

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

<210> 60

<211> 506

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD276(B7-H3)

<400> 60

Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr

1 5 10 15

Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu

20 25 30

Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val

35 40 45

His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg

50 55 60

Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala

100 105 110

Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg

115 120 125

Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro

130 135 140

Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly

145 150 155 160

Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys
 225 230 235 240
 Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile
 245 250 255

 Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly
 260 265 270
 Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp
 275 280 285
 Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val
 290 295 300
 Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
 305 310 315 320

 Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser
 325 330 335
 Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr
 340 345 350
 Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp
 355 360 365
 Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln
 370 375 380

 Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val
 385 390 395 400
 Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val
 405 410 415
 Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met
 420 425 430
 Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys
 435 440 445

 Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile
 450 455 460
 Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly

465						470						475						480	
Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His	Ser	Asp				
					485					490					495				
Ser	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala										
					500					505									
<210> 61																			
<211> 258																			
<212> PRT																			
<213> Homo sapiens																			
<220>																			
<223> Mature VTCN1(B7-H4)																			
<400> 61																			
Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Ile	Ser	Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr				
1				5				10				15							
Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Asn	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Cys				
					20					25					30				
Thr	Phe	Glu	Pro	Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Gln	Trp	Leu				
35				40				45											
Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Val	His	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Lys	Asp				
50				55				60											
Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Phe				
65				70				75				80							
Ala	Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Asn	Val				
					85					90					95				
Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Lys	Cys	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys				
100					105					110									
Gly	Lys	Gly	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Ser	Met				
115					120					125									
Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Arg	Cys				
130				135				140											
Glu	Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Trp	Ala	Ser	Gln				
145				150				155				160							

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

Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn
180 185 190

Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg
210 215 220

Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser
225 230 235 240

Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met

245 250 255
Leu Lys

<210> 62

<211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD28

<400> 62

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
1 5 10 15

Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
20 25 30

Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys

35 40 45
Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
50 55 60

Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile

85 90 95
Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly

100 105 110
Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe

115 120 125
Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val

130 135 140
Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp

145 150 155 160
Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met

165 170 175
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala

180 185 190

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

195 200

<210> 63

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CTLA4

<400> 63

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp

50 55 60

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

65				70				75				80			
Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val
85				90				95							
Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr
100				105				110							
Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Leu
115				120				125							
Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Phe	Tyr	Ser	Phe
130				135				140							

Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro
145 150 155 160

Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys
165 170 175

Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
180 185

<210> 64

<211> 268

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mature PDCD1(PD-1)

<400> 64

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

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

 260 265

<210> 65

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature ICOS

<400> 65

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

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

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

 Val Thr Leu

<210> 66

<211> 259

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature BTLA(CD272)

<400> 66

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His

1	5	10	15
Ser	Ile	Leu	Ala
Gly	Asp	Pro	Phe
Glu	Leu	Glu	Cys
Pro	Val	Lys	Tyr
20	25	30	
Cys	Ala	Asn	Arg
Pro	His	Val	Thr
Trp	Cys	Lys	Leu
Asn	Gly	Thr	Thr
35	40	45	
Cys	Val	Lys	Leu
Glu	Asp	Arg	Gln
Thr	Ser	Trp	Lys
Glu	Glu	Lys	Asn
50	55	60	
Ile	Ser	Phe	Phe
Ile	Leu	His	Phe
Glu	Pro	Val	Leu
Pro	Asn	Asp	Asn
65	70	75	80
Gly	Ser	Tyr	Arg
Cys	Ser	Ala	Asn
Phe	Gln	Ser	Asn
Leu	Ile	Glu	Ser
85	90	95	
His	Ser	Thr	Thr
Leu	Tyr	Val	Thr
Asp	Val	Lys	Ser
Ala	Ser	Glu	Arg
100	105	110	
Pro	Ser	Lys	Asp
Glu	Met	Ala	Ser
Arg	Pro	Trp	Leu
Leu	Tyr	Arg	Leu
115	120	125	
Leu	Pro	Leu	Gly
Gly	Leu	Pro	Leu
Leu	Ile	Thr	Thr
Cys	Phe	Cys	Leu
130	135	140	
Phe	Cys	Cys	Leu
Arg	Arg	His	Gln
Gly	Lys	Gln	Asn
Glu	Leu	Ser	Asp
145	150	155	160
Thr	Ala	Gly	Arg
Glu	Ile	Asn	Leu
Val	Asp	Ala	His
Leu	Lys	Ser	Glu
165	170	175	
Gln	Thr	Glu	Ala
Ser	Thr	Arg	Gln
Asn	Ser	Gln	Val
Leu	Leu	Ser	Glu
180	185	190	
Thr	Gly	Ile	Tyr
Asp	Asn	Asp	Pro
Asp	Pro	Asp	Leu
Cys	Phe	Arg	Met
Gln	Glu		
195	200	205	
Gly	Ser	Glu	Val
Tyr	Ser	Asn	Pro
Cys	Leu	Glu	Glu
Asn	Lys	Pro	Gly
210	215	220	
Ile	Val	Tyr	Ala
Ser	Leu	Asn	His
Ser	Val	Ile	Gly
Pro	Asn	Ser	Arg
225	230	235	240
Leu	Ala	Arg	Asn
Val	Lys	Glu	Ala
Pro	Thr	Glu	Tyr
Ala	Ser	Ile	Cys
245	250	255	

Val Arg Ser

<210> 67

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD4

<400> 67

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys

1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln

50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp

65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu

85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln

100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val

115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu

130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr

145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val

165 170 175

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu

180	185	190	
Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr			
195	200	205	
Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys			
210	215	220	
Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg			
225	230	235	240
Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His			
245	250	255	
Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu			
260	265	270	
Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn			
275	280	285	
Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu			
290	295	300	
Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu			
305	310	315	320
Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu			
325	330	335	
Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln			
340	345	350	
Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro			
355	360	365	
Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu			
370	375	380	
Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg			
385	390	395	400
Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu			
405	410	415	
Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro			
420	425	430	

Ile

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD8A(CD8-alpha)

