



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0169933
(43) 공개일자 2023년12월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/70503 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7027209
- (22) 출원일자(국제) 2022년01월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년08월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2022/050055
- (87) 국제공개번호 WO 2022/153307
국제공개일자 2022년07월21일
- (30) 우선권주장
63/136,687 2021년01월13일 미국(US)
63/139,331 2021년01월20일 미국(US)

- (71) 출원인
카 메디컬 리미티드
이스라엘, 모디인 마카빔-리유티 7178594, 피오박
스 9, 담 하마크빔 스트리트 28
토마스 제퍼슨 유니버시티
미국 펜실베이니아 19107 필라델피아 스위트 110 체
스트리트 스트리트 925
- (72) 발명자
타미르, 아미
이스라엘 레호보트 7656261 나단 엘러만 스트리트
4
타이코친스키, 마크 엘.
미국 펜실베이니아 19066 린덴 레인 메리언 스테이
션 300
브리메르, 에드윈
네덜란드 이디 그로닝겐 9722 모짜르트스트라트
26
- (74) 대리인
특허법인다나

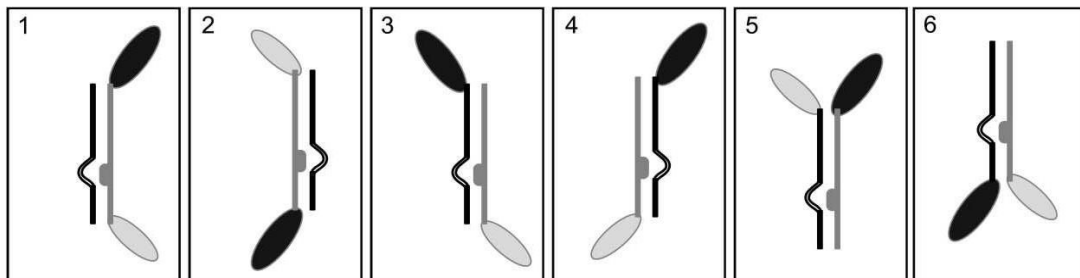
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 I형 막 단백질 이중이량체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

I형 막 단백질 이중이량체를 제공한다. 따라서, SIRPalpha, PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체를 제공하며, 여기서 2개의 폴리펩타이드 각각은 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있고, 여기에서 이중이량체는 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는다. 또한 이중이량체를 코딩하는 핵산 구조물 및 시스템, 이를 발현하는 숙주 세포 및 이의 사용 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70596 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체로서, 상기 2개의 폴리펩타이드 각각은 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있고, 상기 이중이량체는 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는 이중이량체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 2개의 폴리펩타이드에 부착된 이량체화 모이어티를 포함하는 이중이량체.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 이량체화 모이어티는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편인 이중이량체.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 Fc 도메인은 변형되어 Fc 수용체에 대한 이의 결합을 변경하고, 이의 면역 활성화 기능을 감소시키고, 및/또는 상기 융합의 반감기를 개선하는 이중이량체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 SIRP α 폴리펩타이드 및 상기 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 SIRP α 폴리펩타이드 및 상기 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 SIRP α 폴리펩타이드 및 상기 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 SIRP α 폴리펩타이드 및 상기 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 9

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 TIGIT 폴리펩타이드 및 상기 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 TIGIT 폴리펩타이드 및 상기 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 11

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 TIGIT 폴리펩타이드 및 상기 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 12

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 PD1 폴리펩타이드 및 상기 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 13

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 LILRB2 폴리펩타이드 및 상기 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 14

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중이량체는 상기 PD1 폴리펩타이드 및 상기 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드 각각은 상기 이중이량체 내 단량체인 이중이량체.

청구항 16

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 2개의 폴리펩타이드는 상기 이중이량체의 단량체에 포함되는 이중이량체.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체를 포함하는 조성물로서,
상기 이중이량체는 상기 조성물에서 상기 2개의 폴리펩타이드의 우세한 형태(predominant form)인 조성물.

청구항 18

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 및 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 구조물 또는 시스템.

청구항 19

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체 또는 제 18 항의 핵산 구조물 또는 시스템을 포함하는 숙주 세포.

청구항 20

제 18 항의 핵산 구조물 또는 시스템을 숙주 세포에 도입하는 단계 또는 제 19 항의 세포를 배양하는 단계를 포함하는 이중이량체의 제조 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,
상기 이중이량체를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체, 제 17 항의 조성물, 제 18 항의 핵산 구조물 또는 시스템 또는 제 19 항의 세포의 치료적 유효 양을 대상체에 투여함으로써 대상체의 질병을 치료하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에 상기 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병의 치료 방법.

청구항 23

필요로 하는 대상체에 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한, 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체, 제 17 항의 조성물, 제 18 항의 핵산 구조물 또는 시스템 또는 제 19 항의 세포.

청구항 24

제 22 항 또는 제 23 항에 있어서,
상기 질병은 면역 세포의 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는, 방법 또는 사용하기 위한 이중이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포.

청구항 25

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질병과 연관된 세포는 상기 자연 결합 쌍을 발현하는, 방법 또는 사용하기 위한 이중이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포.

청구항 26

제 22 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질병은 암인, 방법 또는 사용하기 위한 이중이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

상기 암은 림프종, 백혈병, 결장 암종, 난소 암종, 폐 암종, 두경부 암종 및 간세포 암종으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법 또는 사용하기 위한 이중이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포.

청구항 28

제 26 항에 있어서,

상기 암은 비-소세포 폐암(NSCLC) 또는 중피종인, 방법 또는 사용하기 위한 이중이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포.

청구항 29

면역 세포를 활성화하는 방법으로서,

상기 방법은 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 이중이량체, 제 17 항의 조성물, 제 18 항의 핵산 구조물 또는 시스템 또는 제 19 항의 세포의 존재 하에 시험관 내(in-vitro) 활성화 면역 세포를 포함하는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 활성화는 상기 자연 결합 쌍을 발현하는 세포의 존재 하에 이루어지는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2021년 1월 13일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제63/136,687호와 2021년 1월 20일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제63/139,33호의 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록 진술

[0004]

2022년 1월 13일에 생성된 303,104 바이트의 89962SequenceListing.txt라는 명칭의 ASCII 파일은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0005]

본 발명은, 일부 구현예에서, I형 막 단백질 이중이량체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0006]

배경 기술

- [0007] 암과 면역 체계 사이의 상호 작용은 복잡하고 다면적이다. 많은 암 환자가 항종양 면역 반응을 보이는 것처럼 보이지만, 암은 면역 탐지와 파괴를 회피하는 전략도 개발한다. 암세포는 표면에서 종양 항원의 발현을 감소시켜 면역 체계가 이를 감지하기 어렵게 만들거나, 면역 세포 비활성화를 유도하는 단백질을 표면에 발현하거나, 미세 환경의 세포가 면역 반응을 억제하고 종양 세포 증식 및 생존을 촉진하는 물질을 방출하도록 유도할 수 있다.
- [0008] 최근에는 면역 체계의 특정 구성 요소를 자극하거나 면역 반응을 억제하는 암세포가 생성하는 신호에 대응하여 종양에 대한 면역 반응을 강화하는 면역 요법이 개발되고 있다. 면역 반응을 조절하는 메커니즘과 분자를 규명하는데 발전이 이루어지면서 암 치료를 위한 새로운 치료 표적이 생겨났다. 이러한 표적에는 T세포 면역 반응 조절에 중심적인 역할을 하는 공동 자극 및 공동 억제 분자(예, CTLA4, PD1), 인터루킨 및 인터페론과 같은 면역 체계 활동을 조절하거나 조절하는데 도움이 되는 단백질, 종양 항원 및 선천성 면역 체계의 활동에 관여하는 성분(예, CD47-SIRP α "don't eat-me" 신호) 등이 포함된다.
- [0009] 추가 배경 기술에 포함된다:
- [0010] 국제 특허 출원 공개 번호 WO/2020/146423, WO201712770, WO2017152132, WO2016023001 및 WO2013112986; 및 미국 특허 번호 7,569,663 및 8,039,437.

발명의 내용

- [0011] 발명의 요약
- [0012] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, SIRP α, PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 이종이량체가 제공되며, 여기서 상기 2개의 폴리펩타이드 각각은 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있고, 상기 이종이량체는 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것이 바람직하다.
- [0013] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 2개의 폴리펩타이드에 부착된 이량체화 모이어티를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편이다.
- [0015] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, Fc 도메인은 변형되어 Fc 수용체에 대한 이의 결합을 변경하고, 이의 면역 활성화 기능을 감소시키고, 및/또는 상기 융합의 반감기를 개선한다.
- [0016] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다..
- [0018] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 TIGIT 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 PD1 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 LILRB2 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 이종이량체는 PD1 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 각각의 폴리펩타이드는 이종이량체 내 단량체이다.
- [0027] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드는 이종이량체의 단량체로 구성된다.
- [0028] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 이종이량체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 이종이량체는 상기 조성물에서 상기 2개의 폴리펩타이드의 우세한 형태(predominant form)이다.
- [0029] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 이종이량체를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 및 숙주 세포

에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 구조물 또는 시스템이 제공된다.

- [0030] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 이종이량체 또는 핵산 구조물 또는 시스템을 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0031] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 이종이량체를 제조하는 방법이 제공되며, 이 방법은 상기 핵산 구조물 또는 시스템을 숙주 세포에 도입하는 단계 또는 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 이종이량체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 본 발명이 필요로 하는 대상체에 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에 치료적 유효 양의 이종이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포를 투여하여 대상체의 질병을 치료하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 이종이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포가 제공되며, 이를 필요로 하는 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용된다.
- [0035] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 질병은 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 질병과 연관된 세포는 자연 결합 쌍을 발현한다.
- [0037] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 질병은 암이다.
- [0038] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병, 결장 암종, 난소 암종, 폐 암종, 두경부 암종 및 간세포 암종으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0039] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 암은 비소세포 폐암(NSCLC) 또는 중피종이다.
- [0040] 본 발명의 일부 구현예의 양태에 따르면, 면역 세포를 활성화하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 이종이량체, 조성물, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포의 존재 하에 면역 세포를 시험관 내에서 활성화하는 것을 포함한다.
- [0041] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 활성화는 자연 결합 쌍을 발현하는 세포의 존재 하에서 이루어진다.
- [0042] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법들 및 재료들이 본 발명의 구현예들의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법들 및/또는 재료들이 하기에 기술된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 특허 명세서가 우선될 것이다. 또한, 재료들, 방법들 및 예시들은 단지 예시적이며, 반드시 제한되는 것을 의도하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 본 발명의 몇몇의 구현예들은 단지 예시로서 첨부된 도면을 참조하여 본원에 기술된다. 이하 도면을 상세하게 구체적으로 참조하면, 도시된 세부사항은 예시에 의한 것이고 본 발명의 구현예들의 예시적인 논의를 목적하는 것임이 강조된다. 이와 관련하여, 도면과 함께 취해진 설명은 당업자로 하여금 본 발명의 구현예들이 어떻게 실시될 수 있는지에 대해 명백하게 한다.

도면에 있어서:

도 1A는 이종이량체의 가능한 배열/형태의 비제한적인 실시예들을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 1B는 본 발명의 일부 구현예에 의해 고려되는 이종이량체의 조성물 및 배열의 개략적인 표현을 나타낸다.

도 2A는 본 명세서에서 "DSP120V1"(SEQ ID NO: 5 및 7)로 지칭되는 SIRP α -PD1 이종이량체의 개략도를 나타낸다.

도 2B-C는 SIRP α -PD1 이종이량체 DSP120V1(SEQ ID NO: 5 및 7)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 2B는 개략적인 3D 모델이고 도 2C는 전체 원자 3D 모델이다. SIRP α ('노브(knob)' 사슬 내)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. PD1 ('홀(hole)' 사슬 내)은 회색 리본 표시(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 오른쪽 하단의 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 오른쪽 상단의 회색 리본으로 표시된다. '스페이스'/'링커' 세그먼트는 SIRP α , hIgG4 및 PD1의 구조 요소들 사이에 회색과 흰색 리본

으로 표시된다. 복합체를 안정화시키는 hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스템 잔기는 CPK 표현(CPK representation)으로 표시된다.

도 3A는 본 명세서에서 "DSP216V1"(SEQ ID NO: 5 및 15)로 지칭되는 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 개략도이다.

도 3B-C는 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216V1(SEQ ID NO: 5 및 15)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 3B는 개략적인 3D 모델이고 도 3C는 전체 원자 3D 모델이다. SIRP α ('노브' 사슬 내)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. LILRB2('홀' 사슬 내)는 짙은 회색 리본으로 표시된다(오른쪽 상단). '노브' 서열의 hIgG4는 도면의 오른쪽 하단에서 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면의 오른쪽 상단에서 회색 리본으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 세그먼트는 SIRP α , hIgG4 및 LILRB2의 구조 요소들 사이에 회색과 흰색 리본으로 표시된다. 복합체를 안정화시키는 hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스템 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 4A는 본원에서 "DSP404V1"(SEQ ID NO: 13 및 30)로 지칭되는 TIGIT-SIGLEC10 이중이량체의 개략도이다.

도 4B-C는 TIGIT-SIGLEC10 이중이량체 DSP404V1(SEQ ID NO: 13 및 30)의 예측된 3D 구조를 보여준다. 도 4B는 개략적인 3D 모델이고 도 4C는 전체 원자 3D 모델이다. TIGIT('노브' 사슬 내)는 회색 표면 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. SIGLEC10('홀' 사슬 내)은 회색 표면 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 오른쪽 하단의 흰색 표면으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 오른쪽 상단의 회색 표면으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 세그먼트는 TIGIT, hIgG4 및 SIGLEC10의 구조 요소들 사이에 회색과 흰색 리본으로 표시된다. 복합체를 안정화시키는 hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스템 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 5A는 본원에서 "DSP502V1"(SEQ ID NO: 13 및 7)로 지칭되는 TIGIT-PD1 이중이량체 개략도이다

도 5B-C는 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502V1(SEQ ID NO: 13 및 7)의 예측된 3D 구조를 보여준다. 도 5B는 개략적인 3D 모델이고 도 5C는 전체 원자 3D 모델이다. TIGIT('노브' 사슬 내)는 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. PD1('홀' 사슬 내)은 회색 리본으로 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면의 오른쪽 하단에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면의 오른쪽 상단에 회색 리본으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 세그먼트는 TIGIT, hIgG4 및 PD1의 구조 요소들 사이에 회색과 흰색 리본으로 표시된다. 복합체를 안정화시키는 hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스템 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 6A-B는 생성된 여러 이중이량체에 대한 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석을 보여준다(아래 표 1의 설명 및 시퀀스 참조). 도 6A는 환원(R) 및/또는 비환원(NR) 하에서 분리한, 표시된 이중이량체를 코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포의 조(정제되지 않은)-5일 상층액 샘플을 SDS-PAGE 이미지를 보여준다. 대조군 샘플은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포를 5일간 배양한 상층액이다. 도 6B는 표시된 대로 단백질-A 또는 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 표시된 이중이량체를 코딩하는 구조체를 형질주입된 세포의 5일 상층액에서 정제된 샘플의 SDS-PAGE 이미지를 보여준다.

도 7A-C는 생산된 여러 이중이량체에 대한 웨스턴 블롯 분석을 보여준다(아래 표 1의 설명 및 시퀀스 참조). 도면에 제시된 샘플은 표시된 이중이량체를 코딩하는 플라스미드를 형질주입된 Expi293F 세포의 조(정제되지 않은) 5일 상층액이다. 상층액을 비환원(NR) 또는 환원(R) 조건에서 SDS-PAGE로 분리한 후 항-PD1(도 7A), 항-SIRP α (도 7B) 또는 항-LILRB2(도 7C) 항체를 사용한 면역 블롯팅을 실시하였다.

도 8A-B는 본 명세서에서 "DSP120"(SEQ ID NO: 1 및 3)으로 지칭되는 SIRP α -PD1 이중이량체와 CD47 및 PDL1의 결합을 보여준다. 이중이량체를 함유하는 상층액 또는 (형질주입되지 않은 Expi293F 세포에서 추출한) 대조군 상층액을 CD47 또는 PDL1이 미리 코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 배양 후, 항 PD-1(CD47 코팅 플레이트의 경우) 또는 토끼 항-인간 SIRP α 항체(PDL1 코팅 플레이트의 경우)로 검출한 다음, 상응하는 HRP 접합 2차 항체로 배양하였다. 검출은 450nm에서 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 620에서 기준과 함께 TMB 기판으로 수행되었다. 도 8A는 농도 의존적인 방식으로 DSP120과 CD47 코팅 플레이트의 결합을 보여주고, 도 8B는 농도 의존적인 방식으로 DSP120과 PDL1 코팅 플레이트의 결합을 보여준다.

도 9A-C는 본 명세서에서 "DSP216"(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 9A) 및 "DSP216V1"(SEQ ID NO: 5 및 15, 도 9B-C)로 지칭되는 SIRP α -LILRB2 이중이량체가 HLA-G에 결합하는 것을 보여준다. 이중이량체 또는 (형질주입되지 않은 Expi293F 세포에서 추출한) 대조군 상층액을 포함하는 상층액을 HLA-G가 미리 코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 토끼 항-인간 SIRP α 항체와 배양한 후 염소 항-토끼 IgG-HRP 및 TMB 기질을 450nm에서 플레이트 리더기를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 620nm에서 참조하여 결합을 검출하였다. 도 9A는 농도에 따른

DSP216과 HLA-G 단백질 코팅 플레이트의 결합을 보여준다. 대조 상층액(대조군)에서는 결합이 관찰되지 않았다. 도 9B-C는 농도에 따라 DSP216V1을 함유한 조 상층액(도 9B) 또는 정제된 DSP216V1(도 9C)이 HLA-G 코팅 플레이트에 결합하는 모습을 보여준다.

도 10A-B는 본 명세서에서 "DSP502"(SEQ ID NO: 9 및 3)로 지칭되는 PD1-TIGIT 이중이량체와 그 PVR 대응체의 결합을 보여준다. 이중이량체 또는 (형질주입되지 않은 Expi293F 세포에서 추출한) 대조군 상층액(도 10A) 또는 정제된 단백질(도 10B)을 포함하는 상층액을 PVR로 미리 코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 배양 후, 항-PD1 항체로 검출한 다음 상응하는 HRP 접합 2차 항체로 배양하여 검출하였다. 검출은 450nm에서 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기판으로 수행되었으며, 620에서 기준이 되었다. 도 10A-B는 농도에 따른 DSP502와 PVR 코팅 플레이트의 결합을 보여준다.

도 11A-E는 유세포 분석에 의해 결정된 DSP120 및 DSP120V1이 PDL1 또는 CD47을 발현하는 세포에 결합하는 것을 보여준다. 제시된 MFI 값은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 만드는데 사용되었다. 도 11A는 DLD1-PDL1 과발현 세포주에서 PDL1의 발현을 보여주는 히스토그램이다. 형광 표지된 항-PDL1 항체로 DLD1 WT 및 PDL1 과발현 세포주(DLD1-PDL1)를 면역 염색한 후 유세포 분석법을 통해 PDL1의 표면 발현 수준을 측정하였다. 도 11B는 CHO-K1-CD47 HB9 클론 세포에서 CD47 수용체의 발현을 보여주는 히스토그램이다. CD47의 표면 발현 수준은 항-CD47 항체로 CHO-K1 WT 및 CD47 과발현 세포주(클론 HB9)를 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정하였다. 도 11C-D는 DLD1-WT와 비교하여 DSP120(도 11C) 및 DSP120V1(도 11D)의 DLD1-PDL1 과발현 세포주에 대한 결합을 보여준다. 배양 후 항-SIRP α 항체를 사용하여 SIRP α 도메인을 면역 염색한 후 유세포 분석법을 통해 세포주에 대한 이중이량체의 결합을 확인하였다. 도 11E는 CHO-K1-CD47 HB9 클론 세포에 대한 DSP120V1의 결합을 보여준다. 이중이량체와 hCD47 과발현 세포주에 대한 결합은 배양 후 항-IgG4 항체를 사용하여 IgG-Fc 도메인을 면역 염색한 다음 유세포 분석으로 확인하였다. 결합 분석의 음성 세포 대조군으로 CHO-K1 WT 세포를 사용하였다.

도 12E-F는 유세포 분석에 의해 확인된 DSP216 및 DSP216V1이 CD47 및 HLA-G를 발현하는 세포에 결합하는 것을 보여준다. 도 12A와 12C는 HT1080(도 12A) 및 HT1080-HLA-G(도 12C) 세포주에서 CD47의 발현을 보여준다. CD47의 세포 표면 발현은 항-인간-CD47 항체 및 IgG1 동형 대조군으로 세포주를 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정하였다. 도 12B와 12D는 HT1080(도 12B) 및 HT1080-HLA-G(도 12D) 세포주에서 HLA-G의 발현을 보여준다. HLA-G의 표면 발현 수준은 항-인간-HLA-G 항체 및 IgG2a 동형 대조군으로 세포주를 면역 염색하여 측정하였다. 도 12E는 CD47 발현 세포 HT1080에 대한 DSP216의 결합을 보여준다. 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 배양 후 LILRB2 항체를 사용하여 LILRB2 도메인을 면역 염색한 후 유세포 분석으로 확인하였다. LILRB2에 양성 반응을 보인 세포의 백분율이 표시되어 있으며 GraphPad Prism 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다. 도 12F는 이중이량체 DSP216V1을 함유한 상층액과 HT1080-HLA-G 세포주의 결합을 보여준다. 이중이량체와 세포주에 대한 결합은 항-IgG4 항체를 사용하여 IgG4 백본을 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정하였다. MFI 값이 표시되어 있으며 GraphPad Prism 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 만드는 데 사용되었다.

도 13은 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이, 본 명세서에서 "DSP402"(SEQ ID NO: 24 및 3)로 지칭되는 SIGLEC10-PD1 이중이량체가 DLD1 WT 및 PDL1 과발현 세포주에 결합하는 것을 나타낸다. 세포를 DSP402와 함께 배양한 후, 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인을 면역 염색한 후 유세포 분석법을 통해 이중이량체와 DLD1 PDL1 과발현 세포주의 결합을 확인하였다. 결합 분석의 음성 세포 대조군으로 DLD-1 WT 세포를 사용하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하기 위해 MFI 값을 제시하고 이를 사용하였다.

도 14A-G는 본 명세서에서 "DSP502"(SEQ ID NO: 9 및 3)로 지칭되는 TIGIT-PD1 이중이량체가 PVR 및 PDL1을 발현하는 세포에 결합하는 것을 보여준다. 도 14A-C는 DLD-1 WT(도 14A), DLD-1 PDL1(도 14B) 및 HT1080(도 14C) 세포주에서 PVR의 발현을 보여준다. PVR의 세포 표면 발현은 APC 표지 항 PVR 항체로 세포주를 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정하였다. MFI 값이 표시된다. 도 14D는 HT1080 세포에서 PDL1의 발현을 보여준다. PDL1의 표면 발현 수준은 APC 표지 항-PDL1 항체 또는 동형 대조군으로 세포주를 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정하였다. 도 14E-F는 DSP502와 DLD1 PDL1(도 14E) 또는 HT1080(도 14F) 세포의 결합을 보여준다. 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 배양 후 항-인간 IgG1 항체를 사용하여 IgG1-Fc 도메인을 면역 염색한 후 유세포 분석으로 확인하였다. DSP502의 각 도메인에 대한 결합의 특이성은 PVR 또는 PD-L1에 대한 차단 Abs로 세포를 배양하여 테스트하였다. 도 14G는 본 명세서에서 "DSP502V1"(SEQ ID NO: 13 및 7), "DSP502V2"(SEQ ID NO: 31 및 7), "DSP502V3"(SEQ ID NO: 33 및 7)으로 지칭되는 TIGIT-PD1 이중이량체가 PVR에 특이적으로 결합하는 것을 보여주며, PVR을 발현하고 PD1을 발현하지 않는 DLD-1 WT 세포에 결합하는 것으로 입증되었다. 이중이량체의 결합은 항-인간 IgG4 항체를 사용하여 IgG4-Fc 도메인을 면역 염색한 후 유세포 분석으로 확인하였다. MFI 값이 표시되

어 있으며 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

도 15는 생성된 여러 이중이량체에 대한 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석을 보여준다(아래 표 1의 설명 및 서열 참조). 이 그림은 표시된 이중이량체를 코딩하는 플라스미드를 감염시킨 Expi293F 세포의 조(정제되지 않은) 5일 상청액 샘플을 환원(R) 및/또는 비환원(NR) 조건에서 분리한 SDS-PAGE 이미지를 나타낸다.

도 16A-F는 본 명세서에서 "DSP216"(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 16A), "DSP216V1"(SEQ ID NO: 5 및 15, 도 16B), "DSP216V3"(SEQ ID NO: 138 및 11, 도 16C), "DSP216V4"(SEQ ID NO: 140 및 15, 그림 16D) "DSP216V5"(SEQ ID NO: 142 및 150, 도 16E) 또는 "DSP216V6"(SEQ ID NO: 144 및 150, 도 16F)를 HT1080-WT 세포에 비해 HLA-G(HT1080-HLA-G)를 과발현하는 세포에 결합한다. 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 바와 같이 차단 항체의 유무에 관계없이 배양한 후 APC 공액 항인간-IgG1 항체를 사용한 IgG 백본의 면역 염색 또는 DSP216V1 및 DSP216V4에 대한 항-SIRP α 를 사용한 SIRP α 도메인의 면역 염색에 이어 유세포 분석으로 결정되었다. 그래프 패드 프리즘 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하기 위해 GMFI 값을 표시하고 사용하였다.

도 17A-F는 CD47 및 HLA-G를 모두 발현하는 JEG-3 세포에 대한 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 17C), DSP216V3(SEQ ID NO: 138 및 11, 도 17D), DSP216V5(SEQ ID NO: 142 및 150, 도 17E) 또는 DSP216V6(SEQ ID NO: 144 및 150, 도 17F)의 결합을 보여준다(도 17A-B). 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 바와 같이 차단 항체의 유무에 관계없이 배양 후 항인간-IgG1 항체를 사용하여 IgG 백본을 면역 염색한 다음 유세포 분석으로 측정하였다. 그래프 패드 프리즘 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하기 위해 GMFI 값을 표시하고 사용하였다.

도 18A-D는 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 18A), DSP216V1(SEQ ID NO: 5 및 15, 도 18B), DSP216V3(SEQ ID NO: 138 및 11, 도 18C) 및 DSP216V4(SEQ ID NO: 140 및 15, 도 18D)의 제조합 인간 CD47 플레이트 결합(PB) 결합을 보여준다. 이중이량체를 포함하는 상청액을 CD47로 사전 코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 결합은 항-인간 IgG1- 또는 IgG4- HRP 항체와 배양하여 검출하고, 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기질로 검출하고, 450nm에서 620nm를 기준으로 하여 검출하였다. O.D. 값은 GraphPad Prism 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하는 데 사용되었다.

도 18E-H는 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 18E), DSP216V1(SEQ ID NO: 5 및 15, 도 18F), DSP216V3(SEQ ID NO: 138 및 11, 도 18G) 및 DSP216V4(SEQ ID NO: 140 및 15, 도 18H)의 제조합 인간 HLA-G 플레이트 결합(PB)을 보여준다. 이중이량체를 포함하는 상청액을 HLA-G가 미리 코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 결합은 항-인간 IgG1 또는 IgG4-HRP 항체로 배양하고, 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기질로 검출한 후 450nm에서 620nm를 기준으로 검출하여 검출하였다. O.D. 값은 GraphPad Prism 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

도 19A-I는 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이 PDL1 및/또는 PVR을 발현하는 세포에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3) 및 본 문서에서 "DSP502V4"(SEQ ID NO: 146 및 148)의 결합을 입증한다. 제시된 MFI 값은 플로우조 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다. 도 19A는 DSP502와 K562 PD-L1 세포의 결합을 보여주며, 도 19B는 DSP502와 K562 PD-L1/PVR 세포의 결합을 보여주며, 도 19C는 DSP502V4와 K562 PD-L1 세포의 결합을 보여준다; 도 19D는 DSP502V4와 K562 PD-L1/PVR 세포의 결합을 보여주며, 도 19E는 DSP502와 K562 PVR 세포의 결합을 보여주며, 도 19F는 DSP502V4와 K562 PVR 세포의 결합을 보여준다. 도 19E, 19F 및 19I는 표시된 바와 같이 K562 PD-L1, K562 PVR 및 K562 PD-L1/PVR 세포에서 PDL1 또는 PVR의 발현을 보여주는 히스토그램이다. 표시된 바와 같이 형광 표지된 항-PDL1 또는 항-PVR 항체를 사용하여 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석하여 PDL1 및 PVR의 표면 발현 수준을 측정하였다.

도 20A는 표시된 바와 같이 차단 항체 유무에 따른 배양 후 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이 PVR을 발현하는 SKOV3 세포에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 결합을 보여준다. 제시된 MFI 값은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

도 20B는 SKOV3 세포에서 PVR의 발현을 보여주는 히스토그램이다. 형광 표지된 항-PVR 항체로 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석법을 통해 PVR의 표면 발현 수준을 측정하였다.

도 21A는 표시된 바와 같이 차단 항체 유무에 관계없이 배양한 후 유세포 분석에 의해 결정된 마우스 PDL1 및 PVR을 발현하는 렌카 세포에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 결합을 보여준다. 제시

된 MFI 값은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하는 데 사용되었다.

도 21B는 렌카 세포에서 PDL-1 및 PVR의 발현을 보여주는 히스토그램을 보여준다. 표시된 바와 같이 형광 표시된 항-PDL1 또는 항-PVR 항체로 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석하여 PDL1 및 PVR의 표면 발현 수준을 측정하였다.

도 22A는 유세포 분석에 의해 결정된 쥐 세포주 AB12에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 결합을 보여준다. 제시된 MFI 값은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하는 데 사용되었다.

도 22B는 AB12 세포에서 PDL1과 PVR의 표면 발현 수준을 보여주는 히스토그램이다. 표시된 바와 같이 형광 표시된 항-PDL1 또는 항-PVR 항체로 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석하여 PDL1 및 PVR의 표면 발현 수준을 측정하였다.

도 23A는 표시된 바와 같이 차단 항체 유무에 따른 배양 후 유세포 분석에 의해 결정된 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 Jurkat NFAT-CD16 세포에 대한 결합을 보여준다. 제시된 MFI 값은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선 그래프를 생성하는 데 사용되었다.

도 23B는 Jurkat NFAT-CD16 세포에서 CD16의 발현을 보여주는 히스토그램이다. 표시된 바와 같이 형광 표시된 항-CD16 항체로 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석법을 통해 CD16의 표면 발현 수준을 측정하였다.

도 24는 다양한 농도의 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)가 있는 상태에서 K562-WT 또는 K562 과발현 PDL1 및 PVR 세포와 공동 배양한 후 Jurkat NFAT-CD16 세포의 루시퍼라제 분비 수준을 보여준다. 루시퍼라제 분비 수준은 루시퍼라제와 첨가된 기질(QUANTI-Luc)의 상호작용에 의해 생성되는 발광 신호로 측정되었다.

도 25A는 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 TIGIT 및 PD1 도메인이 해당 리간드/수용체에 동시에 결합하는 것을 보여준다. 도 25A는 플레이트에 결합된 PDL1에 결합한 후 인간 CD155(PVR)-마우스 IgG2a Fc로 배양하는 과정을 보여준다. 스트렙타비딘 HRP로 검출한 후 표준 ELISA 프로토콜에 따라 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450nm에서 540nm의 기준과 함께 TMB 기질을 추가하여 검출하였다.

도 25B-D는 다양한 농도의 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)가 존재할 때 NK 세포와 K562 PVR/PD-L1 세포의 이중체 형성을 보여준다. 도 25B는 형광 표시된 항-CD16 항체로 세포를 면역 염색한 후 유세포 분석으로 측정된 NK 세포에서 CD16의 발현 수준을 보여주는 히스토그램이다. 도 25C는 표시된 농도의 DSP502가 존재할 때 이중체가 형성되는 것을 보여준다. 도 25D는 표시된 대로 차단 항체:Fc 차단, PVR 차단 또는 PD-L1 차단와 함께 배양한 후 표시된 농도의 DSP502가 존재할 때 이중체가 형성되는 것을 보여준다. Q1(각 패널의 왼쪽 상단 4분의 1)은 K562 PVR/PD-L1 CFSE 표지 세포(Y축의 양성 세포)를 나타내고, Q3(각 패널의 오른쪽 하단 4분의 1)은 NK CPD 표지 세포(X축의 양성 세포)를 나타내고, Q2(각 패널의 오른쪽 상단 4분의 1)는 NK-K562 PVR/PD-L1 세포의 이중화 비율과 이중화 비율을 나타낸다.

도 26은 인간화 NSG 마우스의 A549-NSCLC 이중이식 모델에서 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 생체 내 항종양 효과를 보여주며, 이는 비히클 대조군에 비해 종양 부피 감소로 나타낸다(각 실험군에서 n = 5).

도 27은 AB12 종피종 종양을 가진 마우스에서 비히클 대조군과 비교하여 생존 기간 연장으로 나타나는 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 생체 내 항종양 효과를 보여준다(각 실험군에서 n = 5).

도 28은 과립구에 의한 암세포의 식균 작용에 대한 SIRPα-LILRB2 이중이량체 DSP216(SEQ ID NO: 1 및 11, 도 16A)의 효과를 보여준다. HT1080 또는 HT1080-HLA-G 세포에 라벨을 부착하고 0, 1, 2 또는 5 μg/mL DSP216으로 미리 배양한 다음 과립구와 1:1로 공동 배양하고 유세포 분석법으로 분석하였다. 세 명의 기증자로부터 채취한 과립구에 의한 식균 작용의 백분율을 표시하였다.

도 29A는 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502의 세포 독성 효과를 보여준다(SEQ ID NO: 9 및 3). 표시된 K562 세포와 NK 세포를 표시된 비율로 공동 배양한 후 DSP502가 있을 때 죽은 세포의 백분율을 나타낸 것이다. 막대 위의 별표는 처리하지 않은 공동 배양과 비교하여 통계적 유의성을 나타낸다.

도 29B는 표시된 K562 세포와 공동 배양한 후 NK 세포에서 그랜자임 B 분비에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502(SEQ ID NO: 9 및 3)의 효과를 보여준다. 막대 위의 별표는 처리하지 않은 공동 배양과 비교하여 통계적 유의성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 발명은, 일부 구현예에서, I형 막 단백질 이중이량체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명의 적어도 하나의 구현예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 반드시 다음의 설명에 기재되거나 실시예에 의해 예시된 세부 사항으로 그 적용이 제한되는 것은 아니라는 점을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 구현예가 가능하거나 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다.
- [0046] 암 면역 요법은 면역 체계의 특정 구성 요소를 자극하거나 면역 반응을 억제하는 암 세포에 의해 생성되는 신호에 대응함으로써 종양에 대한 면역 반응을 향상시키는 것을 목표로 한다.
- [0047] 본 발명의 특정 구현예를 실시함에 한정하지 않으면서, 본 발명자들은 이제 SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 I형 막 단백질의 세포외 부분을 포함하는 이중이량체를 생성하였다(이하, 표 1을 예로 들어 참조).
- [0048] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 이중이량체가 제공되며, 상기 2개의 폴리펩타이드 각각은 이들의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있고, 상기 이중이량체는 이들의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는 이중이량체가 제공된다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 "이중이량체"라는 용어는 두 개의 서로 다른 단백질(본원에서는 단량체라고 함)의 인위적인 부착에 의해 형성된 비-자연 발생 이량체 단백질(non-naturally occurring dimeric protein)을 의미한다.
- [0050] 이량체화, 특히 이중이량체화를 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 NATIVE-PAGE, SEC-HPLC 2D 겔, 겔 여과, SEC-MALS, 분석 초원심분리(AUC) 질량 분석법(MS), 모세관 겔 전기영동(CGE) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체는 공유 결합되지 않는다.
- [0052] 다른 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체는 공유 결합되어 있다.
- [0053] 다른 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체는 이황화물 결합에 의해 부착된다.
- [0054] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체는 이황화 결합에 의해 부착된다.
- [0055] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "SIRP α 폴리펩타이드", "PD1 폴리펩타이드", "TIGIT 폴리펩타이드", "LILRB2 폴리펩타이드" 및 "SIGLEC10 폴리펩타이드"라는 용어는 아래에 추가로 설명된 바와 같이, 각각 SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10의 자연 결합 쌍에 적어도 결합할 수 있는 아미노산 서열 또는 이의 기능성 동족체를 가리킨다.
- [0056] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "기능적 동족체"라는 문구는 단편, 동종체(자연적으로 발생하거나 합성/재조합적으로 생산됨) 및/또는 보수적 및 비보수적 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 의미하며, 이는 적어도 이의 자연 결합 쌍을 결합하는 전체 길이 단백질의 활성을 유지한다.
- [0057] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "이의 자연 결합 쌍"이라는 문구는 인용된 폴리펩타이드의 네이티브 리간드 또는 수용체를 지칭한다.
- [0058] 결합을 테스트하기 위한 분석법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 유세포 분석법, BiaCore, 생체 층 간섭 측정 Blitz® 분석법, HPLC를 포함하되, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 용어 "PD1(프로그램된 사멸 1, CD279로도 알려져 있음)"은 *PDCD1* 유전자(유전자 ID 5133)에 의해 코딩된 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, PD1은 인간 PD1이다. 특정 구현예에 따르면, PD1은 다음 GenBank 번호 NP_005009에 제공된 것과 같은 인간 PD1을 지칭한다.
- [0061] PD1에 대한 두 개의 리간드, 즉 PDL1 및 PDL2(B7-DC라고도 함)가 지금까지 확인되었다. 특정 구현예에 따르면, PDL1 단백질은 다음 GenBank 번호 NP_001254635 및 NP_054862에 제공된 것과 같은 인간 단백질을 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, PDL2 단백질은 다음 GenBank 번호 NP_079515에 제공된 것과 같은 인간 단백질을 지칭한다.
- [0062] 특정 구현예에 따르면, PD1 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 37을 포함한다.

- [0063] 특정 구현예에 따르면, PD1 아미노산 서열은 SEQ ID 번호: 37로 구성된다.
- [0064] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SPR 분석에 의해 결정된 바와 같이, 1 nM - 100 μ M, 10- nM - 10 μ M, 100 nM - 100 μ M, 200 nM - 10 μ M의 Kd를 갖는 PD-L1과 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0065] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SPR 분석에 의해 결정된 약 270 nM의 Kd를 갖는 PDL1과 결합한다.
- [0066] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SPR 분석에 의해 결정된 바와 같이 약 8-9 μ M의 Kd를 갖는 PDL1과 결합한다.
- [0067] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 PD1의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0068] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:41, 42 또는 43 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0069] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 41, 42 또는 43을 포함한다.
- [0070] 특정 구현예에 따르면, PD1 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 41, 42 또는 43으로 구성된다.
- [0071] 용어 "PD1 폴리펩타이드"는 또한 원하는 활성(즉, PD-L1 및/또는 PD-L2와의 결합)을 나타내는 기능성 동족체를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, SEQ ID NO: 37, 41, 42, 또는 43 또는 본원에 개시된 임의의 다른 PD1 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 추가로 기술된 바와 같음)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 "동일성" 또는 "서열 동일성"은 전반적인 동일성, 즉 본 명세서에 개시된 전체 아미노산 또는 핵산 서열에 대한 동일성을 의미하며, 그 일부가 아닌 전체에 대한 동일성을 의미한다.
- [0073] 서열 동일성 또는 상동성은 Blast, ClustalW 및 MUSCLE과 같은 임의의 단백질 또는 핵산 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0074] 상기 동족체는 또한 본원 이하에서 추가로 기술되는 바와 같이, 오솔로그(ortholog), 결실, 삽입, 또는 아미노산 치환을 포함하는 치환 변이체를 지칭할 수 있다.
- [0075] 특정 구현예들에 따르면, 상기 PD1 폴리펩타이드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당업계에 알려져 있으며 예를 들면, Maute et al. PNAS, 2015 Nov 24;112(47):E6506-14; Ju Yeon et al. Nature Communications 2016 volume 7, Article number: 13354 (DOI: 10.1038/ncomms13354); Zack KM et al. Structure. 2015 23(12): 2341-2348 (DOI:10.1016/j.str.2015.09.010); 및 US 특허 공개 No. 2016/0039903에 개시되어 있고, 이들 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0076] 특정 구현예에 따르면, 돌연변이는 PD1 폴리펩타이드의 PDL1에 대한 친화성을 SEQ ID NO: 37과 비교하여 증가시키는 결과를 초래한다.
- [0077] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 42에 제시된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, 및 A107 중에서 선택된 아미노산 서열에 위치한다.
- [0078] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 42에 제시된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, C68, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106 및 A107 중에서 선택된 아미노산 서열에 위치한다.
- [0079] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 SEQ ID NO: 42에 제시된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 (1) V39H 또는 V39R; (2) L40V 또는 L40I; (3) N41I 또는 N41V; (4) Y43F 또는 Y43H; (5) R44Y 또는 R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, 또는 M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G 또는 S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, 또는

N49S; (9) Q50K, Q50E, 또는 Q50H, (10) T51V, T51L, 또는 T51A, (11) D52F, D52R, D52Y, 또는 D52V, (12) K53T 또는 K53L, (13) A56S, 또는 A56L, (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, 또는 Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F 또는 G65V, (16) Q66P, (17) V72I, (18) H82Q, (19) M83L 또는 M83F, (20) R90K, (21) Y96F, (22) L97Y, L97V 또는 L97I, (23) A100I 또는 A100V; (24) S102T 또는 S102A, (25) L103I, L103Y 또는 L103F, (26) A104S, A104H 또는 A104D, (27) P105A, (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R 또는 K106T, 및 (29) A107P, A107I 또는 A107V로 이루어진 군에서 선택된다.

[0080] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 SEQ ID NO: 42에 제시된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 (1) V39H 또는 V39R; (2) L40V 또는 L40I; (3) N41I 또는 N41V; (4) Y43F 또는 Y43H; (5) R44Y 또는 R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, 또는 M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G 또는 S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, 또는 N49S; (9) Q50K, Q50E, 또는 Q50H, (10) T51V, T51L, 또는 T51A, (11) D52F, D52R, D52Y, 또는 D52V, (12) K53T 또는 K53L, (13) A56S 또는 A56L, (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L 또는 Q63P, (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F 또는 G65V; (16) Q66P, (17) C68S(18), V72I, (19) H82Q, (20) M83L 또는 M83F, (21) R90K, (22) Y96F, (23) L97Y, L97V, 또는 L97I, (24) A100I 또는 A100V, (25) S102T 또는 S102A, (26) L103I, L103Y 또는 L103F; (27) A104S, A104H 또는 A104D; (28) P105A; (29) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R 또는 K106T; 및 (30) A107P, A107I 또는 A107V로 이루어진 군에서 선택된다.

[0081] 특정 구현예에 따르면, 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 37에 기재된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 잔기 C93에 위치한다(예, SEQ ID NO: 42에 기재된 PD1 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 잔기 C68에 해당한다).

[0082] 따라서, 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 39 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.

[0083] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 39를 포함한다.

[0084] 특정 구현예에 따르면, PD1 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 39로 구성된다.

[0085] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "SEQ ID NO: 37에 기재된 PD1 아미노산 서열에 대응하는", "SEQ ID NO: 37에 대응하는", "SEQ ID NO: 42에 기재된 PD1 아미노산 서열에 대응하는" 또는 "SEQ ID NO: 42에 대응하는" 문구는 다른 PD1 아미노산 서열과 비교하여 해당 아미노산 잔기를 포함하도록 의도한다.

[0086] 보존적 아미노산 및 비-보존적 아미노산 치환에 대한 추가 설명은 본원 상기와 하기에 더 제공된다.

[0087] 본 발명의 일부 구현예의 PD1은 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 39, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 또는 81과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 또는 상동성을 갖거나, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.

[0088] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 43에 대응하는 아미노산 세그먼트 P1 - L5 및/또는 F146 - V150 중 어느 하나를 포함하지 않는다.

[0089] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 43에 대응하는 아미노산 잔기 P1 - L5 및/또는 F146 - V150 중 어느 하나를 포함하지 않는다.

[0090] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 100 - 288 아미노산, 100 - 200 아미노산, 120-180 아미노산, 120-160, 130-170 아미노산, 130-160, 130-150, 140-160 아미노산, 145-155 아미노산, 123-166 아미노산, 138-145 아미노산, 123 - 148 아미노산, 126-148 아미노산, 123 - 140 아미노산, 126 - 140 아미노산, 127 - 140 아미노산, 130 - 140 아미노산을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.

[0091] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 39, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0092] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 39, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 53, 55, 57, 59, 61, 63,

65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 구성된다.

- [0093] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 49 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0094] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 49를 포함한다.
- [0095] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 49로 구성된다.
- [0096] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 38, 40, 44, 46, 46, 48, 50, 54, 56, 58, 60, 62, 62, 64, 66, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 또는 82와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0097] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 38, 40, 44, 46, 48, 50, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열을 포함한다.
- [0098] 특정 구현예에 따르면, PD1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 38, 40, 44, 46, 48, 50, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열을 포함한다.
- [0099] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0100] 본 명세서에서 사용되는 "SIRP α (신호 조절 단백질 알파, CD172a로도 알려짐)"라는 용어는 SIRP α 유전자(유전자 ID 140885)에 의해 코딩된 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, SIRP α 는 인간 SIRP α 이다. 특정 구현예에 따르면, SIRP α 는 다음 GenBank 번호 NP_001035111, NP_001035112, NP_001317657 또는 NP_542970에 제공되는 바와 같은 인간 SIRP α 를 지칭한다.
- [0101] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 83을 포함한다.
- [0102] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 83으로 구성된다.
- [0103] SIRP α 의 알려진 결합 쌍은 CD47이다. 특정 구현예에 따르면, CD47 단백질은 다음과 같은 인간 단백질을 의미하며, 예컨대 다음 GenBank 번호 NP_001768 또는 NP_942088에 제공된다.
- [0104] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SPR에 의해 결정되는 0.1 - 100 μ M, 0.1 - 10 μ M, 1-10 μ M, 0.1-5 μ M 또는 1-2 μ M의 Kd로 CD47과 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0105] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 상기 SIRP α 의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0106] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0107] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85를 포함한다.
- [0108] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85로 구성된다.
- [0109] 용어 "SIRP α 폴리펩타이드"는 또한 원하는 활성(즉, CD47 결합)을 나타내는 기능적 동족체를 포함한다. 이러한 동족체들은 예를 들어, SEQ ID NO: 83 또는 85 또는 본원에 개시된 임의의 다른 SIRP α 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 폴리펩타이드와 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열(본원 이하에서 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0110] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 Weiskopf K et al. (2013); 341(6141):88-91에 공개되어 있는

며, 그 내용은 본 명세서에 참조로 완전히 통합되어 있다.

- [0111] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4, V6, A21, A27, I31, E47, K53, E54, H56, V63, L66, K68, V92 및 F96에서 선택된 아미노산 잔기에 위치한다.
- [0112] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4, A27, E47 및 V92로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0113] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4V 또는 L4I, V6I 또는 V6L, A21V, A27I 또는 A27L, I31F 또는 I31T, E47V 또는 E47L, K53R, E54Q, H56P 또는 H56R, V63I, L66T 또는 L66G, K68R, V92I 및 F94L 또는 F94V로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0114] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4I, A27I, E47V 및 V92I로 이루어진 군에서 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0115] 본원에서 사용된 "SEQ ID NO: 85에 기재된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "SEQ ID NO: 85에 상응하는"이라는 어구는 임의의 다른 SIRP α 아미노산 서열에 대한 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0116] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 89 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0117] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 89를 포함한다.
- [0118] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 89로 구성된다.
- [0119] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 상기 및 하에서 추가로 제공된다.
- [0120] 본 발명의 일부 구현예의 SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85, 87, 89, 91 또는 93의 폴리펩타이드와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성을 갖거나; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0121] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 상응하는 아미노산 분절 K117 - Y343을 포함하지 않는다.
- [0122] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 상응하는 아미노산 잔기 K117 - Y343 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0123] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 상응하는 아미노산 분절 P118 - Y343을 포함하지 않는다.
- [0124] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85에 상응하는 아미노산 잔기 P118 - Y343 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0125] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 100-504, 100-500 아미노산, 150-450 아미노산, 200-400 아미노산, 250-400 아미노산, 300-400 아미노산, 320-420 아미노산, 340-350 아미노산, 300-400의 아미노산, 340-450 아미노산, 100-200 아미노산, 100-150 아미노산, 100-125 아미노산, 100-120 아미노산, 100-119 아미노산, 105 - 119 아미노산 110 - 119 아미노산, 115 - 119 아미노산, 105 - 118 아미노산, 110 - 118 아미노산, 115 - 118 아미노산, 105 - 117 아미노산, 110 - 117 아미노산, 115 - 117 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0126] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85, 87, 89, 91 및 93으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0127] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85, 87, 89, 91 및 93으로 이루어진 군에서 선택된

아미노산 서열을 포함한다.

- [0128] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 85, 87, 89, 91 및 93으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 구성된다.
- [0129] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 86, 88, 90, 92 또는 94와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0130] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 86, 88, 90, 92 및 94로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열을 포함한다.
- [0131] 특정 구현예에 따르면, SIRP α 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 86, 88, 90, 92 및 94로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열로 구성된다.
- [0132] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0133] 본원에서 사용되는 용어 "TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체)"는 TIGIT 유전자(유전자 ID 201633)에 의해 코딩하는 폴리펩타이드를 의미한다. 특정 구현예에 따르면, TIGIT는 인간 TIGIT이다. 특정 구현예에 따르면, TIGIT는 다음 GenBank 번호 NP_776160 또는 XP_024309156에서 제공된 것과 같은 인간 TIGIT를 의미한다.
- [0134] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 106을 포함한다.
- [0135] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 106으로 구성된다.
- [0136] 알려진 TIGIT 결합 쌍은 CD155(PVR)이다. 특정 구현예에 따르면, CD155 단백질은 다음 GenBank 번호 NP_001129240, NP_001129241, NP_001129242, NP_006496에 제공된 것과 같은 인간 단백질을 의미한다.
- [0137] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SPR에 의해 측정된 0.01 - 100 μ M, 0.1 - 100 μ M, 0.1 - 10 μ M 또는 0.1 - 5 μ M의 Kd로 CD155에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0138] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 TIGIT의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0139] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 107, 113 또는 115 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0140] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 107, 113 또는 115를 포함한다.
- [0141] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 107, 113 또는 115로 구성된다.
- [0142] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 113을 포함한다.
- [0143] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 113으로 구성된다.
- [0144] 용어 "TIGIT 폴리펩타이드"는 또한 기능적 동족체(원하는 활성(즉, 결합 CD155)를 나타냄)를 포함한다. 이러한 동족체는 예를 들어 SEQ ID NO: 106, 107, 113 또는 115의 폴리펩타이드 또는 본원에 개시된 임의의 다른 TIGT 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성을 갖거나; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열(하기에 추가로 기재된 바와 같음)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0145] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0146] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 106에 제시된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는 I42 및 C69에서 선택된 아미노산 잔기에 위치한다.

- [0147] 특정 구현예에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 106에 제시된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는 I42A 및 C69S로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0148] 본원에서 사용된 바와 같이, "SEQ ID NO: 106에 기재된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "SEQ ID NO: 106에 상응하는"이라는 어구는 임의의 다른 TIGIT 아미노산 서열에 대한 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0149] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 109 또는 111 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0150] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 109 또는 111을 포함한다.
- [0151] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 109 또는 111로 구성된다.
- [0152] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 상기 및 하기에서 추가로 제공된다.
- [0153] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드는 100-244 아미노산, 100-200 아미노산, 100-150 아미노산, 120-140 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0154] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 108, 110, 112 또는 114와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0155] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 108, 110, 112 및 114로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열을 포함한다.
- [0156] 특정 구현예에 따르면, TIGIT 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 108, 110, 112 및 114로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열로 구성된다.
- [0157] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0158] 본원에서 사용되는 용어 "LILRB2(백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 멤버 2)"는 LILRB2 유전자(유전자 ID 10288)에 의해 코딩하는 폴리펩타이드를 의미한다. 특정 구현예에 따르면, LILRB2는 인간 LILRB2이다. 특정 구현예에 따르면, LILRB2는 다음 GenBank 번호 NP_001074447, NP_001265332, NP_001265333, NP_001265334, NP_001265335에 제공된 것과 같은 인간 LILRB2를 의미한다.
- [0159] LILRB2의 알려진 결합 쌍은 주요 조직 적합성 분자(MHC, 예, HLA-G)이다. 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SPR에 의해 측정된 바와 같이 0.1 nM - 100 μM, 0.1 nM - 10 μM, 1 nM - 1 μM, 1 - 100 nM, 또는 1 - 10 nM의 Kd로 MHC(예, HLA-G)에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0160] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 상기 LILRB2의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0161] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 95 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0162] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 95를 포함한다.
- [0163] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 95로 구성된다.
- [0164] LILRB2의 세포외 도메인은 D1 - D4로 알려진 4개의 Ig 유사 도메인을 포함한다.
- [0165] 따라서, 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 적어도 하나의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0166] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 적어도 2개의 Ig-유사 도메인, 적어도 3개의 Ig-유사 도메인 또는 4개의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0167] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 LILRB2의 도메인 D1 및 D2; LILRB2의 도메인 D1, D2 및 D3, LILRB2의 도메인 D1, D2 및 D4 또는 LILRB2의 도메인 D1, D2, D3 및 D4를 포함한다.
- [0168] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 96 또는 98 또는 이의 기능적 동족체(예를 들어, 단편)를 포함한다.

- [0169] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 96 또는 98을 포함한다.
- [0170] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 96 또는 98로 구성된다.
- [0171] 용어 "LILRB2 폴리펩타이드"는 또한 원하는 활성(즉, MHC, 예를 들어 HLA-G 결합)을 나타내는 기능성 동족체를 포함한다. 이러한 동족체는 예를 들어, SEQ ID NO: 95의 폴리펩타이드 또는 본원에 개시된 임의의 다른 LILRB2 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성을 갖거나; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(하기에 추가로 설명됨)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0172] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 보존적 아미노산 및 비-보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 상기 및 하기에 추가로 제공된다.
- [0173] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 100-597 아미노산, 100-500 아미노산, 100-400 아미노산, 150 - 400 아미노산, 300 - 400 아미노산, 350 - 400 아미노산, 150 - 250 아미노산, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0174] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 96을 포함한다.
- [0175] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 96으로 구성된다.
- [0176] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 97 또는 99와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0177] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 97을 포함한다.
- [0178] 특정 구현예에 따르면, LILRB2 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 97로 구성된다.
- [0179] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0180] 본원에서 사용된 용어 "SIGLEC-10(시알산-결합 Ig-유사 력틴 10)"은 SIGLEC10 유전자(유전자 ID 89790)에 의해 코딩되는 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10은 다음의 GenBank 번호 NP_001164627, NP_001164628, NP_001164629, NP_001164630, NP_001164632에 제공된 것과 같은 인간 SIGLEC10을 의미한다.
- [0181] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 100을 포함한다.
- [0182] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 100으로 구성된다.
- [0183] SIGLEC10의 알려진 결합 쌍은 CD24 및/또는 CD52에서 발현되는 시알산이다. 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 SPR에 의해 측정된 1 nM - 100 μ M, 0.01 - 100 μ M, 0.01 - 10 μ M, 0.1 - 10 μ M, 0.1 - 5 μ M, 또는 0.1 - 1 μ M의 Kd로 CD24 또는 CD52에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0184] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC-10 폴리펩타이드는 SIGLEC10의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0185] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 적어도 하나의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0186] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 적어도 2개의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0187] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 105 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0188] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC-10 폴리펩타이드는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0189] 특정 구현예에 따르면, 하나의 돌연변이는 SEQ ID NO: 100에 제시된 SIGLEC10 아미노산 서열에 상응하는 아미노

산 잔기 C36에 위치한다.

- [0190] 특정 구현예에 따르면, 하나의 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 100에 제시된 SIGLEC10 아미노산 서열에 상응하는 C36S이다.
- [0191] 본원에서 사용된 바와 같이, "SEQ ID NO: 100에 기재된 SIGLEC10 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "SEQ ID NO: 100에 상응하는"이라는 어구는 임의의 다른 SIGLEC10 아미노산 서열에 대한 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0192] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 103 또는 이의 기능적 동족체(예, 단편)를 포함한다.
- [0193] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 103을 포함한다.
- [0194] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC-10 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 103으로 구성된다.
- [0195] 보존적 아미노산 및 비-보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 상기 및 하기에 추가로 제공된다.
- [0196] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 아미노산 서열은 100-639 아미노산, 100-600 아미노산, 100 - 550 아미노산, 100 - 300 아미노산, 100 - 200 아미노산, 100 - 150 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0197] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 102 또는 104와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0198] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 104를 포함한다.
- [0199] 특정 구현예에 따르면, SIGLEC10 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 104로 구성된다.
- [0200] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 PD1 폴리펩타이드, SIRP α 폴리펩타이드 및 TIGIT 폴리펩타이드, SIRP α 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드, SIRP α 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드, PD1 폴리펩타이드 및 TIGIT 폴리펩타이드, PD1 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드, PD1 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드, TIGIT 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드, TIGIT 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드 또는 LILRB2 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0201] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0202] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0203] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0204] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 96에 제시된 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0205] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 93에 제시된 SIRP α 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 96에 제시된 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0206] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0207] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 103에 제시된 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0208] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SIRP α 폴리펩타이드 및 TIGIT 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0209] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 85에 제시된 SIRP α 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 109에 제시된 TIGIT 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0210] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0211] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 109, 111 또는 113에 제시된 TIGIT 폴리펩타이드 및 SEQ ID

NO: 49에 제시된 PD1 폴리펩타이드를 포함한다.

- [0212] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0213] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 109에 제시된 TIGIT 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 96에 제시된 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0214] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 TIGIT 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0215] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 109에 제시된 TIGIT 폴리펩타이드 및 SEQ IS NO: 103에 제시된 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0216] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 PD1 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0217] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 49에 제시된 PD1 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 103에 제시된 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0218] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 LILRB2 폴리펩타이드 및 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0219] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 96에 제시된 LILRB2 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 103에 제시된 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0220] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 PD1 폴리펩타이드 및 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0221] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 49에 제시된 PD1 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 96에 제시된 LILRB2 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0222] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는다.
- [0223] 본원에서 사용되는 바와 같이, "II형 막 단백질의 아미노산 서열"이라는 어구는 이의 자연 결합 쌍에 적어도 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 연속적인 아미노산 서열을 의미한다. 특정 구현예에 따르면, 이러한 아미노산 서열은 II형 막 단백질 또는 이의 기능적 단편의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0224] 본원에서 사용되는 "II형 막 단백질"이라는 어구는 C-말단 세포외 도메인을 갖는 막관통 단백질을 의미한다.
- [0225] 이러한 II형 막 단백질의 비-제한적 예로는 4-1BBL, FasL, TRAIL, TNF-alpha, TNF-beta, OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, GITRL, EDA1/2, 림프톡신 알파 및 림프톡신 베타를 포함한다.
- [0226] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 본원에 개시된 2개의 폴리펩타이드 외에 이의 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하지 않는다.
- [0227] 본원에서 사용되는 바와 같이, "I형 막 단백질의 아미노산 서열"이라는 어구는 적어도 자연 결합 쌍에 결합할 수 있는 I형 막 단백질의 연속적인 아미노산 서열을 의미한다. 특정 구현예에 따르면, 이러한 아미노산 서열은 I형 막 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 기능적 단편을 포함한다.
- [0228] 본원에서 사용되는 "I형 막 단백질"이라는 어구는 N-말단 세포외 도메인을 갖는 막관통 단백질을 의미한다.
- [0229] 이러한 I형 막 단백질의 비-제한적 예로는 LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFBR (e.g. TGFBR1), LY96, CD96, KIT, CD244 및 GFER을 포함한다.
- [0230] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 본원에 개시된 2개의 폴리펩타이드 및 임의로 하기에 추가로 기재된 바와 같은 이량체화 모이어티(예, 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편) 이외의 단백질성 표적화, 신호전달, 면역 조절 모이어티 및/또는 치료 모이어티를 추가로 포함하지 않는다.
- [0231] 이러한 모이어티의 비-제한적 예로는 사이토카인, 리간드, 수용체, 면역 조절 폴리펩타이드 및 항체의 결합 도메인(예, ScFv)을 포함한다.
- [0232] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 본원에 기재된 2개의 폴리펩타이드 및 임의로 하기에 추가로 기재된 바와 같은 이량체화 모이어티(예, 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편)로 구성된다.

- [0233] 다른 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 이중 치료 모이어티에 부착되거나 이를 포함한다. 치료 모이어티는 소분자 화합물 및 폴리펩타이드를 포함하는 임의의 분자일 수 있다.
- [0234] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 치료 모이어티의 비-제한적 예로는 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 사이토카인 모이어티, 면역조절 모이어티, 폴리펩타이드, 항체, 약물, 화학물질 및/또는 방사성 동위원소를 포함한다.
- [0235] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 치료 모이어티는 본 발명의 일부 구현예의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 치료 모이어티를 코딩하는 핵산 서열과 번역 융합함으로써 접합된다.
- [0236] 추가로 또는 대안적으로, 치료 모이어티는 당업자에게 공지된 임의의 접합 방법을 사용하여 본 발명의 일부 구현예의 이중이량체에 화학적으로 접합(커플링)될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 3-(2-피리딜디티오)프로피온산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(N-숙신이미드 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트라고도 함)("SDPD")(Sigma, Cat. No. P-3415; 예, Cumber et al. 1985, Methods of Enzymology 112: 207-224 참조), 글루타르알데하이드 접합 절차(예, G.T. Hermanson 1996, "Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego 참조) 또는 카르보다이미드 접합 절차 [예, J. March, Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, pp. 349-50 & 372-74 (3d ed.), 1985; B. Neises et al. 1978, Angew Chem., Int. Ed. Engl. 17:522; A. Hassner et al. 1978, Tetrahedron Lett. 4475; E.P. Boden et al. 1986, J. Org. Chem. 50:2394 and L.J. Mathias 1979, Synthesis 561 참조]를 사용하여 관심 있는 제제에 접합될 수 있다.
- [0237] 치료 모이어티는 예를 들어 (기능성 부분이 폴리펩타이드인 경우) 펩타이드 결합을 통해 또는 유기 중합체와 같은 링커 펩타이드 또는 다른 화학적 모이어티와 같은 개재 링커 요소에 대한 공유 결합을 통해 직간접적으로 임의의 적합한 화학적 연결을 사용하는 것과 같이 당업계[예, [hypertexttransferprotocol://worldwideweb\(dot\)chemistry\(dot\)org/portal/Chemistry](http://hypertexttransferprotocol://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/Chemistry) 참조]에서 널리 시행되는 표준 화학 합성 기술을 사용하여 본 발명의 일부 구현예의 이중이량체에 부착될 수 있다. 키메라 펩타이드는 펩타이드의 카르복시(C) 또는 아미노(N) 말단에서의 결합을 통해 또는 직쇄, 분지쇄 또는 고리형 측쇄, 내부 탄소 또는 질소 원자 등과 같은 내부 화학 그룹에 대한 결합을 통해 연결될 수 있다.
- [0238] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 검출가능한 태그를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에 따르면, 이중이량체에 포함된 임의의 폴리펩타이드는 검출가능한 태그를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 일 구현예에서 "검출 가능한 태그"라는 용어는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 숙련된 실무자에 의해 검출될 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 검출가능한 태그는 펩타이드 서열일 수 있다. 선택적으로 검출 가능한 태그는 화학 작용제 또는 단백질 분해와 같은 효소 수단에 의해 제거될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예의 검출가능한 태그는 폴리펩타이드 또는 이중이량체의 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 "검출 가능한 태그"라는 용어에는 키틴 결합 단백질(CBP)-태그, 말토오스 결합 단백질(MBP)-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)-태그, 폴리(His)-태그, FLAG 태그, V5-태그와 같은 에피토프 태그, c-myc-tag, HA-tag, 녹색형광단백질(GFP), 적색형광단백질(RFP), 황색형광단백질(YFP), 청색형광단백질(BFP), 청록색형광단백질(CFP) 등의 형광태그; 뿐만 아니라 이들 태그의 파생물, 또는 당업계에 공지된 임의의 태그를 포함한다. "검출 가능한 태그"라는 용어는 "검출 가능한 마커"라는 용어도 포함한다.
- [0239] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드는 이의 N-말단에 부착된 검출가능한 태그(예, 폴리(His)-태그)를 포함한다.
- [0240] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드는 이의 C-말단에 부착된 검출가능한 태그(예, 폴리(His)-태그)를 포함한다.
- [0241] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드의 N-말단은 검출가능한 태그(예, 폴리(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [0242] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드의 C-말단은 검출가능한 태그(예, 폴리(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [0243] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에 따르면, 이중이량체에 포함된 임의의 폴리펩타이드는 절단 가능한 모이어티에 융합될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 회복을 용이하게 하기 위해, 발현된 코딩 서열은 본 발명의 일부 구현예의 폴리펩타이드 및 융합된 절단 가능한 모이어티를 코딩하도록 조작될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리펩타이드는 친화성 크로마토그래피에 의해, 예를 들어, 절단 가능한 모이어티에 특이적인 컬럼에 고정화하여 쉽게 분리되도록 설계된다. 일 구현예에서, 절단 부위는 폴

리펩타이드와 절단가능한 모이어티 사이에 조작되고 펩타이드는 이 부위에서 융합 단백질을 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 작용제로 처리함으로써 크로마토그래피 컬럼에서 방출될 수 있다[예, Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); and Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990 참조)]. 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 본원에 개시된 2개의 폴리펩타이드에 부착된 이량체화 모이어티를 포함한다.

- [0244] 본원에서 사용되는 용어 "이량체화 모이어티"는 이중이량체를 형성하기 위해 2개의 상이한 모노머를 부착할 수 있는 모이어티를 지칭한다. 이러한 이량체화 모이어티는 당업계에 공지되어 있고 화학적 및 단백질성 모이어티를 포함한다.
- [0245] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 폴리펩타이드에 직접 부착된다.
- [0246] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 폴리펩타이드에 직접적으로 부착되지 않는다.
- [0247] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 폴리펩타이드에 공유 결합된다.
- [0248] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 폴리펩타이드에 비-공유적으로 부착된다.
- [0249] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 폴리펩타이드(들)에 대해 이중성이다.
- [0250] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 적어도 2개의 상이한 분자의 조성이다.
- [0251] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 2개의 폴리펩타이드 중 적어도 하나의 자연 결합 쌍을 발현하는 세포 및/또는 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍을 발현하는 세포에 대한 이중이량체의 결합 시 면역 반응을 활성화할 수 있다.
- [0252] 본원에서 사용되는 "활성화"라는 어구는 세포 증식, 성숙, 사이토카인 생산 및/또는 조절 또는 효과기 기능의 유도를 초래하는 면역 세포(예, T 세포, NK 세포, B 세포, 수지상 세포, 대식세포)의 자극을 의미한다. 면역 세포 활성화 또는 기능을 평가하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 BRDU 및 티미딘 혼입과 같은 증식 분석, 크롬 방출과 같은 세포독성 분석, 세포내 사이토카인 염색 ELISPOT 및 ELISA와 같은 사이토카인 분비 분석, 유세포 분석 및 다량체(예, 사량체) 어세이를 사용하는 CD25, CD69 및 CD69와 같은 활성화 마커의 발현을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0253] 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이러한 이량체화 모이어티의 비-제한적인 예는 이하에 추가로 설명되는 바와 같이 항체의 Fc 도메인이다.
- [0254] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 비-단백질성 모이어티, 예를 들어 가교제, 유기 중합체, 합성 중합체, 소분자 등이다.
- [0255] 다수의 이러한 비-단백질성 모이어티가 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 Santa Cruz, Sigma-Aldrich, Proteochem 등에서 시판되고 있다. 특정 구현예에 따르면, 비단백질성 모이어티는 이중이작용성 가교 링커이다. 이중이작용성 가교 링커는 두 개의 서로 다른 반응 말단을 가지고 있다. 전형적으로, 제1 단계에서, 단량체는 이중이작용성 시약의 하나의 반응성 기로 변형되고; 나머지 유리 시약은 제거된다. 두 번째 단계에서는 개질된 모노머를 두 번째 모노머와 혼합한 다음 시약의 다른 쪽 끝에 있는 개질제 그룹과 반응시킨다. 가장 널리 사용되는 결합 단백질은 아민 및 설프하이드릴 그룹을 통해 결합된다 (가장 불안정한 아민 반응성 NHS-에스테르가 먼저 결합하고 결합되지 않은 시약을 제거한 후 설프하이드릴 그룹에 대한 결합이 진행된다). 설프하이드릴 반응성 그룹은 일반적으로 말레이미드, 피리딜 디설프아이드 및 알파-할로세틸이다. 다른 가교링커는 카르복실기(-COOH)와 1차 아민(-NH₂) 사이를 연결하는 카르보디이미드를 포함한다. 다른 접근법은 하나의 단량체의 라이신 잔기를 티올로 변형시키는 것이며, 두 번째 단량체는 말레이미드 그룹을 첨가한 후 단량체 사이에 안정한 티오에스테르 결합을 형성함으로써 변형된다. 단량체 중 하나에 자연 티올이 있는 경우 이러한 그룹은 다른 단량체에 부착된 말레이미드와 직접 반응할 수 있다. 비스[2-(4-아지도살리실아미도)에틸] 디설프아이드, BASED와 같은 하나의 광반응성 말단을 갖는 이중이작용성 가교 링커도 있다 광반응성 그룹은 UV 광에 노출될 때 비특이적으로 반응하기 때문에 - 반응할 특정 그룹이 없을 때 사용된다. 이러한 이중이작용성 가교제의 비-제한적 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: 알킨-PEG4-말레이미드, 알킨-PEG5-N-히드록시숙신이미딜에스테르, 말레이미드-PEG-숙신이미딜에스테르, 아지도-PEG4-페닐옥사디아졸 메틸설프온, LC-SMCC(숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트)), MPBH(4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 히드라지드 염산염 + 1/2 디옥산), PDPH(3-(2-피리딜티오)프로피오닐 히드라지드), SIAB(N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트), SMPH(숙신이미딜-6-(b-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트), 설프-KMUS(N-(κ-말레이미도운데카노일옥시) 설프숙신이미딜 에스테르), 설프-SIAB(설프숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트), 3-(말

레이미도)프로피온산 N-히드록시숙신이미드에스테르, 메톡시카르보닐술펜일클로라이드, 프로파길-PEG-산, 아미노-PEG-t-부틸에스테르, BocNH-PEG5-산, BMPH(N-(β -말레이미도프로피온산)히드라이드, 트리플루오로아세트산염), ANB-NOS, BMPs, EMCS, GMBS, LC-SPDP, MBS, SBA, SIA, Sulfo-SIA, SMCC, SMPB, SMPH, SPDP, 설폰-LC-SPDP, 설폰-MBS, 설폰-SANPAH, 설폰-SMCC.

- [0256] 다른 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 단백질성 모이어티이다.
- [0257] 다른 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 단백질성 이량체 모이어티이다.
- [0258] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드는 이량체화 단백질성 모이어티의 N-말단에 부착된다.
- [0259] 특정 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드는 이량체화 단백질성 모이어티의 N-말단에 부착된다.
- [0260] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드는 이량체화 단백질성 모이어티의 C-말단에 부착된다.
- [0261] 특정 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드는 이량체화 단백질성 모이어티의 C-말단에 부착된다.
- [0262] 특정 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드 중 하나는 이량체 단백질성 모이어티의 N-말단에 부착되고, 2개의 폴리펩타이드 중 두 번째는 이량체 단백질성 모이어티의 C-말단에 부착된다.
- [0263] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 2개의 상이한 친화성 상보적 태그에 대한 2개의 별개의 친화성 모이어티를 갖는 친화성 쌍 폴리펩타이드의 멤버를 포함한다. 이러한 친화성 쌍은 당업계에 잘 알려져 있으며 헤마글루티닌(HA), 항-HA, AviTag™, V5, Myc, T7, FLAG, HSV, VSV-G, His, 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 리자베딘, 금속 친화성 태그, 락틴 친화성 태그를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 숙련된 기술자라면 어떤 태그를 선택해야 하는지 알 것이다.
- [0264] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 항체(예, IgG, IgA, IgD 또는 IgE) 또는 이의 단편의 Fc 도메인이다.
- [0265] 특정 구현예에 따르면, IgG, IgA, IgD 또는 IgE의 Fc이다.
- [0266] 특정 구현예에 따르면, IgG의 Fc 도메인.
- [0267] 특정 구현예에 따르면, IgG1 또는 IgG4의 Fc 도메인이다.
- [0268] 특정 구현예에 따르면, 인간 IgG4의 Fc 도메인이다. 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 인간 IgG4 Fc 도메인의 비-제한적 예는 SEQ ID NO: 134에 제공된다.
- [0269] 특정 구현예에 따르면, 인간 IgG1의 Fc 도메인이다. 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 인간 IgG1 Fc 도메인의 비제한적 예는 SEQ ID NO: 137 및 156에 제공된다.
- [0270] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 부분은 Fc 도메인 단량체이다.
- [0271] 다른 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 Fc 도메인 이량체이다.
- [0272] 항체의 Fc 도메인을 사용하여 이중이량체를 생성하는데 사용할 수 있는 메커니즘에는 노브-인트루-홀(knob-into-hole) 또는 전하 쌍과 같으나 이에 제한되지 않는 여러 가지 메커니즘이 있다(예, Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. (2010) 285(25):19637 참조, 전체 내용이 참조로 포함됨).
- [0273] 따라서, 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환(본원에서 돌연변이라고도 함)을 포함할 수 있다.
- [0274] 서열 동일성의 백분율이 단백질과 관련하여 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환에 의해 흔히 상이한 것으로 인식되고, 이때, 아미노산 잔기는 유사한 화학적 특성(예, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되고, 따라서 분자의 기능적 특성을 변화시키지 않는다. 서열이 보존적 치환으로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율은 치환의 보존적 특성을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존적 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성(similarity)" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 간주된다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 통상적으로, 이는 보존적 치환을 완전 불일치(full mismatch)가 아닌 부분적인 것으로 점수평가(scoring)하는 것을 포함하여, 서열 동일성 백분율을 증가시킨다. 따라서, 예를 들면, 동일한 아미노산에 1의 점수가 주어지고 비보존적 치환에 0의 점수가 주어지는 경우, 보존적 치환은 0과 1 사이의 점수가 주어진다. 보존적 치환의 점수평가는 예를 들면, 헨리코프(Henikoff) S 및 헨리코프 JG의 알고리즘 [Amino acid substitution matrices from protein blocks. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992,

89(22): 10915-9]에 따라 계산된다.

- [0275] 보존적 아미노산 및 비-보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 이하에서 더 제공된다.
- [0276] Fc 도메인에서의 이러한 치환은 당업계에 공지되어 있다.
- [0277] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 대표적인 예시는 "노브-인투-홀"("KIH") 형태이다. 이러한 노브 및 홀 돌연변이는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들면, 미국 특허 번호 제US8216805호, Shane Atwell et al. J. Mol. Biol. (1997) 270, 26-35; Cater et al. (Protein Engineering vol.9 no.7 pp.617-621, 1996); 및 A. Margaret Merchant et.al. Nature Biotechnology(1998) 16 July에 개시되어 있으며, 이들의 전문은 참조로 본 명세서에 포함된다. 또한, Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998)에 기술된 것과 같이, "노브 및 홀" 돌연변이들은 이황화 결합(disulfide bonds)과 결합되어 이종이량체로 형성을 왜곡할 수 있다.("knobs and hole" mutations can be combined with disulfide bonds to skew formation to heterodimerization).
- [0278] 따라서, 특정 구현예들에 따르면, 상기 단량체들 중 하나는 노브 돌연변이(들)를 포함하는 Fc 도메인을 포함하고 다른 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.
- [0279] 특정 면역글로불린 클래스 및 서브클래스로부터 특이적인 면역글로불린 Fc 도메인을 선택하고 노브 돌연변이를 위한 제1 Fc 변이체를 선택하고 홀 돌연변이를 위한 다른 하나를 선택하는 것은 당업자의 범위 내에 있다. 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 치환의 비제한적 예시는 S228P, L235E, T366W, Y349C, T366S, L368A, Y407V 및/또는 E356C(EU 넘버링(Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda)에 따름), 또는 L234A, L235A, Y349C, T366W, T354C, D356C, T366S, L368A 및/또는 Y407V(인간 IgG1에 해당 전장 항체의 일부로 EU 넘버링(Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda)에 따름)를 포함한다.
- [0280] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 노브 돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 도메인의 비-제한적 예는 SEQ ID NO: 135, 157, 158 및 163에 제공된다.
- [0281] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 홀 돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 도메인의 비제한적 예는 SEQ ID NO: 136, 159 및 164에 제공된다.
- [0282] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 노브 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인의 비제한적 예는 SEQ ID NO: 27, 51, 154 및 160에 제공된다.
- [0283] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 홀 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 도메인의 비제한적 예는 SEQ ID NO: 28, 52, 152, 161 및 162에 제공된다.
- [0284] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 27, 28, 51, 52, 134, 135, 136, 137, 152, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 및 164 또는 본원에 개시된 원하는 활성을 나타내는 이의 기능적 단편과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성을 갖거나, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0285] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 SEQ ID NO: 135-136, 27-28 또는 51-52로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0286] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 변형되어 Fc 수용체에 대한 이의 결합을 변경하고, 이의 면역 활성화 기능을 감소시키고, 및/또는 상기 용합의 반감기를 개선한다.
- [0287] 특정 구현예에 따르면, 자연 결합 쌍(들)이 건강한 세포에서 발현되는 것으로 알려진 경우, Fc 도메인은 변형되어 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하고, 및/또는 이의 면역 활성화 기능을 감소시킨다.
- [0288] 특정 구현예에 따르면, SIRP α-LILRB2 이종이량체는 변형되어 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 이의 면역 활성화

기능을 감소시킨다.

- [0289] 다른 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하고, 이의 면역 활성화 기능을 감소시키고, 및/또는 융합의 반감기를 개선하도록 변형되지 않는다.
- [0290] 특정 구현예에 따르면, 자연 결합 쌍(들)이 단독으로 발현되거나 병리학적 세포(예, 암 세포) 상에서 과발현되는 것으로 알려진 경우, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하고/하거나 면역 활성화를 감소시키기 위해 변형되지 않는다. 그것의 기능.
- [0291] 특정 구현예에 따르면, TIGIT-PD1 이중이량체는 Fc 수용체에 대한 결합을 변경하고, 및/또는 이의 면역 활성화 기능을 감소시키도록 변형되지 않은 Fc 도메인을 포함한다.
- [0292] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 변형되어 생체 내에서 Fc 수용체(예: Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII 및 Fc.gamma.RIII)에 대한 결합을 감소시키거나 방지한다. 이러한 변형은 예를 들어 일련의 돌연변이 IgG1, IgG2 및 IgG4 Fc 도메인 및 이들의 Fc.감마.R 결합 특성을 설계하고 기술한 Clark 및 동료들에 의해 기술되었다(Armour et al., 1999; Armour et al., 2002, 그 내용 전체가 참조로 여기에 포함됨). Fc 수용체에 결합하는 것을 감소시키기 위한 인간 IgG1의 Fc에서의 추가적 또는 대안적 변형은 [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] 아미노산 L234 및 L235를 Fc 수용체 결합에 필수적인 것으로 식별한 CHAPPEL 및 동료들(Proc. Natl. Acad. Sci (1991) 88: 9036-9040, 그 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 의해 설명된다. P329의 G로의 추가적인 치환은 결합을 더 약하게 하며, 치환의 이러한 LALA-PG 조합은 예를 들어 Schlothauer, T., et al. (2016) Protein Eng. Des. Sel. 29, 457-466; 및 국제 특허 공개 번호 WO 2012/130831(이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다. Fab 암(arm) 교환을 방지하고 Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키기 위한 인간 IgG4의 Fc에서의 추가적 또는 대안적 변형은 각각 [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] S228P 및 L235E를 확인한 John-Paul Silva et al. (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (2015), 290: 9, 5462-5469, 그 내용은 전문이 본원에 참조로 포함됨) 및 Newman et al., (Clinical Immunology (2001) 98:2, 내용 이들 중 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 의해 기술되어 있다.
- [0293] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 FcγRIIIa 결합을 최대화하도록 변형된다. 이러한 수정은 예를 들어 Shields RL J Biol Chem. (2001) 276:6591, Smith P, Proc Natl Acad Sci USA. (2012) 109:6181, Stavenhagen et al., Cancer Res (2007) 67:8882, Lazar et al., Proc Natl Acad Sci UCA (2006) 103:4005, Richards et al., 2008 Cancer Ther 7:2517 and Mimoto et al., (2013) MAbs 5:229 에 기술되어 있으며, 그 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이러한 변형의 비-제한적 예로는 [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] S298, E333 및 K334(예, S298A, E333A, K334A); G236A, S239A, A330L 및 I332E; F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L; S239D, I332E 및 A330L; 236A, S239D 및 I332E; 및 비대칭 치환 - 하나의 중쇄에서 L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A 및 반대편 중쇄에서 D270E/K326D/A330M/K334E로부터 선택된 하나 이상의 아미노 잔기에서의 치환을 포함한다.
- [0294] 특정 구현예에 따르면, Fc 도메인은 예를 들어 보체 결합을 감소시키고/시키거나 보체 의존성 세포독성을 감소 또는 제거하는 것과 같이 이펙터 기능을 변경하기 위해 변형된다. 이러한 수정은 예를 들어 미국특허 5,624,821 및 5,648,260, 미국특허 6,194,551, WO 99/51642, Wines et al., 2000, Idusogie et al. (2000) J. Immunol. 164:4178; Tao et al. (1993) J. Exp. Med. 178:661 and Canfield & Morrison (1991) J. Exp. Med. 173: 1483에 기술되어 있으며, 그 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이러한 변형의 비-제한적 예로는 [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322; 329, 331 및 322; L234 및/또는 L235(예, L234A 및/또는 L235A); D270, K322, P329 및 P331(예, D270A, K322A, P329A 및 P331A)로부터 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산에서의 치환을 포함한다.
- [0295] 특정 구현예에 따르면, 융합 단백질의 반감기를 개선하기 위해 Fc 도메인이 변형된다. 이러한 변형은 예를 들어 미국 특허 5,869,046 및 미국 특허 6,121,022 에 기술되어 있으며, 그 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 예를 들어, [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] 252(예, Thr 도입), 254(예, Ser 도입) 및 256(예, Phe 도입)에서 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산의 치환. 반감기를 개선하기 위한 또 다른 변형은 CH1 또는 CL 영역을 변경하여 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 두 루프에서 발견되는 것과 같은 회수 수용체 모티프를 도입하는 것일 수 있다.
- [0296] FcRn 결합을 최대화하고 반감기를 연장하는 것이 또한 예를 들어 Stapleton NM, Nat Commun. (2011) 2:599,

Shields RL. J Biol Chem. (2001) 276:6591, Dall'acqua WF J Immunol. (2002) 169:5171, Zalevsky J, Nat Biotechnol. (2010) 28:157, Ghetie V, Nat. Biotechnol. (1997) 15:637 and Monnet C, MAbs. (2014) 6:422에 기술되어 있으며, 그 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 그러한 변형의 비-제한적 예는 [전장 항체에 상응하는 EU 넘버링(Kabat et al.)에 따라] Arg435His; Asn434Ala; Met252Tyr, Ser254Thr 및 Thr256Glu; Met428Leu 및 Asn434Ser; Thr252Leu, Thr253Ser 및 Thr254Phe; Glu294delta, Thr307Pro 및 Asn434Tyr; Thr256Asn, Ala378Val, Ser383Asn 및 Asn434Tyr로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 치환을 포함한다.

- [0297] 특정 구현예에 따르면, 이량체화 모이어티는 류신 지퍼 또는 나선-루프-나선을 포함한다.
- [0298] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체에 포함된 각각의 모이어티는 모이어티들 사이, 폴리펩타이드(예, SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2, SIGLEC10)와 이량체화 모이어티 사이를 분리하는 링커를 포함할 수 있다.
- [0299] 다른 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 폴리펩타이드(예, SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2, SIGLEC10)와 이량체화 모이어티 사이에 링커를 포함하지 않는다.
- [0300] 당업계에 공지된 임의의 링커가 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있다.
- [0301] 특정 구현예에 따르면, 링커는 자연 발생 다중 도메인 단백질로부터 유래될 수 있거나, 예를 들어 문헌 [Chichili et al., (2013), Protein Sci. 22(2): 153-167, Chen et al, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369(전체 내용이 참조로 여기에 포함됨)에 기술된 바와 같이 실증적 링커이다. 일부 구현예에서, 링커는 Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 및 Crasto et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312(전체 내용이 참조로 여기에 포함됨)에 기술된 것과 같은 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램을 설계하는 링커를 사용하여 설계될 수 있다.
- [0302] 특정 구현예에 따르면, 링커는 PEG와 같은 합성 링커이다.
- [0303] 특정 구현예에 따르면 링커는 기능적일 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 링커는 폴딩 및/또는 안정성을 개선하고, 발현을 개선하고, 약동학을 개선하고, 및/또는 이중이량체의 생체활성을 개선하는 기능을 할 수 있다. 또 다른 예에서, 링커는 이중이량체를 특정 세포 유형 또는 위치로 표적화하는 기능을 할 수 있다.
- [0304] 특정 구현예에 따르면, 링커는 폴리펩타이드이다.
- [0305] 폴리펩타이드 링커의 비제한적 예로는 서열 LE, GGGGS(SEQ ID NO: 124), (GGGGS) n ($n=1-4$)(SEQ ID NO: 123), GGGSGGGG(SEQ ID NO: 122), (GGGGS) x_2 (SEQ ID NO: 125), (GGGGS) x_2 +GGGG(SEQ ID NO: 121), (GGGGS) x_3 (SEQ ID NO: 117), (GGGGS) x_4 (SEQ ID NO: 118), (Gly) $_8$ (SEQ ID NO: 119), (Gly) $_6$ (SEQ ID NO: 120), (EAAAK) $_n$ ($n=1-3$)(SEQ ID NO: 126), A(EAAAK) $_n$ A($n = 2-5$)(SEQ ID NO: 127), AEA AAKEEAAKA (SEQ ID NO: 128), A(EAAAK)4ALEA(EAAAK) $_4$ A (SEQ ID NO: 129), PAPAP (SEQ ID NO: 130), K ESGSVSS EQ LAQ FRS LD(SEQ ID NO: 131), EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO: 132), GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO: 133) 및 (XP) $_n$, (X는 지정된 임의의 아미노산, 예를 들면, Ala, Lys 또는 Glu임)를 갖는 링커를 포함한다.
- [0306] 특정 구현예에 따르면, 링커는 SEQ ID NO: 117을 포함한다 (예를 들어 LILRB2 폴리펩타이드와 Fc 도메인 사이의 링커로 제한되지 않음).
- [0307] 특정 구현예에 따르면, 링커는 SEQ ID NO: 125을 포함한다 (예를 들어, SIRP α , PD1, TIGIT 또는 SIGLEC10 폴리펩타이드와 Fc 도메인 사이의 링커로서 이에 제한되지 않음).
- [0308] 특정 구현예에 따르면, 링커는 1개 내지 6개의 아미노산 길이이다.
- [0309] 특정 구현예에 따르면, 링커는 글리신 및/또는 세린 잔기로 실질적으로 구성된다(예, 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 97% 또는 100% 글리신 및 세린).
- [0310] 특정 구현예에 따르면, 링커는 단일 아미노산 링커이다.
- [0311] 본 발명의 일부 구현예에서, 하나의 아미노산은 글리신이다.
- [0312] 특정 구현예에 따르면, 링커는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인 또는 힌지 영역이 아니다.
- [0313] 본원에 개시된 이중이량체는 SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로 이루어진 군에서 선택된 2개의 폴리

펩타이드를 포함한다. 그러한 이중이량체의 가능한 배열의 비-제한적인 예는 도 1A에 개략적으로 도시되어 있다.