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala

85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125

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

130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

165 170 175

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

180 185 190
 Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 210
 <210> 69
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

 <223> Mature CD8B(CD8-beta)
 <400> 69
 Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
 1 5 10 15
 Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45
 Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60

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

 Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu
 145 150 155 160

Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg
165 170 175
Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe Tyr Lys
180 185
<210> 70
<211> 497
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Mature LAG3
<400> 70
Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
1 5 10 15
Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
20 25 30
Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
35 40 45
Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
50 55 60
Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
65 70 75 80
Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
85 90 95
Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
115 120 125
Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
130 135 140
Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
145 150 155 160
Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg

165 170 175
Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His

180 185 190
Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser

195 200 205
Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser

210 215 220
Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu

225 230 235 240
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu

245 250 255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro

260 265 270
Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe

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

290 295 300
Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu

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

325 330 335
Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe

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

355 360 365
Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys

370 375 380
Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr

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

405 410 415

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

<210> 71

<211> 280

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature HAVCR2(TIM-3)

<400> 71

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15
Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30
Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45
Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60
Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80
Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95
Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys

100 105 110
 Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro

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

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

 245 250 255
 Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
 260 265 270
 Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
 275 280
 <210> 72
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Mature CEACAM1
 <400> 72
 Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser

20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr

35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg

50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln

65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala

115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp

130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr

165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser

180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile

195 200 205

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

210 215 220

Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr

260 265 270
Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser

275 280 285
Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr

290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly

305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu

325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val

340 345 350
Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile

355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu Ala Cys

405 410 415
Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg Asp Leu

420 425 430

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

435 440 445

Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu Asn Phe

450 455 460

Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser Leu Thr

465 470 475 480

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

485 490

<210> 73

<211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature TIGIT

<400> 73

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

Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu

115 120 125

Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys

130 135 140

Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys

145 150 155 160

Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly

165 170 175

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

180 185 190

Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser

195 200 205

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

210

215

220

<210> 74

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature PVR(CD155)

<400> 74

Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln

1 5 10 15

Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln

20 25 30

Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg

35 40 45

His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro

50

55

60

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

65 70 75 80

Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu

85 90 95

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

100 105 110

Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr

115

120

125

Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala

130 135 140

Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser

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

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

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

 370 375 380
 Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg
 385 390 395
 <210> 75
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Mature PVRL2(CD112)

<400> 75

Gln Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu

20 25 30

Tyr Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His

35 40 45

Gln Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu

85 90 95

His Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala

100 105 110

Thr Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr

165 170 175

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

180 185 190

Thr Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys

195 200 205

Val Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu

210 215 220

Ser Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn

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

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

 Gln Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp
 355 360 365
 Leu Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu
 370 375 380
 Glu Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu
 385 390 395 400
 His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr
 405 410 415

 Glu Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg
 420 425 430
 Ser Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro
 435 440 445
 Val Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro
 465 470 475 480

Ile Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly

485 490 495

Lys Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val

500 505

<210> 76

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD226

<400> 76

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

1 5 10 15

Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val Glu Trp

20 25 30

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

35 40 45

His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg Asn Ala

65 70 75 80

Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro

85 90 95

Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp Ser Phe

100 105 110

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

115 120 125

Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val Gln Ala

130 135 140

Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu Thr Tyr

145 150 155 160

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

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

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

275 280 285
 Ser Gln Pro Thr Asn Gln Ser Met Asp Asp Thr Arg Glu Asp Ile Tyr
 290 295 300
 Val Asn Tyr Pro Thr Phe Ser Arg Arg Pro Lys Thr Arg Val
 305 310 315

<210> 77

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD2

<400> 77

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
 1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
 20 25 30
 Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
 35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
 50 55 60
 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

290 295 300
 Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn
 325
 <210> 78
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Mature CD160
 <400> 78
 Ile Asn Ile Thr Ser Ser Ala Ser Gln Glu Gly Thr Arg Leu Asn Leu
 1 5 10 15
 Ile Cys Thr Val Trp His Lys Lys Glu Glu Ala Glu Gly Phe Val Val
 20 25 30
 Phe Leu Cys Lys Asp Arg Ser Gly Asp Cys Ser Pro Glu Thr Ser Leu
 35 40 45
 Lys Gln Leu Arg Leu Lys Arg Asp Pro Gly Ile Asp Gly Val Gly Glu
 50 55 60

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

 Glu Gly Thr Leu Ser Ser Gly Phe Leu Gln Glu Lys Val Trp Val Met
 130 135 140
 Leu Val Thr Ser Leu Val Ala Leu Gln Ala
 145 150

<210> 79

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD200

<400> 79

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro

1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val

20 25 30

Thr Trp Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn

65 70 75 80

Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile

115 120 125

Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val

130 135 140

Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn

145 150 155 160

Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn

165 170 175

Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val

180 185 190

Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Tyr Trp Phe Ser Val Pro

195 200 205
Leu Leu Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Ile Leu Leu Val Leu Ile Ser

210 215 220
Ile Leu Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu
225 230 235 240
Ser Gln Gly Val Gln Lys Met Thr

245

<210> 80

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature CD200R1(CD200R)

<400> 80

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

1 5 10 15

Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala Val Leu Cys

20 25 30
Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr Trp Glu Ile

35 40 45

Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg Lys Glu Thr

50 55 60

Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile Thr Trp Val

65 70 75 80

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

85 90 95
Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro Asp Gly Asn

100 105 110

Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Gln Glu Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys Ser Thr Cys

165 170 175

His Trp Glu Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His Val Ser His

180 185 190

Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro Val Pro Gly

195 200 205

Ala Lys Lys Ser Ala Lys Leu Tyr Ile Pro Tyr Ile Ile Leu Thr Ile

210 215 220

Ile Ile Leu Thr Ile Val Gly Phe Ile Trp Leu Leu Lys Val Asn Gly

225 230 235 240

Cys Arg Lys Tyr Lys Leu Asn Lys Thr Glu Ser Thr Pro Val Val Glu

245 250 255

Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys Asn Asn Pro

260 265 270

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

275 280 285

Glu Val Asp Thr Asp Leu His Thr Leu

290 295

<210> 81

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature NC R3 (NKp30)