- [0314] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체 배열은 도 1A의 패널 1-6에 도시된 배열로부터 선택되며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0315] 특정 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드는 이중이량체의 단량체에 포함된다. 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이러한 이중이량체 배열의 비제한적 예는 도 1A의 패널 1-2에 제시되어 있다.
- [0316] 따라서, 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체 중 하나는 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드이다.
- [0317] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체 중 하나는 단백질성 이량체화 모이어티(예, 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편)를 통해 부착된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드이다.
- [0318] 본원에서 사용되는 용어 "융합 폴리펩타이드"는 자연에서 단일 아미노산 서열에서 함께 발견되지 않는 2개 이상의 부분을 갖는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0319] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체 중 하나는 노브 돌연변이(들)를 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편을 통해 부착된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드이고, 다른 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0320] 구체적인 구현예에 따르면, 이중이량체의 단량체 중 하나는 홀 돌연변이(들)를 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편을 통해 부착된 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드이고, 다른 단량체는 노브 돌연변이(들)를 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0321] 다른 특정 구현예에 따르면, 2개의 폴리펩타이드 각각은 이중이량체 내의 단량체이다. 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이러한 이중이량체 배열의 비-제한적인 예는 도 1A의 패널 3-6에 제시되어 있다. 특정 구현예에 따르면, 이중이량체 배열은 도 1A의 패널 5에 도시된 바와 같다.
- [0322] 구체적인 구현예에 따르면, 이중이량체는 단백질성 이량체화 모이어티(예를 들어, 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편)에 부착된(예, 번역 융합으로서) 2개의 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 제1 단량체 및 단백질성 이량체화 모이어티(예를 들어, 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편)에 부착된(예, 번역 융합으로서) 2개의 폴리펩타이드 중 두 번째를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0323] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 노브 돌연변이(들)를 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편에 부착된(예, 번역 융합으로서) 2개의 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 제1 단량체 및 홀 돌연변이(들)을 포함하는 항체의 Fc 도메인 또는 이의 단편에 부착된(예, 번역 융합으로서) 2개의 폴리펩타이드 중 두 번째를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0324] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체 조성 및 배열은 도 1B에 개략적으로 도시된 이중이량체로부터 선택되며, 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0325] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 이중이량체의 비-제한적인 예는 하기 표 1에 제시되어 있다.
- [0326] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1 또는 5와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 3 또는 7과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0327] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 3을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0328] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 3에 기재된 단량체를 포함한다.

- [0329] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0330] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0331] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 9 또는 13과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 11 또는 15와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0332] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 9를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 11을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0333] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 9에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 11에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0334] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 13을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0335] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 13에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 15에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0336] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1, 5, 17, 138, 140, 142 또는 144와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 11, 15, 19 또는 150과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0337] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1, 5 또는 17과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 11, 15 또는 19와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0338] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 11을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0339] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 11에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0340] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0341] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 15에 기재된 단량체를 포함한다.

- [0342] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 17을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 19를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0343] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 17에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 19에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0344] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 138을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 11을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0345] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 138에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 11에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0346] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 140을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0347] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 140에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 15에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0348] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 142를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 150을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0349] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 142에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 150에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0350] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 144를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 150을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0351] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 144에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 150에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0352] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 21 또는 22와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 3 또는 7과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0353] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 21을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 3을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0354] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 21에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 3에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0355] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 22를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0356] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 22에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0357] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24 또는 25와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 3 또는 7과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.

- [0358] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 3을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0359] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 3에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0360] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 25를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0361] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 25에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0362] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 1 또는 5와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 29 또는 30과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0363] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 1를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 29을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0364] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 1에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 29에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0365] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 30을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0366] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 5에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 30에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0367] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9 또는 13과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 29 또는 30과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0368] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 29을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0369] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 29에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0370] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 13을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 30을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0371] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 13에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 30에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0372] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24 또는 25와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIGLEC10 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 11 또는 15와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도

85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LILRB2 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.

- [0373] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 11을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0374] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 24에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 11에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0375] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 25를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 15를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0376] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 25에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 15에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0377] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9, 13, 31, 33 또는 146과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 3, 7 또는 148과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0378] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9, 13, 31 또는 33과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 3 또는 7과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD1 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0379] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 3을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0380] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 9에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 3에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0381] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 13을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0382] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 13에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0383] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 31을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0384] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 31에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0385] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 33을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0386] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 33에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 7에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0387] 특정 구현예에 따르면, 이종이량체는 SEQ ID NO: 146을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 148을 포함하는 단량체

를 포함한다.

- [0388] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 146에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 148에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0389] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1 또는 5와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α 폴리펩타이드를 포함하는 단량체; 및 SEQ ID NO: 35 또는 36과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT 폴리펩타이드를 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0390] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1을 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 35을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0391] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 1에 기재된 단량체 및 SEQ ID NO: 35에 기재된 단량체를 포함한다.
- [0392] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 단량체 및 SEQ ID NO: 36을 포함하는 단량체를 포함한다.
- [0393] 특정 구현예에 따르면, 이중이량체는 SEQ ID NO: 5에 제시된 단량체 및 SEQ ID NO: 36에 제시된 단량체를 포함한다.
- [0394] 특정 구현예에 따르면, 본원에 개시된 이중이량체는 가용성이다(즉, 합성 또는 자연 발생 표면에 고정되지 않음).
- [0395] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 이중이량체는 합성 또는 자연 발생 표면에 고정된다.
- [0396] 본 발명의 추가적 또는 대안적 측면에 따르면, 본원에 개시된 이중이량체를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 이중이량체는 상기 조성물에서 2개의 폴리펩타이드의 우세한 형태이다.
- [0397] 이량체화, 특히 이중이량체화를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 상기 및 하기에서 추가로 설명된다.
- [0398] 특정 구현예에 따르면, 우세한 형태는 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%를 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0399] 구체적인 구현예에 따르면, 본원에 기술된 이중이량체 또는 이를 포함하는 조성물의 생산 수율, 안정성, 활성, 선택성 및/또는 안전성은 동종이량체를 포함하는 조성물의 생산 수율, 안정성, 활성, 선택성 및/또는 안전성 보다 높다. 동일한 2개의 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 동종이량체는 조성물에서 2개의 폴리펩타이드의 우세한 형태, 동일한 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 단리된 단량체 및/또는 각각의 2개의 폴리펩타이드를 단일 작용제로서 포함한다.
- [0400] 특정 구현예에 따르면, 본원에 기재된 기술된 이중이량체 또는 이를 포함하는 조성물의 생산 수율, 안정성, 활성, 선택성 및/또는 안전성은 항체, 예를 들어 본원에 기술된 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍을 표적으로 하는 이중특이성 항체의 생산 수율, 안정성, 활성, 선택성 및/또는 안전성 보다 높다.
- [0401] 특정 구현예에 따르면, 증가된 선택성 및/또는 안전성은 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍에 대한 이중이량체의 결합 시에만 선택적 활성에 의해 나타날 수 있다 (예, 자연 결합 쌍 중 하나만을 발현하는 세포와 비교하여 이중이량체의 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍을 발현하는 세포). 특정 구현예에서, 이량체화 모이어티가 Fc 도메인인 경우, 선택성 및/또는 안전성은 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍에 대한 결합 시에만 Fc 수용체의 결합 및/또는 활성화에 의해 나타날 수 있다.
- [0402] 특정 구현예에 따르면, 용어 "더 높은"은 통계적으로 유의미한 증가를 의미한다.
- [0403] 특정 구현예에 따르면, 용어 "더 높은"은 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배의

증가를 의미한다.

- [0404] 특정 구현예에 따르면, 본원에 기술된 이중이량체 또는 이를 포함하는 조성물은 단일 작용제로서의 2개의 폴리펩타이드 각각과 비교하여 조합된 개선된 활성을 갖는다. 본원에서 사용되는 "조합된 개선된 활성"이라는 어구는 적어도 부가적이지만 바람직하게는 상승적으로 개선된 활성을 의미한다.
- [0405] 특정 구현예에 따르면, 본원에 기재된 이중이량체 또는 이를 포함하는 조성물의 응집체의 양은 동일한 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 동종이량체를 포함하는 조성물의 응집체의 양 보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 더 적고, 여기서 동종이량체는 조성물 내 2개의 폴리펩타이드의 우세한 형태, 동일한 2개의 폴리펩타이드 및/또는 각각의 2개의 폴리펩타이드를 단일 작용제로서 포함하는 단리된 단량체이다.
- [0406] 본 발명의 일부 구현예의 이중이량체는 SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10으로부터 선택된 2개의 폴리펩타이드를 포함하기 때문에, 이중이량체는 시험관내(in-vitro), 생체외(ex-vivo) 및/또는 생체내(in-vivo)에서 면역 세포를 활성화시키는 방법에 사용될 수 있다.
- [0407] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, 이중이량체의 존재 하에 시험관내 면역 세포 활성화를 포함하는 면역 세포 활성화 방법, 이를 포함하는 조성물, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템 또는 이를 포함하는 숙주세포를 제공한다. .
- [0408] 특정 구현예에 따르면, 면역 세포는 말초 단핵 혈액 세포(PBMC)를 포함한다.
- [0409] 본원에서 사용되는 용어 "말초 단핵 혈구(PBMC)"는 단일 핵을 갖는 혈구를 의미하며 림프구, 단핵구 및 수지상 세포(DC)를 포함한다.
- [0410] 특정 구현예에 따르면, PBMC는 수지상 세포(DC), T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0411] 특정 구현예에 따르면, PBMC는 T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포를 포함한다.
- [0412] PBMC를 얻는 방법은, 대상체로부터의 전혈을 채취하고 항-응고제(예를 들면, 헤파린 또는 시트레이트)를 함유하는 용기(container)에 수집하는 것; 및 성분채집술(apheresis)과 같이 당업계에 익히 공지되어 있다. 이어서, 특정 구현예들에 따르면, PBMC들 중 적어도 하나의 유형은 말초 혈액으로부터 정제된다. 전혈로부터 PBMC를 정제하기 위한 몇몇의 방법들 및 시약들, 예를 들면 백혈구 성분채집술(leukapheresis), 침강(sedimentation), 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation)(예를 들면, 피콜(ficoll)), 원심 세정(centrifugal elutriation), 분획화(fractionation), 화학적 용해, 예를 들면, 적혈구 세포의 화학적 용해(예를 들면, ACK에 의함), 세포 표면 마커를 이용한 특이적 세포 유형의 선별(selection)[예를 들면, 인비트로젠(Invitrogen), 스템셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies), 셀프로(Cellpro), 어드밴스트 마그네틱스(Advanced Magnetix) 또는 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec.)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 세포 분리(magnetic cell separation) 기술을 이용함], 및 특이적 항체로의 근절(eradication)(예를 들면, 사멸)과 같은 방법에 의한 또는 음성 선택(negative selection)(예를 들면, 마그네틱 세포 분리 기술, FACS 분류기 및/또는 포획 ELISA 라벨링(capture ELISA labeling)을 이용함)에 기초한 친화성 기반 정제에 의한 특이적 세포 유형의 고갈(depletion)이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들면, THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor) 및 FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A.Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)에 기재되어 있다.
- [0413] 특정 구현예에 따르면, 면역 세포는 종양 침윤 림프구를 포함한다.
- [0414] 본원에서 사용되는 "종양 침윤 림프구(TIL)"라는 용어는 혈류를 차단하고 종양으로 이동하는 단핵 백혈구를 지칭한다.
- [0415] 특정 구현예들에 따르면, 상기 TIL은 T 세포, B 세포, NK 세포 및 단핵구로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0416] TIL을 얻는 방법은 예를 들면, 생검(biopsy) 또는 부검(necropsy)에 의해 대상체로부터 종양 샘플을 얻고 이의 단일 세포 현탁액을 제조하는 것과 같이 당업계에 익히 공지되어 있다. 상기 단일 세포 현탁액은 임의의 적합한 방식으로 얻을 수 있으며, 예를 들면, 기계적으로(예를 들면, GentleMACS TM 분해기(Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.)를 사용하여 종양을 분해함) 또는 효소적으로(예를 들면, 콜라게나제 또는 DNase) 얻을 수 있다. 이어서, TIL들 중 적어도 하나의 유형은 상기 세포 현탁액으로부터 정제될 수 있다. 원하는 유형의 TIL을 정제

하기 위한 몇몇의 방법들 및 시약들, 예를 들면 세포 표면 마커를 이용한 특이적 세포 유형의 선별[예를 들면, 인비트로겐, 스텝셀 테크놀로지스, 셀프로, 어드밴스트 마그네틱스 또는 밀테니 바이오텍으로부터 상업적으로 입수가 가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 세포 분리 기술을 이용함], 및 특이적 항체로의 근절(예를 들면, 사멸)과 같은 방법에 의한 또는 음성 선택(예를 들면, 마그네틱 세포 분리 기술, FACS 분류기 및/또는 포획 ELISA 라벨링을 이용함)에 기초한 친화성 기반 정제에 의한 특이적 세포 유형의 고갈이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들면, THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor) 및 FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A.Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)에 기재되어 있다.

- [0417] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 식세포작용 세포를 포함한다.
- [0418] 본원에서 사용되는 용어 "식세포작용 세포"는 식세포작용을 할 수 있는 세포를 지칭하며, 전문 및 비-전문 식세포작용 세포 둘 모두를 포함한다. 식세포작용을 분석하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 예를 들면 사멸 분석(killing assays), 유세포 측정법 및/또는 현미경 평가(생세포 이미징(live cell imaging), 형광 현미경(fluorescence microscopy), 공초점 현미경(confocal microscopy), 전자 현미경(electron microscopy))을 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 상기 식세포작용 세포는 단핵구, 수지상 세포(DC) 및 과립구(granulocyte)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0419] 특정 구현예에 따르면, 상기 식세포작용 세포(phagocyte)는 과립구를 포함한다.
- [0420] 특정 구현예에 따르면, 상기 식세포작용 세포는 단핵구를 포함한다.
- [0421] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 단핵구를 포함한다.
- [0422] 특정 구현예에 따르면, 용어 "단핵구"는 순환하는 단핵구 및 조직에 존재하는 대식세포(단핵 식세포로도 지칭됨) 둘 모두를 지칭한다.
- [0423] 특정 구현예에 따르면, 상기 단핵구는 대식세포를 포함한다. 통상적으로, 대식 세포의 세포 표면 표현형(phenotype)은 CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80(마우스)/EMR1(인간), 라이소자임(lysozyme) M, MAC-1/MAC-3 및 CD68을 포함한다.
- [0424] 특정 구현예에 따르면, 상기 단핵구는 순환하는 단핵구를 포함한다. 통상적으로, 순환하는 단핵구의 세포 표면 표현형은 CD14 및 CD16(예를 들면, CD14++ CD16-, CD14+CD16++, CD14++CD16+)을 포함한다.
- [0425] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 DC를 포함한다.
- [0426] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수지상 세포(DC)"는 림프 또는 비-림프 조직에서 발견되는 형태학적으로 유사한 세포 유형의 다양한 집단의 임의의 구성원을 지칭한다. DC는 전문적인 항원 제시 세포(antigen presenting cell)의 한 클래스(class)이고, HLA-제한된 T 세포를 감작하는 높은 능력을 갖는다. DC는 예를 들면, 형질세포양(plasmacytoid) 수지상 세포, 골수성 수지상 세포(미성숙 및 성숙 수지상 세포 포함), 랑게르한스(Langerhans) 세포, 지상감입 세포(interdigitating cell), 소포성(follicular) 수지상 세포를 포함한다. 수지상 세포는 기능에 의해 또는 표현형, 특히 세포 표면 표현형에 의해 인식될 수 있다. 이 세포들은 세포 표면 상에 베일(veil)-유사 돌출부를 갖는 이들의 독특한 형태, 중간 내지 높은 수준의 표면 HLA-클래스 II 발현, 및 T 세포, 특히 나이브(naive) T 세포에 항원을 제시하는 능력을 특징으로 한다(Steinman R, et al., Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196. 참조). 통상적으로, DC의 세포 표면 표현형은 CD1a+, CD4+, CD86+ 또는 HLA-DR을 포함한다. 용어 DC는 미성숙 및 성숙 DC 둘 모두를 포함한다.
- [0427] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 과립구를 포함한다.
- [0428] 본 명세서에 사용되는 용어 "과립구"는 이의 세포질에서 과립의 존재를 특징으로 하는 다형핵 백혈구를 지칭한다.
- [0429] 특정 구현예에 따르면, 상기 과립구는 호중구(neutrophil)를 포함한다.
- [0430] 특정 구현예에 따르면, 상기 과립구는 비만 세포(mast-cell)를 포함한다.
- [0431] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0432] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T 세포"는 CD4+ 또는 CD8+ 표현형을 갖는 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)+, CD3+를 갖는 분화된 림프구를 지칭한다. 상기 T 세포는 이펙터 T 세포 또는 조절 T 세포일 수 있다.

- [0433] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이펙터 T 세포"는 예를 들면, 사이토카인을 생산함으로써 다른 면역 세포를 활성화하거나 지시하는 T 세포, 또는 세포독성 활성을 갖는 T 세포(예를 들면, CD4+, Th1/Th2, CD8+ 세포독성 T 림프구)를 지칭한다.
- [0434] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절 T 세포" 또는 "Treg"는 이펙터 T 세포뿐만 아니라 선천적(innate) 면역계 세포를 포함하는, 다른 T 세포의 활성화를 음성적으로(negatively) 조절하는 T 세포를 지칭한다. Treg 세포는 이펙터 T 세포 반응의 지속적인 억제를 특징으로 한다. 특정 구현예에 따르면, 상기 Treg은 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포이다.
- [0435] 특정 구현예에 따르면, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포이다.
- [0436] 다른 특정 구현예에 따르면, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [0437] 특정 구현예에 따르면, 상기 T 세포는 기억 T 세포이다. 기억 T 세포의 비-제한적 예로는 CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7- 표현형을 갖는 이펙터 기억 CD4+ T 세포, CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7+ 표현형을 갖는 중앙 기억 CD4+ T 세포, CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7- 표현형을 갖는 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7+ 표현형을 갖는 중앙 기억 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0438] 특정 구현예에 따르면, 상기 T 세포는 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 핵산 서열로 형질도입된 조작된(engineered) T 세포를 포함한다.
- [0439] 특정 구현예에 따르면, 상기 목적하는 발현 생성물은 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0440] 본 명세서에서 사용되는 어구 "TCR을 코딩하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "TCR을 코딩하는 핵산 서열로 형질도입하는"은 MHC의 맥락에서 제시되는 원하는 항원에 대한 특이성을 갖는 T 세포로부터의 가변성 α - 및 β -사슬(chain)의 클로닝(cloning)을 지칭한다. TCR로 형질도입하는 방법은 당해 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면 Nicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012:404081; Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94); 및 Lamers et al, Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623에 개시되어 있다.
- [0441] 본 명세서에서 사용되는 어구 "CAR을 코딩하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "CAR을 코딩하는 핵산 서열로 형질도입하는"은 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열의 클로닝을 지칭하며, 이때, 상기 CAR은 항원 인식 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함한다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 인공적으로 작제된 하이브리드(hybrid) 단백질 또는 T-세포 신호전달 또는 T-세포 활성화 도메인에 연결된 항체(예, 단일 사슬 가변성 단편(single chain variable fragment; scFv))의 항원 결합 도메인을 함유하는 폴리펩타이드이다. CAR로 형질도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 예를 들면, Davila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1(9):1577-1583; Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94); Maus et al. Blood. 2014 Apr 24;123(17):2625-35; Porter DL The New England journal of medicine. 2011, 365(8):725-733; Jackson HJ, Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(6):370-383; 및 Globerson-Levin et al. Mol Ther. 2014;22(5):1029-1038에 개시되어 있다.
- [0442] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 B 세포를 포함한다.
- [0443] 본 명세서에서 사용되는 용어 "B 세포"는 B 세포 수용체(BCR)+, CD19+ 및/또는 B220+ 표현형을 갖는 림프구를 지칭한다. B 세포는 특이적 항원에 결합하여 체액성 반응을 유발하는 이의 능력을 특징으로 한다.
- [0444] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 NK 세포를 포함한다.
- [0445] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NK 세포"는 CD16+ CD56+ 및/또는 CD57+ TCR- 표현형을 갖는 분화된 림프구를 지칭한다. NK는 특이적 세포용해성 효소의 활성화에 의해 "자기(self)" MHC/HLA 항원을 발현하는데 실패한 세포에 결합하여 이를 사멸시키는 이들의 능력, NK 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하는 종양 세포 또는 다른 이환된(diseased) 세포를 사멸시키는 능력, 및 면역 반응을 자극하거나 억제하는 시토카인으로 불리는 단백질 분자를 방출하는 능력을 특징으로 한다.
- [0446] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 NKT 세포를 포함한다.
- [0447] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NKT 세포"는 반-불변(semi-invariant) $\alpha\beta$ T-세포 수용체를 발현하고, NK1.1과 같은 NK 세포와 통상적으로 관련되어 있는 다양한 분자 마커 또한 발현하는 T 세포의 특화된(specialized) 집단을 지칭한다. NKT 세포는 NK1.1+ 및 NK1.1-, 및 CD4+, CD4-, CD8+ 및 CD8- 세포를 포함한다. NKT 세포 상의 TCR은 MHC I-유사 분자 CD1d에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다는 점에서 고유하다. NKT 세포는 염증 또는

면역 내성(immune tolerance)을 촉진하는 시토카인을 생산하는 이들의 능력으로 인해 보호 또는 유해 효과를 가질 수 있다.

- [0448] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 건강한 대상체로부터 얻어진다.
- [0449] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 병리(예, 암)를 앓고 있는 대상체로부터 얻어진다.
- [0450] 특정 구현예에 따르면, 활성화는 2개의 폴리펩타이드 중 적어도 하나의 자연 결합 쌍 또는 2개의 폴리펩타이드 중 적어도 하나의 외인성 결합 쌍을 발현하는 세포의 존재 하에 있다.
- [0451] 특정 구현예에 따르면, 활성화는 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍 또는 2개의 폴리펩타이드의 외인성 결합 쌍을 발현하는 세포의 존재 하에 있다.
- [0452] 특정 구현예에 따르면, 상기 외인성 결합 쌍은 가용성이다.
- [0453] 다른 특정 구현예에 따르면, 외인성 결합 쌍은 고체 지지체에 고정된다.
- [0454] 특정 구현예에 따르면, 결합 쌍을 발현하는 세포는 병리학적(이환된) 세포, 예를 들어 암 세포를 포함한다.
- [0455] 특정 구현예에 따르면, 상기 조절은 적어도 1차 활성화 신호[예를 들면, 항원 제시 세포(APC) 상의 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC)/펩타이드 복합체와 T-세포 수용체(TCR)의 연결(ligation)]를 적어도 전송할 수 있는 자극제의 존재 하에서 이루어지며, 이는 세포 증식, 성숙, 시토카인 생산, 식세포작용 및/또는 면역 세포의 조절 또는 이펙터 기능의 유도를 초래한다. 특정 구현예에 따르면, 상기 자극제는 또한 2차 공동-자극 신호를 전송할 수 있다.
- [0456] 상기 자극제의 양 및 상기 자극제와 상기 면역 세포 사이의 비를 결정하는 방법은 당업계의 숙련자의 능력 범위 내이며, 따라서 본 명세서에 명시하지 않는다.
- [0457] 상기 자극제는 상기 면역 세포를 항원-의존적 또는 항원-독립적(즉, 다중클로날(polyclonal)) 방식으로 활성화할 수 있다.
- [0458] 특정 구현예에 따르면, 자극제는 항원 비-특이적 자극제를 포함한다.
- [0459] 비-특이적 자극제는 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 따라서, 비-제한적 예로서, 상기 면역 세포가 T 세포를 포함하는 경우, 항원 비-특이적 자극제는 T 세포 표면 구조에 결합하여 상기 T 세포의 다중클로날 자극을 유도할 수 있는 제제, 예를 들면, 항-CD28 항체와 같은 공동-자극 단백질과 병용되는 항-CD3 항체일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 다른 비-제한적 예로는 항-CD2, 항-CD137, 항-CD134, 노치(Notch)-리간드, 예를 들면, 델타-유사 1/4, Jagged1/2 중 단독 또는 항-CD3과 다양하게 조합하여 포함한다. T 세포의 다중클로날 자극을 유도할 수 있는 다른 제제는 미토겐(mitogen), PHA, PMA-이오노마이신(ionomycin), CEB 및 CytoStim(Miltenyi Biotech)을 포함하지만, 이들에 제한되는 않는다. 특정 구현예에 따르면, 상기 항원 비-특이적 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 상기 T 세포 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 코팅된 비드(bead), 예를 들면 Miltenyi Biotec으로부터 얻은 CD3CD28 MACSiBeads를 포함한다.
- [0460] 특정 구현예에 따르면, 상기 자극제는 항원-특이적 자극제를 포함한다.
- [0461] 항원 특이적 T 세포 자극제의 비-제한적 예로는 항원-로딩된(loaded) 항원 제시 세포[APC, 예, 수지상 세포] 및 펩타이드 로딩된 재조합 MHC를 포함한다. 따라서, 예를 들면, T 세포 자극제는 원하는 항원(예, 종양 항원)이 사전로딩된(preloaded) 수지상 세포 또는 원하는 항원을 코딩하는 mRNA로 형질주입된 수지상 세포일 수 있다.
- [0462] 특정 구현예에 따르면, 상기 항원은 암 항원이다.
- [0463] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암 항원"은 비-암성 세포와 비교하여 암성 세포에 의해 과발현되거나 단독으로 발현된 항원을 지칭한다. 암 항원은 공지된 암 항원이거나 암 세포에서 발달하는 새로운 특이적 항원(즉, 신생 항원(neoantigen))일 수 있다.
- [0464] 공지된 암 항원에 대한 비제한적 예시는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-AS, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-AS, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-I, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4(MAGE-B4), MAGE-C1/CT7, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 XAGE, 멜라닌세포(melanocyte) 분화 항원, p53, ras, CEA, MUCI, PMSA, PSA, 티로시나제(tyrosinase), Melan-A, MART-I, gp100, gp75, 알파액티닌(alphaactinin)-4, Bcr-Abi 융합 단백질, Casp-8, 베

타-카테닌(beta-catenin), cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, dek-can 융합 단백질, EF2, ETV6-AML1 융합 단백질, LDLR-푸코실트랜스퍼라제(fucosyltransferase)AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2, 및 3, neo-PAP, 미오신(myosin) 클래스 I, OS-9, pml-RAR 알파 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오스포스페이트 이소머라제(Triosephosphate isomerase), GnTV, Herv-K-mel, NA-88, SP17, 및 TRP2-Int2, (MART-I), E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 항원, EBNA, 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV) 항원 E6 및 E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p185erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 알파-태아 단백질(fetoprotein), 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, O250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NYCO-I, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2 결합 단백질\사이클로필린(cyclophilin) C-관련 단백질), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, 티로시나제 관련 단백질, TRP-1 또는 TRP-2를 포함한다.

- [0465] 발현될 수 있는 다른 종양 항원은 당업계에 익히 공지되어 있다(예를 들면, W000/20581; Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern, Beverley and Carroll, Cambridge University Press, Cambridge 참조). 이 종양 항원들의 서열들은 공공의 데이터베이스로부터 쉽게 입수 가능하고, WO 1992/020356 AI, WO 1994/005304 AI, WO 1994/023031 AI, WO 1995/020974 AI, WO 1995/023874 AI & WO 1996/026214 AI에서도 발견된다.
- [0466] 대안적으로 또는 추가적으로, 종양 항원은 예를 들면, 생검에 의해 대상체로부터 얻은 암 세포를 이용하여 확인될 수 있다.
- [0467] 따라서, 특정 구현예에 따르면, 상기 자극제는 암 세포를 포함한다.
- [0468] 특정 구현예에 따르면, 상기 조절은 항암제의 존재 하에서 이루어진다.
- [0469] 특정 구현예에 따르면, 상기 면역 세포는 상기 조절 후에 정제된다.
- [0470] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 얻을 수 있는 분리된 면역 세포를 고려한다.
- [0471] 특정 구현예에 따르면, 본 발명에 따라 사용되고, 및/또는 얻어진 면역 세포는 신선하게 분리되고, 보관, 예를 들면 향후 사용을 위해 액체 질소 온도에서 장기간(예, 수개월, 수년) 냉동보존(cryopreserved)(즉, 동결)할 수 있으며, 세포주를 보관할 수 있다.
- [0472] 동결보존 방법은 당업자에게 일반적으로 알려져 있으며, 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 제W02007054160호 및 제W0 2001039594호 및 미국 특허 출원 공개 번호 제US20120149108호에 개시되어 있다.
- [0473] 특정 구현예에 따르면, 본 발명에 따라 얻어진 세포는 세포 은행(cell bank) 또는 보관소(depository) 또는 보관 시설(storage facility)에 보관될 수 있다.
- [0474] 결과적으로, 본 개시는 또한 면역 세포의 활성화로부터 혜택을 받을 수 있는 질병, 예를 들어 과증식성 질병; 면역 억제 및 감염과 관련된 질병에 대한 입양(adoptive) 면역 세포 치료요법들에 대한 원천으로서 본 발명의 분리된 면역 세포 및 방법의 용도를 추가로 제안하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0475] 따라서, 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 활성화 후에 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 입양 전달(adoptively transferring)하는 단계를 포함한다.
- [0476] 특정 구현예에 따르면, 입양 세포 치료요법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 따라 얻어질 수 있는 면역 세포를 제공한다.
- [0477] 본 발명의 특정 구현예에 따라 사용되는 세포들은 자가(autologous) 또는 비-자가일 수 있고; 이들은 대상체에 대해 동계(syngeneic) 또는 비-동계: 동종이계(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic)일 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 구현예를 나타낸다.
- [0478] 본 개시는 또한 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법에서 본 발명의 조성물(예, 이종이량체, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템 또는 이를 발현하는 숙주 세포)의 용도를 고려한다.
- [0479] 따라서, 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 상기 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 이종이량체, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 이로써 대상체의 질병을

치료한다.

- [0480] 본 발명의 추가적 또는 대안적 양태에 따르면, 상기 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는데 사용하기 위한 이중이량체, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0481] 용어 “치료하는” 또는 “치료”는 병리 (질병, 질환, 또는 의학적 상태)의 발생(development)을 억제, 방지 또는 저지(arresting)하고, 및/또는 병리 또는 병리 증상의 감소, 경감(remission), 또는 퇴행을 유발하는 것을 지칭한다. 당업자는 병리의 발생을 평가하기 위해 다양한 방법론 및 분석방법들을 사용할 수 있고, 마찬가지로 병리의 감소, 경감, 또는 퇴행을 평가하기 위해 다양한 방법론 및 분석들을 사용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0482] 본 명세서에서 사용되는 용어 “대상체”는 포유동물, 예를 들면 임의의 연령 및 성별의 인간을 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 용어 “대상체”는 병리 (질병, 질환, 또는 의학적 상태)를 앓고 있는 대상체를 지칭한다. 특정 구현예에 따르면, 상기 용어는 병리가 발생할 위험이 있는 개체를 포함한다.
- [0483] 특정 구현예에 따르면, 질병과 관련된 세포(예, 암 세포)는 2개의 폴리펩타이드 중 적어도 하나의 자연 결합 쌍을 발현한다.
- [0484] 특정 구현예에 따르면, 질병과 관련된 세포(예, 암 세포)는 2개의 폴리펩타이드의 자연 결합 쌍을 발현한다.
- [0485] 특정 구현예에 따르면, 질병은 면역 세포를 활성화하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있다.
- [0486] 본 명세서에서 사용되는 어구 “면역 세포를 활성화하는 것으로부터 이익을 얻는 질병”은 대상체의 면역 반응 활성이 질병의 증상을 적어도 완화하거나 증상의 개시(onset)를 지연하기에 충분하나, 그렇게 하면 어떠한 이유로든 대상체의 면역 반응 활성이 최적보다 낮은, 질병을 지칭한다.
- [0487] 면역 세포의 활성화하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병의 비-제한적 예로는 과증식성 질병 (hyper-proliferative disease), 면역 억제와 관련된 질병, 약물 (예를 들면, mTOR 억제제, 칼시뉴린 억제제, 스테로이드)에 의해 유발되는 면역 억제, 및 감염을 포함한다.
- [0488] 특정 구현예에 따르면, 상기 질병은 과증식성 질병을 포함한다.
- [0489] 특정 구현예에 따르면, 상기 과증식성 질병은 경화증 (sclerosis), 섬유증 (fibrosis), 특발성 폐 섬유증 (Idiopathic pulmonary fibrosis), 건선 (psoriasis), 전신 경화증/경피증 (systemic sclerosis/scleroderma), 원발성 담즙성 담관염 (primary biliary cholangitis), 원발성 경화성 담관염 (primary sclerosing cholangitis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 방사선 유발 폐 섬유증(radiation-induced pulmonary fibrosis), 골수 섬유증(myelofibrosis) 또는 복막후 섬유증(retroperitoneal fibrosis)을 포함한다.
- [0490] 다른 특정 구현예에 따르면, 상기 과증식성 질병은 암을 포함한다.
- [0491] 본 명세서에서 사용되는 용어 “암”은 악성(malignant) 및 전암성(pre-malignant) 암을 둘 모두를 포함한다.
- [0492] 전암성 또는 양성 형태의 암과 관련하여, 선택적으로, 이의 조성물 및 방법은 전암성 암이 악성 형태로 진행되는 것을 정지시키기 위해 적용될 수 있다.
- [0493] 본 발명의 몇몇 구현예의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형 또는 비-고형 암 및/또는 암 전이일 수 있다.
- [0494] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 악성 암을 포함한다.
- [0495] 본 발명의 몇몇 구현예의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형암 또는 비-고형암 및/또는 암 전이일 수 있다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하나, 이들에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예로는 편평 세포암 (squamous cell cancer), 폐암 (소세포 폐암 (small-cell lung cancer), 비소세포 폐암 (non-small-cell lung cancer), 폐 선암종 (adenocarcinoma of the lung) 및 폐 편평 암종 (squamous carcinoma of the lung) 포함), 복막암 (cancer of the peritoneum), 간세포암(hepatocellular cancer), 위암 (gastric or stomach cancer) (위장암 (gastrointestinal cancer) 포함), 췌장암 (pancreatic cancer), 교모세포종 (glioblastoma), 자궁경부암 (cervical cancer), 난소암 (ovarian cancer), 간암 (liver cancer), 방광암 (bladder cancer), 간세포종 (hepatoma), 유방암 (breast cancer), 결장암 (colon cancer), 결장직장암 (colorectal cancer), 자궁내막암종 또는 자궁암종 (endometrial or uterine carcinoma), 침샘암종

(salivary gland carcinoma), 신장암 (kidney or renal cancer), 간암, 전립선암(prostate cancer), 외음부암 (vulval cancer), 갑상선암 (thyroid cancer), 간세포성 암종 (hepatic carcinoma) 및 다양한 유형의 두경부암 (head and neck cancer), 및 B-세포 림프종 (B-cell lymphoma) (저등급/소포성 비호지킨 림프종 (low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma; NHL); 소형 림프구성 (SL) NHL(small lymphocytic NHL); 중간 등급/소포성 NHL (intermediate grade/follicular NHL); 중간 등급 미만성 NHL(intermediate grade diffuse NHL); 고등급 면역모세포성 NHL (high grade immunoblastic NHL); 버킷 림프종(Burkitt lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종 (Diffused large B cell lymphoma; DLBCL), 고등급 림프모구성 NHL (high grade lymphoblastic NHL); 고등급 소형 비분할 세포 NHL (high-grade small non-cleaved cell NHL); 거대 종양 NHL (bulky disease NHL); 맨틀 세포 림프종 (mantle cell lymphoma); AIDS-관련 림프종(AIDS-related lymphoma); 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 (Waldenstrom's Macroglobulinemia); T 세포 림프종(T cell lymphoma), 호지킨 림프종 (Hodgkin lymphoma), 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia; CLL); 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia; ALL); 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia, AML), 급성 전골수성 백혈병 (acute promyelocytic leukemia; APL), 털세포 백혈병 (Hairy cell leukemia); 만성 골수모구성 백혈병 (chronic myeloblastic leukemia; CML); 및 이식-후 림프증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disorder; PTLD), 및 모종증 (phakomatoses)과 관련된 비정상적 혈관증식, 부종 (edema) (예, 뇌종양과 관련된 부종), 및 메이크 증후군 (Meigs' syndrome)을 포함한다.

[0496] 구체적인 구현예에 따르면, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 직장암, 비소세포 폐암, 비호지킨 림프종, 신장 세포암 (renal cell cancer), 전립선암, 간암, 췌장암, 연조직 육종 (soft-tissue sarcoma), 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma), 카르시노이드 암종 (carcinoid carcinoma), 두경부암, 흑색종 (melanoma), 난소암, 중피종(mesothelioma) 및 다발성 골수종 (multiple myeloma)으로 이루어진 군에서 선택된다. 본 발명의 치료를 받을 수 있는 암성 병태(cancerous condition)는 전이성 암을 포함한다.

[0497] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 전-악성(악성 전 단계,pre-malignant) 암을 포함한다.

[0498] 전-악성 암 (또는 전-암)은 잘 특성화되어 있고 당업계에 익히 공지되어 있다 (예를 들면, Berman JJ. and Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8 참조). 본 발명의 방법을 통해 치료받을 수 있는 전-악성 암의 클래스는 후천성 소형 또는 현미경적 전-악성 암, 핵 비정형성(nucleaer atypia)을 갖는 후천성 거대 병변, 암으로 진행되는 유전성 과증식성 증후군과 함께 발생하는 전구병변, 및 후천성 미만성 과형성증 및 미만성 화생을 포함한다. 소형 또는 현미경적 전-악성 암의 예로는 자궁경부의 고등급 편평 상피내 병변 (High grade squamous intraepithelial lesion; HGSIL), 항문 상피내 신생물(anal intraepithelial neoplasia; AIN), 성대의 이형성증 (dysplasia), (결장의) 이상 음와 (aberrant crypts), 전립선 상피내 신생물 (prostatic intraepithelial neoplasia; PIN)을 포함한다. 핵 비정형성을 갖는 후천성 거대 병변의 예시는 관상선종 (tubular adenoma), 이상단백혈증을 갖는 혈관면역모세포 림프선종 (angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia, AILD); 비정형성 수막종 (atypical meningioma), 위 용종 (gastric polyp), 거대 플라크 유사건선 (large plaque parapsoriasis), 골수 이형성증 (myelodysplasia), 유두상 이행 세포 상피내 암종 (papillary transitional cell carcinoma in-situ), 모세포 증가 불응성 빈혈 (refractory anemia with excess blasts), 및 슈나이더 유두종 (Schneiderian papilloma)을 포함한다. 암으로 진행되는 유전성 과증식성 증후군과 함께 발생하는 전구 병변의 예시는 비정형성 모반 증후군 (atypical mole syndrome), C 세포 선종증 (C cell adenomatosis) 및 MEA를 포함한다. 후천성 미만성 과다형성증 및 미만성 화생의 예로는 AIDS, 비정형 림프 증식 (atypical lymphoid hyperplasia), 골의 파제트병 (Paget's disease), 이식-후 림프증식성 질병, 및 궤양성 대장염 (ulcerative colitis)을 포함한다.

[0499] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 항문암 (Anal Cancer), 기저 세포 암종 (Basal Cell Carcinoma), B-세포 비호지킨 림프종 (B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma), 담관암 (Bile Duct Cancer), 방광암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 (Chronic Myelocytic Leukemia; CML), 결장직장암, 피부 T-세포 림프종 (Cutaneous T-Cell Lymphoma), 미만성 거대 B-세포 림프종 (Diffuse Large B-Cell Lymphoma), 자궁내막암 (Endometrial Cancer), 식도암 (Esophageal Cancer), 나팔관암 (Fallopian Tube Cancer), 소포성 림프종 (Follicular Lymphoma), 위암, 위식도 (GE) 접합부 암종 (Gastroesophageal Junction Carcinomas), 생식 세포 종양 (Germ Cell Tumors), 배아세포종(정상피종) (Germinomatous (Seminomatous)), 생식 세포 종양, 다형성 교모세포종 (Glioblastoma Multiforme; GBM), 교육종 (Gliosarcoma), 두경부암, 간세포 암종 (Hepatocellular Carcinoma), 호지킨 림프종, 하인두암 (Hypopharyngeal Cancer), 후두암 (Laryngeal Cancer), 평활근육종 (Leiomyosarcoma), 맨틀 세포 림프종, 흑색종, 메르켈 세포 암종 (Merkel Cell

Carcinoma), 다발성 골수종, 신경내분비종양 (Neuroendocrine Tumors), 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 구강암 (Oral Cavity (Mouth) Cancer), 구강인두암 (Oropharyngeal Cancer), 골육종 (Osteosarcoma), 난소암, 췌장암, 말초신경초종양 (신경섬유육종) (Peripheral Nerve Sheath Tumor (Neurofibrosarcoma)), 말초 T세포 림프종(Peripheral T-Cell Lymphomas; PTCL), 복막암, 전립선암, 신세포암종 (Renal Cell Carcinoma), 침샘암 (Salivary Gland Cancer), 피부암 (Skin Cancer), 소세포 폐암, 연조직 육종, 편평 세포 암종 (Squamous Cell Carcinoma), 활막 육종 (Synovial Sarcoma), 고환암 (Testicular Cancer), 흉선 암종 (Thymic Carcinoma), 갑상선암, 요관암 (Ureter Cancer), 요도암 (Urethral Cancer), 자궁암 (Uterine Cancer), 질암 (Vaginal Cancer) 또는 외음부암이다.

[0500] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 방광암, 유방암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 (Chronic myelogenous leukemia), 결장직장암, 미만성 거대 B-세포 림프종, 상피 난소암(Epithelial Ovarian Cancer), 상피 종양 (Epithelial Tumor), 나팔관암, 소포성 림프종, 다형성 교모세포종, 간세포 암종, 두경부암, 백혈병, 림프종, 맨틀 세포 림프종, 흑색종, 중피종, 다발성 골수종, 비인두암(Nasopharyngeal Cancer), 비호지킨 림프종, 비-소세포 폐 암종(Non-small-cell lung carcinoma), 난소암, 전립선암, 또는 신세포암종이다.

[0501] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병 및 암종(예, 결장 암종, 난소 암종, 폐 암종, 두경부 암종, 간세포 암종)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0502] 특정 구현예에 따르면, 암은 비소세포 폐암(NSCLC)이다.