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

Val Val Pro Ala Pro Leu Pro Pro Pro Cys Gly Ser Ser Ala His Leu
 165 170 175
 Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly
 180

<210> 82

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> VSIG8

<400> 82

Met Arg Val Gly Gly Ala Phe His Leu Leu Leu Val Cys Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Ser Ala Val Arg Ile Asn Gly Asp Gly Gln Glu Val Leu
 20 25 30

Tyr Leu Ala Glu Gly Asp Asn Val Arg Leu Gly Cys Pro Tyr Val Leu

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Leu Arg Arg Lys Tyr Ala Pro Pro Pro Cys Gly Gly Pro
 355 360 365
 Glu Asp Val Ala Leu Ala Pro Cys Thr Ala Ala Ala Ala Cys Glu Ala
 370 375 380
 Gly Pro Ser Pro Val Tyr Val Lys Val Lys Ser Ala Glu Pro Ala Asp
 385 390 395 400
 Cys Ala Glu Gly Pro Val Gln Cys Lys Asn Gly Leu Leu Val
 405 410

<210> 83

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature VSIG8

<400> 83

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

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

65	70							75							80				
Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ile	Asn	Leu	Met	Asn	Leu	Gln				
				85			90				95								
Val	Ser	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Thr	Met				
				100			105				110								
Ala	Thr	Arg	Lys	Val	Ile	Val	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Pro				
				115			120				125								
Met	Cys	Trp	Thr	Glu	Gly	His	Met	Thr	Tyr	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Leu				
				130			135				140								
Lys	Cys	Tyr	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Tyr	Lys	Trp	Ala				
				145			150				155					160			
Lys	Ile	Ser	Gly	His	His	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Ala	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser				
				165			170				175								
Gln	His	Ser	Tyr	His	Ser	Glu	Leu	Ser	Tyr	Gln	Glu	Ser	Phe	His	Ser				
				180			185				190								
Ser	Ile	Asn	Gln	Gly	Leu	Asn	Asn	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Lys	Asp	Ile				
				195			200				205								
Ser	Arg	Ala	Asp	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Thr	Val	Ala	Asn	Asn	Val				
				210			215				220								
Gly	Tyr	Ser	Val	Cys	Val	Val	Glu	Val	Lys	Val	Ser	Asp	Ser	Arg	Arg				
				225			230				235					240			
Ile	Gly	Val	Ile	Ile	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly				
				245			250				255								
Cys	Leu	Ala	Val	Gly	Ile	Trp	Gly	Leu	Val	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly				
				260			265				270								
Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Tyr	Gly	Asn	Gly	Gly				
				275			280				285								
Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Asp	Leu	Ala	Ser	Glu	Ile	Arg	Glu				
				290			295				300								
Asp	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Arg	Val				
				305			310				315					320			

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

370 375 380
 Val Gln Cys Lys Asn Gly Leu Leu Val
 385 390

<210> 84

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> VSIG8 ECD

<400> 84

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

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

100 105 110
 Ala Thr Arg Lys Val Ile Val Thr Val Gln Ala Arg Pro Ala Val Pro

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

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

225 230 235 240
Ile Gly

<210> 85

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v1

<400> 85

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Ala	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile	Lys				
65					70					75					80				
Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Tyr	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly				
85					90					95									
Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Asn				
100					105					110									
Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Val	Pro	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn	Val				
115					120					125									
Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ser	Ile	His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Lys				
130					135					140									
Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Tyr	Asp				
145					150					155					160				
Gly	Val	Met	Gln	Lys	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Thr	Glu	Leu	Tyr	Asp	Val				
165					170					175									
Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Ser	Asn	Met	Thr				
180					185					190									
Ile	Phe	Cys	Ile	Leu	Glu	Thr	Asp	Lys	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro				
195					200					205									
Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	His	Ile	Pro				
210					215					220									
<210> 86																			
<211> 224																			
<212> PRT																			
<213> Artificial Sequence																			
<220>																			
<223> CD86 ECD v2																			
<400> 86																			
Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Gln	Ala	Tyr	Phe	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro				
1				5				10				15							
Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val				
20					25					30									
Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gln				

35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Gly Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

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

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

 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Val Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 87
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v3
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (215)...(215)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (217)...(217)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (218)...(218)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 87

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Xaa Pro Xaa Xaa Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 88

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v4

<400> 88

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

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

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Asn Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

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

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220

<210> 89

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v5

<400> 89

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

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

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

<210> 90

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v6

<400> 90

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

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Met Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Asp Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp His Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 91

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v7

<220>

<221> VARIANT

<222> (201)...(201)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 91

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

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

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

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

 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 92
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v8
 <400> 92
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asp Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Arg
65 70 75 80

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asp Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asp Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 93

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v9

<400> 93

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly

85 90 95

Leu Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Ala Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Val Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 94

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v10

<400> 94

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210

215

220

<210> 95

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v11

<400> 95

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1

5

10

15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20

25

30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Met Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35

40

45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50

55

60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65

70

75

80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85

90

95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100

105

110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115

120

125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130

135

140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ile Ser Ser Ser Val Pro Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220
<210> 96
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD86 ECD v12
<400> 96
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Lys Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Ser Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

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

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 97
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD86 ECD v13
<400> 97

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

130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160
Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val

165 170 175
Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 98

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v14

<400> 98

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Pro Gln Ile Lys

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

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Arg Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 99

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v15

<400> 99

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Leu Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

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

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

 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 100
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v16
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (212)...(212)
 <223> Xaa is any amino acid
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (221)...(221)
 <223> Xaa is any amino acid

<400> 100

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

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

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

195 200 205
Phe Ser Ile Xaa Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Xaa His Ile Pro
210 215 220

<210> 101

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v17

<220>

<221> VARIANT

<222> (221)...(221)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 101

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Glu Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Asn

180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Xaa His Ile Pro
 210 215 220

<210> 102

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v18

<220>

<221> VARIANT

<222> (215)...(215)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 102

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30
 Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Xaa Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 103

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v19

<220>

<221> VARIANT

<222> (212)...(212)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (215)...(215)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 103