[0503] 특정 구현예에 따르면, 암은 중피종[예, 악성 흉막 중피종(MPM)]이다.

[0504] 특정 구현예에 따르면, 상기 백혈병은 급성 비림프구성 백혈병 (acute nonlymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병 (acute granulocytic leukemia), 만성 과립구성 백혈병 (chronic granulocytic leukemia), 급성 전골수성 백혈병, 성인 T-세포백혈병 (adult T-cell leukemia), 무백혈성 백혈병 (aleukemic leukemia), 백혈구병성 백혈병 (leukocythemtic leukemia), 호염기성 백혈병 (basophylic leukemia), 모세포 백혈병 (blast cell leukemia), 소 백혈병 (bovine leukemia), 만성 골수성 백혈병, 피부 백혈병 (leukemia cutis), 배아 백혈병 (embryonal leukemia), 호산구성 백혈병 (eosinophilic leukemia), 그로스 백혈병 (Gross' leukemia), 털세포 백혈병 (hairy-cell leukemia), 혈모세포성 백혈병 (hemoblastic leukemia), 혈구모세포성 백혈병 (hemocytoblastic leukemia), 조직구성 백혈병 (histiocytic leukemia), 줄기 세포 백혈병 (stem cell leukemia), 급성 단구성 백혈병 (acute monocytic leukemia), 백혈구 감소성 백혈병 (leukopenic leukemia), 림프구성 백혈병 (lymphatic leukemia), 림프모구성 백혈병 (lymphoblastic leukemia), 림프구성 백혈병, 림프형성 백혈병 (lymphogenous leukemia), 림프 백혈병 (lymphoid leukemia), 림프육종 세포 백혈병 (lymphosarcoma cell leukemia), 비만세포 백혈병 (mast cell leukemia), 거대핵세포 백혈병 (megakaryocytic leukemia), 미세골수모구성 백혈병 (micromyeloblastic leukemia), 단구성 백혈병 (monocytic leukemia), 골수모구성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수 과립구성 백혈병 (myeloid granulocytic leukemia), 골수단구성 백혈병 (myelomonocytic leukemia), 네겔리 백혈병 (Naegeli leukemia), 형질 세포 백혈병 (plasma cell leukemia), 형질구성 백혈병 (plasmacytic leukemia), 전골수성 백혈병 (promyelocytic leukemia), 리더 세포 백혈병 (Rieder cell leukemia), 쉴링 백혈병 (Schilling's leukemia), 줄기세포 백혈병, 아백혈병성 백혈병 (subleukemic leukemia), 및 미분화 세포 백혈병 (undifferentiated cell leukemia)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0505] 특정 구현예에 따르면, 상기 백혈병은 전골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 또는 만성 골수성 백혈병이다.

[0506] 특정 구현예에 따르면, 암은 림프종이다.

[0507] 특정 구현예에 따르면, 림프종은 B 세포 림프종, T 세포 림프종, 호지킨스 림프종 또는 비-호지킨스 림프종이다.

[0508] 특정 구현예에 따르면, 비-호지킨 림프종은 공격적 NHL (aggressive NHL), 변형성 NHL (transformed NHL), 지연성 NHL (indolent NHL), 재발성 NHL (relapsed NHL), 불응성 비호지킨 림프종 (refractory NHL), 저등급 NHL, 소포성 림프종, 거대 세포 림프종 (large cell lymphoma), B-세포 림프종, T-세포 림프종, 맨틀 세포 림프종, 버킷 림프종, NK 세포 림프종 (NK cell lymphoma), 미만성 거대 B-세포 림프종, 급성 림프모구 림프종 (acute lymphoblastic lymphoma), 및 균상식육종 (mycosos fungoides)/세즈리 증후군 (Sezry syndrome)을 포함하는 피부 T 세포 암 (cutaneous T cell cancer)으로 이루어진 군에서 선택된다.

- [0509] 특정 구현예에 따르면, 상기 암은 다발성 골수종이다.
- [0510] 적어도 몇몇 구현예에 따르면, 상기 다발성 골수종은 카파-형 경쇄 및/또는 람다-형 경쇄를 생성하는 다발성 골수종 암 (multiple myeloma cancers); 원발성 형질 세포 백혈병 (primary plasma cell leukemia; PCL)을 포함하는 공격적 다발성 골수종 (aggressive multiple myeloma); 다발성 골수종으로 진행될 수 있는 단세포군감마글로불린병증 (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS), 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia; WM, 림프형질세포성 림프종 (lymphoplasmacytic lymphoma)으로도 알려짐)과 같은 양성 형질 세포 질환 (benign plasma cell disorders); 또한 다발성 골수종으로 진행될 수 있는 무증상 다발성 골수종 (smoldering multiple myeloma; SMM), 지연성 다발성 골수종 (indolent multiple myeloma), 다발성 골수종의 전암성 형태 (premalignant); 원발성 아밀로이드증 (primary amyloidosis)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0511] 특정 구현예에 따르면, 암은 종양 미세 환경에서 종양 침윤 림프구(TIL)를 갖는 종양 및/또는 종양 미세 환경에서 자연 결합 쌍의 상대적으로 높은 발현을 갖는 종양의 존재에 의해 정의된다.
- [0512] 특정 구현예에 따르면, 질병은 면역 억제 또는 약물(예, mTOR 억제제, 칼시뉴린 억제제, 스테로이드)에 의해 유발되는 면역억제와 관련된 질병을 포함한다.
- [0513] 특정 구현예에 따르면, 질병은 HIV, 홍역, 인플루엔자, LCCM, RSV, 인간 라이노바이러스, EBV, CMV 또는 파르보바이러스를 포함한다.
- [0514] 특정 구현예에 따르면, 질병은 감염을 포함한다.
- [0515] 본 명세서에서 사용되는 용어 “감염” 또는 “감염성 질병”은 병원체에 의해 유발되는 질병을 지칭한다. 병원체의 구체적인 예로는 바이러스성 병원체 (viral pathogen), 세포내 마이코박테리아 병원체 (intracellular mycobacterial pathogen) (예, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)), 세포내 박테리아 병원체 (intracellular bacterial pathogen) (예, 리스테리아 모노사이토제네스 (Listeria monocytogenes))와 같은 세균성 병원체 (bacterial pathogen), 또는 세포내 원생동물 병원체 (intracellular protozoan pathogen) (예, 레이시마니아 (Leishmania) 및 트리파노소마 (Trypanosoma))를 포함한다.
- [0516] 본 발명의 교시에 따라 치료 가능한 감염성 질병을 유발하는 바이러스성 병원체의 구체적인 유형은 레트로바이러스 (retrovirus), 켄코바이러스 (circovirus), 파보바이러스 (parvovirus), 파포바바이러스 (papovavirus), 아데노바이러스 (adenovirus), 헤르페스바이러스 (herpesvirus), 이리도바이러스(iridovirus), 폭스바이러스 (poxvirus), 헤파드나바이러스 (hepadnavirus), 피코나바이러스 (picornavirus), 칼리시바바이러스 (calicivirus), 토가바이러스 (togavirus), 플라비바이러스 (flavivirus), 레오바이러스 (reovirus), 오르토믹소바이러스 (orthomyxovirus), 파라믹소바이러스 (paramyxovirus), 램도바이러스 (rhabdovirus), 버나바이러스 (bunyavirus), 코로나바이러스 (coronavirus), 아레나바이러스 (arenavirus), 및 필로바이러스 (filovirus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0517] 본 발명의 교시에 따라 치료할 수 있는 바이러스성 감염의 구체적인 예로는 인간 면역 결핍 바이러스-유도 후천성 면역결핍 증후군 (human immunodeficiency virus (HIV)-induced acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)), 인플루엔자 (influenza), 리노바이러스 감염 (rhinoviral infection), 바이러스성 뇌수막염 (viral meningitis), 엡스타인-바 바이러스 감염 (Epstein-Barr virus (EBV) infection), A, B, 또는 C형 간염 바이러스 감염 (hepatitis A, B or C virus infection), 홍역, 유두종 바이러스 감염/사마귀 (papilloma virus infection/warts), 거대세포바이러스 감염 (cytomegalovirus (CMV) infection), 단순 포진 바이러스 감염 (Herpes simplex virus infection), 황열병 (yellow fever), 에볼라 바이러스 감염 (Ebola virus infection), 광견병 (rabies) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0518] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물 (예, 이중이량체 핵산 구조물 또는 시스템 및/또는 이를 발현하는 숙주 세포)은 질병을 치료하기 위해, 진통제 (analgesics), 화학요법제 (chemotherapeutic agents), 방사선요법제 (radiotherapeutic agents), 세포독성 요법 (컨디셔닝) (cytotoxic therapies (conditioning)), 호르몬 요법 (hormonal therapy), 항체 (antibodies) 및 당업계에 익히 공지된 다른 치료 요법 (예, 수술)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다른 확립된 또는 실험적 치료 요법과 병용(in combination)하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0519] 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 몇몇 구현예의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 항체를 포함한다.

- [0520] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물 (예, 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템, 및/또는 이를 발현하는 숙주세포)은 골수 세포, 조혈 줄기 세포, PBMC, 제대혈 줄기 세포, 및/또는 유도 만능 줄기 세포와 같으나, 이에 제한되지 않은 입양 세포 (adoptive cell) 이식과 병용하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0521] 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 몇몇 구현예의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 항암제를 포함한다.
- [0522] 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 일부 구현예의 조성물과 함께 투여되는 치료제는 항감염제(예, 항생제 및 항바이러스제)를 포함한다.
- [0523] 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 일부 구현예의 조성물과 함께 투여되는 치료제는 면역억제제(예, GCSF 및 기타 골수 자극제, 스테로이드)를 포함한다.
- [0524] 특정 구현예에 따르면 병용 요법은 상가 효과를 갖는다.
- [0525] 특정 구현예에 따르면, 병용 요법은 시너지 효과를 갖는다.
- [0526] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 질병 치료를 위한 치료제를 포장하는 포장재; 및 이중이량체, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포;를 포함하는 제조 물품이 제공된다.
- [0527] 특정 구현예에 따르면, 상기 제조 물품은 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병, 예를들면 면역 세포 활성화로 이익을 얻을 수 있는 질병의 치료를 위해 식별된다.
- [0528] 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 치료제; 및 이중이량체, 이를 포함하는 조성물, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 별도의 용기에 포장된다.
- [0529] 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 치료제; 및 이중이량체, 이를 포함하는 조성물, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 공동 제형으로 포장된다.
- [0530] 본 명세서에서, 상호교환적으로 사용되는 용어 "아미노산 서열", "단백질", "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질성 모이어티"는 천연 펩타이드 (분해 생성물, 합성적으로 합성된 펩타이드 또는 재조합 펩타이드), 펩티도 모방체 (통상적으로, 합성적으로 합성된 펩타이드), 및 펩타이드의 유사체인 펩토이드(peptoid) 및 세미펩토이드(semipeptoid)- 예를 들면, 펩타이드가 생체 내에서 보다 안정적이게 하거나 세포 내로 더욱 침투하도록 하는 변형을 가질 수 있음 - 를 포함한다. 이러한 변형은 N 말단 변형, C 말단 변형, 펩타이드 결합 변형, 골격 변형, 및 잔기 변형을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 펩티도모방체 화합물의 제조 방법은 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들면 Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)은 본 명세서에 전문이 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 이 부분에 대한 추가적인 세부사항은 하기와 같다.
- [0531] 펩타이드 내의 펩타이드 결합 ($-CO-NH-$)은 예를 들면, N-메틸화 아미드 결합 ($-N(CH_3)-CO-$), 에스테르 결합 ($-C(=O)-O-$), 케토메틸렌 결합 ($-CO-CH_2-$), 설파닐메틸렌 결합 ($-S(=O)-CH_2-$), α -아자 결합 ($-NH-N(R)-CO-$) (여기서, R은 임의의 알킬 (예를 들면, 메틸)), 아민 결합 ($-CH_2-NH-$), 설파이드 결합 ($-CH_2-S-$), 에틸렌 결합 ($-CH_2-CH_2-$), 하이드록시에틸렌 결합 ($-CH(OH)-CH_2-$), 티오아미드 결합 ($-CS-NH-$), 올레핀 이중 결합 ($-CH=CH-$), 플루오르화 올레핀 이중 결합 ($-CF=CH-$), 레트로 아미드 결합 ($-NH-CO-$), 펩타이드 유도체 ($-N(R)-CH_2-CO-$) (여기서 R은 탄소 원자에 자연적으로 존재하는 "노말(normal)" 측쇄로 치환될 수 있다.
- [0532] 이 변형들은 펩타이드 사슬을 따라 임의의 결합에서 발생할 수 있으며, 동시에 여러 (2-3) 결합에서도 발생할 수 있다.
- [0533] 천연 방향족 아미노산, Trp, Tyr, 및 Phe는 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실산 (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid, Tic), 나프틸알라닌 (naphthylalanine), 페닐알라닌의 고리 메틸화 유도체 (ring-methylated derivatives of Phe), 페닐알라닌의 할로젠화 유도체 (halogenated derivatives of Phe) 또는 O-methyl-Tyr와 같은 비천연 방향족 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [0534] 본 발명의 몇몇 구현예의 펩타이드는 또한 하나 이상의 변형된 아미노산 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체 (예, 지방산, 복합 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.
- [0535] 용어 "아미노산" 또는 "아미노산들"은 20개의 자연 발생 아미노산; 예를 들면, 하이드록시프롤린, 포스포세린, 및 포스포트레오닌을 포함하는, 흔히 생체 내에서 번역후 변형된 아미노산들; 및 2-아미노아디프산, 하이드록시

라이신, 이소테스모신, 노르-발린, 노르-류신, 및 오르니틴을 포함하나, 이에 제한되지 않는 기타 일반적인지 않은 아미노산들을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 용어 "아미노산"은 D- 및 L-아미노산 둘 모두를 포함한다.

[0536] 하기 표 2 및 3은 본 발명의 몇몇 구현예와 함께 사용될 수 있는 자연 발생한 아미노산 (표 2), 및 비-통상적이거나 변형된 아미노산 (예를 들면, 합성 아미노산, 표 3)을 나열한다.

[0537] 표 2

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

[0538]

[0539] 표 3

비-통상적인 아미노산	코드	비-통상적인 아미노산	코드
오르니틴	Orn	하이드록시프롤린	Hyp
α -아미노부티르산	Abu	아미노노르보르닐- 카르복실레이트	Norb
D-알라닌	Dala	아미노사이클로프로판- 카르복실레이트	Cpro
D-아르기닌	Darg	N-(3-구아니디노프로필)글리신	Narg
D-아스파라긴	Dasn	N-(카바밀메틸)글리신	Nasn
D-아스파르트산	Dasp	N-(카복시메틸)글리신	Nasp
D-시스테인	Dcys	N-(티오메틸)글리신	Ncys
D-글루타민	Dgln	N-(2-카바밀메틸)글리신	Ngln
D-글루탐산	Dglu	N-(2-카복시메틸)글리신	Nglu
D-히스티딘	Dhis	N-(이미다졸메틸)글리신	Nhis
D-이소류신	Dile	N-(1-메틸프로필)글리신	Nile
D-류신	Dleu	N-(2-메틸프로필)글리신	Nleu
D-라이신	Dlys	N-(4-아미노부틸)글리신	Nlys
D-메티오닌	Dmet	N-(2-메틸티오메틸)글리신	Nmet
D-오르니틴	Dorn	N-(3-아미노프로필)글리신	Norn
D-페닐알라닌	Dphe	N-벤질글리신	Nphe
D-프롤린	Dpro	N-(하이드록시메틸)글리신	Nser
D-세린	Dser	N-(1-하이드록시메틸)글리신	Nthr
D-트레오닌	Dthr	N-(3-인돌메틸)글리신	Nhtrp
D-트립토판	Dtrp	N-(p -하이드록시페닐)글리신	Ntyr
D-티로신	Dtyr	N-(1-메틸메틸)글리신	Nval

[0540]

D-발린	Dval	N-메틸글리신	Nmgly
D-N-메틸알라닌	Dnmala	L-N-메틸알라닌	Nmala
D-N-메틸아르기닌	Dnmarg	L-N-메틸아르기닌	Nmarg
D-N-메틸아스파라긴	Dnmasn	L-N-메틸아스파라긴	Nmasn
D-N-메틸아스파라테이트	Dnmasp	L-N-메틸아스파르트산	Nmasp
D-N-메틸시스테인	Dnmcys	L-N-메틸시스테인	Nmcys
D-N-메틸글루타메이트	Dnmgln	L-N-메틸글루타민	Nmgln
D-N-메틸글루탐산	Dnmglu	L-N-메틸글루탐산	Nmglu
D-N-메틸히스티딘	Dnmhis	L-N-메틸히스티딘	Nmhis
D-N-메틸이소류신	Dnmile	L-N-메틸이소류신	Nmile
D-N-메틸류신	Dnmieu	L-N-메틸류신	Nmieu
D-N-메틸라이신	Dnmlys	L-N-메틸라이신	Nmlys
D-N-메틸메티오닌	Dnmmet	L-N-메틸메티오닌	Nmmet
D-N-메틸오르니틴	Dnmorn	L-N-메틸오르니틴	Nmorn
D-N-메틸페닐알라닌	Dnmphe	L-N-메틸페닐알라닌	Nmphe
D-N-메틸프롤린	Dnmpro	L-N-메틸프롤린	Nmpro
D-N-메틸세린	Dnmser	L-N-메틸세린	Nmser
D-N-메틸트레오닌	Dnmthr	L-N-메틸트레오닌	Nmthr
D-N-메틸트립토판	Dnmtrp	L-N-메틸트립토판	Nmtrp
D-N-메틸티로신	Dnmtyr	L-N-메틸티로신	Nmtyr
D-N-메틸발린	Dnmval	L-N-메틸발린	Nmval
L-노르류신	Nle	L-N-메틸노르류신	Nmnle
L-노르발린	Nva	L-N-메틸노르발린	Nmnva
L-에틸글리신	Etg	L-N-메틸-에틸글리신	Nmetg
L-t-부틸글리신	Tbug	L-N-메틸-t-부틸글리신	Nmtbug

[0541]

L-호모페닐알라닌	Hphe	L-N-메틸-호모페닐알라닌	Nmhphe
α -나프틸알라닌	Anap	N-메틸- α -나프틸알라닌	Nmanap
페닐살라민	Pen	N-메틸페닐살라민	Nmpen
γ -아미노부티르산	Gabu	N-메틸- γ -아미노부티레이트	Nmgabu
사이클로헥실알라닌	Chexa	N-메틸-사이클로헥실알라닌	Nmchexa
사이클로펜틸알라닌	Cpen	N-메틸-사이클로펜틸알라닌	Nmcpen
α -아미노- α -메틸부티레이트	Aabu	N-메틸- α -아미노- α -메틸부티레이트	Nmaabu
α -아미노이소부티르산	Aib	N-메틸- α -아미노이소부티레이트	Nmaib
D- α -메틸아르기닌	Dmarg	L- α -메틸아르기닌	Marg
D- α -메틸아스파라긴	Dmasn	L- α -메틸아스파라긴	Masn
D- α -메틸아스파르테이트	Dmasp	L- α -메틸아스파르테이트	Masp
D- α -메틸시스테인	Dmcys	L- α -메틸시스테인	Mcys
D- α -메틸글루타민	Dmgln	L- α -메틸글루타민	Mgln
D- α -메틸글루탐산	Dmglu	L- α -메틸글루타메이트	Mglu
D- α -메틸 히스티딘	Dmhis	L- α -메틸히스티딘	Mhis
D- α -메틸이소류신	Dmile	L- α -메틸이소류신	Mile
D- α -메틸류신	Dmleu	L- α -메틸류신	Mleu
D- α -메틸라이신	Dmlys	L- α -메틸라이신	Mlys
D- α -메틸메티오닌	Dmmet	L- α -메틸메티오닌	Mmet
D- α -메틸오르니틴	Dmorn	L- α -메틸오르니틴	Morn
D- α -메틸페닐알라닌	Dmphe	L- α -메틸페닐알라닌	Mphe
D- α -메틸프롤린	Dmpro	L- α -메틸프롤린	Mpro
D- α -메틸세린	Dmser	L- α -메틸세린	Mser
D- α -메틸트레오닌	Dmthr	L- α -메틸트레오닌	Mthr

[0542]

D- α -메틸트립토판	Dmtrp	L- α -메틸트립토판	Mtrp
D- α -메틸티로신	Dmtyr	L- α -메틸티로신	Mtyr
D- α -메틸발린	Dmval	L- α -메틸발린	Mval
N-사이클로부틸글리신	Ncbut	L- α -메틸노르발린	Mnva
N-사이클로헥실글리신	Nchep	L- α -메틸에틸글리신	Metg
N-사이클로헥실글리신	Nchex	L- α -메틸- ϵ -부틸글리신	Mtbug
N-사이클로데실글리신	Ncdec	L- α -메틸-호모페닐알라닌	Mhphe
N-사이클로데실글리신	Ncdod	α -메틸- α -나프틸알라닌	Manap
N-사이클로옥틸글리신	Ncoct	α -메틸페닐알라닌	Mpen
N-사이클로프로필글리신	Ncpro	α -메틸- γ -아미노부티레이트	Mgabv
N-사이클로운데실글리신	Ncund	α -메틸-사이클로헥실알라닌	Mchexa
N-(2-아미노에틸)글리신	Naeg	α -메틸-사이클로펜타메틸알라닌	Mcpen
N-(2,2-디페닐에틸)글리신	Nbhm	N-(N-(2,2-디페닐에틸)카바미메틸-글리신	Nnbhm
N-(3,3-디페닐프로필)글리신	Nbhe	N-(N-(3,3-디페닐프로필)카바미메틸-글리신	Nnbhe
1-카복시-1-(2,2-디페닐에틸아미노)사이클로프로판	Nmbc	1,2,3,4-테트라하이드로미소퀴놀린-3-카복실산	Tic
포스포세린	pSer	포스포트레오닌	pThr
포스포티로신	pTyr	O-메틸-티로신	
2-아미노아디프산		하이드록시라이신	

[0543]

[0544]

본 발명의 몇몇 구현예의 펩타이드는 바람직하게는 선형 형태로 사용되지만, 고리화가 펩타이드 특성을 심각하게 방해하지 않는 경우, 펩타이드의 고리 형태도 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0545]

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

[0546]

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

[0547]

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

[0548]

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

[0549]

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

[0550]

보존적 치환에 영향을 미칠 때, 치환 아미노산은 측쇄에 원래 아미노산과 동일하거나 유사한 작용기를 가져야 한다.

[0551]

기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 익히 공지되어 있다. 어떤 아미노산 변화가 표현형으로 침묵할 가능성이 있는지에 관한 지침은 Bowie et al., 1990, Science 247: 1306 1310에서도 찾을 수 있다. 이 보존적으로 변형된 변이체는 다형성 변이체 (polymorphic variants), 중간 동족체 (interspecies

homologs), 및 대립 유전자 (alleles)에 추가되며 이들을 배제되지 않는다. 통상적인 보존적 치환은 1) 알라닌 (A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신 (K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린 (S), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예를 들면, Creighton, Proteins(1984) 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 아미노산은 측쇄와 관련된 특성을 기반으로 치환될 수 있으며, 예를 들면 극성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 세린(S) 및 트레오닌(T); 측쇄의 전하를 기반으로 하는 아미노산, 예를 들면 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 및 소수성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 발린(V) 및 류신(L)은 치환될 수 있다. 상술한 바와 같이, 변화는 일반적으로 단백질의 폴딩 또는 활성에 상당한 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환과 같은 사소한 특성을 갖는다.

[0552] 본 발명에서, 어구 “비-보존적 치환”은 상이한 전기화학적 및/또는 입체적 특성을 갖는 또 다른 자연 또는 비자연 발생 아미노산에 의한 모체 서열 (parent sequence)에 존재하는 아미노산의 대체를 지칭한다. 따라서, 치환 아미노산의 측쇄는 치환되는 천연 아미노산의 측쇄보다 유의하게 더 클 (더 작을) 수 있고/있거나 치환되는 아미노산과 상당히 상이한 전자 특성을 갖는 작용기를 가질 수 있다. 이 유형의 비보존적 치환의 예시는 알라닌 대신 페닐알라닌 또는 사이클로헥실메틸 글리신로의 치환, 글리신 대신 이소류신으로의 치환, 아스파르트산 대신 $-NH-CH [(-CH_2)_5-COOH] -CO-$ 로의 치환을 포함한다. 본 발명의 범주에 속하는 이 비보존적 치환은 여전히 항 박테리아 특성을 갖는 펩타이드를 구성하는 것이다.

[0553] 본 발명의 펩타이드의 N 및 C 말단은 작용기에 의해 보호될 수 있다. 적합한 작용기는 Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991에 기재되어 있으며, 이의 교시 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 바람직한 보호기는, 예를 들면 화합물의 친수성을 감소시키고 친유성을 증가시킴으로써 그에 부착된 화합물의 세포 내로의 수송을 용이하게 하는 것이다.

[0554] 특정 구현예에 따르면, 아미노산들 중 하나 이상은 예를 들면 작용기의 추가에 의해 변형될 수 있다 (개념적으로 "화학적으로 변형된"으로 간주됨). 예를 들면, 천연 서열에 나타나는 측쇄 아미노산 잔기는 선택적으로 변형될 수 있지만, 하기에 기술된 바와 같이 대안적으로 단백질의 다른 부분은 측쇄 아미노산 잔기에 추가하여 또는 측쇄 아미노산 잔기를 대체하여 선택적으로 변형될 수 있다. 상기 변형은, 예를 들면 화학적 합성 과정에 화학적으로 변형된 아미노산을 추가하는 것이 뒤따르는 경우, 분자의 합성 동안 선택적으로 수행될 수 있다. 그러나 분자에 이미 존재하는 아미노산의 화학적 변형 ("in situ" 변형)도 가능하다. 펩타이드 또는 단백질로의 변형은 예를 들면 엑소뉴클레아제 결실, 화학적 변형, 또는 이중성 도메인 또는 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 융합에 의한, 유전자 합성, 부위-특이적 (예, PCR 기반) 또는 무작위 돌연변이유발(예, EMS)에 의해 도입될 수 있다.

[0555] 본 명세서에서 사용되는 용어 “화학적 변형”은 펩타이드를 언급할 때, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 당업계에 익히 공지된 가공 또는 기타 번역 후 변형과 같은 자연적 과정에 의해, 또는 화학적 변형 기술에 의해 변형되었을 때의 펩타이드를 지칭한다. 변형의 비제한적인 예시적인 유형은 카르복시메틸화, 아세틸화, 아실화, 인산화, 글리코실화, 아미드화, ADP-리보실화, 지방 아실화, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 탄수화물 기, 지방산 기, 접합을 위한 링커의 첨가, 기능화, GPI 앵커 형성, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 메틸화, 미리스틸화, 페길화, 프레닐화, 인산화, 유비퀴틴화, 또는 임의의 유사한 과정 및 공지된 보호/차단기를 포함한다. 에테르 결합은 세린 또는 트레오닌 하이드록실을 당의 하이드록실에 연결하는데 선택적으로 사용될 수 있다. 아미드 결합은 글루탐이트 또는 아스파르테이트 카르복실기를 당의 아미노기에 연결하는데 선택적으로 사용될 수 있다 (Garg and Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, Ang. Chem. Int Ed. English 26:294-308 (1987)). 아세탈 및 케탈 결합은 또한 아미노산과 탄수화물 사이에 선택적으로 형성될 수 있다. 지방산 아실 유도체는 예를 들면 유리 아미노기(예, 라이신)의 아실화에 의해 선택적으로 제조될 수 있다 (Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

[0556] 특정 구현예에 따르면, 변형은 PCT 출원 번호 제WO 2006/050262호에 기재된 바와 같이, 펩타이드에 사이클로 알칸 모이어티를 추가하는 것을 포함하며, 이는 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 이 모이어티는 생체분자와 함께 사용하도록 고안되었으며 선택적으로 단백질에 다양한 특성을 부여하는데 사용할 수 있다.

[0557] 또한, 선택적으로 펩타이드 상의 임의의 지점이 변형될 수 있다. 예를 들면, 단백질 상의 당화 모이어티의 PEG화는 PCT 출원 번호 WO 2006/050247에 기재된 바와 같이 임의로 수행될 수 있으며, 이는 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기가 O-연결 및/또는 N-연결 글리코실화에

선택적으로 추가될 수 있다. PEG 기는 선택적으로 분지형 또는 선형일 수 있다. 선택적으로, 임의의 유형의 수용성 중합체는 글리코실 링커를 통해 단백질 상의 글리코실화 부위에 부착될 수 있다.

- [0558] "PEG화된 단백질 (PEGylated protein)"은 단백질의 아미노산 잔기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 갖는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 이의 단편을 의미한다.
- [0559] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 커플링제의 존재 또는 부재 하에서, 또는 커플링 또는 활성화 모이어티 (예, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지르딘, 옥시란, 또는 바람직하게는 말레이미드 모이어티)를 이용한 유도체화의 존재 또는 부재 하에서, 폴리알킬렌 글리콜 화합물 또는 이의 유도체를 의미한다. 말레이미도 모노메톡시 PEG와 같은 화합물은 본 발명의 예시적인 또는 활성화된 PEG 화합물이다. 폴리프로필렌 글리콜과 같은 다른 폴리알킬렌 글리콜 화합물이 본 발명에서 사용될 수 있다. 기타 적절한 폴리알킬렌 글리콜 화합물은 하기 유형: 텍스트란, 콜로민산 또는 기타 탄수화물 기반 중합체, 아미노산 중합체 및 비오틴 유도체의 하전 또는 중성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0560] 특정 구현예에 따르면, 펩타이드는 변형된 글리코실화 패턴(즉, 원래 또는 고유 글리코실화 패턴으로부터 변경됨)을 갖도록 변형된다. 본 명세서에서 사용되는 "변경된 (altered)"은 하나 이상의 탄수화물 모이어티가 결실되고/되거나 원래 단백질에 적어도 하나의 글리코실화 부위를 갖는 것을 의미한다.
- [0561] 단백질의 글리코실화는 일반적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착하는 것을 지칭한다. 트리펩타이드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열 (recognition sequence)이다. 따라서, 폴리펩타이드에서 이 트리펩타이드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 형성한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로오스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신도 사용될 수 있다.
- [0562] 펩타이드에 글리코실화 부위를 추가하는 것은 펩타이드의 아미노산 서열을 변경 (alter)하여 하나 이상의 전술한 트리펩타이드 서열 (N-연결 글리코실화 부위의 경우)을 함유하도록 함으로써 편하게 수행된다. 변경은 원래 펩타이드의 서열 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우)에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다. 펩타이드의 아미노산 서열은 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 또한 변경될 수 있다.
- [0563] 펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 펩타이드의 아미노산 잔기에 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 사용된 커플링 모드에 따라, 당은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실기, (c) 시스테인과 같은 유리 설프하이드릴기, (d) 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린과 같은 유리 하이드록실기 (e) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판과 같은 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이 방법은 예를 들면 WO 87/05330과 Aplin 및 Wriston, CRC Crit. Rev.Biochem., 22: 259-306(1981)에 기재되어 있다.
- [0564] 펩타이드에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로, 효소적으로 또는 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 펩타이드를 트리플루오로메탄설폰산 또는 동등한 화합물에 노출시켜야 한다. 이 처리는 연결당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래하여 아미노산 서열을 손상 없이 보존하도록 한다.
- [0565] 화학적 탈글리코실화는 Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987); and Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981)에 기재되어 있다. 펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350(1987)에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소- 글리코시다제의 사용으로 달성될 수 있다.
- [0566] 본 발명의 몇몇 구현예의 펩타이드 및 이를 포함하는 펩타이드는 고체상 및 재조합 기술과 같으나, 이에 제한되지 않은 펩타이드 합성 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기술로 합성 및 정제될 수 있다
- [0567] 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드 및/또는 이중이량체를 제조하는 것은 고상 펩타이드 합성을 포함한다.
- [0568] 고체상 펩타이드 합성의 경우, J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 및 J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1973에서 많은 기술의 요약물을 찾을 수 있다. 고전적인 용액 합성에 대해서는 G.

Schroder and K. Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York), 1965을 참조한다.

- [0569] 일반적으로, 이 방법들은 하나 이상의 아미노산 또는 적절하게 보호된 아미노산을 성장하는 펩타이드 사슬에 순차적으로 추가하는 것을 포함한다. 일반적으로 제1 아미노산의 아미노 또는 카르복실기는 적절한 보호기에 의해 보호된다. 보호된 또는 유도체화된 아미노산은 불활성 고체 지지체에 부착되거나 아미드 결합을 형성하기에 적합한 조건 하에 적합하게 보호된 상보적 (아미노 또는 카르복실) 기를 갖는 서열에 다음 아미노산을 첨가함으로써 용액에서 사용될 수 있다. 이어서, 새로 추가된 아미노산 잔기로부터 보호기가 제거되고, 다음 아미노산 (적합하게 보호됨) 등이 추가된다. 모든 원하는 아미노산을 적절한 순서로 연결한 후, 남아있는 보호기 (및 임의의 고체 지지체)를 순차적으로 또는 동시에 제거하여 최종 펩타이드 화합물을 제공한다. 이 일반적인 절차를 간단하게 변형함으로써, 예를 들면, (카이랄 중심을 라세미화하지 않는 조건에서) 보호된 트리펩타이드를 적절하게 보호된 디펩타이드와 커플링함으로써 탈보호 후 펜타펩타이드 등을 형성하는 것처럼 성장하는 사슬에 한 번에 하나 이상의 아미노산을 추가할 수 있다. 펩타이드 합성에 대한 추가 설명은 미국 특허 번호 제6,472,505호에 기재되어 있다.
- [0570] 대규모 펩타이드 합성은 Andersson Biopolymers 2000;55(3):227-50에 기재되어 있다.
- [0571] 특정 구현예에 따르면, 이를 포함하는 폴리펩타이드 또는 이중이량체는 시험관내 발현 시스템을 사용하여 합성된다.
- [0572] 따라서, 본원에 기재된 임의의 폴리펩타이드는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩될 수 있다. 이들 폴리뉴클레오티드는 그 자체로 또는 본원에 개시된 폴리펩타이드의 재조합 생산에 사용될 수 있다.
- [0573] "재조합" 펩타이드 또는 단백질은 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 펩타이드 또는 단백질을 지칭한다; 즉, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 DNA 구조물에 의해 형질전환된 세포로부터 생산된다.
- [0574] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 이중이량체를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드, 및 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 구조물 또는 시스템이 제공된다.
- [0575] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 비제한적 예는 상기 및 하기 표 1에 기재되어 있다.
- [0576] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 RNA 서열, 상보적 폴리뉴클레오티드 서열 (complementary polynucleotide sequence; cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 (genomic polynucleotide sequence) 및/또는 복합 폴리뉴클레오티드 서열 (composite polynucleotide sequences) (예, 상기의 조합)의 형태로 분리 및 제공되는 단일 또는 이중 가닥 핵산 서열을 지칭한다.
- [0577] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 임의의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 서열은 보존적 핵산 치환을 포함할 수 있다. 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오티드는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 아미노산 서열을 본질적으로 동일하거나 연관된 (예, 자연적으로 인접한) 서열을 코딩하지 않는 핵산을 지칭한다. 유전자 암호의 퇴화(degeneracy)로 인해 기능적으로 동일한 많은 핵산들이 대부분의 단백질을 코딩한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 코딩된 폴리펩타이드를 변경하지 않고 기술된 상응하는 코돈 중 다른 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오티드의 한 종인 "침묵 변이 (silent variation)"이다. 특정 구현예에 따르면, 폴리펩타이드를 코딩하는 본 명세서에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 서열은 또한 핵산의 침묵 변이를 나타낸다. 당업자는 특정 상황에서 핵산의 각 코돈 (일반적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 일반적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 침묵 변이는 발현 생성물과 관련하여 기재된 서열에 내재되어 있다.
- [0578] 포유동물 세포에서 외인성 폴리펩타이드를 발현시키기 위해, 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 포유동물 세포 발현에 적합한 핵산 구조물에 결합된다. 이러한 핵산 구조물은 구성성 또는 유도성 방식으로 세포에서 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 지시하기 위한 프로모터 서열을 포함한다.
- [0579] 특정 구현예에 따르면, 상기 조절 요소는 이중성 조절 요소다.
- [0580] 본 발명의 몇몇 구현예의 핵산 구조물 (본 명세서에서 "발현 벡터"로도 지칭됨)은 이 벡터(예, 셔틀벡터)를 원핵생물, 진핵생물, 또는 바람직하게는 둘 모두에서의 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가 서열을 포함한다. 또

한, 통상적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열, 전사 및 번역 종결자 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 이러한 구조물은 통상적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2가닥 DNA 합성의 원점, 및 3' LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다.

- [0581] 본 발명의 몇몇 구현예의 핵산 구조물은 통상적으로 그것이 위치하는 숙주 세포로부터 펩타이드의 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이러한 목적을 위한 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇 구현예의 폴리펩타이드 변이체의 신호 서열이다.
- [0582] 진핵생물 프로모터는 일반적으로 TATA 박스 및 상류 프로모터 요소의 두 가지 유형의 인식 서열을 포함한다. 전사 개시 부위의 상류에 있는 25-30개 염기쌍에 위치한 TATA 박스는 RNA 중합효소가 RNA 합성을 시작하도록 지시하는데 관여하는 것으로 생각된다. 다른 상류 프로모터 요소는 전사가 시작되는 속도를 결정한다.
- [0583] 바람직하게는, 본 발명의 몇몇 구현예의 핵산 구조물에 의해 사용되는 프로모터는 형질전환된 특정 세포 집단에서 활성이 있다. 세포 유형-특이적 및/또는 조직-특이적 프로모터의 예시는 간 특이적인 알부민 [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프구 특이적인 프로모터 [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]와 같은 프로모터; 특히 T-세포 수용체의 프로모터 [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] 및 면역글로불린; [Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740], 뉴로필라멘트 프로모터와 같은 뉴런 특이적 프로모터 [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], 췌장-특이적 프로모터 [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] 또는 유청 촉진제와 같은 유선 특이적 촉진제(미국 특허 번호 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 번호 제264,166호)를 포함한다.
- [0584] 인핸서 요소는 연결된 동종성 또는 이종성 프로모터로부터 최대 1,000배까지 전사를 자극할 수 있다. 인핸서는 전사 개시 부위의 하류 또는 상류에 배치될 때 활성이 있다. 바이러스에서 파생된 많은 인핸서 요소는 광범위한 숙주 범위를 가지며 다양한 조직에서 활성을 가진다. 예를 들면, SV40 초기 유전자 인핸서는 많은 세포 유형에 적합하다. 본 발명의 몇몇 구현예에 적합한 다른 인핸서/프로모터 조합은 폴리오마 바이러스 (polyoma virus), 인간 또는 쥐 사이토메갈로바이러스 (human or murine cytomegalovirus, CMV), 쥐 백혈병 바이러스(murine leukemia virus), 쥐 또는 라우스 육종 바이러스 (murine or Rous sarcoma virus) 및 HIV와 같은 다양한 레트로바이러스로부터의 장기 반복부로부터 유래된 것을 포함한다. Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983를 본 명세서에 참조로 포함한다.
- [0585] 발현 벡터의 구성에서, 프로모터는 바람직하게는 자연 상태(natural setting)에서 전사 개시 부위로부터의 거리와 이종성 전사 개시 부위로부터의 거리가 대략 동일하게 위치한다. 그러나, 당업계에 공지된 바와 같이, 프로모터 기능의 손실 없이 이 거리의 일부 변동은 수용될 수 있다.
- [0586] 폴리아데닐화 서열은 또한 mRNA 번역의 효율을 증가시키기 위해 발현 벡터에 추가될 수 있다. 정확하고 효율적인 폴리아데닐화를 위해서는 2개의 별개의 서열 요소가 필요하다: 폴리아데닐화 부위의 하류에 위치한 GU 또는 U 풍부한 서열과 상류 11-30개 뉴클레오타이드에 위치한 고도로 보존된 6개 뉴클레오타이드 서열인 AAUAAA. 본 발명의 몇몇 구현예에 적합한 종결 및 폴리아데닐화 신호는 SV40에서 유래된 것을 포함한다.
- [0587] 상술한 요소에 더하여, 본 발명의 몇몇 구현예의 발현 벡터는 통상적으로 클로닝된 핵산의 발현 수준을 증가시키거나 재조합 DNA를 보유하는 세포의 식별을 용이하게 하도록 의도된 다른 특수화된 요소를 함유할 수 있다. 예를 들면, 많은 동물 바이러스는 허용 가능한 세포 유형에서 바이러스 게놈의 추가 염색체 복제를 촉진하는 DNA 서열을 포함한다. 이 바이러스 레플리콘 (replicon)을 포함하는 플라스미드는 플라스미드 위에 또는 숙주 세포의 게놈과 함께 운반되는 유전자에 의해 적절한 요소가 제공될 때까지 에피솜으로 (episomally) 복제된다.
- [0588] 벡터는 진핵생물 레플리콘 (replicon)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 진핵생물 레플리콘 (replicon)이 존재하는 경우 적절한 선택 가능한 마커를 사용하여 진핵생물 세포에서 벡터를 증폭할 수 있다. 벡터가 진핵생물 레플리콘 (replicon)을 포함하지 않으면, 에피솜 증폭이 불가능하다. 대신에, 재조합 DNA는 프로모터가 원하는 핵산의 발현을 지시하는 조작 (engineer)된 세포의 게놈에 통합된다.
- [0589] 본 발명의 몇몇 구현예의 발현 벡터는 예를 들면, 내부 리보솜 진입 부위 (internal ribosome entry site, IRES) 및 프로모터-키메라 폴리펩타이드의 게놈 통합을 위한 서열로부터 여러 단백질의 번역을 허용하는 추가적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0590] 따라서, 특정 구현예에 따르면, 이중이량체에 포함된 단량체 둘 모두는 단일 구조물로부터 발현된다.
- [0591] 다른 특정 구현예들에 따르면, 이중이량체에 포함된 각각의 단량체는 상이한 구조물로부터 발현된다.

- [0592] 발현 벡터에 포함된 개별 요소는 다양한 구성으로 배열될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들면, 인핸서 요소, 프로모터 등, 및 "머리에서 꼬리까지 (head-to-tail)" 구성으로 배열된 단량체 또는 이중이량체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열조차도 역보체 (inverted complement) 또는 역병렬 가닥 (anti-parallel strand)으로서 상보적 배열로 존재할 수 있다. 이러한 다양한 배열은 발현 벡터의 비-코딩 요소에서 발생할 가능성이 더 높지만, 발현 벡터 내의 코딩 서열의 대안적 배열에서도 예상된다.
- [0593] 포유동물 발현 벡터의 예시는 Invitrogen에서 사용 가능한 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, Promega에서 사용 가능한 pCI, Strategene에서 사용 가능한 pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, Clontech에서 사용 가능한 pTRES, 및 이의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0594] 레트로바이러스와 같은 진핵생물 바이러스의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터도 사용 가능하다. SV40 벡터는 pSVT7 및 pMT2를 포함한다. 소 유두종 바이러스 (bovine papilloma virus) 유래 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하고, 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Bar virus) 유래 벡터는 pHEBO 및 p205를 포함한다. 다른 예시적인 벡터는 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터 (SV-40 early promoter), Sv-40 후기 프로모터 (SV-40 later promoter), 메탈로티오네인 프로모터 (metallothionein promoter), 무린 유방 종양 바이러스 프로모터 (murine mammary tumor virus promoter), 라우스 육종 바이러스 프로모터 (Rous sarcoma virus promoter), 다면체 프로모터 (polyhedrin promoter), 또는 진핵세포에서 발현에 효과적인 다른 프로모터의 지시 하에서 단백질의 발현을 허용하는 임의의 벡터를 포함한다.
- [0595] 상술한 바와 같이, 바이러스는 많은 경우에 숙주 방어 기제를 회피하도록 진화한 매우 전문화된 감염원이다. 일반적으로 바이러스는 특정 세포 유형을 감염시키고 전파한다. 바이러스 벡터의 표적화 특이성은 자연적 특이성을 사용하여 미리 결정된 세포 유형을 특이적으로 표적화함으로써 재조합 유전자를 감염된 세포에 도입한다. 따라서, 본 발명의 몇몇 구현예에 의해 사용되는 벡터의 유형은 형질전환된 세포 유형에 의존할 것이다. 형질전환된 세포 유형에 따라 적합한 벡터를 선택하는 능력은 당업자의 능력 내에 있으며, 본 명세서에는 선택 고려사항에 대한 일반적인 설명은 제공하지 않는다. 예를 들면, 골수 세포는 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형 (human T cell leukemia virus type I, HTLV-I)을 사용하여 표적화될 수 있고 신장 세포는 Liang CY et al., 2004 (Arch Virol. 149: 51-60)에 기재된 바와 같이 바큘로바이러스 오토그래프 칼리포니카 다중뉴클레오폴리하이드로 바이러스 (baculovirus Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)에 존재하는 이중성 프로모터를 사용하여 표적화될 수 있다.
- [0596] 재조합 바이러스 벡터는 양태 감염 및 표적화 특이성과 같은 이점을 제공하기 때문에 단량체 및 이중이량체의 생체 내 (in vivo) 발현에 유용하다. 측방(lateral) 감염은 예를 들어 레트로바이러스의 수명 주기에 내재된 것으로, 감염된 단일 세포가 많은 자손 비리온 (progeny virions)을 생성하여 싹을 틔우고 (bud off) 감염시키는 과정이다. 그 결과 처음에는 원래 바이러스 입자에 의해 감염되지 않았던 넓은 지역이 급속히 감염된다. 이는 감염원이 딸 자손 (daughter progeny)을 통해서만 전파되는 수직형 감염과 대조적이다. 측면으로 (laterally) 퍼지지 않는 바이러스 벡터도 생성될 수 있다. 이 특성은 특정 유전자를 국소화된 표적 세포에만 도입하는 것을 목적으로 하는 경우에 유용할 수 있다.
- [0597] 다양한 방법을 사용하여 본 발명의 몇몇 구현예의 발현 벡터를 세포 내로 도입할 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 및 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예를 들면, 안정적인 또는 일시적인 형질주입, 리포펙션, 전기천공, 및 재조합 바이러스 벡터로의 감염을 포함한다. 또한, 양성-음성 선별 방법 (positive-negative selection method)에 대해서는 미국 특허 번호 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조한다.
- [0598] 바이러스 감염에 의한 핵산 도입은 바이러스의 감염 특성으로 인해 더 높은 형질주입 효율을 얻을 수 있기 때문에 리포펙션 및 전기천공과 같은 다른 방법에 비해 몇 가지 장점을 제공한다.
- [0599] 현재 바람직한 생체 내 (in vivo) 핵산 전달 기술은 아데노바이러스 (adenovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 단순 헤르페스 I 바이러스 (Herpes simplex I virus), 또는 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus, AAV) 및 지질 기반 시스템 (lipid-based system)과 같은 바이러스 또는 비-바이러스 구조물을 사용한 형질주입

을 포함한다. 유전자의 지질 매개 전달에 유용한 지질은 예를 들면 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol이다[Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]. 유전자 요법에 사용하기 위한 가장 바람직한 구조물은 바이러스, 가장 바람직하게는 아데노바이러스 (adenovirus), AAV, 렌티바이러스(lentivirus), 또는 레트로바이러스 (retroviruses)이다. 레트로바이러스 구조물과 같은 바이러스 구조물은 적어도 하나의 전사 프로모터/인핸서 또는 위치-정의 요소(들) (locus-defining element(s)), 또는 대체 스플라이싱 (alternate splicing), 핵 RNA 이동 (nuclear RNA export) 또는 메신저의 번역 후 변형과 같은 다른 수단에 의해 유전자 발현을 조절하는 기타 요소들을 포함한다. 이러한 벡터 구조물은 바이러스 구조물에 이미 존재하지 않는 한, 패키징 신호 (packaging signal), 긴 말단 반복부 (long terminal repeats, LTR) 또는 이의 부분, 및 사용되는 바이러스에 적합한 양성 및 음성 가닥 프라이머 결합 부위 (positive and negative strand primer binding sites)를 포함한다. 또한, 이러한 구조물은 통상적으로 구조물이 위치하는 숙주 세포로부터 펩타이드 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이 목적을 위한 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇 구현예의 폴리펩타이드 변이체의 신호 서열이다. 선택적으로, 구조물은 또한 폴리아데닐화를 지시하는 신호, 뿐만 아니라 하나 이상의 제한 부위 및 번역 종결 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 구조물은 통상적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2가닥 DNA 합성의 원점, 및 3' LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다. 양이온성 지질 (cationic lipid), 폴리라이신(polylysine), 및 덴드리머(dendrimer)와 같은 비바이러스성 다른 벡터를 사용할 수 있다.

[0600] 언급한 바와 같이, 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 것 외에, 본 발명의 몇몇 구현예의 발현 구조물은 발현된 단량체 또는 이종이량체의 안정성, 생산, 정제, 수율, 또는 독성을 향상시키기 위해 조작 (engineer)된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 몇몇 구현예의 단량체 또는 이종이량체를 포함하는 융합 단백질 또는 절단 가능한 융합 단백질 및 이종성 단백질의 발현은 조작 (engineer)될 수 있다. 이러한 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피, 예를 들면, 이종성 단백질에 특이적인 컬럼에 대한 고정화에 의해 융합 단백질이 용이하게 분리될 수 있도록 고안될 수 있다. 절단 부위가 본 발명의 몇몇 구현예의 단량체 또는 이종이량체와 이종성 단백질 사이에 조작 (engineer)되는 경우, 절단 부위를 교란시키는 적절한 효소 또는 시약으로 처리함으로써 단량체 또는 이종이량체가 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다 [예를 들면, Booth et al. (1988) Immunol. Lett. 19:65-70; 및 Gardella et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:15854-15859 참조].

[0601] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 세포를 고려한다.

[0602] 따라서, 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 이종이량체 또는 핵산 구조물 또는 시스템을 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0603] 상기 언급된 바와 같이, 다양한 원핵 또는 진핵 세포가 본 발명의 몇몇 구현예의 이종이량체를 발현하기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 이들은, 재조합 박테리아과지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코딩 서열을 함유하는 cosmid DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터에 형질전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus, CaMV); 담배 모자이크 바이러스 (tobacco mosaic virus, TMV))에 감염되거나 코딩 서열을 포함하는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물 발현 시스템은 또한 본 발명의 몇몇 구현예의 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다.

[0604] 박테리아 구조물의 예시는 E. coli 발현 벡터의 pET 시리즈를 포함한다 [Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89].

[0605] 본 발명의 교시와 함께 사용될 수 있는 진핵세포의 예시는 포유동물 세포 (mammalian cell), 진균 세포 (fungal cell), 효모 세포 (yeast cell), 곤충 세포 (insect cell), 조류 세포 (algal cell) 또는 식물 세포 (plant cell)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0606] 효모에서, 미국 특허 번호 제5,932,447호에 기술한 바와 같이, 구성성 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 대안적으로, 효모 염색체 내로의 외래 DNA 서열의 통합을 촉진하는 벡터가 사용될 수 있다.

[0607] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 예를 들면, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터 [Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514], 또는 TMV에 대한 외피 단백질 프로모터 [Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311]가 사용될 수

있다. 대안적으로, RUBISCO의 작은 서브유닛과 같은 식물 프로모터 [Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 및 Brogli et al., (1984) Science 224:838-843] 또는 열 충격 프로모터 (heat shock promoter) (예를 들면, soybean hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B) [Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565]가 사용될 수 있다. Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스성 벡터, 직접 DNA 형질전환, 미세주입, 전기천공 및 당업자에게 공지된 기타 기법을 사용하여 이 구조물들을 식물 세포 내로 도입할 수 있다. 예를 들면, Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463를 참조한다.

- [0608] 당업계에 익히 공지된 곤충 및 포유동물 숙주 세포 시스템과 같은 다른 발현 시스템도 본 발명의 몇몇 구현예에 의해 사용될 수 있다.
- [0609] 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 포유동물 세포이다.
- [0610] 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 인간 세포이다.
- [0611] 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 세포주 (cell line)이다.
- [0612] 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 1차 세포 (primary cell)이다.
- [0613] 상기 세포는 혈액, 근육, 신경, 뇌, 심장, 폐, 간, 췌장, 비장, 흉선, 식도, 위, 장, 신장, 고환, 난소, 모발, 피부, 뼈, 유방, 자궁, 방광, 척수 또는 각종 체액을 포함하나, 이에 제한되지 않는 적합한 조직으로부터 유래될 수 있다. 세포는 배아, 태아, 및 성체 단계뿐만 아니라 발달 기원 (developmental origin), 즉 외배엽, 중배엽 및 내배엽 기원을 비롯한 임의의 발달 단계로부터 유래될 수 있다.
- [0614] 포유동물 세포의 비제한적인 예시는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 계통 (monkey kidney CV1 line)(COS, e.g. COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계통 (human embryonic kidney line) (현탁액 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 or HEK293, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 1977); 아기 햄스터 신장 세포 (baby hamster kidney cell) (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (mouse sertoli cell) (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 1980); 원숭이 신장 세포 (monkey kidney cell) (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (African green monkey kidney cell) (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포 (human cervical carcinoma cell) (HeLa, ATCC CCL 2); NIH3T3, Jurkat, 개 신장 세포 (canine kidney cell) (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로쥐 간 세포 (buffalo rat liver cell) (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (human lung cell) (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (human liver cell) (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (mouse mammary tumor) (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주 (human hepatoma line) (Hep G2), PER.C6, K562, 및 중국 햄스터 난소 세포 (Chinese hamster ovary cells, CHO)를 포함한다.
- [0615] 본 발명의 몇몇 구현예에 따르면, 상기 포유동물 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO), HEK293, PER.C6, HT1080, NS0, Sp2/0, BHK, Namalwa, COS, HeLa 및 Vero 세포로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0616] 본 발명의 몇몇 구현예에 따르면, 상기 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO), PER.C6 또는 293 (예, Expi293F) 세포를 포함한다.
- [0617] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에 기술된 핵산 구조물 또는 시스템을 숙주 세포에 도입하거나 본원에 기술된 핵산 구조물 또는 시스템을 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는 이중이량체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0618] 특정 구현예에 따르면, 상기 생산은 32 - 37℃, 5 - 10% CO₂에서 5 - 13일 동안 배양하는 단계를 포함한다.
- [0619] 본 발명의 특정 구현예와 함께 사용될 수 있는 생산 조건의 비-제한적인 예로는 하기 실시예 부분에 개시되어 있다.
- [0620] 따라서, 예를 들면 이중이량체를 코딩하는 발현 벡터는 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포, CHO-K1 또는 CHO-DG44와 같은 포유동물 세포에서 발현된다. 이후 형질도입된 세포를 Expi293F, ExpiCHO, CHO-K1 또는 CHO-DG44 세포 제조업체 지침 (Thermo)에 따라 세포 특이적 배양 배지에서 32 - 37℃ 5 - 10% CO₂에서 배양한다. 최소 5일 동안 배양한 후 상층액에서 단백질을 수집하고 정제한다.
- [0621] 특정 구현예에 따르면, 배양은 배치 (batch), 분할-배치 (split-batch), 유가 (fed-batch) 또는 관류 방식

(perfusion mode)으로 수행된다.

- [0622] 특정 구현예에 따르면, 상기 배양은 유가 (fed-batch) 조건 하에서 수행된다.
- [0623] 특정 구현예에 따르면, 상기 배양은 36.5℃에서 수행된다.
- [0624] 특정 구현예에 따르면, 상기 배양은 32℃로 온도 변화(temperature shift)를 시키면서 36.5℃에서 수행한다. 이 온도 변화는 정지기에 도달하기 전에 세포 대사를 늦추도록 영향을 미칠 수 있다.
- [0625] 특정 구현예에 따르면, 상기 방법은 발현된 폴리펩타이드에 이량체화 모이어티를 부가하는 단계를 포함한다.
- [0626] 특정 구현예에 따르면, 방법은 이중이량체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0627] 특정 구현예에 따르면, 제조합 이중이량체의 회수는 적절한 배양 시간 후에 수행된다. 특정 구현예에 따르면, 제조합 이중이량체를 회수하는 것은 이중이량체를 포함하는 전체 배양 배지를 수집하는 것을 지칭하며, 분리 또는 정제의 추가 단계를 암시할 필요는 없다. 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 몇몇 구현예의 이중이량체는 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography), 이온 교환 크로마토그래피 (ion exchange chromatography), 여과 (filtration), 전기영동 (electrophoresis), 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 겔 여과 크로마토그래피 (gel filtration chromatography), 역상 크로마토그래피 (reverse phase chromatography), 콘카나발린 A 크로마토그래피 (concanavalin A chromatography), 혼합 모드 크로마토그래피 (mix mode chromatography), 금속 친화성 크로마토그래피 (metal affinity chromatography), 렉틴 친화성 크로마토그래피 크로마토포커싱 (Lectins affinity chromatography chromatofocusing) 및 차등 가용화 (differential solubilization)와 같으나, 이에 제한되지 않는 다양한 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 정제할 수 있다.
- [0628] 특정 구현예에 따르면, 생산 및 정제 후, 이중이량체의 치료학적 효능은 생체 내에서 (in vivo) 또는 생체 외에서 (in vitro) 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 세포 생존율, 형질전환 마우스의 생존율, 및 활성화 마커의 발현을 포함한다.
- [0629] 본 발명의 몇몇 구현예의 조성물(예, 이중이량체, 이를 코딩하는 핵산 구조물 또는 시스템 및/또는 세포)은 유기체 그 자체로 (per se), 또는 적합한 담체 또는 부형제와 혼합되는 약제학적 조성물로 투여될 수 있다.
- [0630] 따라서, 본 발명은 몇몇 구현에서 본 명세서에 개시된 조성물의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0631] 본 명세서에서 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과에 대해 책임이 있는 조성물 (예, 본 명세서에서 개시한 이중이량체, 핵산 구조물 또는 시스템 및/또는 세포)을 지칭한다.
- [0632] 본 명세서에서 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 부형제의 예는 탄산칼슘 (calcium carbonate), 인산칼슘 (calcium phosphate), 다양한 당 및 유형의 전분, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0633] 이하, 어구 "생리학적으로 허용 가능한 담체" 및 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 유기체에 상당한 자극을 일으키지 않고 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보조제는 이들 문구 하에 포함된다.
- [0634] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 생리학적으로 양립 가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예, 주사 또는 주입)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 염"은 모체 화합물 (parent compound)의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 임의의 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예를 들면, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19 참조). 이러한 염의 예는 산 부가염 (acid addition salt) 및 염기 부가염 (base addition salt)을 포함한다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인 등과 같은 무독성 무기산뿐만 아니라 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 하이드록시알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 술폰산 등과 같은 무독성 유기산으로부터 유래된 것을 포함한다. 염기 부가염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과

같은 무독성 유기 아민에서 유래된 것을 포함한다.

- [0635] 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용 가능한 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 항산화제의 예로는 하기를 포함한다: (1) 아스코르브산 (ascorbic acid), 시스테인 하이드로클로라이드 (cysteine hydrochloride), 중황산나트륨 (sodium bisulfate), 메타중아황산나트륨 (sodium metabisulfite), 아황산나트륨 (sodium sulfite) 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸화 하이드록시아니솔 (butylated hydroxyanisole; BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene; BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트 (propyl gallate), 알파-토코페롤 (alpha-tocopherol) 등과 같은 지용성 항산화제; (3) 시트르산 (citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트산 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 소르비톨 (sorbitol), 타르타르산 (tartaric acid), 인산 (phosphoric acid) 등과 같은 금속 킬레이트제. 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 약제학적 조성물은 또한 세제 및 가용화제 (예, TWEEN 20 (polysorbate-20), TWEEN 80 (polysorbate-80)) 및 보존제 (예, Thimersol, 벤질 알코올 (benzyl alcohol)) 및 버킹제 (예, 유당 (lactose), 만니톨)과 같은 첨가물질을 포함할 수 있다.
- [0636] 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예시는 물, 다양한 버퍼 함량(예, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도의 완충 식염수, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은) 및 이의 적합한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다.
- [0637] 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다.
- [0638] 상기 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 상술한 살균 절차와 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함함으로써 미생물의 존재 방지를 보장할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함함으로써 주사 가능한 약제학적 형태의 장기간 흡수를 야기할 수 있다.
- [0639] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 약제학적 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.
- [0640] 치료학적 조성물은 통상적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균되고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅제를 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면 당, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨과 같은 다가알코올을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 조성물에 포함함으로써 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수를 야기할 수 있다. 멸균 주사 용액 (Sterile injectable solutions)은 필요에 따라 위에 열거된 성분들을 단독 또는 조합과 함께 활성 화합물을 필요한 양으로 적절한 용매에 혼합한 후, 멸균 정밀여과 (microfiltration)하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 필요한 위에 열거된 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 (sterile vehicle)에 혼합함으로써 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가로 원하는 성분의 분말을 생성한다.
- [0641] 멸균 주사 용액 (Sterile injectable solutions)은 필요에 따라 위에 열거된 성분들을 단독 또는 조합과 함께 활성 화합물을 필요한 양으로 적절한 용매에 혼합한 후, 멸균 정밀여과 (microfiltration)하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 필요한 위에 열거된 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 (sterile vehicle)에 혼합함으로써 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가로 원하는 성분의 분말을 생성한다.
- [0642] 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여

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

[0643] 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하기 위해 투여 요법이 조정된다. 예를 들면, 단일 볼루스(bolus)가 투여될 수 있고, 시간이 지남에 따라 여러 분할 용량이 투여될 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 따라 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투여 단위 형태(dosage unit form)로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 산출하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 포함한다. 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 투여 단위 형태에 대한 사양(specification)은 (a) 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과, 및 (b) 개체의 민감성(sensitivity) 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 혼합하는 기술에 내재된 한계에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0644] 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술은 “Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0645] 본 발명의 몇몇 구현예의 약제학적 조성물은 예를 들면 통상적인 혼합(mixing), 용해(dissolving), 과립화(granulating), 당제-제조(dragee-making), 부양(levigating), 유화(emulsifying), 캡슐화(encapsulating), 포획(entrapping) 또는 동결건조(lyophilizing) 공정에 의해 당업계에 익히 공지된 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0646] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 치료제에 대한 바람직한 투여 경로는 혈관내 전달(intravascular delivery) (예, 주사 또는 주입), 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 피하(subcutaneous), 척수(spinal), 경구(oral), 장(enteral), 직장(rectal), 폐(pulmonary) (예, 흡입), 비강(nasal), 국소(topical) (경피(transdermal), 협측(buccal) 및 설하(sublingual) 포함), 방광내(intravesical), 유리체내(intravitreal), 복강내(intraperitoneal), 질(vaginal), 뇌 전달(brain delivery) (예, 뇌실내(intra-cerebroventricular), 대뇌(intra-cerebral) 및 대류 강화 확산(convection enhanced diffusion)), CNS 전달(예, 척추강내(intrathecal), 척수주위(perispinal) 및 척추(intra-spinal)) 또는 비경구(parenteral) (피하, 근육내, 복강내, 정맥내(IV) 및 피내 포함), 경피(transdermal) (수동적으로 또는 이온 삼투요법(iontophoresis) 또는 전기천공(electroporation) 사용), 경점막(transmucosal) (예, 설하 투여, 비강, 질, 직장 또는 설하), 투여 또는 임플란트를 통한 투여, 또는 다른 비경구 투여 경로를 통한 투여, 예를 들면 주사 또는 주입, 또는 기타 당업계에 공지된 전달 경로 및/또는 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 어구 “비경구 투여(parenteral administration)”는 일반적으로 주사에 의한 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 동맥내(intraarterial), 척수강내(intrathecal), 피막내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 기관내(transtracheal), 피하(subcutaneous), 표피하(subcuticular), 관절내(intraarticular), 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내(intraspinal), 경막외(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입 또는 생체 침식성 삽입물(bioerodible inserts)을 사용하고, 각각의 투여 경로에 적절한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 단백질, 치료제 또는 약제학적 조성물은 복강내 또는 정맥내로 투여될 수 있다.

[0647] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물은 비경구 주사에 의해 수용액으로 투여된다. 제형은 또한 현탁액 또는 에멀전의 형태일 수 있다. 일반적으로, 비경구 주사를 위한 약제학적 조성물은 효과적인 양의 본 명세서에 개시된 조성물을 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체를 포함한다. 이러한 조성물은 선택적으로 하기 중 하나 이상을 포함한다: 희석제, 멸균수, 다양한 완충제 내용물(예, Tris-HCl, 아세테이트(acetate), 포스페이트(phosphate)), pH, 및 이온 강도의 완충 식염수; 및 세제 및 가용화제(예, TWEEN 20 (폴리소르베이트-20), TWEEN 80 (폴리소르베이트-80)), 항산화제(예, 아스코르브산(ascorbic acid), 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite), 염산시스테인(cysteine hydrochloride), 중황산나트륨(sodium bisulfate), 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite), 아황산나트

륨 (sodium sulfite)과 같은 수용성 항산화제; 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸화 하이드록시시아니솔 (butylated hydroxyanisole; BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene, BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트 (propyl gallate), 알파-토코페롤(alpha-tocopherol)과 같은 지용성 항산화제; 및 시트르산 (citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 소르비톨 (sorbitol), 타르타르산 (tartaric acid), 인산(phosphoric acid)과 같은 금속 킬레이트제; 및 보존제 (예, Thimersol, 벤질 알코올 (benzyl alcohol)) 및 버킹제 (예, 유당 (lactose), 만니톨). 비수성 용매 또는 비히클의 예시는 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 및 옥수수 오일과 같은 식물성 오일, 젤라틴 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르가 있다. 제형은 동결 건조 또는 진공 건조되어 사용 직전에 재용해/재현탁될 수 있다. 제형은 예를 들면 박테리아 보유 필터를 통한 여과, 살균제를 조성물에 혼입, 조성물 조사, 또는 조성물에 가열함으로써 살균될 수 있다.

[0648] 본 명세서에 개시된 다양한 조성물 (예, 폴리캡타이드)은 국소적으로 적용될 수 있다. 국소 투여는 대부분의 펩타이드 제형에 대해 잘 작동하지 않지만 특히 폐, 비강, 구강 (설하, 협측), 질 또는 직장 점막에 적용하는 경우 효과적일 수 있다.

[0649] 본 발명의 조성물은 약 5 마이크론 (micron) 미만의 공기역학적 직경을 갖는 분무 건조 입자 또는 에어로졸로서 전달될 때 흡입하면서 폐로 전달되고 폐 상피 내층을 가로질러 혈류로 전달될 수 있다. 치료 제품의 폐 전달을 위해 설계된 광범위한 기계 장치가 사용될 수 있으며, 이들 모두는 당업자에게 친숙한 분무기, 정량 흡입기 및 분말 흡입기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상업적으로 사용 가능한 장치의 일부 구체적인 예는 Ultravent 분무기(Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II 분무기(Marquest Medical Products, Englewood, CO.); Ventolin 정량 흡입기(Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); 및 Spinhaler 분말 흡입기(Fisons Corp., Bedford, MA)이다. Nektar, Alkermes 및 Mannkind는 모두 본 명세서에 기술된 제형에 기술을 적용할 수 있는 임상 시험에서 승인된 흡입성 인슐린 분말 제제를 가지고 있다.

[0650] 점막에 투여하기 위한 제형은 일반적으로 정제, 젤, 캡슐, 현탁액 또는 에멀전에 혼입될 수 있는 분무 건조된 약물 입자일 것이다. 표준 제약 부형제는 임의의 제형기 (formulator)에서 구할 수 있다. 경구 제형은 씹는껌 (chewing gum), 젤 스트립 (gel strip), 정제 (tablet) 또는 로젠지 (lozenge)의 형태일 수 있다.

[0651] 경피 제형 또한 제조될 수 있다. 이는 통상적으로 연고, 로션, 스프레이 또는 패치일 것이며, 일반적으로 표준 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 경피 제형은 침투 증강제를 포함하는 것을 필요로 할 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 바뀔 수 있다. 선택된 투여량 수준은 본 발명의 사용된 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 투여 기간, 기타 약물 및/또는 사용된 특정 조성물과 병용된 물질, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강, 및 치료되는 환자의 이전 병력, 및 의학 분야에서 익히 공지된 유사 인자를 포함하는 다양한 약독학적 인자에 따라 달라질 것이다.

[0652] 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물은 치료학적 유효량으로 대상체에게 투여된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효량 (effective amount)" 또는 "치료학적 유효량 (therapeutically effective amount)"은 치료되는 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 억제 또는 완화하거나 달리 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 용량을 의미한다. 치료학적 유효량의 결정은 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0653] 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 제제에 대해, 치료학적 유효량 또는 용량은 생체 외 및 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정할 수 있다. 예를 들면, 원하는 농도 또는 역가를 달성하기 위해 용량을 동물 모델에서 공식화할 수 있다. 이러한 정보는 사람에게 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용할 수 있다. 본 명세서에 기재된 활성 성분의 독성 및 치료 효능은 생체 외, 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 이 생체 외 및 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 수득한 데이터는 인간에 사용하기 위한 용량 범위를 공식화하는데 사용할 수 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 용량은 환자의 상태를 고려하여 개별 의사가 선택할 수 있다(예를 들면, Fingl, et al., 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조).

[0654] 활성 성분의 수준이 생물학적 효과(최소 유효 농도, minimal effective concentration, MEC)를 유도하거나 억제하기에 충분하도록 투여량 및 간격을 개별적으로 조정할 수 있다. MEC는 각 제제에 따라 다르지만 생체 외 데이터로부터 추정할 수 있다. MEC를 달성하는데 필요한 용량은 개인의 특성과 투여 경로에 따라 달라진다. 혈장

농도를 결정하기 위해 검출 분석이 사용될 수 있다.

- [0655] 치료 대상 질환의 중증도 및 반응성에 따라 1회 또는 복수의 투여가 가능하며, 치료 과정은 며칠에서 몇 주 또는 완치 또는 질병 상태의 감소가 달성될 때까지 지속될 수 있다.
- [0656] 투여될 조성물의 양은, 물론 치료되는 대상체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다.
- [0657] 특정 구현예에서, 조성물(예, 이종이량체, 핵산 구조물 또는 시스템 또는 세포)은 예를 들면 치료될 부위에 직접 주사함으로써 국소적으로 투여된다. 일반적으로, 주사는 전신 투여에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 큰 증가된 국소 농도 (localized concentration)을 야기한다. 이종이량체 조성물은 치료될 부위 밖으로 폴리펩타이드의 수동 확산을 감소시킴으로써 폴리펩타이드 조성물의 증가된 국소 농도를 형성하는 것을 돕기 위해 상술한 바와 같이 매트릭스와 조합될 수 있다.
- [0658] 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 의료 기기로 투여될 수 있다. 예를 들면, 선택적인 구현예에서, 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 약제학적 조성물은 미국 특허 번호 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 개시된 장치와 같은 바늘 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 익히 공지된 임플란트 및 모듈의 예는 하기를 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식 가능한 미세 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료 장치를 개시하는 미국 특허 제4,486,194호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제4,447,224호; 다중 챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,475,196호. 이 특허들은 본 명세서에 참조로 포함된다. 많은 다른 이러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 당업자에게 알려져 있다.
- [0659] 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형 (controlled release formulation)과 같이 빠른 방출에 대항하여 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트 (ethylene vinyl acetate), 폴리무수물 (polyanhydrides), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid), 콜라겐 (collagen), 폴리오르토에스테르 (polyorthoester), 및 폴리락트산 (polylactic acid)과 같은 생분해성, 생체적합성 폴리머가 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다(예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조).
- [0660] 중합체 장치 (막대, 실린더, 필름, 디스크) 또는 주입 (미세 입자)의 이식 후 전신적으로 장기간 방출을 위해 제어 방출 중합체 장치를 제조할 수 있다. 매트릭스는 마이크로스피어와 같은 마이크로입자의 형태일 수 있으며, 여기서 펩타이드는 고체 중합체 매트릭스 또는 마이크로캡슐 내에 분산되고, 여기서 코어는 중합체 셀과 다른 재료이고, 펩타이드는 코어에 분산되거나 현탁되며, 사실상 액체 또는 고체일 수 있다. 본 명세서에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 마이크로입자, 마이크로스피어 및 마이크로캡슐은 상호교환적으로 사용된다. 대안적으로, 중합체는 나노미터에서 4 센티미터 범위의 얇은 슬래브 또는 필름, 그라딩 또는 기타 표준 기술에 의해 생성된 분말, 또는 하이드로겔과 같은 겔로 구조될 수 있다.
- [0661] 본원에 개시된 활성제의 전달을 위해 비록 생분해성 매트릭스가 바람직하지만, 비생분해성 또는 생분해성 매트릭스가 사용될 수 있다. 합성 중합체가 분해 및 방출 프로파일의 더 나은 특성으로 인해 선호되지만, 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 원하는 방출 기간에 따라 선택된다. 어떤 경우에는 선형 방출 (linear release)이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 펄스 방출 (pulse release) 또는 "대량 방출 (bulk release)"이 더 효과적인 결과를 제공할 수 있다. 중합체는 하이드로겔 (통상적으로 최대 약 90 중량%의 물을 흡수함) 형태일 수 있고, 선택적으로 다가 이온 또는 중합체와 가교결합될 수 있다.
- [0662] 매트릭스는 용매 증발, 분무 건조, 용매 추출 및 당업자에게 공지된 기타 방법에 의해 형성될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어는 예를 들면 Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987); Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6:275-283(1987); 및 Mathiowitz, et al., J. Appl Polymer Sci, 35:755-774(1988)에 기술된 바와 같이, 약물 전달을 위한 마이크로스피어 제조를 위해 개발된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0663] 상기 장치는 이식 또는 주사 부위를 (이는 일반적으로 전신 치료용 투여량보다 훨씬 적은 투여량일 수 있음) 치료하기 위해 국소 방출용으로 제형화되거나 전신 전달용으로 제형화될 수 있다. 이는 피하, 근육 내, 지방 내로

이식 또는 주사되거나, 연하 (삼킴, swallowing)될 수 있다.

- [0664] 특정 구현예에서, 본 발명의 적어도 몇몇 구현예에 따른 치료학적 화합물이 BBB를 통과하는 것을 보장하기 위해 (원하는 경우), 이들은 예를 들면 리포솜으로 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들면, 미국 특허 번호 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어 표적 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들면, VV Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 참조). 예시적인 표적화 모이어티는 엽산 (folate) 또는 비오틴 (biotin) (예를 들면, Low 등의 미국 특허 번호 제5,416,016호 참조); 만노사이드 (mannoside) (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 (antibody) (PG Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체 (surfactant protein A receptor) (Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134); p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)를 포함하며, K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273도 참조한다.
- [0665] 본 발명의 몇몇 구현예의 조성물은, 원하는 경우 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은 예를 들면 블리스터 팩 (blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 지침이 포함될 수 있다. 팩 또는 디스펜서는 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에서 규정한 형식으로, 컨테이너와 관련된 통지에 의해 수송될 수도 있으며, 여기서 통지는 인간 또는 동물 투여의 조성물 형태에 대한 기관의 승인을 반영한다. 예를 들면, 이러한 통지는 미국 식품의약국 (FDA)이 처방약에 대해 승인한 라벨링(label) 또는 승인된 제품 삽입서일 수 있다. 적합한 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 제법을 포함하는 조성물은 상술한 바와 같이 또한 제조되고, 적절한 컨테이너에 배치되고, 지시된 상태의 치료를 위해 라벨링될 수 있다.
- [0666] 본 명세서에서 사용되는 용어 “약”은 $\pm 10\%$ 를 가리킨다.
- [0667] 용어 "포함한다", "포함하는", "포함된다", "포함되는", "갖는" 및 이들의 활용형은 "포함하지만 이들에 제한되는 것은 아님"을 의미한다.
- [0668] 용어 "구성된"은 "포함하고 제한되는"을 의미한다.
- [0669] 용어 "필수적으로 구성된"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있지만, 추가 성분, 단계 및/또는 부분이 청구된 조성물, 방법, 또는 구조의 기초적이고 신규한 특성을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만 포함하는 것을 의미한다.
- [0670] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태 "한", "하나" 및 "상기"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 예를 들면, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 화합물을 포함할 수 있다.
- [0671] 본 출원 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 구현예들은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지의 편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없이 제한적으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위와 해당 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 1에서 6과 같은 범위의 설명은 1에서 3, 1에서 4, 1에서 5, 2에서 4, 2에서 6, 3에서 6 등과 같은 하위 범위, 뿐만 아니라 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 개별 숫자를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0672] 수치 범위가 본 명세서에서 표시될 때마다, 표시된 범위 내에서 인용된 숫자 (분수 또는 정수)를 포함하는 것을 의미한다. 제1 표시 번호와 제2 표시 번호 "사이 범위의/~사이의 범위"라는 어구 및 제1 표시 번호에서 제2 표시 번호 “까지”의 "범위의/범위"라는 어구는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되며 제1 및 제2 표시 번호 및 그 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하는 것을 의미한다.
- [0673] 본 명세서에서 사용되는 용어 “방법”은 주어진 과제를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차로서 알려진 방식, 수단, 기술, 및 절차 또는 화학, 약리학, 생물학, 생화학, 및 의학 분야의 기술자에 의해 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 용이하게 개발되는 방식, 수단, 기술, 및 절차를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0674] 특정 서열 목록에 대한 참조가 이루어질 때, 이러한 참조는 서열 오류, 복제 오류, 또는 염기 치환, 염기 결실 또는 염기 추가로 발생하는 기타 변경으로 인한 사소한 서열 변이를 포함하는 상보적 서열에 실질적으로 상응하는 서열도 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 이러한 변화의 빈도가 50개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으

로 100개 뉴클레오티드 중 1개 미만, 대안적으로 200개 뉴클레오티드 중 1개 미만, 대안적으로 500개 뉴클레오티드 중 1개 미만, 대안적으로 1000개 뉴클레오티드 중 1개 미만, 대안적으로 5,000개 뉴클레오티드 중 1개 미만, 10,000개 뉴클레오티드 중 1개 미만인 것을 조건으로 한다.

[0675] 명료함을 위해 별도의 실시예의 맥락에서 설명된 본 발명의 특정 특징은 또한 단일 실시예에서 조합되어 제공될 수 있음이 이해된다. 역으로, 간결함을 위해 단일 실시예의 맥락에서 설명되는 본 발명의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위 조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 설명된 실시예에 적합하게 제공될 수 있다. 실시예가 그러한 요소 없이 작동하지 않는 한, 다양한 실시예의 맥락에서 설명된 특정 특징은 해당 실시예의 필수 특징으로 간주되지 않는다.

[0676] 본 명세서에서 설명되고 아래 청구범위 섹션에 청구된 바와 같이 본 발명의 다양한 구현예 및 양태는 다음 실시예에서 실험적 지원을 찾을 수 있다.

[0677] 실시예

[0678] 상술한 바와 함께, 비제한적인 방식으로 본 발명의 몇몇 구현예를 예시하는 하기 실시예를 참조한다.

[0679] 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 명명법과 본 발명에서 사용되는 실험실 절차에는 분자, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술이 포함된다. 이러한 기술은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들면, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 상술한 방법론; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 사용 가능한 번역분석은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기재되어 있다 (예를 들면, 미국 특허 번호 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호 및 제5,281,521호를 참조); "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 상술한 문헌들은 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 다른 일반적인 참고문헌들은 본 명세서 전반에 제공된다. 그 안에 있는 절차는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 독자의 편의를 위해 제공된다. 본 명세서에 포함된 모든 정보는 참조로 포함된다.

[0680] 재료 및 방법

[0681] **시약** - ExcelBand™ 3-칼라 고범위 단백질 마커 또는 ExcelBand™ 3-칼라 엑스트라 범위 단백질 마커(각각 SMOBIO, Cat# PM2600 또는 PM2800), 샘플 버퍼(GenScript Cat# M00676), 폴리아크릴아미드 겔 8% 또는 4-20% GenScript Cat# M00662 또는 M00656), ECL 플러스 웨스턴 블롯팅 기질(Pierce, Cat# 32132), TMB-ELISA 기질 용액(Sigma, Cat# T0440), TMB 스타프 용액(Southern Biotech, Cat# 0412-01), 스트렙타비딘-HRP(피어스 Cat# TS21126), FuGENE® HD 형질감염 시약(Promega, Cat# TM328), Vybrant DiD 세포 라벨링 솔루션(Thermo Fisher, Cat# V22887), 림포프랩, ™ 밀도 구배 배지(StemCells Technologies, Cat# 07801).

[0682] **항체** - LEAFTM 정제된 마우스 항 인간 PD-L1(CD274) B7H1 클론 29E.2A3, BioLegend, Cat# 329711, 항-인간 PD1(GenScript, Cat# A01829-40), APC-표지된 항 PD1(Biolegend, Cat# 329908), APC 마우스 IgG2b, κ

IC(Biolegend, Cat# 400322), 바이오틴화 토끼 항인간 SIRP α (LSBio Cat# LS-C370337), 토끼 항-인간 SIRP α 항체(항-약물 항체 DSP107) Batch#104, 인간 LILRB2(R&D 시스템 Cat# MAB2078), APC 항-인간 CD155 항체(Biolegend, Cat# 337618), APC 마우스 IgG1k(Biolegend, Cat# 400120), APC 항-인간 CD47 항체(Biolegend, Cat# 323124), APC 항-인간 CD274(Biolegend, Cat# 329708), APC 항-인간 CD172a/b SIRP α 클론 SE5A5 항체, 마우스 IgG1, κ , (Biolegend, Cat# 323809), PE 마우스 항-인간 IgG1-Fc, (SouthernBiotech), Cat# 9054-09), PE 마우스 항-인간 IgG4(SouthernBiotech, Cat# 9190-09), AF647 항인간 IgG4-Fc, (SouthernBiotech Cat# 9200-31), APC 항인간 CD85d(ILT4) 항체 클론 41D1(Biolegend, Cat# 338708), 염소 항토끼 IgG(H+L)-HRP 컨쥬게이트(R&D systems, Cat# 170-6515), 염소 항-마우스 IgG HRP 컨쥬게이트(Bio-rad Cat# 170-6516), APC 항-인간 HLA-G(특허 US 2020/0102390 A1), APC 인간 IgG4(Biolegend, Cat# 403706), CD47 차단제 Ab(특허 WO 2011/143624 A2), HLA-G 차단제 Ab(특허 US 2011/143624 A2) 2020/0102390 A1), 마우스 항-인간 IgG1 HRP 컨쥬게이트(Southern Biotech, Cat# 9054-05), 마우스 항-인간 IgG4 HRP 컨쥬게이트(Southern Biotech, Cat#9200-05), PE 마우스 항-인간 IgG1 FC(Southern Biotech, Cat# 9054-09), PE 마우스 항-인간 IgG4-Fc(SouthernBiotech, Cat#9190-09), 항-인간 PVR(NOVUS, Cat# NB6001241), APC 마우스 항-인간 IgG1 힌지(Southern Biotech), Cat# 9054-09), APC 항 인간 TIGIT, mIgG2a 클론 A15153G(Biolegend, Cat# 372706), APC mIgG2a MOPC-173(Biolegend, Cat#400220), PE 항 인간 PD-L1, 29E2A3, mIgG2b(Biolegend, Cat# 329706), APC 항 인간 CD16, mIgG1 클론 ICRF44(Biolegend, Cat# 301310).

[0683] **제조합 단백질** - 인간 제조합 HLA-G 단백질(His 태그), (Abcam Cat# ab225660), 인간 PDL-1 FC 태그(Acro Cat# PD1-H5258), 인간 PDL-1-Fc(GenScript U3420DK140-1), 인간 CD47 단백질 HIS 태그(Acro, Cat# CD7-H5227), 인간 CD155(PVR) 단백질 Fc 태그(Acro Cat# CD5-H5251 및 CD5-H5254).

[0684] **세포주** - Expi 293F(Gibco, Cat# A14257), DLD1-WT 세포주(ATCC, CCL-221), DLD1-PDL1 세포주(Hendriks et al 2016), HT1080 WT(ATCC CCL-121), CHO-K1, CHO-K1-CD47, CHO-K1-CD47(Cell Bank Australia, CBA-0146), HT1080-HLA-G(세포는 HLA-G 발현 플라스미드로 바이러스 감염에 의해 생성됨), JEG-3 세포(ATCC, HTB -36), K562(ATCC, CCL-243), K562 PVR, K562 PD-L1, K562 PVR/PD-L1(K562 세포를 PDL1 및/또는 PVR 발현 플라스미드로 형질감염시키고 안정한 발현 세포에 대한 선택에 의해 생성됨), AB12(ECACC, 10092306), Renca(ATCC, CRL-2947), Jurkat NFAT-CD16(Promega, jkt1-nfat-cd16), SK-OV-3(ATCC, HTB-77).

[0685] **배지 및 조직 배양 시약** - Expi 269 배지(Gibco, Cat# A-14351-01), RPMI 1640(Biological Industries, Cat# 01-100-1A), FCS(Gibco, Cat# 12657-029), BSA, Sigma, A7030, EDTA, Sigma, E7889, 세포 해리 버퍼, Gibco, 13151-014, EMEM(Biological Industries, Cat# 01-040-1A), DMEM(Biological Industries, Cat# 01-055-1A), TrypLE 엑스프레스(Gibco, Cat# 12604-13), 글루타맥스(Gibco, Cat# 35050-038), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco, Cat# 151140-122), 피루브산나트륨(Biological Industries, Cat# 03-042-1B), IMDM(Biological Industries, Cat# 01-058-1A).

[0686] **장비** - FACS 장치, 스트라타다임, 세포 분석 S1000EXI, ELISA 리더기, 씨모사이언스 멀티스캔 FC, ELISA 소프트웨어, 마이크로플레이트 리더기 RE용 SkanIt 소프트웨어 4.1, ver. 4.1.0.43.

[0687] **이종이량체-단백질의 구조 분석** - 상동체 X-선 구조를 기반으로 각 부분에 대한 상동성 모델링을 수행하였다. PD1 - PDB ID의 경우: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5JXE 및 4ZQK가 템플릿으로 사용되었다. hIgG4 - PDB ID의 경우: 4C54, 4C55, 5W5M 및 5W5N이 템플릿으로 사용되었다. SIRP α - PDB ID의 경우: 2UV3, 2WNG, 4CMM, 6BIT, 2JJS 및 2JJT를 템플릿으로 사용되었다. LILRB2 - PDB ID의 경우: 2GW5, 4LLA, 2DYP 및 6BCP가 템플릿으로 사용되었다. SIGLEC10 - PDB ID의 경우: SIGLEC8 동족체의 2N7A 및 2N7B가 템플릿으로 사용되었다. TIGIT - PDB ID의 경우: 3QOH, 3RQ3, 3UCR, 3UDW 및 5V52가 템플릿으로 사용되었다.

[0688] 링커 분절은 주로 구조 위반을 방지하고 가능한 '스페이스' 길이에 대한 그럴듯한 추정을 가능하게 하기 위해 CHARMM에서 루프 모델링을 사용하여 모델링되었다.