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Ile Tyr Leu Gly

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

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

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

210 215 220
 <210> 104
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v20
 <400> 104
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Val Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

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

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

 Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 105
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v21

<400> 105

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

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

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

195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 106

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v22

<400> 106

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Asn Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210

215

220

<210> 107

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v23

<400> 107

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50

55

60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115

120

125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190
 Val Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 108
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v24
 <400> 108
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

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

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

 Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160

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

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp Thr Phe
210 215 220

<210> 109

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v25

<400> 109

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

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

100 105 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160
Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val

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

<210> 110

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v26

<400> 110

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

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

Ser Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 111

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v27

<400> 111

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 112

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v28

<400> 112

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

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

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

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 113

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v29

<400> 113

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30
 Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

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

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

 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 114
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v30
 <400> 114

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

<210> 115

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v31

<400> 115

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 116

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v32

<400> 116

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195	200	205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile		
210	215	220
<210> 117		
<211> 224		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> CD86 ECD v33		
<400> 117		
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro		
1	5	10
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val		
20	25	30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly		
35	40	45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser		
50	55	60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys		
65	70	75
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly		
85	90	95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn		
100	105	110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val		
115	120	125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys		
130	135	140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp		
145	150	155
Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val		

165 170 175
 Ser Ile Arg Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 118
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CD86 ECD v34
 <400> 118
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

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

 Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175
 Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Val Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 119
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD v35
 <400> 119
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110
 Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Ser Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

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

210 215 220

<210> 120

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v36

<400> 120

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

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 121

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v37

<400> 121

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 122

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86(B7-2) IgV WT

<400> 122

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

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

Glu Leu Ser

<210> 123

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86(B7-2) IgV (24-134)

<400> 123

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

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

<210> 124

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v44

<400> 124

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 125

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v45

<400> 125

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

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

<210> 126

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v46

<400> 126

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

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

<210> 127

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v47

<400> 127

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 128

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v48

<400> 128

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser

50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 129

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v49

<400> 129

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

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

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 130

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v50

<400> 130

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 131

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgC WT v1

<400> 131

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

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

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

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 132

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgC WT v2

<400> 132

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

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

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

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

 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220
 <210> 133
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 IgC WT v3
 <400> 133
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 134

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 WT IgC v4

<400> 134

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

<210> 135

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 NKP30 Stack v1

<400> 135

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly

85 90 95

Leu Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Ala Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

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

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

 Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu His
 340 345 350
 Pro Gln Leu
 355
 <210> 136
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 NKP30 Stack v2
 <400> 136
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35	40	45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser		
50	55	60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys		
65	70	75
80		
Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly		
85	90	95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn		
100	105	110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val		
115	120	125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys		
130	135	140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp		
145	150	155
160		
Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val		
165	170	175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr		
180	185	190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro		
195	200	205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro		
210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu		
225	230	235
240		
Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser Ala		
245	250	255
Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Val Ala Ile Gly		
260	265	270
Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val Arg		
275	280	285

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

Pro Gln Leu
 355

<210> 137

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 NKP30 Stack v3

<400> 137

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

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

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

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

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

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

 Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val Arg
 305 310 315 320
 Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly Leu
 325 330 335
 Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu His
 340 345 350
 Pro Gln Leu
 355
 <210> 138

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 NKP30 Stack v4

<400> 138

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Val Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

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

 Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Val Ala Ile Gly
 260 265 270
 Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val Arg
 275 280 285
 Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Val Pro Leu Ala Pro Ser
 290 295 300
 Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val Arg
 305 310 315 320

 Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly Leu
 325 330 335
 Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu His
 340 345 350
 Pro Gln Leu
 355
 <210> 139
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 NKP30 Stack v5
 <400> 139
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val Arg

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

Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu His
 340 345 350
 Pro Gln Leu
 355

<210> 140

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 NKP30 Stack v6

<400> 140

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

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

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

Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu His Pro Gln Leu
 225 230 235

<210> 141

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v51

<400> 141

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

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

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

 100 105 110

<210> 142

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v52

<400> 142

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

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

<210> 143

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v53

<400> 143

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

<210> 144

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v54

<400> 144

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Lys Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Asn Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 145

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v55

<400> 145

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro

1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 146

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v56

<400> 146

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1					5					10					15				
Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val				
20				25				30											
Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly				
35				40				45											
Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Gly	Arg	Thr	Ser				
50				55				60											
Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile	Lys				
65				70				75				80							

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

<210> 147

$\langle 211 \rangle$ 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> CD86 IgV v57

<400> 147

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

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

85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110
<210> 148
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD86 IgV v58
<400> 148
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asp Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Arg
65 70 75 80
Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Phe Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly
85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110
<210> 149
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD86 IgV v59
<400> 149
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

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

100 105 110

<210> 150

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v60

<400> 150

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80
Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100	105	110
<210> 151		
<211> 111		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> CD86 IgV v61		
<400> 151		
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro		
1 5 10 15		
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val		
20 25 30		
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Met Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly		
35 40 45		
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser		
50 55 60		
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys		
65 70 75 80		
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly		
85 90 95		
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala		
100 105 110		

<210> 152

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v62

<400> 152

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro		
1 5 10 15		
Cys Lys Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val		

20 25 30
 Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Ser Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

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

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v63

<400> 153

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

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

<210> 154

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v64

<400> 154

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Pro Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v65

<400> 155

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95
 Met Ile Arg Ile His His Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110

<210> 156

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v66

<400> 156

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110

<210> 157

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v67

<400> 157

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 158

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v68

<400> 158

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 159

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v69

<400> 159

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Ile Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asn Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 160

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v70

<400> 160

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Val Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 161

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v71

<400> 161

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

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

<210> 162

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v72

<400> 162

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

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

<210> 163

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v73

<400> 163

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 164

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v74

<400> 164

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

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

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 165

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v75

<400> 165

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

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

100 105 110

<210> 166

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v76

<400> 166

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Ile Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 167