[0689] **이종이량체의 제조** - 비교 기능 분석 및 생산 평가를 위해, "노브" 인투 "홀" 방법(예를 들어 미국 특허 번호 US8216805에 설명됨)을 사용하여 여러 이종이량체(본원에서 "DSP"라고 함)를 설계 및/또는 생산하였다. 하기 표 1 참조. 생산은 원하는 Fc 융합 단백질에 대한 코딩 서열로 클로닝된 pcDNA3.4 발현 벡터에 의해 형질감염된 Expi293F 세포에서 수행되었다(이하 표 1 참조).

[0690] 서열은 EcoRI 및 HindIII 또는 XbaI 및 EcoRV와 같은 제한 효소를 사용하여 벡터에 복제되었으며, Kozak 서열 및 STOP 코돈과 인공 신호 펩타이드(MESPAQLFLLLWLPDGVHA, SEQ ID NO: 116)가 추가되었다. 세포 배양 상등액

에서 단백질을 수집하고 경우에 따라 단백질 A(PA) Poros MabCapture A 수지 또는 음이온 교환 하이트랩 Q FF 수지를 사용하여 1단계 정제를 통해 단백질을 정제하였다.

표 1: 설계된 이중이량체에 대한 설명

이중이량체	제 1 단량체		제 2 단량체	
	설명	서열 aa / na	설명	서열 aa / na
DSP120	SIRPa-IgG1 knob Fc	1 (85+51) / 2	PD1-IgG1 hole Fc	3 (49+52) / 4
DSP120V1	SIRPa-IgG4 knob Fc	5 (85+135) / 6	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8
DSP205	TIGIT- IgG1 knob Fc	9 (109+51) / 10	LILRB2- IgG1 hole Fc	11 (96+52) / 12
DSP205V1	TIGIT- IgG4 knob Fc	13 (109+135) / 14	LILRB2-IgG4 hole Fc	15 (96+136) / 16
DSP216	SIRPa-IgG1 knob Fc	1 (85+51) / 2	LILRB2-IgG1 hole Fc	11 (96+52) / 12
DSP216V1	SIRPa-IgG4 knob Fc	5 (85+135) / 6	LILRB2-IgG4 hole Fc	15 (96+136) / 16
DSP216V2	SIRPa-IgG1 knob Fc	17 (85+27) / 18	LILRB2-IgG1 hole Fc	19 (96+28) / 20
DSP220	LILRB2-IgG1 knob Fc	21 (96+51)	PD1-IgG1 hole Fc	3 (49+52) / 4
DSP220V1	LILRB2-IgG4 knob Fc	22 (96+135) / 23	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8
DSP402	SIGLEC10-IgG1 knob Fc	24 (103 +51)	PD1-IgG1 hole Fc	3 (49+52) / 4
DSP402V1	SIGLEC10-IgG4 knob Fc	25 (103+135) / 26	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8
DSP403	SIRPa-IgG1 knob Fc	1 (85+51) / 2	SIGLEC10-IgG1 hole Fc	29 (103 +52)
DSP403V1	SIRPa-IgG4 knob Fc	5 (85+135) / 6	SIGLEC10-IgG4 hole Fc	30 (103 +136)
DSP404	TIGIT-IgG1 knob Fc	9 (109+51) / 10	SIGLEC10-IgG1 hole Fc	29 (103 +52)
DSP404V1	TIGIT- IgG4 knob Fc	13 (109+135) / 14	SIGLEC10-IgG4 hole Fc	30 (103 +136)
DSP412	SIGLEC10-IgG1 knob Fc	24 (103 +51)	LILRB2-IgG1 hole Fc	11 (96+52) / 12
DSP412V1	SIGLEC10-IgG4 knob Fc	25 (103 +135) / 26	LILRB2-IgG4 hole Fc	15 (96+136) / 16
DSP502	TIGIT-IgG1 knob Fc	9 (109+51) / 10	PD1-IgG1 hole Fc	3 (49+52) / 4
DSP502V1	TIGIT-IgG4 knob Fc	13 (109+135) / 14	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8
DSP502V2	TIGIT-IgG4 knob Fc	31 (111+135) / 32	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8

DSP502V3	TIGIT-IgG4 knob Fc	33 (113+135) / 34	PD1-IgG4 hole Fc	7 (49 + 136) / 8
DSP503	SIRPa-IgG1 knob Fc	1 (85+51) / 2	TIGIT-IgG1 hole Fc	35 (109+52)
DSP503V1	SIRPa-IgG4 knob Fc	5 (85+135) / 6	TIGIT-IgG4 hole Fc	36 (109+136)
DSP216V3	SIRPa-short-IgG1 knob Fc	138 (93+51) / 139	LILRB2-IgG1 hole Fc	11 (96+52) / 12
DSP216V4	SIRPa-short-IgG4 knob Fc	140 (93+135) / 141	LILRB2-IgG4 hole Fc	15 (96+136) / 16
DSP216V5	SIRPa-IgG1 knob Fc-LALA	142 (85+154) / 143	LILRB2-IgG1 hole Fc-LALA	150 (96+152) / 151
DSP216V6	SIRPa-short-IgG1 knob Fc-LALA	144(93+154) / 145	LILRB2-IgG1 hole Fc-LALA	150 (96+152) / 151
DSP502V4	TIGIT-IgG1 knob Fc-LALA	146 (109+154) / 147	PD1-IgG1 hole Fc-LALA	148 (49+152) / 149

[0693]

[0694]

SDS-PAGE 분석 - 각 이종이량체 샘플에서 35 μ l의 세포 배양 상층액 또는 3 μ g 정제된 단백질을 β -메르캅토에탄올 유무에 관계없이 로딩 버퍼와 혼합하고(각각 환원 및 비환원 조건) 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 8% 또는 4-20% 구배 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 SDS-PAGE에서 분리하였다. 겔에서 단백질 이동은 제조업체 지침에 따라 e-Stain 기계(GenScript)로 시각화하였다.

[0695]

웨스턴 블롯 분석 - 생성된 이종이량체(레인당 50-500ng)를 포함하는 샘플을 환원 또는 비환원 조건(각각 β -메르캅토에탄올 유무에 관계없이 로딩 버퍼에서)에서 처리하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 8% 또는 4-20% 구배 SDS-PAGE에서 분리하였다. 그런 다음 단백질을 PVDF 멤브레인으로 옮기고 1차 항체로 1시간 또는 하룻밤 동안 배양한 다음 HRP 결합 2차 항체로 1시간 배양하였다. ECL 개발 후 신호를 검출하였다.

[0696]

샌드위치 ELISA에 의한 이종이량체와 대응 리간드/수용체의 결합 - 평평한 바닥 96웰 플레이트에 분석된 이종이량체의 한쪽 암(arm)의 수용체/리간드를 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하여 CD47 단백질, PDL1 단백질, HLA-G 단백질 또는 PVR 단백질과 같은 재조합 대응 단백질을 미리 코팅한 후 차단 및 세척하였다. 연속적으로 희석된 세포 배양 상층액 또는 생성된 이종이량체를 포함하는 정제된 단백질 샘플을 미리 코팅된 해당 웰에 추가하였다. 추가 세척 단계에 이어, 이종이량체의 두 번째 암(arm) 또는 IgG 백본에 대한 비표지 Ab 또는 HRP 표지 Ab를 바이오티닐화하여 포획된 단백질에 결합하도록 허용하였다. 그 후, 검출된 Ab에 HRP가 표지되지 않은 경우 HRP 접합 이차 Ab 또는 스트렙타비딘-HRP를 추가하였다. 검출은 450nm에서 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기판으로 수행되었으며, 620nm에서 기준이 되었다. O.D. 값은 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 바인딩 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

[0697]

세포 표면에 발현된 대응 리간드/수용체에 대한 이종이량체의 결합 - 분석된 이종이량체 대응체 중 하나를 발현하는 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 생산된 이종이량체의 연속 희석액으로 배양한 후, 이종이량체의 두 번째 성분(즉, 세포가 발현하는 상대와 결합하지 않는 성분) 또는 IgG 백본에 특이적으로 형광 표지된 항체로 면역 염색하고 유세포 분석법을 통해 분석하였다. 선택적으로, 세포가 두 가지 대응 항체를 모두 발현하는 경우, 이종이량체와 함께 배양하기 전에 그 중 하나에 대한 차단 항체로 사전 배양하였다. O.D. 값은 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

[0698]

SIRPa와 LILRB2 도메인을 포함하는 이종이량체가 대식세포와 PMN 세포에 미치는 영향 - 인간 CD47을 발현하는 과립구 HT1080 또는 인간 CD47과 인간 HLA-G를 발현하는 HT1080-HLA-G 세포의 암세포 포식력을 테스트하기 위해 DiD로 표지하고 0, 1, 2 또는 5 μ g/mL DSP216으로 RT에서 15분 동안 사전 배양하였다. 그 후, 세포를 과립구와 이펙터 대 표적(E : T) 비율 1 : 1로 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 공동 배양하고 유세포 분석기로 분석하였다. MFI 값을 사용하여 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 결합 곡선 그래프를 생성하였다.

[0699]

세포 독성 분석 - 공동 배양 분석에서 NK 세포(이펙터 세포)에 의한 표적 세포의 사멸을 테스트하였다. 하룻밤 배양 후 유세포 분석(FACS)을 통해 죽은 표적 세포의 비율을 분석하였다. 사전 표지된 표적 세포[K562 WT, K562 과발현 PVR(이하 K562 PVR), K562 과발현 PDL1(이하 K562 PDL1) 또는 K562 과발현 PVR/PDL1(이하 K562 PVR/PDL1) 세포]를 96웰 플레이트에 넣고 다양한 농도의 TIGIT-PD1 이종이량체가 있는 상태에서 1차 NK 세포와 다양한 이펙터-표적(E : T) 비율로 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C에서 ON 배양 후 유세포 분석법으로 분석하였다. 표적 세포에 발현된 PVR/PD-L1 리간드 존재 시 사멸 효과의 억제에 대한 참조로 K562 WT 표적 세포를 사용하였다.

TIGIT-PD1 이중이량체 처리에 대한 기준은 처리되지 않은 표적 세포였다.

- [0700] **그랜자임 B의 분비** - 그랜자임 B는 NK 세포와 세포 독성 T 세포의 과립에서 가장 흔히 발견되는 세린 프로테아제이다. 이 효소는 기공을 형성하는 단백질 퍼포린과 함께 이들 세포에서 분비되어 표적 세포의 세포 사멸을 매개한다. 사전 표지된 표적 세포(K562 WT, K562 PVR, K562 PDL1 및 K562 PVR/PDL1 과발현 세포)를 96웰 플레이트에 넣고 다양한 농도의 TIGIT-PD1 이중이량체가 있는 상태에서 다양한 이펙터-표적(E : T) 비율로 1차 NK 세포와 배양하였다. 37℃에서 배양한 후 상층액을 수집하여 ELISA를 사용하여 그랜자임 B 수치를 분석하였다.
- [0701] **리포터 유전자 시스템에 의한 루시페라제 활성 분석법을 사용한 FcγRIIIa 결합** - IgG1-Fc에 의한 FcγRIIIa 활성화는 Jurkat NFAT CD16 과발현 세포(Promega)의 리포터 시스템을 사용하여 검출되었다. 이 시스템에서 FcγRIIIa에 결합하면 세포 내 칼슘 수치가 증가하고 칼슘에 민감한 포스포타제인 칼시뉴린이 활성화되어 NFAT 단백질이 빠르게 탈인산화되는 등 일련의 신호 전달이 유도된다. 탈인산화된 NFAT는 핵으로 이동하여 루시페라제 발현 및 분비를 유도한다. 루시페라제 분비 수준은 루시페라제와 첨가된 기질(QUANTI-Luc)의 상호작용에 의해 생성되는 발광 신호로 측정하였다. K562 PVR/PDL-1 세포(타겟 세포)와 Jurkat NFAT-CD16 과발현 세포(이펙터 세포)의 공동 배양 분석에서 TIGIT-PD1 이중이량체의 IgG1-Fc 암(arm)과 Jurkat CD16 과발현 세포의 FcγRIIIa(CD16) 결합을 테스트하였다. 이를 위해 K562 PVR/PD-L1을 96웰 플레이트에서 배양하고 다양한 농도의 TIGIT-PD1 이중이량체가 있는 상태에서 배양하였다. 37℃에서 1시간 배양한 후, 표적 세포에 Jurkat NFAT CD16 과발현 세포를 추가하여 E : T 비율 2 : 1로 첨가하였다. 37℃에서 6시간 배양 후 루미노미터로 루시페라제 활성을 분석하였다. K562 WT 표적 세포는 표적 세포에 발현된 PVR/PD-L1 리간드가 있는 상태에서 루시페라제 활성의 기준으로 사용되었다. TIGIT-PD1 이중이량체 처리에 대한 대조군은 처리되지 않은 표적 세포였다.
- [0702] **ELISA로 측정된 TIGIT-PD1 이중이량체와 이의 대응 이중이량체의 동시 결합** - 평평한 바닥 96웰 플레이트에 hrPDL1-Fc 단백질을 사전 코팅한 후 차단 및 세척하였다. 연속적으로 희석된 정제된 TIGIT-PD1 이중이량체 샘플을 사전 코팅된 해당 웰에 추가하였다. 배양 및 추가 세척 단계를 거친 후, 검출 단백질인 마우스 IgG2a Fc에 결합된 인간 CD155(PVR)를 추가하고 포획된 단백질에 결합하도록 허용하였다. 추가 세척 후, 과산화효소 결합 AffiniPure 염소 항-마우스 IgG를 추가하고 배양 및 세척 후 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기판으로 620nm에서 기준과 함께 450nm에서 검출을 수행하였다.
- [0703] **NK 세포와 종양 세포에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체의 동시 결합** - NK 세포와 종양 세포에 대한 TIGIT 및 PD1의 동시 결합은 TIGIT-PD1 이중이량체가 있는 상태에서 NK 원시 세포와 K562 PVR/PD-L1 세포의 공동 배양 세포 시스템에서 테스트되었다. 서로 다른 세포 유형에 대한 두 가지 모이오티의 동시 결합은 유세포 분석에 의해 이중 양성 염색 세포 집단으로 검출된 이중체 형성으로 이어진다. 이중 세포 형성을 검출하기 위해 CPD 염료로 사전 표지된 1차 NK 세포를 CFSE 염료로 사전 표지된 K562 PVR/PD-L1 세포와 2 : 1의 비율로 혼합하여 공동 배양하였다. 4℃에서 2시간 배양한 후 다양한 농도의 TIGIT-PD1 이중이량체가 존재할 때 이중 세포 형성을 테스트하였다. 또한, 이중 세포 형성의 특이성은 Abs 차단제와 함께 1시간 배양 후 테스트하였다: Fc 차단제, PVR Ab 또는 PD-L1 Ab로 1시간 배양한 후 이중이량체를 추가하였다.
- [0704] **생체내 합성 모델: AB12 마우스 중피종 암 모델에서 TIGIT-PD1 이중이량체의 효과** - 7주령 암컷 BALB/c 마우스에 AB12 마우스 악성 흉막 중피종(MPM) 세포를 복강 내로 접종한 후 TIGIT-PD1 이중이량체 또는 비히클 대조군으로 처리하였다. 이중이량체의 효과는 마우스 생존에 미치는 영향을 통해 평가하였다.
- [0705] 치료 프로토콜:
- [0706] 연구 0일에 10⁵의 AB12 세포를 정맥 내 접종하였다.
- [0707] 실험에는 두 그룹이 배정되었다:
- [0708] 그룹 1- 접종 후, 6일째부터 마우스를 200 μl의 비히클/마우스로 정맥 내 처리하였다. 비히클은 3일마다 투여하였다.
- [0709] 그룹 2- 접종 후, 6일째부터 마우스를 200 μl 부피의 150 μg TIGIT-PD1 이중이량체로 정맥 내 처리하였다. 3일 간격으로 총 4회 투여하였다.
- [0710] 동물들은 매일 이환율과 사망률을 평가하였다.
- [0711] **생체 내 NSG 모델: A549 인간 폐 선암종 암 모델에서 TIGIT-PD1 이중이량체의 효과** - 11~13주령 NSG 마우스에

인간 폐 선암종 세포를 피하 접종한 후 TIGIT-PD1 이중이량체 또는 비히클 대조군으로 처리하였다. 이중이량체의 효과는 종양 부피를 평가하고 종양 성장 억제(TGI)를 계산하여 평가하였다.

[0712] 치료 프로토콜:

[0713] 연구 0일에 5.0×10^6 의 A549 세포를 피하에 접종하였다. 9일째에 마우스에 방사선을 조사하고 인간 PBMC(5×10^6)를 정맥 주사한 후 16일째에 인간 PBMC(5×10^6)를 2차로 주사하였다.

[0714] 실험에는 두 그룹이 배정되었다:

[0715] 그룹 1- 마우스를 대상으로 9일째부터 격일(EOD)마다 $200 \mu\text{l}$ /마우스 PBS를 정맥 주사하였다.

[0716] 그룹 2- 마우스는 9일째부터 $150 \mu\text{g}$ TIGIT-PD1 이중이량체를 $200 \mu\text{l}$ /마우스 EOD 용량으로 정맥 주사하였다. 총 4회 투여하였다.

[0717] 종양 부피는 첫 번째 치료일(9일째)과 추적 기간 동안의 EOD에서 측정하였다. 모든 동물은 18일째에 희생되었다.

[0718] 실시예 1

[0719] 두 개의 Fc 융합 단백질로 구성된 이중이량체의 선택, 설계, 생산 및 특성화

[0720] SIRP α , PD1, TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC10 중에서 선택된 두 개의 단백질을 포함하는 여러 개의 이중이량체가 설계되었으며, 각 단백질은 "노브" 인ту "홀"으로의 방법(예, 미국 특허 번호 US8216805에 설명됨)을 사용하여 IgG1 또는 IgG4의 Fc 도메인에 융합된다(상기 표 1 참조).

[0721] 다음 매개변수를 최적화하기 위해 이중이량체-단백질의 구조 분석을 수행하였다:

- [0722] · 폴딩 - 표적에 결합할 수 있도록 적절히 폴딩하여 잠재적인 디황화물 스क्र램블링을 최소화한다.
- [0723] · 무결성 - 노출된 단백질 분해 부위가 없어야 한다.
- [0724] · 포유류 발현 시스템에서 높은 발현.
- [0725] · 낮은 면역원성.

[0726] 도 2A-5C는 본원에서 "DSP120V1", "DSP216V1", "DSP404V1", "DSP502V1"로 지칭되는 이중이량체의 개략도(상기 표 1의 설명 및 서열 참조) 및 식별된 도메인 및 세그먼트에 대해 생성된 3D 모델을 보여준다. 이 분석을 통해 리간드에 대한 결합 가능성과 서로 다른 도메인 간의 간섭이 없을 것으로 예측하였다.

[0727] 그 다음, 여러 개의 이중이량체를 생성하고 분석하였다. 도 6A-B와 도 15에서 볼 수 있듯이, 비환원 조건에서는 예상되는 이중이량체 분자량 형태의 단백질이 높은 비율로 관찰되었고, 환원 조건에서는 두 개의 서브유닛의 발현이 확인되었다. 소량의 동종이량체(두 개의 "노브" 또는 두 개의 "홀" 단편으로 구성된 이량체)만이 SDS-PAGE를 통해 검출되었다.

[0728] 또한, 생성된 이중이량체는 설계된 모든 도메인을 포함한다; 예를 들어, DSP120V1은 PD1 및 SIRP α 도메인을 모두 포함한다(도 7A-B 및 8A-B); DSP216 및 DSP216V1은 LILRB2 및 SIRP α 도메인을 모두 포함한다(도 7C 및 9A-C); DSP402는 PD1 도메인(도 7A); DSP502는 PD1 및 TIGIT 도메인(도 7A 및 10A-B)을 모두 포함한다.

[0729] 다음 단계에서, 생성된 이중이량체는 그 조성에 따라 아래의 실시예 2-8에 따라 추가로 분석된다.

[0730] 실시예 2

[0731] 이중이량체는 대응 리간드/수용체와 결합한다

[0732] 세포 표면에 발현된 CD47 및 PDL1에 대한 SIRP α -PD1 이중이량체의 결합 분석

[0733] 본원에서 "DSP120" 및 "DSP120V1"로 지칭되는 SIRP α -PD1 이중이량체의 PD1 도메인과 세포에 발현된 인간 PDL1의 결합은 항-SIRP α 를 검출 항체와 PDL1을 과발현하는 DLD1-PDL1 세포주(도 11A)를 사용하여 결정하였다. 낮은 수준의 내인성 PDL1을 발현하는 DLD1-WT 세포(도 11A)를 대조군으로 사용하였다. 도 11C-D에 표시된 바와 같이, DSP120 및 DSP120V1은 용량 의존적으로 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합하였다.

[0734] SIRP α -PD1 이중이량체 DSP120의 SIRP α 도메인과 세포에서 발현된 인간 CD47의 결합은 검출 항체로 PE 접합

항-IgG4 항체와 인간 CD47을 과발현하는 CHO-K1 세포주(도 11B)를 사용하여 결정하였다. CHO-K1 세포는 인간 CD47을 발현하지 않기 때문에 대조군으로 사용되었다(도 11B). 도 11E에 표시된 바와 같이, DSP120은 용량 의존적인 방식으로 CHO-K1 CD47 과발현 세포에 결합하였다.

[0735] **플레이트 결합 CD47 또는 PDL1에 대한 SIRP α -PD1 이중이량체의 결합 분석**

[0736] 항-인간 PD-1(CD47 코팅 플레이트의 경우) 또는 항-인간 SIRP α 항체(PDL1 코팅 플레이트의 경우)를 사용하여 배양한 후 해당 HRP 접합 이차 항체로 배양한 후 SIRP α -PD1 이중이량체 DSP120의 PD1 및 SIRP α 도메인과 플레이트에 결합된 PDL1 또는 CD47의 결합을 측정하였다. 검출은 TMB 기관으로 수행하였다. 도 8A는 농도 의존적인 방식으로 DSP120과 CD47 코팅 플레이트의 결합을 보여주고, 도 8B는 농도 의존적인 방식으로 DSP120과 PDL1 코팅 플레이트의 결합을 보여준다.

[0737] **세포 표면에 발현된 CD47 및 HLA-G에 대한 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 결합 분석**

[0738] 인간 CD47을 발현하고(도 12A) HLA-G를 발현하지 않는 HT1080 세포주(도 12B)와 검출 항체로 APC 접합 항-LILRB2를 사용하여 본원에서 "DSP216"으로 지칭되는 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 SIRP α 도메인과 세포에 발현된 인간 CD47의 결합을 결정하였다. 도 12E에서 볼 수 있듯이, DSP216은 용량 의존적으로 CD47 발현 세포에 결합하였다.

[0739] HLA-G를 과발현하는 HT1080 세포주(도 12D)와 항-인간 IgG4 항체를 사용하여 본원에서 "DSP216V1"로 지칭되는 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 SIRP α 및 LILRB2 도메인과 세포에 발현된 HLA-G 및/또는 인간 CD47의 결합을 결정하였다. 도 12F에서 볼 수 있듯이, DSP216V1은 용량 의존적으로 HLA-G 및 인간 CD47 발현 세포에 결합하였다.

[0740] HT1080-HLA-G는 HLA-G와 CD47을 모두 발현하므로, 각 리간드에 대한 차단 항체를 사용하여 인간 CD47 및 HLA-G에 대한 특이적 결합을 추가로 테스트하였다. 도 16A에 표시된 바와 같이, 항 인간 HLA-G 차단 항체를 사용하여 HT1080-HLA-G 세포주에서 발현된 HLA-G에 대한 DSP216의 특정 용량 의존적 결합을 확인하였다(검출 항체로 APC 접합 항 인간 IgG1 항체가 사용됨). 마찬가지로, 항-인간 CD47 및 항-인간 HLA-G 차단 항체를 사용하여 HT1080 세포주에서 발현된 인간 CD47 및 인간 HLA-G뿐만 아니라 HT1080-HLA-G 세포주에서 발현된 인간 CD47에 대한 DSP216V1의 특정 용량 의존적 결합을 확인하였다(도 16B, APC 접합 항-SIRP α 항체를 검출 항체로 사용함).

[0741] 같은 방식으로, 항-인간 HLA-G 차단 항체 또는 항-인간 CD47 차단 항체를 사용하여 HLA-G를 과발현하는 HT1080-HLA-G 세포주 또는 JEG3 세포주(인간 CD47 및 인간 HLA-G를 모두 발현하는 두 세포주)를 사용하여 인간 HLA-G에 대한 LILRB2 도메인의 특정 용량 의존적 결합과 본원에서 "DSP216V3", "DSP216V4", "DSP216V5" 및 "DSP216V6"으로 지칭되는 다른 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 CD47에 대한 SIRP α 도메인의 특정 용량 의존적 결합을 결정하였다(도 16C-17F, 검출 항체로서 APC 접합 항 인간 IgG1 또는 APC 접합 항-SIRP α 항체가 사용됨).

[0742] **플레이트에 결합된 인간 CD47 또는 인간 HLA-G에 대한 SIRP α -LILRB2 이중이량체의 결합 분석**

[0743] 항-인간 SIRP α 항체(HLA-G 코팅 플레이트의 경우)를 사용한 후 해당 HRP 접합 2차 항체와 배양하거나 항-인간 항 IgG1-HRP 또는 항-인간 IgG4-HRP를 사용하여 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216, DSP216V1, DSP216V3, DSP216V4의 SIRP α 및 LILRB2 도메인과 플레이트 결합 CD47 또는 HLA-G의 결합을 결정하였다. 검출은 TMB 기관으로 수행되었다. 도 9A-C 및 18A-H에 표시된 바와 같이, 테스트한 모든 이중이량체는 농도에 따라 플레이트 결합 CD47과 플레이트 결합 HLA-G 모두에 결합하였다.

[0744] **세포 표면에서 발현된 CD24 및 PDL1에 대한 SIGLEC-10-PD1 이중이량체의 결합 분석**

[0745] 본원에서 "DSP402"로 지칭되는 SIGLEC-10-PD1 이중이량체의 PD1 도메인과 인간 PDL1의 결합을 PDL1을 과발현하는 DLD1-PDL1 세포주 및 검출 항체로 APC 접합 항-PD1을 사용하여 결정하였다(도 11A). 낮은 수준의 내인성 PDL1을 발현하는 DLD1-WT 세포를 대조군으로 사용하였다(도 11A). 도 13에 표시된 바와 같이, DSP402는 용량 의존적으로 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합하였다.

[0746] CD24 발현 세포를 사용하여 SIGLEC-10 도메인과 수용체와의 결합을 테스트하였다.

[0747] **세포 표면에 발현된 PVR, PDL1 및 Fc γ RIIIa(CD16)에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체의 결합 분석**

[0748] 본 명세서에서 "DSP502"로 지칭되는 TIGIT-PD1 이중이량체의 PD1 도메인과 인간 PDL1의 결합을 PDL1을 과발현하는 DLD1-PDL1 세포주(도 11A)와 PD-L1을 내인성 발현하는 HT1080 세포주(도 14D)를 사용하여 결정하였다. 높은 수준의 내인성 PVR을 발현하는 DLD1-PDL1 및 HT1080 세포주를 사용하여 DSP502의 TIGIT 도메인과 인간 PVR의

결합을 확인하였다(14B 및 14C). 두 분석 모두에서 PE 접합 항-인간 IgG1 항체를 검출 항체로 사용하였다.

- [0749] 도 14E-F에 표시된 바와 같이, DSP502는 용량 의존적으로 PDL1 발현 세포와 결합했으며, 이 결합은 항-인간 PD-L1 차단 항체에 의해 차단되었다.
- [0750] 도 14E-F는 또한 항-인간 PVR 차단 항체를 사용하여 이러한 세포에 대한 DSP502의 결합을 차단한 것으로 표시된 바와 같이, DSP502의 TIGIT 도메인이 PVR 발현 세포에 용량 의존적으로 결합하는 것을 보여준다.
- [0751] 도 14G는 PD1이 아닌 PVR을 발현하는 DLD-1 WT 세포에 대한 다른 TIGIT-PD1 이중이량체(이하, "DSP502V1", "DSP502V2" 및 "DSP502V3")의 TIGIT 도메인의 용량 의존적 결합을 보여준다(도 14A 및 11A). 검출 항체로 PE 접합 항-인간 IgG4 항체를 사용하였다. 이 세 단백질의 결합 패턴은 유사하다.
- [0752] 또한, PD-L1을 과발현하는 K562 PD-L1 세포주, PVR을 과발현하는 K562 세포주, 및 PVR과 PD-L1을 모두 과발현하는 K562 PVR/PD-L1 세포주를 사용하여 DSP502 및 본원에서 "DSP502V4"(Fc-IgG1 도메인에 LALA 돌연변이 포함)로 지칭되는 또 다른 TIGIT-PD1 이중이량체의 PD1 및 TIGIT 도메인과 인간 PDL1 및 인간 PVR 각각에 대한 용량 의존적 결합을 결정하였다(도 19A-I).
- [0753] 도면에 표시된 바와 같이 결합 분석에서 PE 접합 항-인간 IgG1 항체 또는 APC 접합 항-TIGIT 및 항-인간 IgG1 항체를 검출 항체로 사용하였다.
- [0754] 높은 수준의 내인성 PVR을 발현하는 SKOV3 세포주에 대한 DSP502의 TIGIT 도메인의 용량 의존적 결합도 관찰되었다(도 20A-B, PE 접합된 항-인간 IgG1 항체가 검출 항체로 사용됨).
- [0755] 세포에 발현된 마우스 PDL1 및 마우스 PVR에 대한 DSP502의 PD1 및 TIGIT 도메인의 용량 의존적 결합은 또한 PVR을 내인성 발현하는 AB12 세포주(도 22A-B, PE 접합된 항-인간 IgG1 항체를 검출 항체로 사용) 또는 PD-L1 및 PVR을 모두 내인성 발현하는 세포주인 렌카(도 21A-B, PE 접합된 항-인간 IgG1 항체가 검출 항체로 사용됨)를 사용하여 관찰되었다.
- [0756] 렌카 세포에서 발현된 각 리간드(PDL1 및 PVR)에 대한 DSP502의 특이적 결합은 항-mPDL1 및 항-mPVR 차단 항체를 사용하여 입증되었다.
- [0757] 또한, CD16을 과발현하는 Jurkat NFAT 세포주를 사용하여 DSP502의 Fc 도메인과 인간 Fc 수용체 CD16의 결합을 확인하였다(도 23B). 검출 항체로 PE 접합 항-인간 IgG1 항체를 사용하였다. 도 23A에서 볼 수 있듯이 DSP502는 용량 의존적으로 세포에 결합하였다. CD16에 대한 결합의 특이성은 이중이량체와 세포의 결합을 완전히 차단하는 Fc 차단제를 사용하여 입증되었다.
- [0758] 이중이량체의 Fc 수용체에 대한 결합 효과를 추가로 테스트하기 위해, K562 PVR/PDL-1 세포(표적 세포)와 CD16을 과발현하는 Jurkat NFAT 세포(이펙터 세포)의 공동 배양 분석하고 6시간 배양 후 루시페라제 신호를 분석하였다. Jurkat-NFAT-CD16 세포는 NFAT 요소에 융합된 ISG54 프로모터의 제어 하에 루시페라제 리포터 유전자를 안정적으로 발현한다. 검출 시약을 첨가하면 루시페라제가 생성하는 생체 발광 신호로 Fc γ RIIIa 결합을 측정하였다. 도 24에서 볼 수 있듯이, DSP502가 존재하는 상태에서 세포를 공동 배양하면 루시페라제 분비가 증가하였다. 중요한 것은 Jurkat NFAT-CD16 세포를 DSP502와 함께 단일 배양 분석으로 배양했을 때(즉, K562 PVR/PDL-1 세포가 없는 경우) 루시페라제 분비가 검출되지 않았다는 점이다. 따라서 DSP502가 PVR 및/또는 PDL1에 고정되지 않은 경우, Jurkat 세포에서 발현된 Fc γ RIIIa에 결합하는 것만으로는 신호 전달을 시작하기에 충분하지 않다.
- [0759] **플레이트 결합 PVR에 대한 TIGIT-PD1 이중이량체의 결합 분석**
- [0760] 항-인간 PD1 항체를 사용하여 배양한 후 상응하는 HRP 접합 이차 항체로 배양한 후 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502의 TIGIT 도메인과 플레이트에 결합된 PVR의 결합을 결정하였다. 검출은 TMB 기관으로 수행되었다. 도 10A-B에 표시된 바와 같이, DSP502는 농도에 따라 플레이트에 PVR을 결합하였다.
- [0761] **실시예 3A**
- [0762] **이중이량체는 엘리사에 의해 결정된 바와 같이 대응 리간드/수용체와 동시에 결합한다**
- [0763] 이중이량체 양쪽의 대응 리간드/수용체에 대한 결합, 즉 PD1과 PDL1, LILRB2와 HLA-G, SIRP α 와 CD47, TIGIT와 PVR, SIGLEC-10과 CD24의 결합은 샌드위치 ELISA 기반 분석으로 테스트한다. 이 분석은 이중이량체 단백질의 다양한 변이체의 기능적 특성을 비교하는데도 사용된다.

[0764] 평평한 바닥 96웰 플레이트에 CD47 단백질, PDL1 단백질, HLA-G 단백질, PVR 또는 CD24와 같은 재조합 대응 단백질로 배양하여 한쪽 암(arm)의 수용체/리간드로 사전 코팅한 후 차단 및 세척한다. 연속적으로 희석된 세포 배양 상층액 또는 생성된 이중이량체를 포함하는 정제된 단백질 샘플을 사전 코팅된 해당 웰에 추가한다. 추가 세척 단계에 이어, 이중이량체의 두 번째 암(arm)에 대한 비오틴화 또는 표지되지 않은 가용성 수용체/리간드를 추가하고 포획된 단백질에 결합하도록 한다. 그런 다음 두 번째 수용체/리간드에 대한 스트렙타비딘-HRP 또는 HRP 접합 Ab를 추가하고 표준 ELISA 프로토콜에 따라 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450nm에서 620nm의 기준과 함께 TMB 기판으로 검출한다. 또는 두 단백질을 동일한 물량으로 혼합하여 플레이트를 코팅하고 IgG 특이 항체로 결합을 검출한다.

[0765] 도 25A에 표시된 바와 같이, TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502는 PVR과 PDL1을 동시에 결합하였다.

[0766] 실시예 3B

[0767] **이중이량체는 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이 대응 리간드/수용체와 동시에 결합한다**

[0768] TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502와 이의 모든 대응 물질의 동시 결합(즉, 예, IgG1-Fc와 Fc γ RIIIa, TIGIT와 PVR, PD1과 PDL1의 결합)을 Fc γ RIIIa를 발현하는 NK 1차 세포(도 25B)와 PVR 및 PDL1을 발현하는 K562 PVR/PD-L1을 사용하여 유세포 분석(도 19F)으로 테스트하였다. 구체적으로, 다양한 농도의 DSP502가 있는 상태에서 각각 CPD 염료로 사전 표지된 NK 세포를 CFSE 염료로 사전 표지된 K562 PVR/PD-L1 세포와 2 : 1의 비율로 공동 배양하였다. 이중체 염색의 형성은 유세포 분석법을 사용하여 분석되었으며 이중체 염색 이벤트로 나타났다. 도 25C에서 볼 수 있듯이, DSP502가 이중 염색 형성을 매개하여 두 세포 유형에 동시에 DSP가 결합했음을 나타낸다. 또한, DSP502에 의한 이러한 이중체 형성 매개 활성화는 PVR, PD-L1 또는 Fc γ RIII에 대한 특정 차단 항체에 의해 차단되었으며(도 25D), 이는 이중체 형성을 위한 최적의 조건이 세 가지 수용체가 관여할 때임을 나타낸다.

[0769] 실시예 4

[0770] **리간드-수용체 결합 차단에 대한 이중이량체의 효과**

[0771] 이중이량체는 표적 세포에서 발현되는 내인성 리간드/수용체와 네이티브 수용체/리간드의 상호작용을 차단하도록 설계되었다.

[0772] 예를 들어, 관련 이중이량체의 PD1 부분은 T 세포에서 발현되는 내인성 PD1과 종양 세포에서 발현되는 PDL1의 상호 작용을 차단하도록 설계되었다. 이를 위해 이러한 상호작용을 차단하는 차단제로서 생산된 이중이량체의 효과를 평가한다. 재조합 인간 PDL1을 플레이트에 코팅한다. 그 다음, 플레이트를 세척하고 생산된 이중이량체(예, 표 1 참조) 또는 양성 대조 항-PD1 차단 항체의 다양한 농도로 1시간 동안 배양한다. 비오틴화된 PD1을 첨가한 후 추가 배양하고, 표준 ELISA 프로토콜에 따라 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질로 플레이트를 세척하고 블롯팅한다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 리더기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 분석하고 620nm에서 참조한다.

[0773] 마찬가지로, 관련 이중이량체의 차단 활성을 연구하여 PVR-TIGIT, SIGLEC10-CD24, LILRB2-HLA-G 및 CD47-SIRP α 결합을 차단하는 효과를 평가한다.

[0774] 실시예 5

[0775] **이중이량체의 생체 내 항종양 효과**

[0776] 실험 설계:

[0777] 생산된 이중이량체의 암 치료 효능을 테스트하기 위해 세 가지 생체 내 마우스 모델을 사용한다:

[0778] 1. 인간 줄기세포 또는 인간 PBMC 또는 고정화된 인간 PBMC와 이중이량체의 표적을 발현하는 인간 종양 세포를 접종한 NSG 마우스.

[0779] 2. 인간 종양 세포를 접종한 누드-SCID 마우스.

[0780] 3. 테스트된 이중이량체의 대리 마우스 단백질을 사용한 합성 마우스 종양 모델.

[0781] 모든 모델에서 마우스에 종양 세포를 정맥 내(IV), 복강 내(IP), 피하(SC) 또는 동소적으로 접종한다. 종양이 만져지면($\sim 80\text{mm}^3$), 생성된 이중이량체의 다른 용량과 다른 요법으로 마우스를 정맥, IP, SC 또는 동소적으로 치료한다.

- [0782] 마우스의 체중과 임상 징후를 추적한다. 종양은 일주일에 몇 번씩 캘리퍼로 측정하며, 종양의 부피는 다음 공식에 따라 계산한다: $V = \text{길이} \times \text{너비}^2/2$. 마우스 체중은 정기적으로 측정한다. 종양의 성장과 생존은 전체 실험을 통해 모니터링된다.
- [0783] 종양을 절제하거나 림프절을 배출하고, 특정 항체 염색 및 유세포 측정 분석을 사용한 소화 및 면역 표현형으로 종양에서 면역 세포의 침윤 (infiltration) 및 하위 유형 지정 (sub-typing)을 시험한다. 또한, 면역 세포의 침윤 또는 종양의 괴사성 등급을 종양 절제, 파라핀 임베딩 (embedding) 및 특정 항체와 면역조직화학 염색을 위한 절편화에 의해 결정된다.
- [0784] 희생 시 마우스 장기를 적출하여 파라핀 블록에 임베딩하여 H&E 및 IHC 염색을 한다.
- [0785] 하기 시험을 위해 일반적인 절차에 따라 다양한 시점에 마우스에서 혈액 샘플을 채취한다: PK 분석, 혈장 내 사이토카인 측정, 순환 중인 혈액 세포 하위 집단의 FACS 프로파일링, 혈액학 검사, 혈청 화학 검사, 항약물항체 (ADA) 분석 및 중화항체 분석(Nab).
- [0786] 결과:
- [0787] **인간 비소세포폐암 종양을 보유한 NSG 마우스에서 TIGIT-PD1 이중이량체의 항종양 효과**
- [0788] 인간 폐 선암 세포주인 A549 세포를 접종한 11~13주령의 수컷 NSG 마우스에서 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502의 항종양 생체 내 효과를 평가하였다. 종양 접종 후 18일 동안 DSP502로 치료한 마우스의 종양 부피는 거의 증가하지 않은 반면, 대조군 마우스의 종양 부피는 400mm^3 에 달해 DSP502로 치료하면 종양 성장이 크게 억제되는 것으로 나타났다(도 26).
- [0789] **마우스 중피종 종양 보유 마우스에서 TIGIT-PD1 이중이량체의 항종양 효과**
- [0790] 마우스 악성 흉막 중피종(MPM) 세포주인 AB12 세포를 접종한 7주령의 암컷 BALB/c 마우스에서 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502의 항종양 생체 내 효과를 평가하였다. DSP502로 치료한 마우스는 대조군 마우스에 비해 생존 기간이 유의하게 연장되었다(도 27). 예를 들어, 대조군 처리 마우스의 87.5%가 종양 접종 후 33일째 사망한 반면, DSP502 처리 마우스의 62%는 종양 접종 후 80일 이상 생존하였다.
- [0791] **실시예 6**
- [0792] **관련 이중이량체에서 LILRB2 암이 M-CSF 의존성 대식세포 성숙에 미치는 영향**
- [0793] 이중이량체의 LILRB2 암은 종양 또는 면역세포에 발현된 HLA-G가 대식세포 및 수지상세포와 같은 APC에 발현된 내인성 LILRB2에 대해 유도하는 면역 억제 신호를 경쟁하고 상호 작용을 차단하여 차단하도록 설계되었다. M1 유사 대식세포는 항종양 활성을 보이는 반면, M2 대식세포는 종양 진행을 촉진하는 것으로 보고되었다. M-CSF 의존성 대식세포 성숙 중에 길항 항체로 LILRB2를 차단하면 CD14 및 CD163의 발현이 감소하면서 더 둥글고 단단하게 부착된 M1 유사(항종양) 표현형이 나타나는 것으로 나타났다. 생성된 대식세포를 LPS로 자극한 결과, 전염증성 사이토카인인 TNF α 의 분비가 증가하고 항염증성 IL-10의 분비가 감소하는 것이 확인되었다.
- [0794] 이를 위해 유세포 분석을 이용한 CD14 및 CD163의 검출과 LPS 전처리 대식세포의 자극 후 TNF α 및 IL-10 방출량 측정을 통해 LILRB2를 포함하는 생성된 이중이량체가 M-CSF 의존성 대식세포 성숙에 미치는 영향을 평가하였다.
- [0795] **실시예 7**
- [0796] **SIRP α 또는 LILRB2 도메인을 포함하는 이중이량체가 대식세포 및 다형성 세포에 미치는 영향**
- [0797] 일부 실시예의 이중이량체의 SIRP α 부분은 대식세포 및 과립구와 같은 APC에 발현되는 내인성 SIRP α 에 대해 CD47을 발현하는 종양 세포에 의해 유도되는 "나를 먹지 마 (don't eat me)" 라는 신호를 차단하도록 설계되어 종양 세포의 CD47과 내인성 SIRP α 의 상호 작용을 경쟁 및 차단한다. 이렇게 "나를 먹지 마 (don't eat me)" 라는 신호가 차단되면 종양 세포의 식균 작용이 유도된다.
- [0798] 일부 실시예의 이중이량체의 LILRB2 부분은 부분적으로 종양 또는 면역 세포에서 발현된 HLA-G가 대식세포 및 DC와 같은 APC에서 발현된 내인성 LILRB2에 대해 유도하는 면역 억제 신호를 차단하도록 설계되어 종양 및 면역 세포의 HLA-G와 내인성 LILRB2의 상호 작용을 경쟁하고 차단한다. 이러한 HLA-G의 "나를 먹지 마 (don't eat me)" 신호 차단은 종양 세포의 식균 작용을 유도하고 면역 세포 간의 억제성 HLA-G-LILRB2 신호 전달을 방지하

여 식균 작용을 강화한다.

- [0799] 생산된 SIRP α 를 포함하는 이중이량체가 인간 대식세포 또는 다형핵세포(PMN)에 의한 종양세포의 식세포화에 미치는 영향과 LILRB2를 포함하는 이중이량체가 인간 대식세포 또는 DC에 의한 종양세포의 식세포화에 미치는 영향은 유세포 분석법 또는 형광 현미경으로 평가되었다.
- [0800] 이를 위해 유세포 분석 기반 분석법을 사용하여 인간 PMN(과립구)에 의한 종양 세포의 식세포화에 대한 SIRP α -LILRB2 이중이량체 DSP216의 효과를 평가하였다. 세 명의 다른 기증자로부터 얻은 과립구를 1, 2 또는 5 μ g/mL DSP216으로 배양한 다음 종양 세포주와 1 : 1 E : T 비율로 인간 CD47을 발현하는 종양 세포주 HT1080 또는 인간 CD47과 인간 HLA-G를 모두 발현하는 HT1080-HLA-G와 함께 배양하였다(도 12A 및 12D). 도 28에서 볼 수 있듯이, DSP216 처리는 HT1080 세포의 식세포화 비율과 HT1080-HLA-G의 식세포화 비율을 더 많이 증가시켰다.
- [0801] **실시예 8**
- [0802] **티겟 도메인을 포함하는 이중이량체에 의한 NK 세포 세포 독성 활성**
- [0803] 자연살해(NK)세포는 특정 항원을 B세포와 T세포로 인식하지 않고 직접 세포독성을 유도하거나 사이토카인/케모카인의 분비를 유도한다. NK 세포 독성은 감염된 세포, 악성 세포, 스트레스 세포에 대한 면역 반응에 중요한 역할을 하며, 다양한 질병의 병리 과정에 관여한다.
- [0804] 당업자에게 알려진 수많은 분석법은 생성된 이중이량체가 NK 활성화에 미치는 영향을 결정하기 위해 사용되며, 여기에는 다음을 포함하되 이에 제한되지 않는다:
- [0805] - 세포 독성 분석 - 공동 배양 분석에서 NK 세포(이펙터 세포)에 의한 표적 세포의 사멸. 세포 사멸 비율은 유세포 분석(FACS)으로 분석한다. 사전 표지된 표적 세포(예, K562 PVR/PD-L1 세포 또는 K562 WT 세포)를 96웰 플레이트에 넣고 다양한 이펙터-표적(E:T) 비율로 사전 표지된 1차 NK 세포와 함께 37 °C에서 배양한다. 선택적으로, 분석 전 48시간 동안 1000 U/mL IL-2로 NK 세포를 배양한다. 4시간, 12시간 및/또는 24시간 후에 세포를 채취하여 유세포 분석법으로 분석한다. NK 세포가 없는 배양에서 회수된 표적 세포의 수는 참고 자료로 사용된다.
- [0806] - 세포 독성 분석 - 공동 배양 분석에서 NK 세포(이펙터 세포)에 의한 표적 세포의 사멸. 표적 세포와 카스파제 민감 형광 기질을 사용하여 인큐사이트 기계로 사멸 비율을 측정한다.
- [0807] - 염증성 사이토카인 분비: 1차 NK 세포를 다양한 표적 세포와 다양한 비율로 24시간 동안 자극한다. 무세포 배양 상청액에서 인터페론 γ (IFN- γ) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)의 수치는 ELISA 또는 세포 분석 비드 어레이(CBA)로 측정한다.
- [0808] - 그랜자임 B의 분비: 다양한 표적 세포를 다양한 비율로 12시간 동안 1차 NK 세포를 자극한다. 무세포 배양 상청액에서 그랜자임 B의 수준은 ELISA로 측정한다.
- [0809] 결과:
- [0810] NK 세포의 K562 WT 표적 세포 사멸은 PVR 및/또는 PD-L1을 발현하는 K562 세포 사멸과 비교하여 더 높았다(도 29A). K562 WT 세포를 표적 세포로 포함하는 공동 배양에 TIGIT-PD1 이중이량체 DSP502를 추가해도 NK 세포 독성이 증가하지 않았다(테이터 표시 안 함). 그러나 PVR 및/또는 PD-L1을 발현하는 K562 세포를 표적 세포로 포함하는 공동 배양에 DSP502를 추가하면 처리되지 않은 세포와 비교하여 모든 테스트에서 NK 세포 독성이 유의하게 증가하였다: T 비율에서 유의하게 증가하였다(도 29A). 가장 유의한 세포 독성 효과는 DSP502 이중이량체로 처리한 PVR과 PD-L1을 모두 발현하는 K562 세포에서 관찰되었다.
- [0811] 위에서 설명한 세포 독성 분석에 따라, K562 WT를 표적 세포로 공동 배양한 NK 세포에서 그랜자임 B의 분비는 PVR 및/또는 PD-L1을 표적 세포로 발현하는 K562 세포와 동일한 세포에 비해 더 높았다(도 29B). PVR 및/또는 PD-L1을 표적 세포로 발현하는 K562 세포로 구성된 공동 배양에 DSP502를 추가하면 모든 테스트에서 처리되지 않은 세포에 비해 그랜자임 B 분비가 유의하게 증가하여 모든 E : T 비율을 증가시켰다(도 29B). 세포 독성 분석과 마찬가지로, PVR 및 PD-L1을 모두 발현하는 K562 세포에서 그랜자임 B 분비가 가장 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다.
- [0812] 본 발명은 그 특정 실시예와 관련하여 설명되었지만, 많은 대안, 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 것이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 정신과 넓은 범위에 속하는 모든 이러한 대안, 수정, 및 변형을 포함하도록

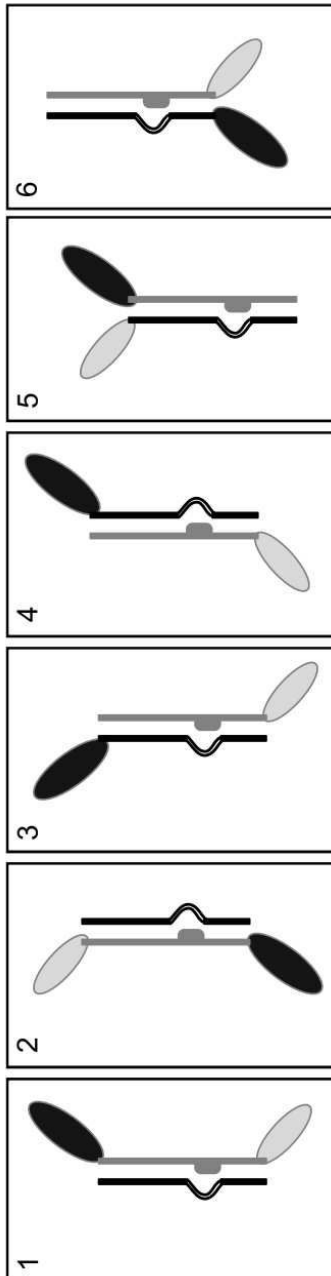
의도하였다.

[0813]

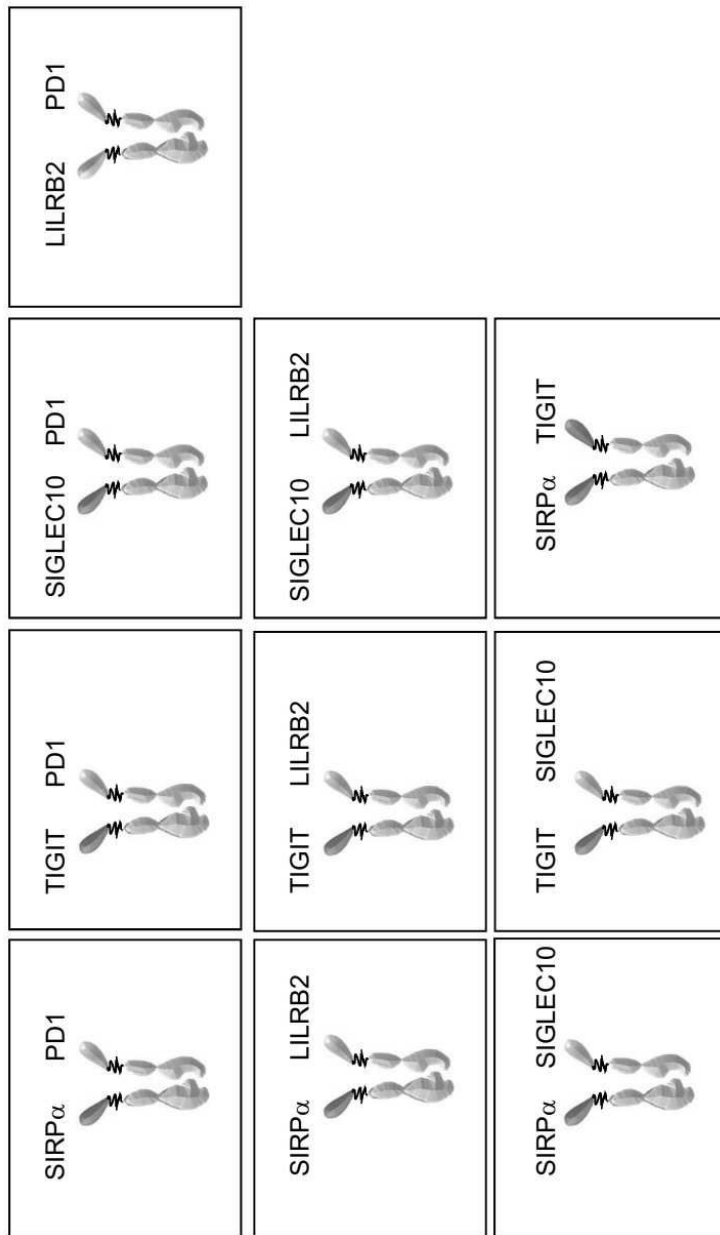
본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 본 명세서에 참조로 포함된다고 표시되는 것과 동일한 정도로, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 본 출원에서 인용 또는 식별은 이러한 참조가 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용 가능하다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 소재목이 사용되는 범위 내에서 반드시 제한적인 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 본 출원의 우선권 문서(들)는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