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v77

<400> 167

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser

50 55 60

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

<210> 168

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v78

<400> 168

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

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

<210> 169

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v79

<400> 169

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

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

<210> 170

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v80

<400> 170

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

65						70						75						80
Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Leu	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly			
					85						90						95	
Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala				
					100						105						110	
<210> 171																		
<211> 111																		
<212> PRT																		
<213> Artificial Sequence																		
<220>																		
<223> CD86 IgV v81																		
<400> 171																		
Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Gln	Ala	Tyr	Phe	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro			
1					5					10					15			
Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val			
					20						25						30	
Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly			
					35						40						45	
Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Gly	Arg	Thr	Ser			
					50						55						60	
Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile	Lys			
					65						70						75	
					70						75						80	
Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Leu	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly			
					85						90						95	
Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala				
					100						105						110	
<210> 172																		
<211> 111																		
<212> PRT																		
<213> Artificial Sequence																		
<220>																		
<223> CD86 IgV v82																		

<400> 172

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

100 105 110

<210> 173

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v83

<400> 173

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

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

100 105 110

<210> 174

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v84

<400> 174

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
100 105 110

<210> 175

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v85

<400> 175

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

<210> 176

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v86

<400> 176

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

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly

85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110
 <210> 177
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 IgV v87
 <400> 177
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

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

 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110
 <210> 178
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 IgV WT v1
 <400> 178
 Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Ala Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 179

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v2

<400> 179

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Gly Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85

90

95

Glu Leu Ser

<210> 180

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v3

<400> 180

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 181

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v4

<400> 181

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

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

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

<210> 182

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v5

<400> 182

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

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 183

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v6

<400> 183

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Thr Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 184

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v7

<400> 184

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45

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

<210> 185

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v8

<400> 185

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

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

<210> 186

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v9

<400> 186

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Thr Pro Thr Gly Leu Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 187

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v10

<400> 187

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

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

Glu Leu Ser

<210> 188

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v11

<400> 188

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

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

Glu Leu Ser

<210> 189

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v12

<400> 189

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

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

<210> 190

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v13

<400> 190

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

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Lys Cys Ile Ile
 65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95
 Glu Leu Ser

<210> 191

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v14

<400> 191

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60

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

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 192

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v15

<400> 192

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Gly Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Leu Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His His Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 193

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v16

<400> 193

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50

55

60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65

70

75

80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85

90

95

Glu Leu Ser

<210> 194

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v17

<400> 194

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1

5

10

15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20

25

30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35

40

45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50

55

60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65

70

75

80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85

90

95

Glu Leu Ser

<210> 195

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v18

<400> 195

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile

65 70 75 80

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 196

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v19

<400> 196

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Ile Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asn Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

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

<210> 197

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v20

<400> 197

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

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

<210> 198

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v21

<400> 198

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
65 70 75 80

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 199

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v22

<400> 199

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
65 70 75 80

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 200

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v23

<400> 200

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

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

Glu Leu Ser

<210> 201

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v24

<400> 201

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

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

<210> 202

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v25

<400> 202

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
 20 25 30
 Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
 35 40 45
 Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 50 55 60
 Leu His Asn Leu Gln Ile Met Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Thr Ile
 65 70 75 80

His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 203

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v26

<400> 203

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

His His Ile Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 204

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v27

<400> 204

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
35 40 45

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

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 205

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v28

<400> 205

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu
1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 206

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v29

<400> 206

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Thr Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 207

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v30

<400> 207

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 208

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v31

<400> 208

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 209

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v32

<400> 209

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 210

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v33

<400> 210

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

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

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95
Glu Leu Ser

<210> 211

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v34

<400> 211

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu
1 5 10 15
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

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

Glu Leu Ser

<210> 212

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v35

<400> 212

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Thr Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 213

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v36

<400> 213

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
50 55 60

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

<210> 214

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v37

<400> 214

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
1 5 10 15

Ser Leu Gly Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
65 70 75 80

Tyr His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 215

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v81

<400> 215

Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 216

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v82

<400> 216

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

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

<210> 217

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v83

<400> 217

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

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

<210> 218

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v84

<400> 218

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 219

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v85

<400> 219

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80
 Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 220

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v86

<400> 220

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

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

Glu Leu Ser

<210> 221

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV WT v87

<400> 221

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val

20 25 30

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser

35 40 45

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg

50 55 60

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile

65 70 75 80

Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser

85 90 95

Glu Leu Ser

<210> 222

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 222

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 223

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 4GS Linker

<400> 223

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 224

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3x G4S Linker

<400> 224

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

1 5 10 15

<210> 225

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2x G4S Linker

<400> 225

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 226

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 226

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 227

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GS(G4S)3 linker

<400> 227

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser

<210> 228

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GS(G4S)5 linker

<400> 228

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 229

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG1 Fc

<400> 229

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu 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 Glu Glu Met 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> 230

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Stack Fc (homodimeric)

<400> 230

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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
 225 230
 <210> 231
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> NKp30 variant

<400> 231

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Val Ala Ile
20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Val Pro Leu Ala Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
100 105 110

His Pro Gln Leu
115

<210> 232

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 variant v2

<400> 232

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
50 55 60

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

His Pro Gln Leu

115

<210> 233

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 WT ECD TIP

<400> 233

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

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140
 Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175

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

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

 Cys Phe
 305
 <210> 234
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 ECD TIP v1
 <400> 234
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

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

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

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

 Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser
 245 250 255
 Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr

260 265 270
 Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln
 275 280 285
 Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
 290 295 300

Cys Phe

305

<210> 235

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v2

<400> 235

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

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

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125
 Tyr Ile Asn Leu Ala Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175

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

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

Cys Phe

305

<210> 236

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v3

<400> 236

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

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

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

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

 Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser
 245 250 255
 Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr
 260 265 270

Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln
275 280 285

Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
290 295 300

Cys Phe

305

<210> 237

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v4

<400> 237

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Val Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160
 Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175

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

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

Cys Phe

305

<210> 238

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v5

<400> 238

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

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

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

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

 Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser
 245 250 255
 Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr
 260 265 270
 Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln

275 280 285
 Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
 290 295 300

Cys Phe

305

<210> 239

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v6

<400> 239

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Ile Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val Ile Ile Cys Val Met Val Phe
225 230 235 240

Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser
245 250 255

Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr
260 265 270

Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln
275 280 285

Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
290 295 300

Cys Phe

305

<210> 240

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v7

<400> 240

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45
 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60
 Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110

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

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

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

Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
290 295 300

Cys Phe

305

<210> 241

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD TIP v8

<400> 241

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Arg Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val Ile Ile Cys Val Met Val Phe

225 230 235 240

Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser

245 250 255

Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr

260 265 270

Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln

275 280 285

Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr

290 295 300

Cys Phe

305

<210> 242

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PAS

<400> 242

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

35 40 45
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 50 55 60
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 65 70 75 80
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 85 90 95
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 100 105 110

 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 115 120 125
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 130 135 140
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 165 170 175

 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 180 185 190
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 195 200 205
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 210 215 220
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 225 230 235 240

 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 245 250 255
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 260 265 270
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 275 280 285

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 290 295 300

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 340 345 350
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 355 360 365

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 370 375 380
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 385 390 395 400

<210> 243

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A protein

<400> 243

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 244

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> eGFP

<400> 244

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

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

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

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
180 185 190
Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
195 200 205
Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
210 215 220
Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235
<210>
245

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Green fluorescent protein

<400> 245

Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu

1 5 10 15

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly

20 25 30

Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His

65 70 75 80

Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr

85 90 95

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

100 105 110

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp

115 120 125

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr

130 135 140

Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile

145 150 155 160

Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln

165 170 175

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

180 185 190

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys

195 200 205

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 210 215 220
 Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235
 <210>
 246
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> eGFP
 <400> 246
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu

195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

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

225 230 235

<210> 247

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> (EAAAK)₅ linker

<400> 247

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

1 5 10 15

Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

20 25

<210> 248

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG-tag

<400> 248

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 249

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 6xHis tag

<400> 249

His His His His His His

1 5

<210> 250

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> rabbit Fc

<400> 250

Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln

50 55 60

Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr

65 70 75 80

Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Glu Asp Trp Leu Arg

85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val

145 150 155 160

Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

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

Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val
195 200 205

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

Ser Pro Gly Lys

225

<210> 251

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> mouse Fc2b

<400> 251

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys
1 5 10 15

Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr
35 40 45

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
50 55 60

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
65 70 75 80

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
85 90 95

Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly

225 230 235

<210> 252

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Knob Fc

<400> 252

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met 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> 253
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> wild-type human IgG1 Fc - delK
 <400> 253
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

 Pro Glu Leu Leu 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 Glu Glu Met 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
 225 230
 <210> 254
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> IgG1 Fc C220S

<400> 254

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu 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 Glu Glu Met 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> 255

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc

<400> 255

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu 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 Cys Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys 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 Glu Glu Met 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> 256
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Fc1.1
 <400> 256
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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> 257

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc

<400> 257

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

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 258

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Stack Fc (homodimeric)

<400> 258

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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> 259

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEFL

<400> 259

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

Pro Glu Leu Leu 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 Cys Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys 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 Glu Glu Met 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
 225 230
 <210> 260
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc1.1

<400> 260

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

Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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
225 230

<210> 261

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc

<400> 261

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195				200				205							
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
210				215				220							
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly										
225				230											
<210> 262															
<211> 235															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<223> IgG2 Fc															
<400> 262															
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro
1				5				10				15			
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
20				25				30							
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
35				40				45							
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
50				55				60							
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
65				70				75				80			
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
85				90				95							
Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
100				105				110							
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys
115				120				125							
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
130				135				140							
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe

145						150						155					160
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
					165					170					175		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
			180						185					190			
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
		195						200					205				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
	210						215					220					
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
225					230					235							
<210>	263																
<211>	229																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220>																	
<223>	IgG4 Fc																
<400>	263																
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe		
1				5				10						15			
Leu	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

> 264

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG4 Fc S228P

<400> 264

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu 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> 265
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> EAAAK linker
 <400> 265
 Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5

<210> 266

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> (EAAAK)₃ linker

<400> 266

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

1 5 10 15

<210> 267

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc1.1 delta EPKSSD

<400> 267

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly

225

<210> 268

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v1 IgC-like

<400> 268

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val

65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly

85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val

100

105

<210> 269

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v2 IgC-like

<400> 269

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val

35

40

45

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

50

55

60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val

65

70

75

80

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly

85

90

95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val

100

105

<210> 270

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v3 IgC-like

<400> 270

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

1

5

10

15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30
Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45
Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Val Pro Leu Ala Ser
50 55 60
Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80
Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95
Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val
100 105

<210> 271

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v4 IgC-like

<400> 271

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15
Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30
Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45
Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80
Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95
Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val

100 105

<210> 272

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v5 IgC-like

<400> 272

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val

65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly

85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val

100 105

<210> 273

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v1 ECD

<400> 273

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

1 5 10 15

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

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

Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95
 Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
 100 105 110

His Pro Gln Leu Gly

115

<210> 274

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v2 ECD

<400> 274

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val

65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly

85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
100 105 110

His Pro Gln Leu Gly
115

<210> 275

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v3 ECD

<400> 275

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Val Pro Leu Ala Ser
50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
100 105 110

His Pro Gln Leu Gly
115

<210> 276

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v4 ECD

<400> 276

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
100 105 110

His Pro Gln Leu Gly
115

<210> 277

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 v5 ECD

<400> 277

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95
Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
100 105 110
His Pro Gln Leu Gly
115

<210> 278

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NKp30 WT IgC-like

<400> 278

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
1 5 10 15

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

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
85 90 95
Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val
100 105

<210> 279

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Stuffer

<400> 279

His Met Ser Ser Val Ser Ala Gln

1 5

<210> 280

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hole Fc

<400> 280

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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> 281

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8-derived hinge and transmembrane domain

<400> 281

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala
 20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp Ile
 35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
 50 55 60

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 65 70

<210> 282

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8-derived hinge and transmembrane domain (2nd
gen CAR)

<400> 282

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

50 55 60

Ser Leu Val Ile Thr

65

<210> 283

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 hinge and transmembrane domain

<400> 283

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Leu Val Ile Thr

65

<210> 284

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3zeta intracellular signaling domain

<400> 284

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 285

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 4-1BB-derived costimulatory domain

<400> 285

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35

40

<210> 286

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28-derived costimulatory domain

<400> 286

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro

1

5

10

15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro

20

25

30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35

40

<210> 287

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28-derived costimulatory domain 2

<400> 287

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1

5

10

15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20

25

30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35

40

<210> 288

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD28-derived costimulatory domain 3

<400> 288

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

1 5 10 15

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

20 25 30

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 289

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD33 Signal Peptide

<400> 289

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

<210> 290

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgGkappa light chain

<400> 290

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

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 291

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HSA signal peptide

<400> 291

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 292

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ig kappa light chain

<400> 292

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

1 5 10 15

Phe Pro Gly Tyr Arg Ser

20

<210> 293

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human azurocidin preprotein signal sequence

<400> 293

Met Thr Arg Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Ser Arg Ala

<210> 294

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 294

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 295

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 295

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 296

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 296

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 297

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 297

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 298

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 298

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 299

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 299

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 300

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 300

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Phe Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 301

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG heavy chain signal peptide

<400> 301

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser

20 25

<210> 302

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> IgG Kappa light chain signal sequences

<400> 302

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

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys

20

<210> 303

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG Kappa light chain signal sequences

<400> 303

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 304

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gaussia luciferase

<400> 304

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

Ala

<210> 305

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human albumin

<400> 305

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 306

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human chymotrypsinogen

<400> 306

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

1 5 10 15

Phe Gly

<210> 307

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human interleukin-2

<400> 307

Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val

1 5 10

<210> 308

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human trypsinogen-2

<400> 308

Met Asn Leu Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Val Ala

1 5 10 15

<210> 309

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A protein

<400> 309

Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210>

> 310

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A protein

<400> 310

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 311

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A protein

<400> 311

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 312

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blue fluorescent protein

<400> 312

Ser Arg Ser Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met

1 5 10 15

Glu Gly Thr Val Asp Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu

20 25 30

Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys Val Val Glu

35 40 45
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Leu
 50 55 60
 Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe
 65 70 75 80
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln
 100 105 110
 Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Thr
 115 120 125
 Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Trp Glu Ala Phe Thr
 130 135 140
 Glu Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Asn Asp Met
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Ser His Leu Ile Ala Asn Ile Lys Thr
 165 170 175
 Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Val
 180 185 190
 Tyr Tyr Val Asp Tyr Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asn Asn Glu
 195 200 205
 Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Ala Arg Tyr Cys Asp Leu Pro
 210 215 220
 Ser Lys Leu Gly His Lys Leu Asn
 225 230
 <210> 313
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Blue fluorescent protein

<400> 313

Ser Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly
1 5 10 15

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

Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys Val Val Glu Gly Gly
35 40 45

Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Leu Tyr Gly

50 55 60

Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys
65 70 75 80

Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr Tyr Glu
85 90 95

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

Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Thr Ser Asn

115 120 125

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Phe Thr Glu
130 135 140

Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Asn Asp Met Ala
145 150 155 160

Leu Lys Leu Val Gly Gly Ser His Leu Ile Ala Asn Ile Lys Thr Thr
165 170 175

Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Val Tyr

180 185 190

Tyr Val Asp Tyr Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asn Asn Glu Thr
195 200 205

Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp Leu Pro
210 215 220

Ser Lys Leu Gly His Lys Leu Asn
225 230

<210> 314

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v38

<400> 314

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80
Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160
Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val

165 170 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

<210> 315

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 v179 (6-127)

<400> 315

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

Leu Cys Gly Ala Ile Thr Leu Ala Pro Lys Val Gln Ile Asp Glu Ser
100 105 110
Leu Arg Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 316

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 WT ECD/PD1v179 ECD (6-127) Stack v1

<400> 316

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

245 250 255
Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn
260 265 270
Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn

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

340 345 350
Arg Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg

355 360

<210> 317

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v1 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v2

<400> 317

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Val Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

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

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
 100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190

Ile Phe Cys Ile Met Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Thr Ser Pro
 195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 225 230 235 240

Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu
 245 250 255

Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn
 260 265 270

Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn
 275 280 285

Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Asn Gln Pro Gly
 290 295 300

Gln Asp Arg Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Tyr
 305 310 315 320

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

325 330 335
Cys Gly Ala Ile Thr Leu Ala Pro Lys Val Gln Ile Asp Glu Ser Leu
340 345 350

Arg Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg

355 360

<210> 318

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v2 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v3

<400> 318

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly

85 90 95

Leu Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Ala Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Pro Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Val Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Arg Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg

355 360

<210> 319

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 ECD v3 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v4

<400> 319

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn

100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val

115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys

130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr

180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

225 230 235 240

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

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

 <210> 320
 <211> 248
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD86 IgV v4 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v5
 <400> 320

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

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

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

 180 185 190
 Asp Arg Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Tyr His
 195 200 205
 Met Ser Val Asp Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys
 210 215 220
 Gly Ala Ile Thr Leu Ala Pro Lys Val Gln Ile Asp Glu Ser Leu Arg
 225 230 235 240
 Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
 245

<210> 321

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v5 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v6

<400> 321

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

245

<210> 322

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v6 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v7

<400> 322

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile Leu His Lys Thr Pro Thr Gly

85 90 95

Leu Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Arg Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Tyr His
195 200 205

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

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

225 230 235 240

Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
245

<210> 323

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v7 /PD1v179 ECD (6-127) Stack v8

<400> 323

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ser
115 120 125

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

130 135 140
 Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr
 145 150 155 160

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

 Gly Ala Ile Thr Leu Ala Pro Lys Val Gln Ile Asp Glu Ser Leu Arg
 225 230 235 240
 Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
 245

 <210> 324
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc knob
 <400> 324

 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met 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

225 230

<210> 325

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc hole

<400> 325

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

Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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
 225 230
 <210> 326
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PD1 v1 Fc CD86 ECD v10

<400> 326

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

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Lys

370 375 380

Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala

385 390 395 400

Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp

405 410 415

Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe

420 425 430

Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp

435 440 445

Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu

450 455 460

Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile

465 470 475 480

His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro

485 490 495
Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu

500 505 510
Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val

515 520 525
Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Val Met Gln

530 535 540
Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu

545 550 555 560
Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile

565 570 575
Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu

580 585 590
Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro

595 600

<210> 327

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD1 v1 Fc CD86 IgV v60

<400> 327

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 Asn Gln Pro
50 55 60

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

65				70				75				80			
Tyr	His	Met	Ser	Val	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr
85				90				95							
Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Pro	Lys	Val	Gln	Ile	Asp	Glu	Ser
100				105				110							
Leu	Arg	Val	Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
115				120				125							
Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
130				135				140							
Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
145				150				155				160			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
165				170				175							
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
180				185				190							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
195				200				205							
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
210				215				220							
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
225				230				235				240			
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
245				250				255							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
260				265				270							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
275				280				285							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
290				295				300							
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
305				310				315				320			

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

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

Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala
385 390 395 400

Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp
405 410 415

Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe
420 425 430

Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp
435 440 445

Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu
450 455 460

Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile
465 470 475 480

His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
485 490

<210> 328

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD1 ECD v1 FcK

<400> 328

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 Asn Gln Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Arg Val Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

165 170 175

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

180 185 190

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

195 200 205

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

210 215 220

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met

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

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

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

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

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

340 345 350
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

355 360

<210> 329

<211> 349

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 IgV v60 FcH

<400> 329

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly

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

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

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

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

340 345

<210> 330

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcH CD86 Igv v60

<400> 330

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Lys Ile
 245 250 255

 Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn
 260 265 270
 Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln
 275 280 285
 Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp
 290 295 300
 Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser
 305 310 315 320

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

 <210> 331
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PD1 ECD v1 FcH CD86 IgV v60
 <400> 331
 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 Asn Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Arg Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp

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

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

260 265 270
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 275 280 285
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 290 295 300
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 305 310 315 320
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

325 330 335
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 340 345 350
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Lys
 370 375 380
 Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala

385 390 395 400
 Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp
 405 410 415
 Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe
 420 425 430
 Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp
 435 440 445
 Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu

450 455 460
 Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile
 465 470 475 480
 His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 485 490

<210> 332

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc

<400> 332

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu 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
 225 230
 <210> 333
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc
 <400> 333
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala 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 Glu Glu Met 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

225

<210> 334

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> PD-1 v94 ECD (13-127)

<400> 334

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Glu Arg

115

<210> 335

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 wt IgV

<400> 335

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

1 5 10 15

Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 336

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 wt ECD 6-127

<400> 336

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> 337

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 wt ECD (13-127)

<400> 337

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

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

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
85 90 95
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
100 105 110

Thr Glu Arg
115

<210> 338

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 v201 ECD (6-127)

<400> 338

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 His Val Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

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

<210> 339

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 wt IgV

<400> 339

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

1 5 10 15

Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 340

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Pertuz HC

<400> 340

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

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

290

295

300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Lys

<210> 341

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Pertuz LC

<400> 341

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly

[illegible]

<400> 342

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

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

245 250 255

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

340 345 350

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

355 360 365

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

500 505 510
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

515 520 525
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

530 535 540
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

545 550 555 560
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

565 570 575

<210> 343

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 H3701 IgV LC

<400> 343

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly

100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

115 120 125
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg

130 135 140
Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala

145 150 155 160
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser

165 170 175
Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

180 185 190
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

195 200 205
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe

210 215 220
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

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

245 250 255
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

260 265 270
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser

275 280 285
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr

290 295 300
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys

305 310 315 320
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

325 330 335
Arg Gly Glu Cys

340

<210> 344

<211> 579

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HC CD86 H3701 IgV

<400> 344

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

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

180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

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

385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr

465 470 475 480

Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser

485 490 495

Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu

500 505 510

Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met

515 520 525

Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn

530 535 540

Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys

545 550 555 560

Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser

565 570 575

Val Leu Ala

<210> 345

<211> 345

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC CD86 H3701 IgV

<400> 345

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Lys Ile Gln
225 230 235 240
Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser
245 250 255
Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu
260 265 270
Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser

275 280 285
Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp
290 295 300
Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Arg

305 310 315 320
Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln
325 330 335
Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
340 345

<210> 346

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Panit HC

<400> 346

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

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95
Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
325	330	335	
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
340	345	350	
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
355	360	365	

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 347

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Panit LC

<400> 347

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu

85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 348
<211> 571
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD86 H3701 IgV HC
<400> 348
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95
 Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 115 120 125
 Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
 130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 180 185 190
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu
 195 200 205
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 210 215 220
 Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 245 250 255
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 260 265 270
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 275 280 285
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 290 295 300
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

325 330 335
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 340 345 350
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

 355 360 365
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 370 375 380
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 385 390 395 400
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 405 410 415
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

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

 485 490 495
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 500 505 510
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 515 520 525
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 530 535 540
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 545 550 555 560
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 349

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD86 H3701 IgV LC

<400> 349

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro

1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val

20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly

35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser

50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly

85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

115 120 125

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

130 135 140

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
195 200 205

Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu Ala Phe
210 215 220

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
245 250 255

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
260 265 270

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
275 280 285

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
290 295 300

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
305 310 315 320

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
325 330 335

Arg Gly Glu Cys
340

<210> 350

<211> 575

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HC CD86 H3701 IgV

<400> 350

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

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

 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

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

 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 465 470 475 480
 Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 485 490 495
 Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 500 505 510

 Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 515 520 525

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
530 535 540
Asp Lys Gly Leu Tyr Arg Cys Ile Ile Leu His Lys Lys Pro Thr Gly
545 550 555 560
Met Ile Arg Ile His Gln Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
565 570 575

<210> 351

<211> 345

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC CD86 H3701 IgV

<400> 351

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

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

 <210> 352
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Ramuc HC

<400> 352

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

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

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

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

195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		

225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 353
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ramuc LC

<400> 353

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210