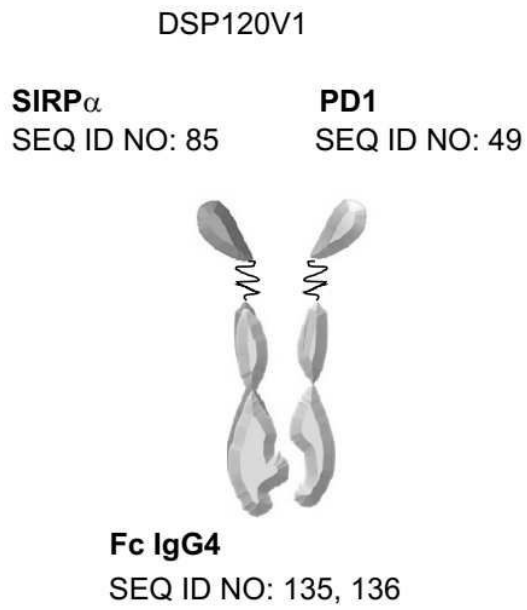
도면1a



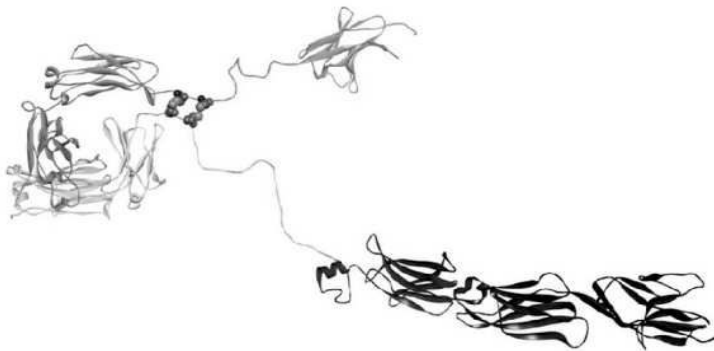
도면1b



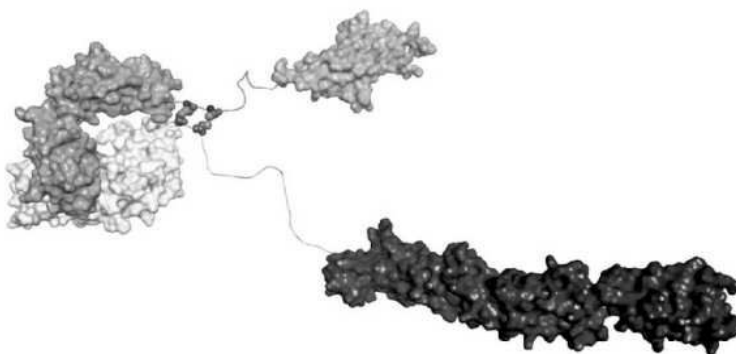
도면2a



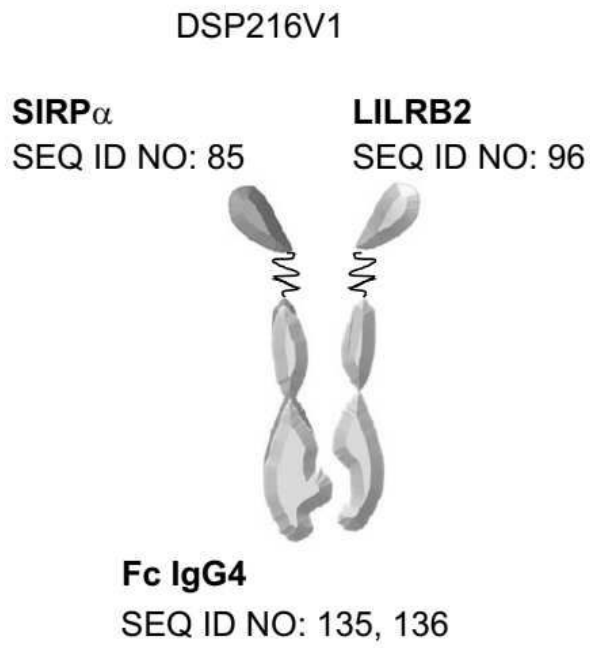
도면2b



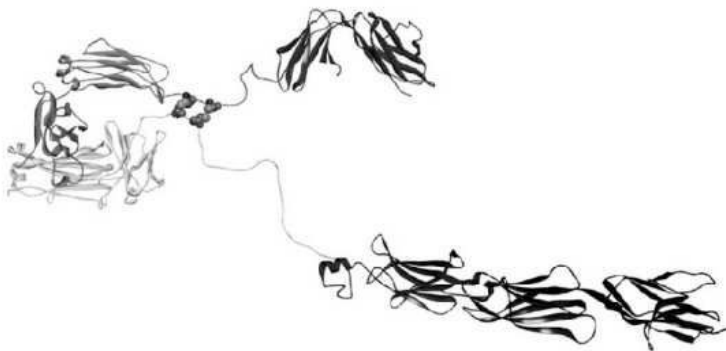
도면2c



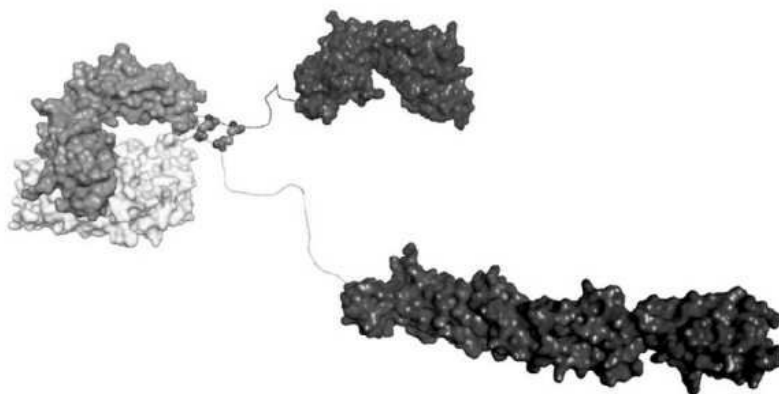
도면3a



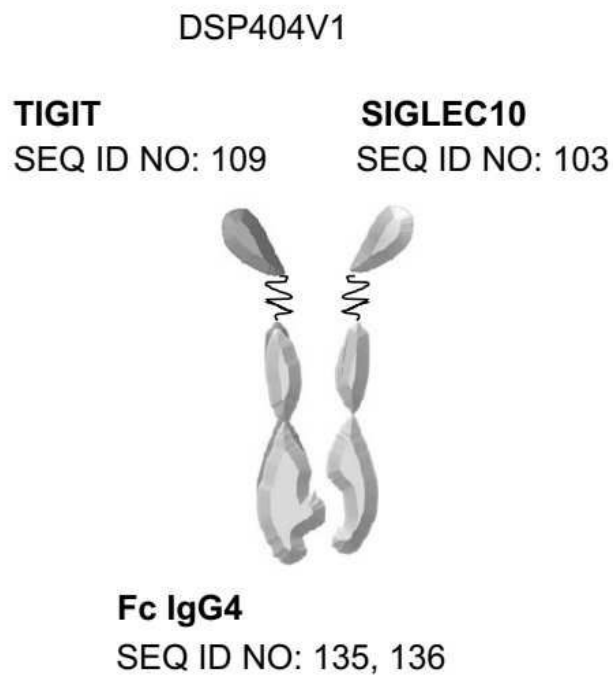
도면3b



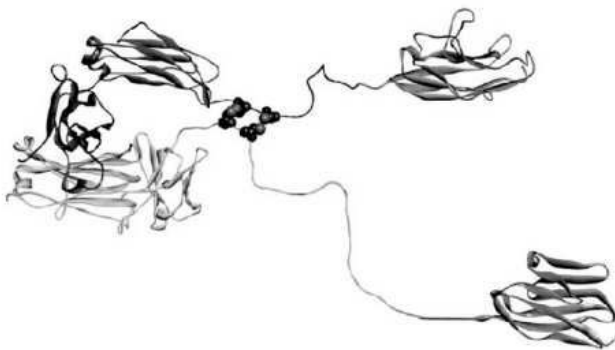
도면3c



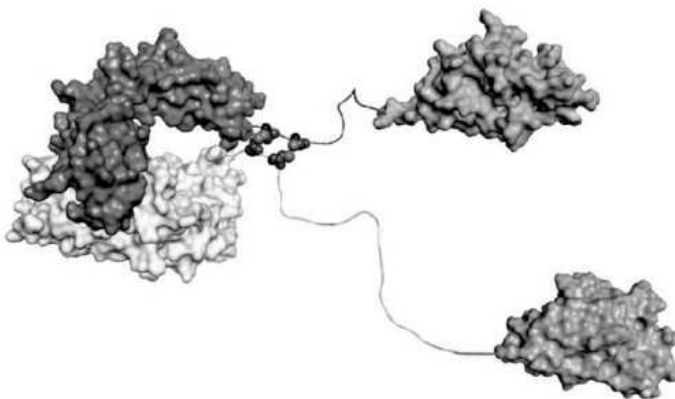
도면4a



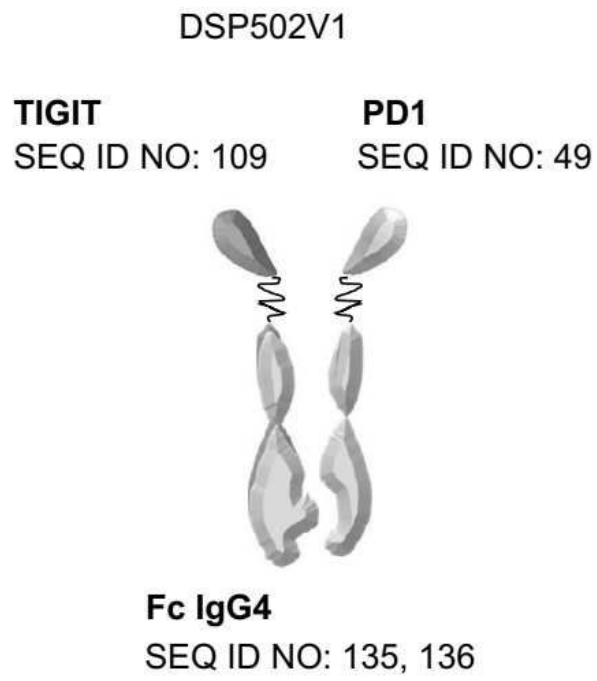
도면4b



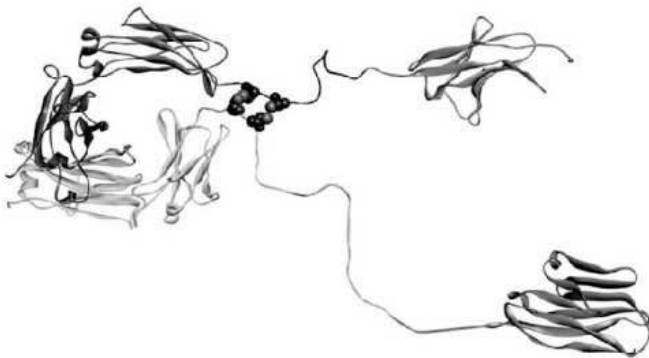
도면4c



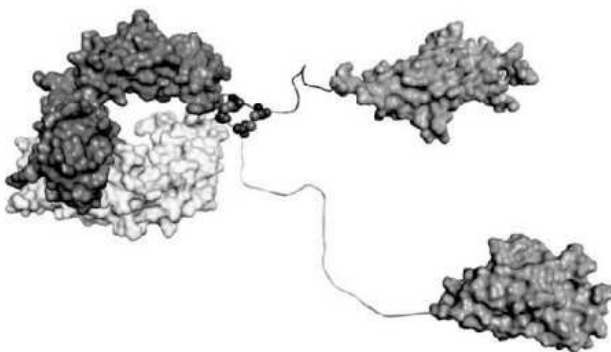
도면5a



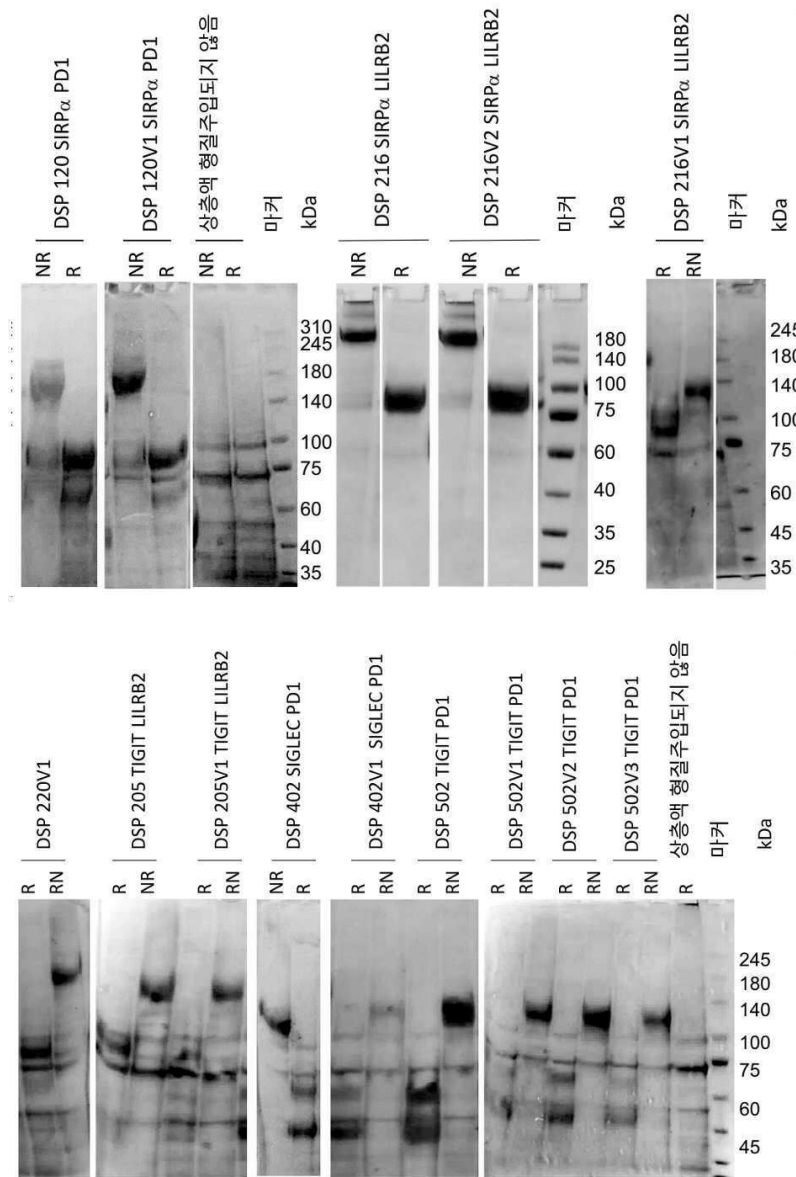
도면5b



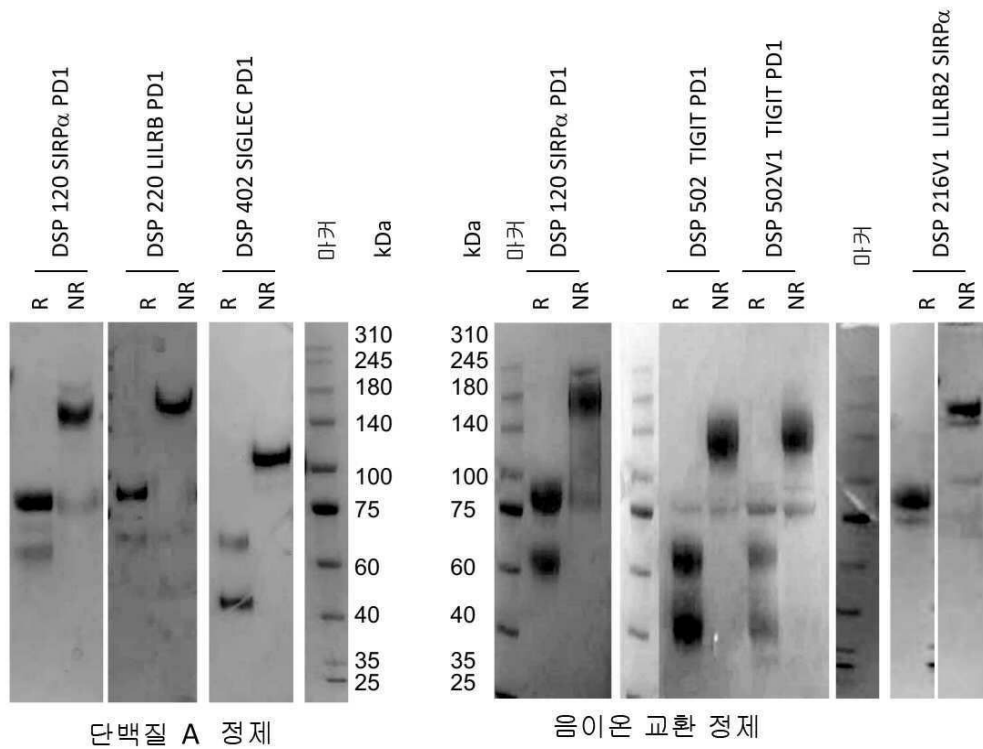
도면5c



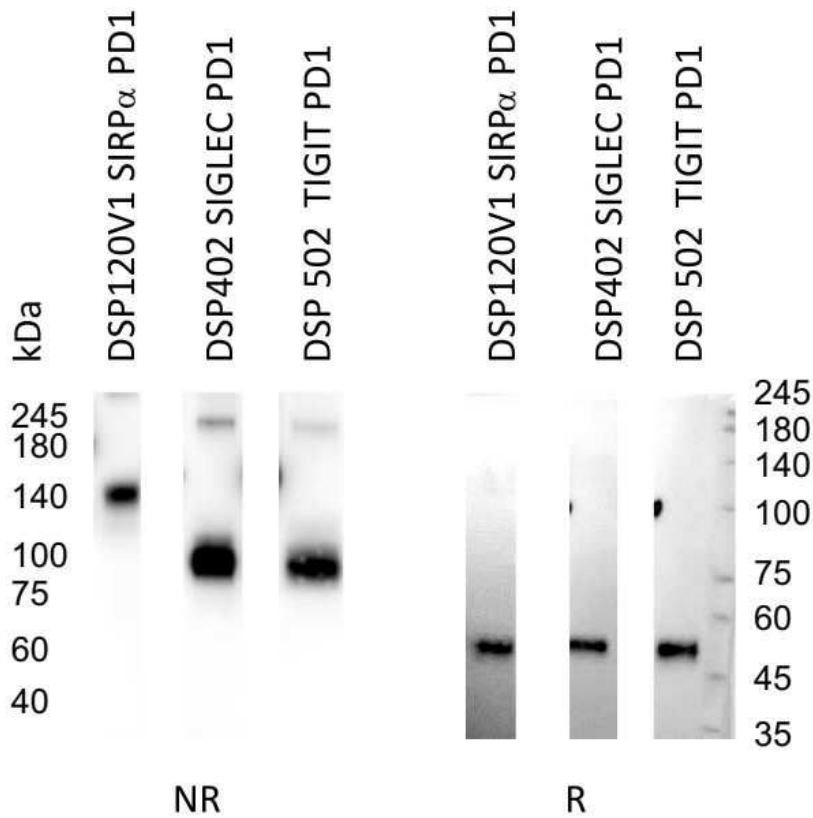
도면6a



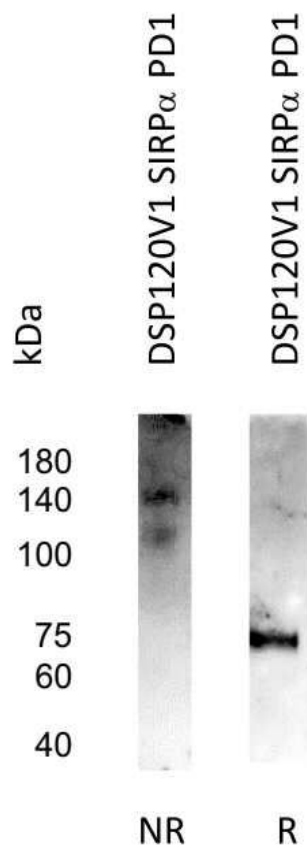
도면6b



도면7a



도면7b

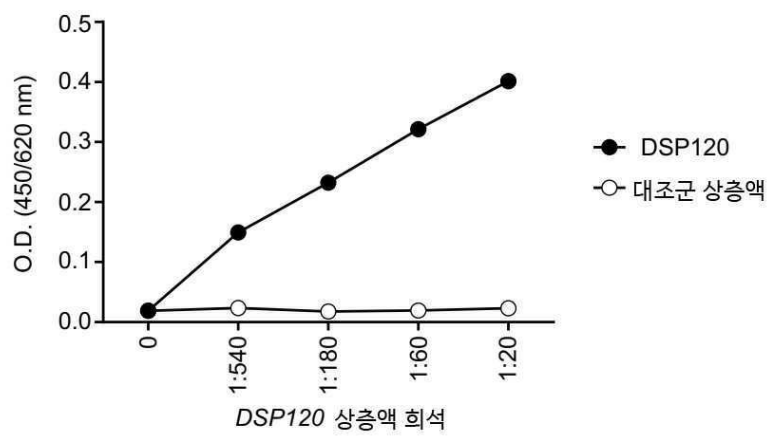


도면7c

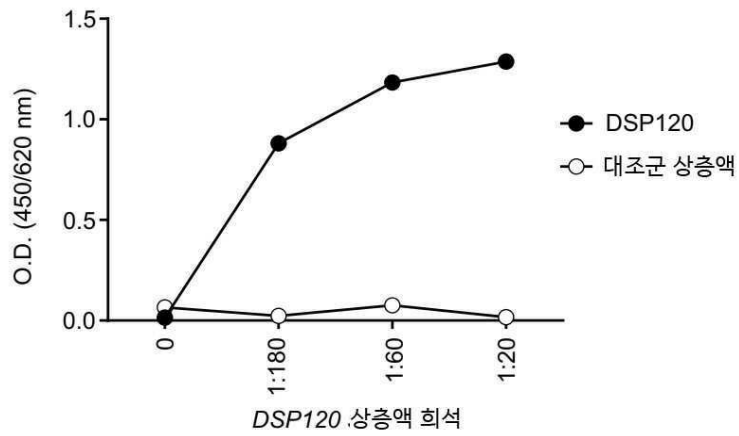


NR

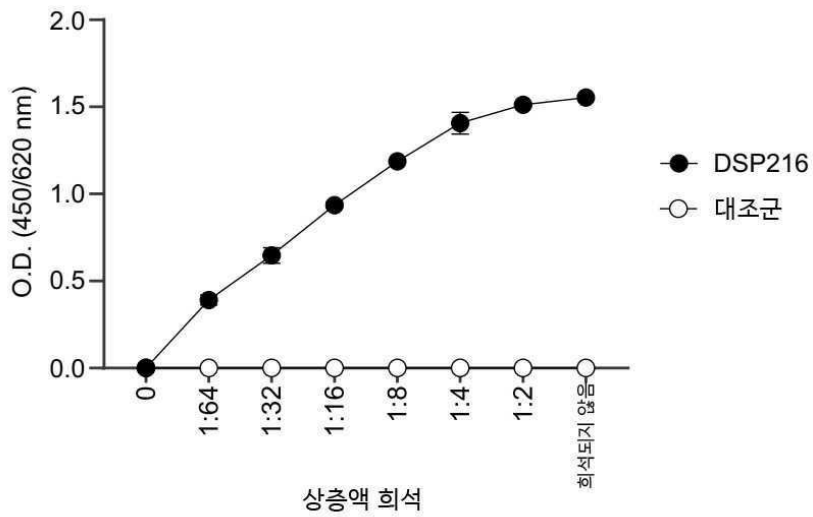
도면8a



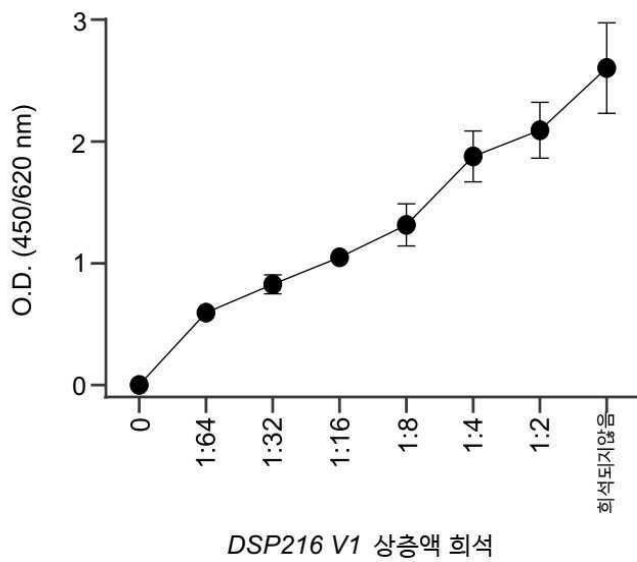
도면8b



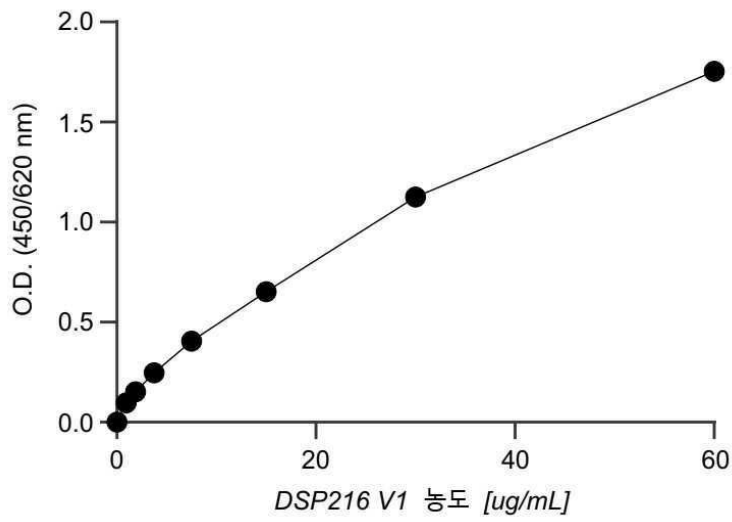
도면9a



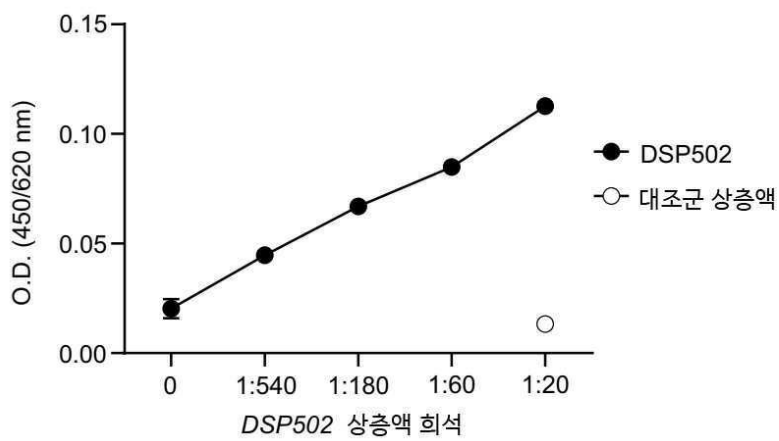
도면9b



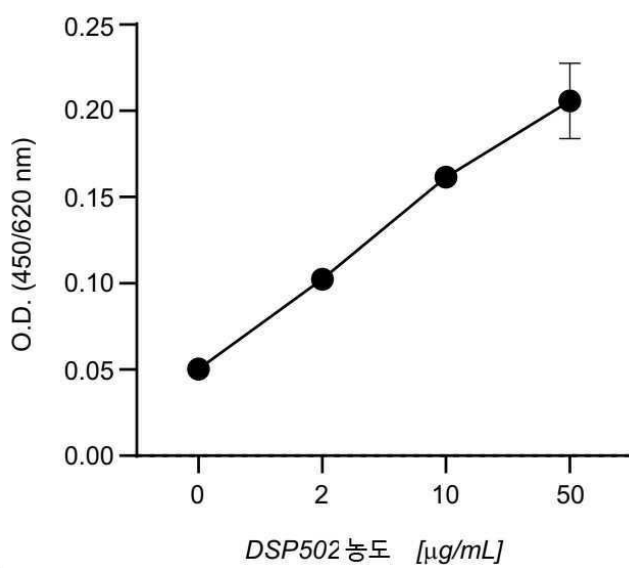
도면9c



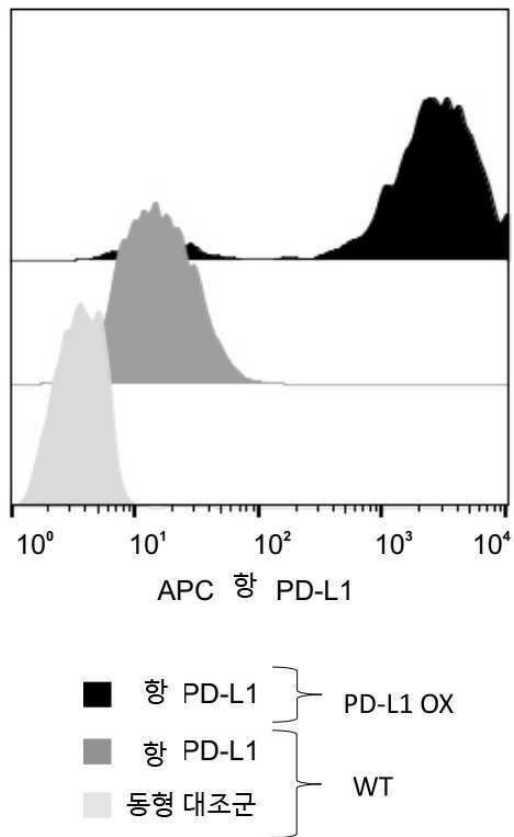
도면10a



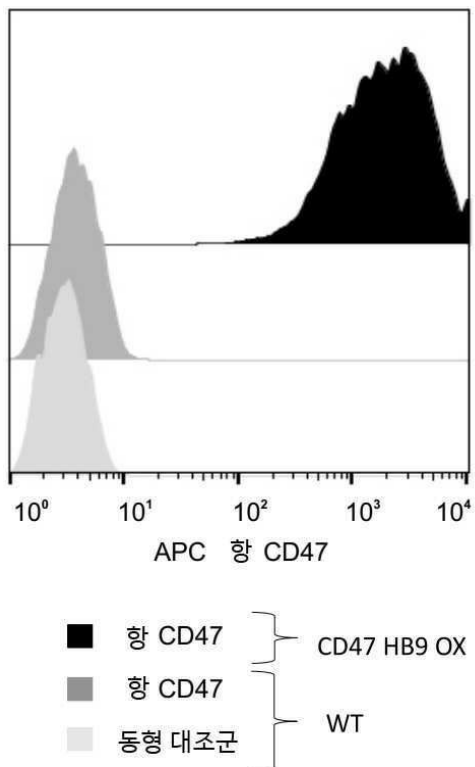
도면10b



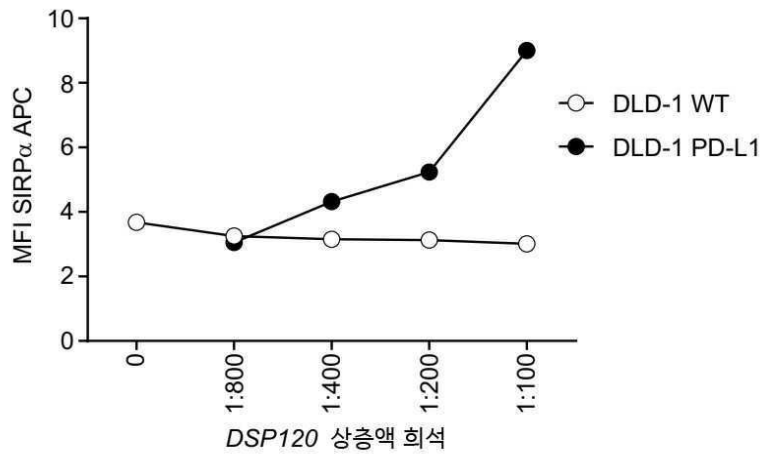
도면11a



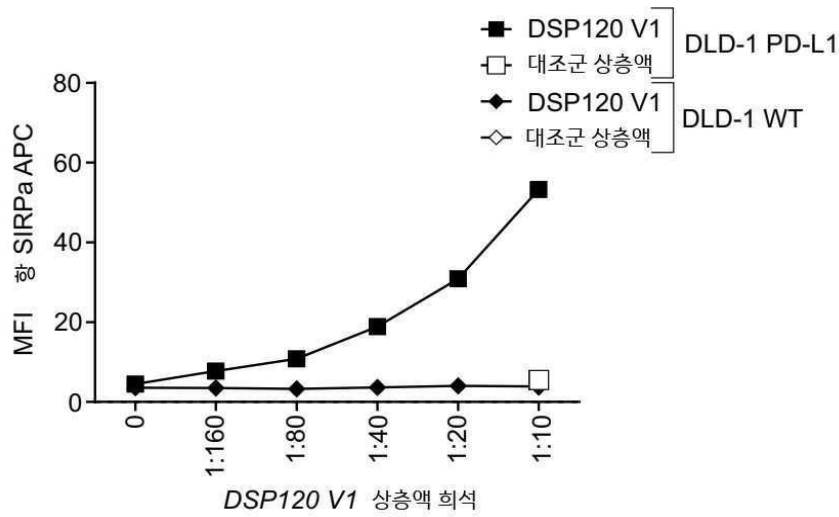
도면11b



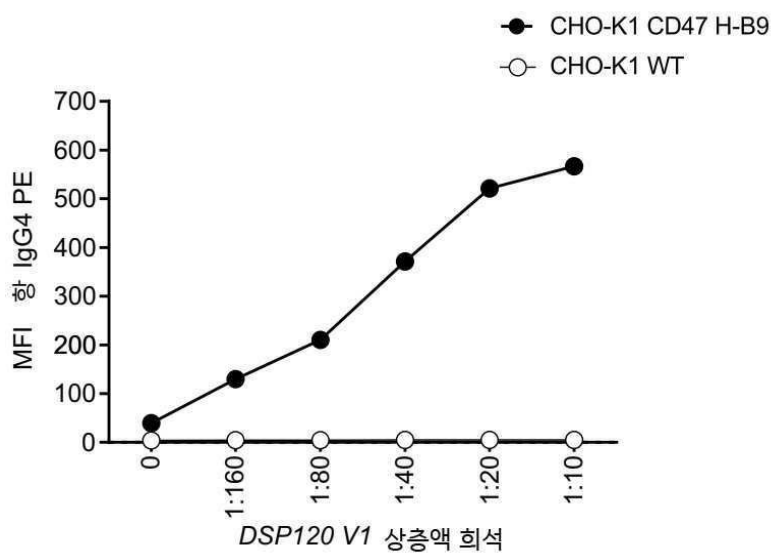
도면11c



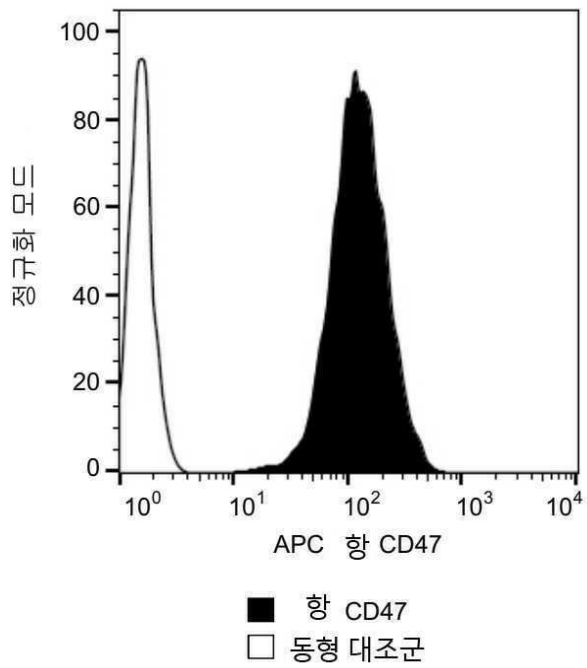
도면11d



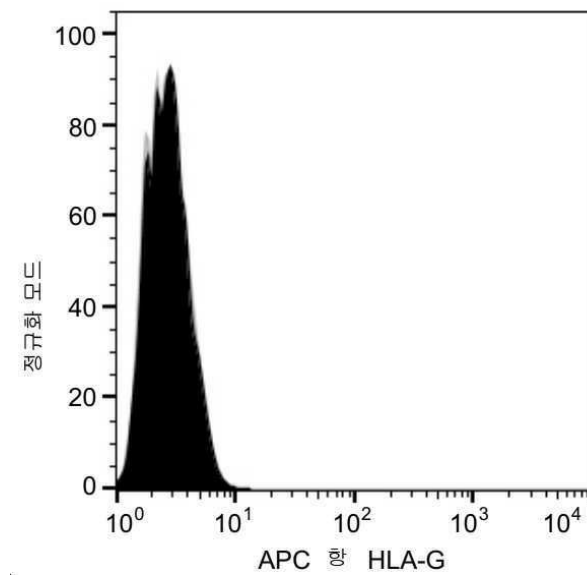
도면11e



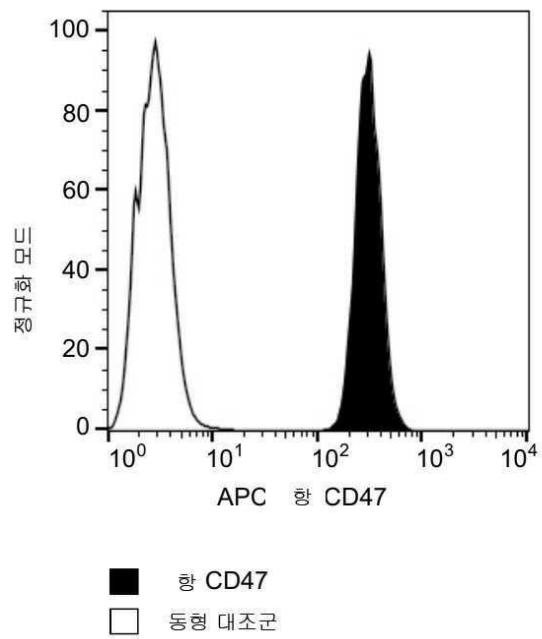
도면12a



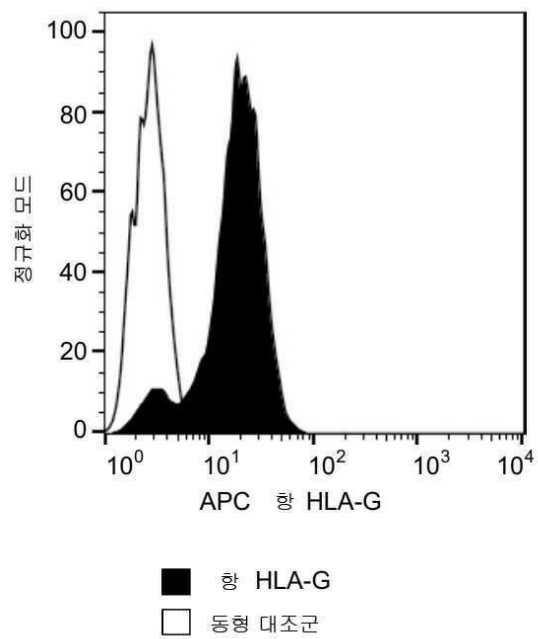
도면12b



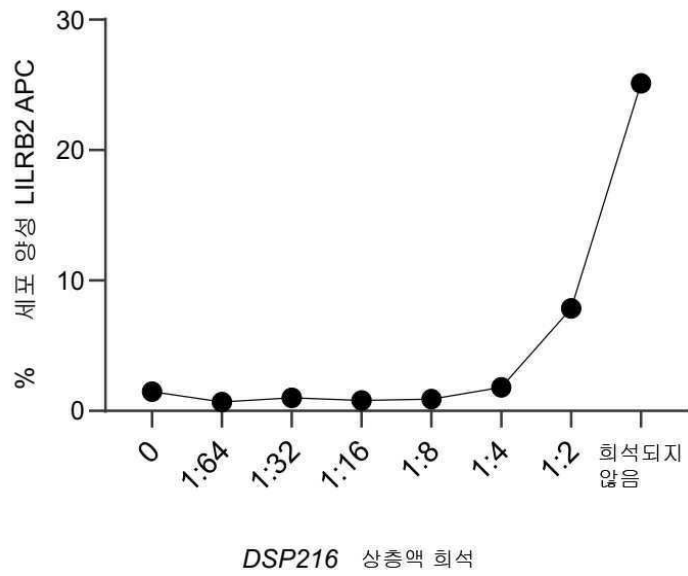
도면12c



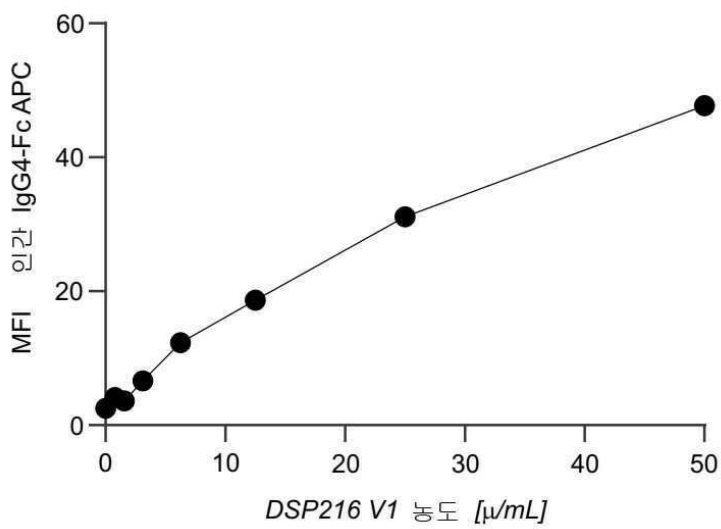
도면12d



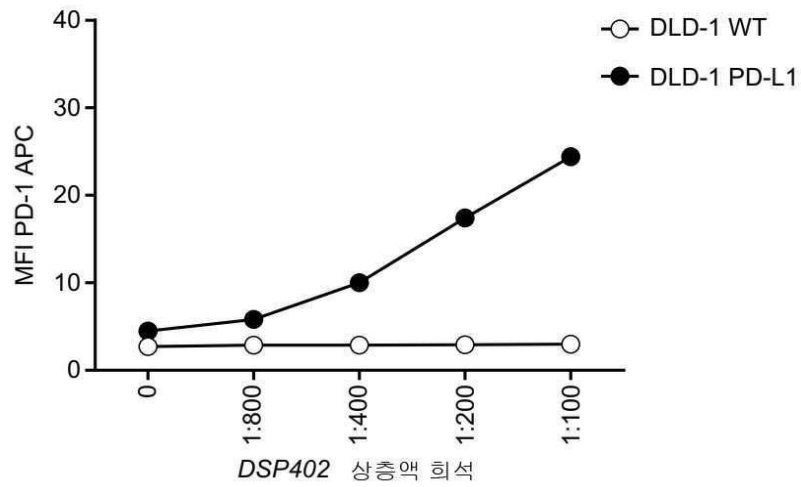
도면12e



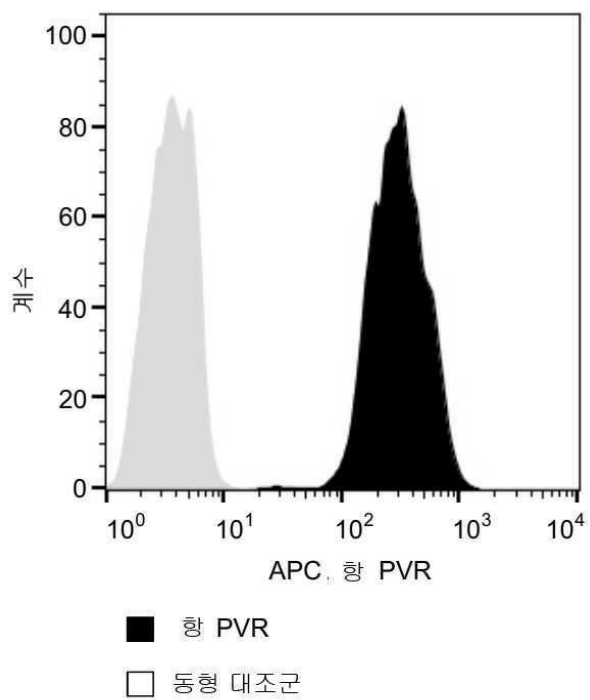
도면12f



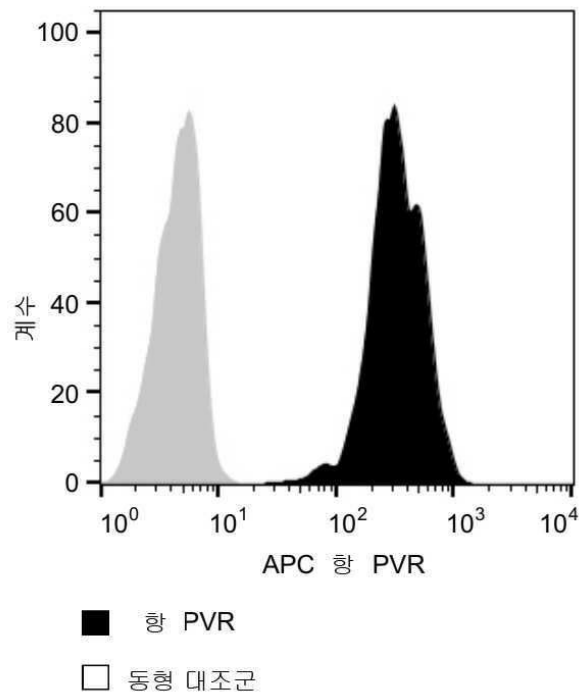
도면13



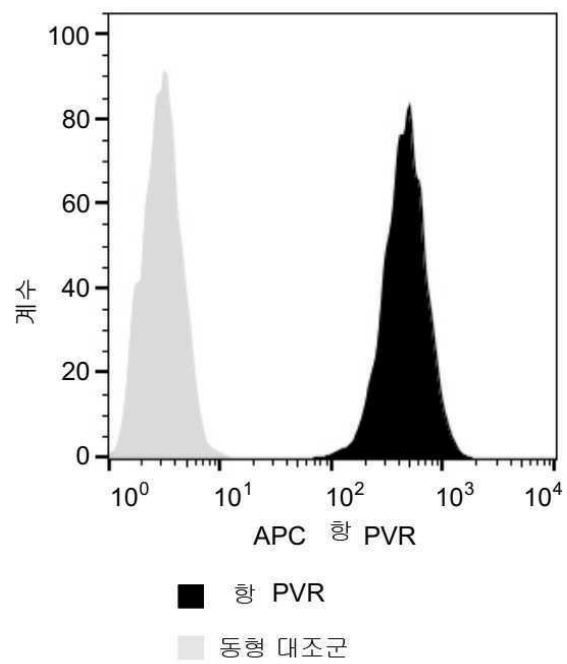
도면14a



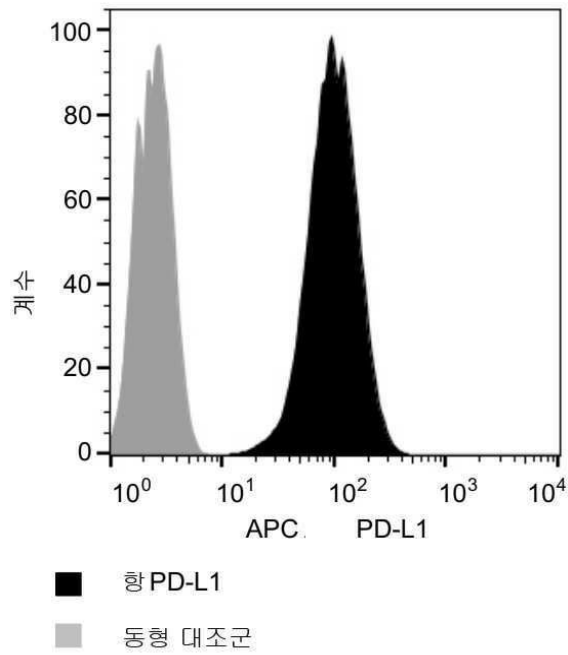
도면14b



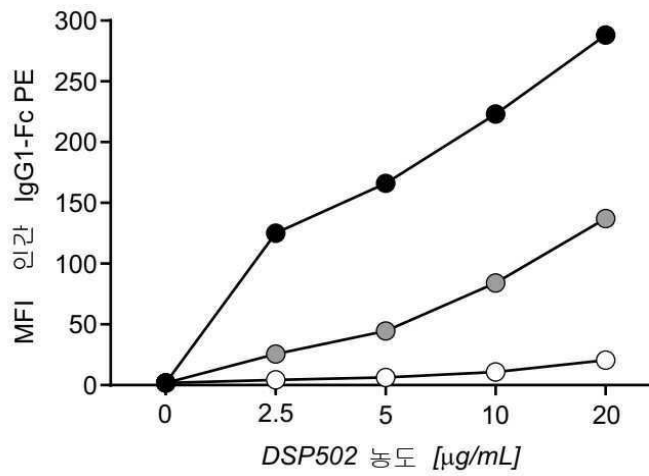
도면14c



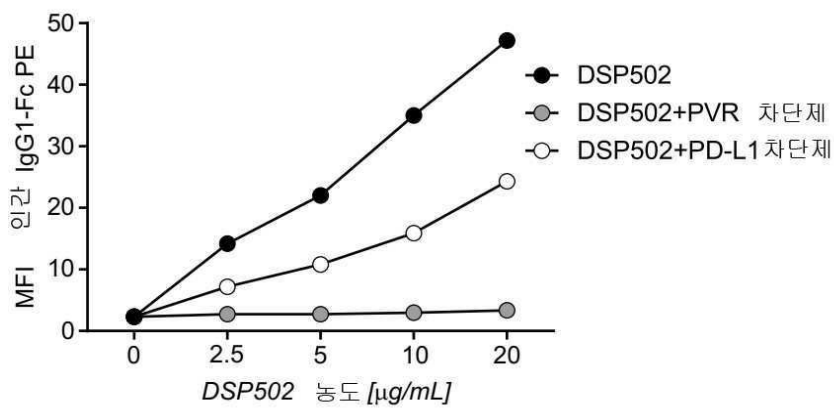
도면14d



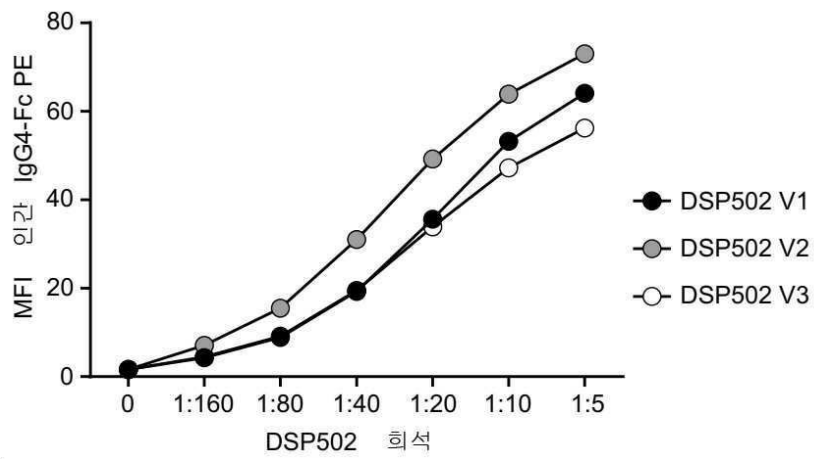
도면14e



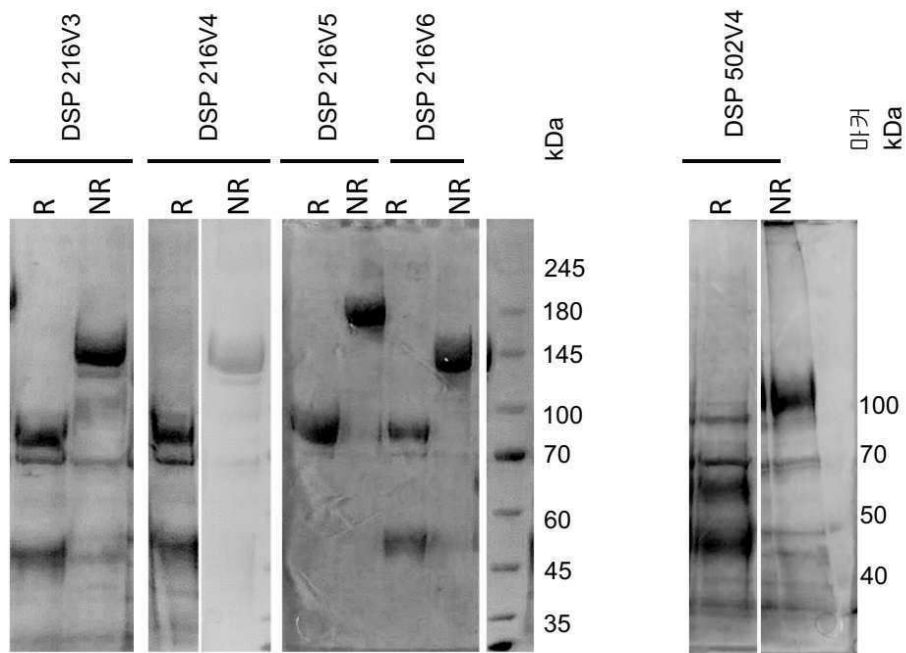
도면14f



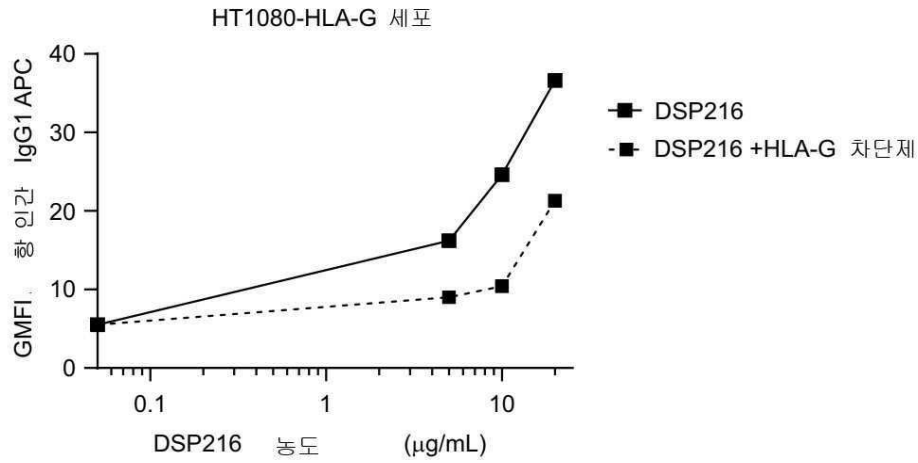
도면14g



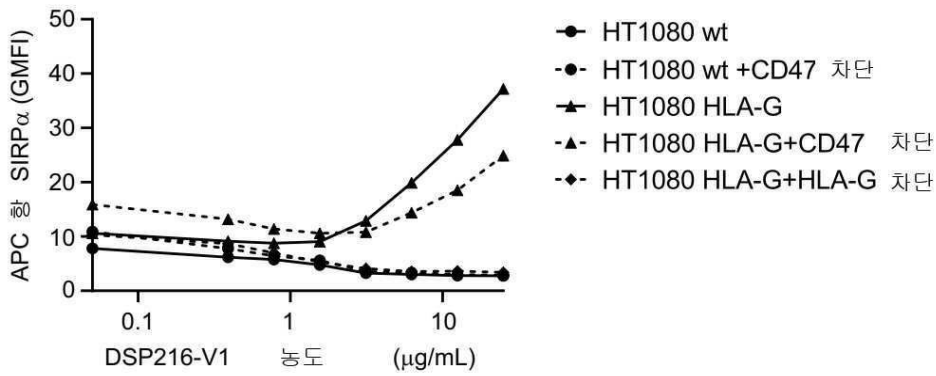
도면15



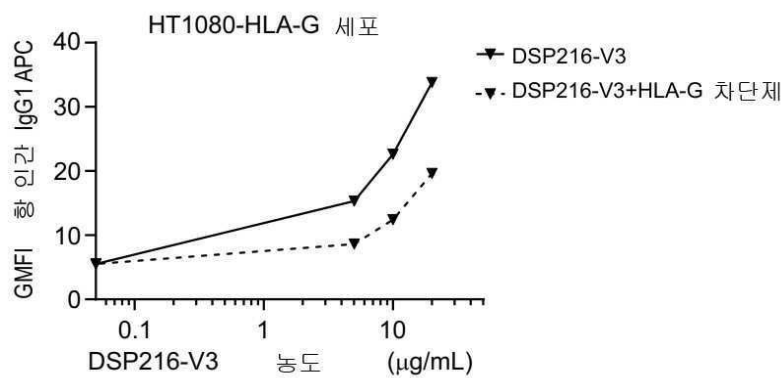
도면16a



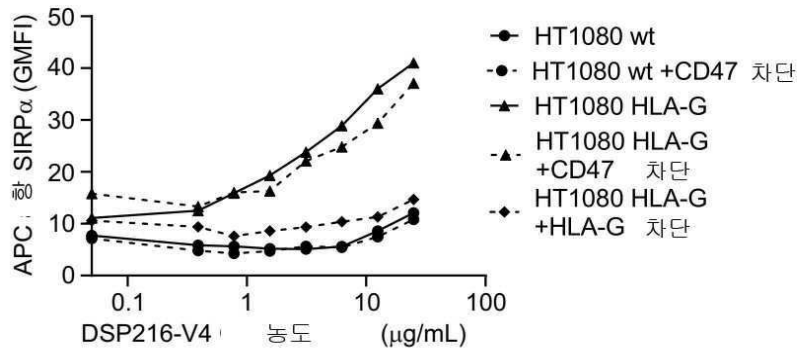
도면16b



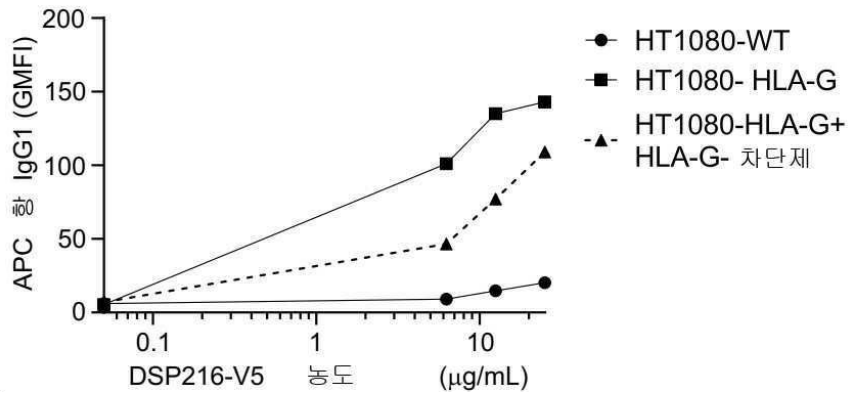
도면16c



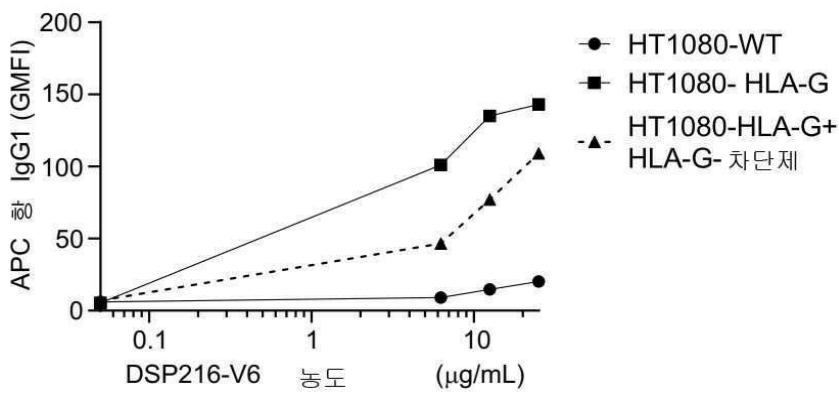
도면16d



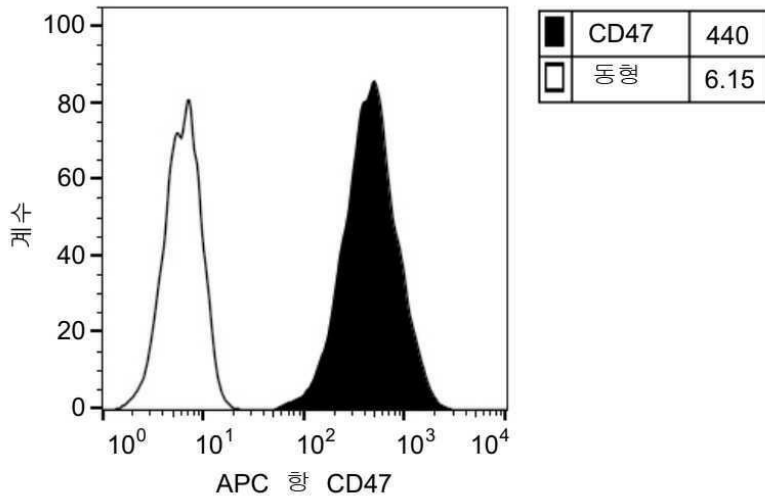
도면16e



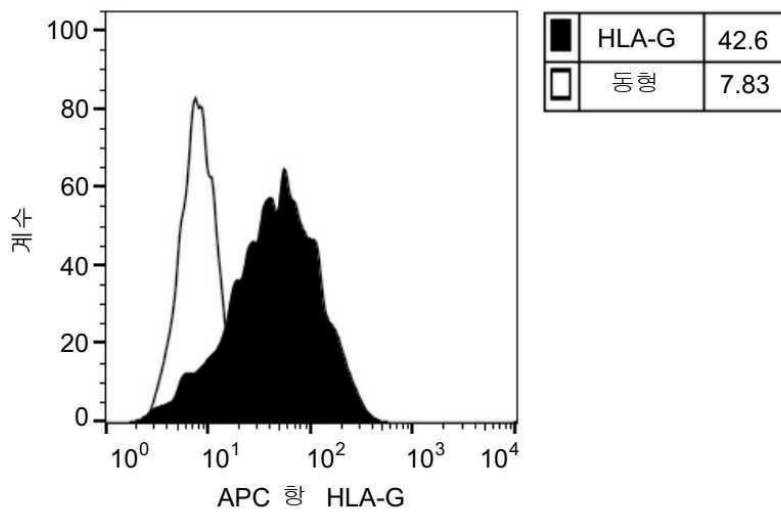
도면16f



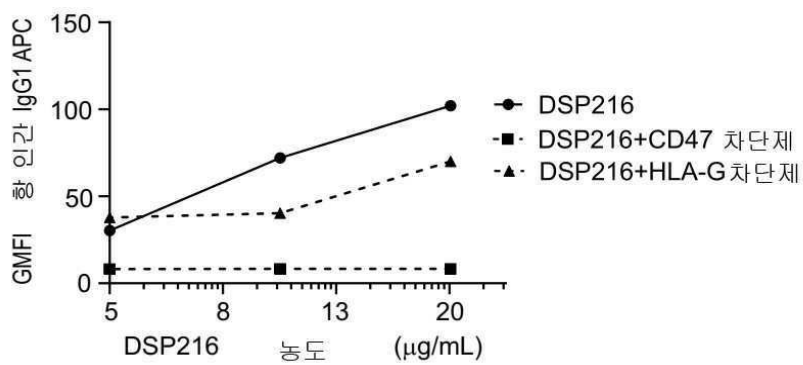
도면17a



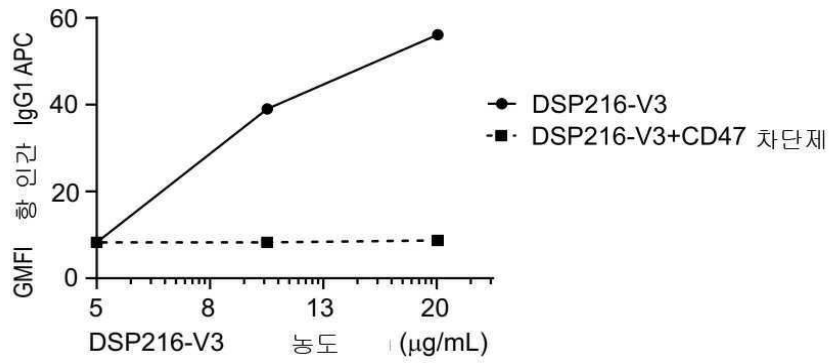
도면17b



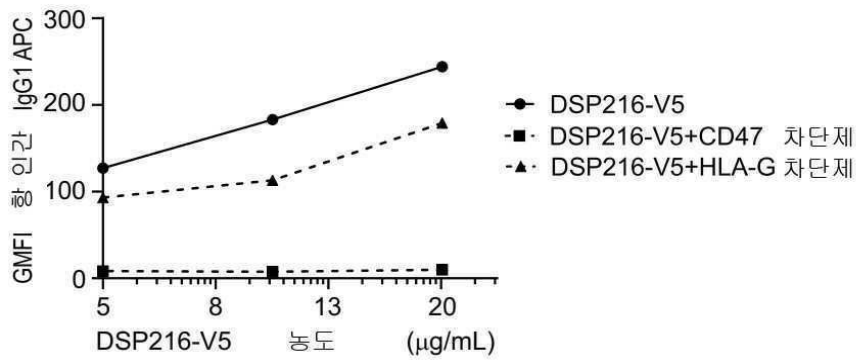
도면17c



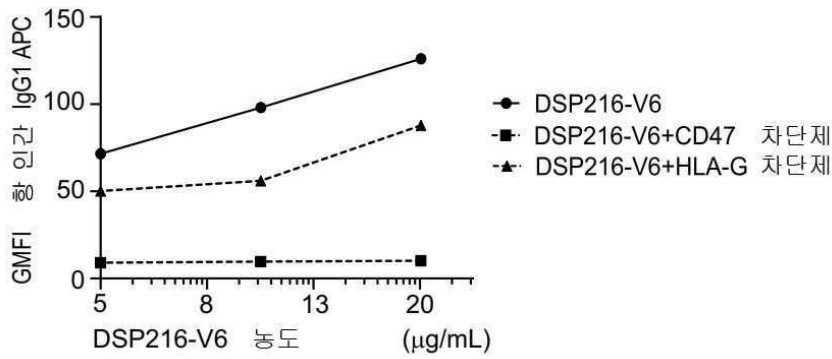
도면17d



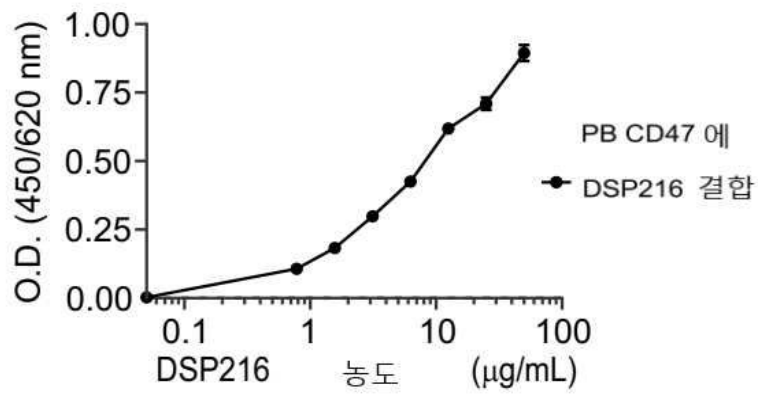
도면17e



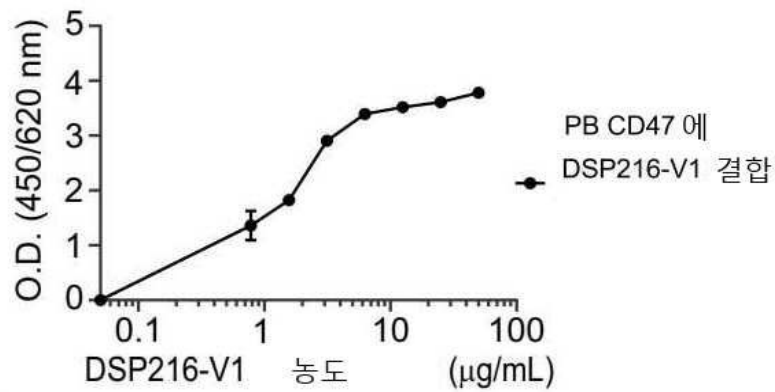
도면17f



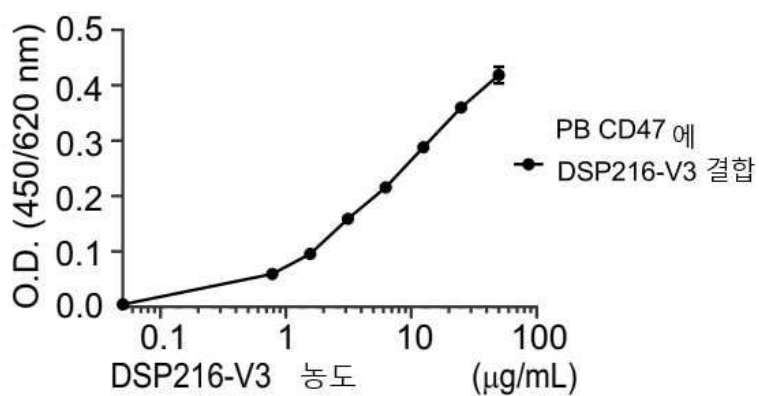
도면18a



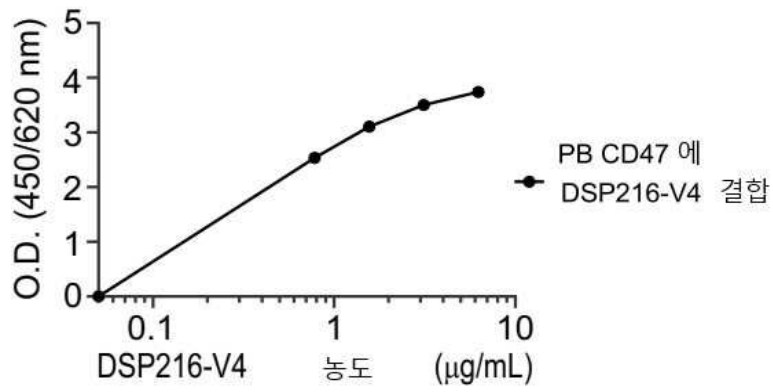
도면18b



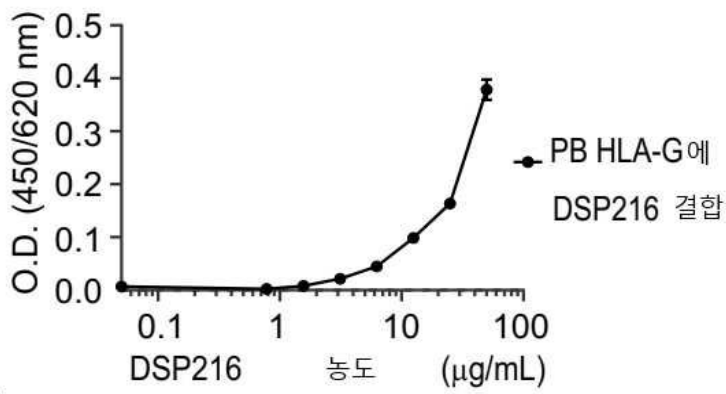
도면18c



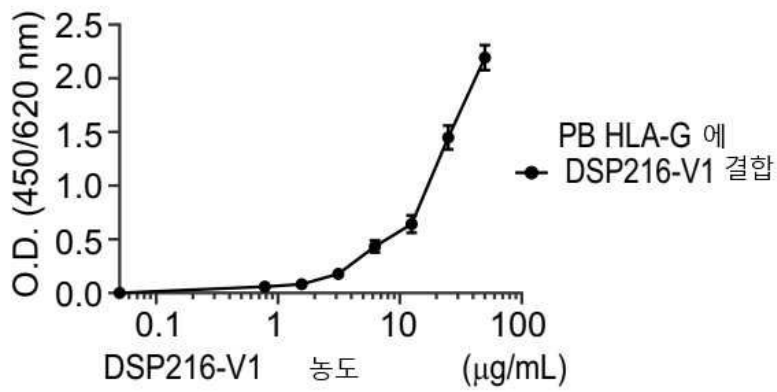
도면18d



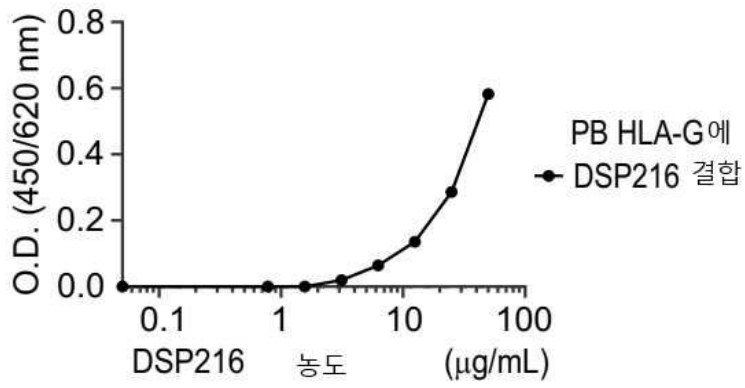
도면18e



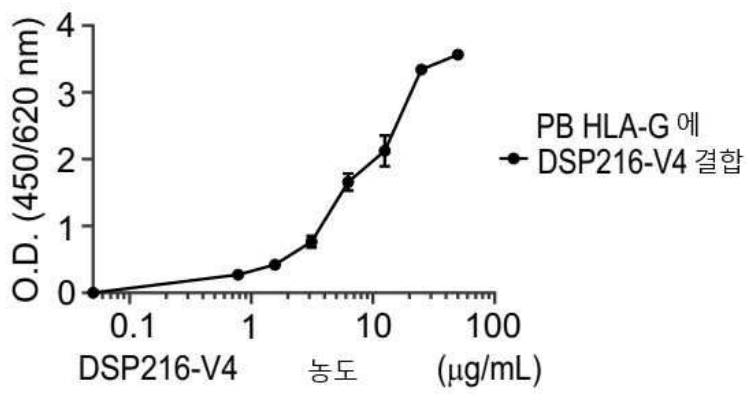
도면18f



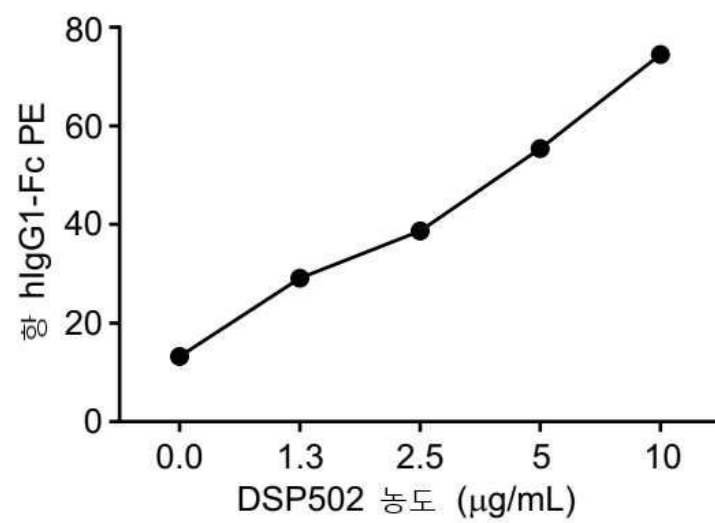
도면18g



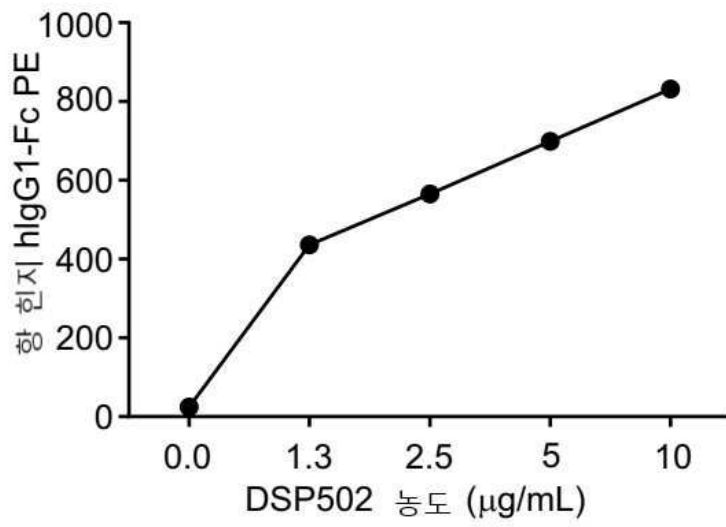
도면18h



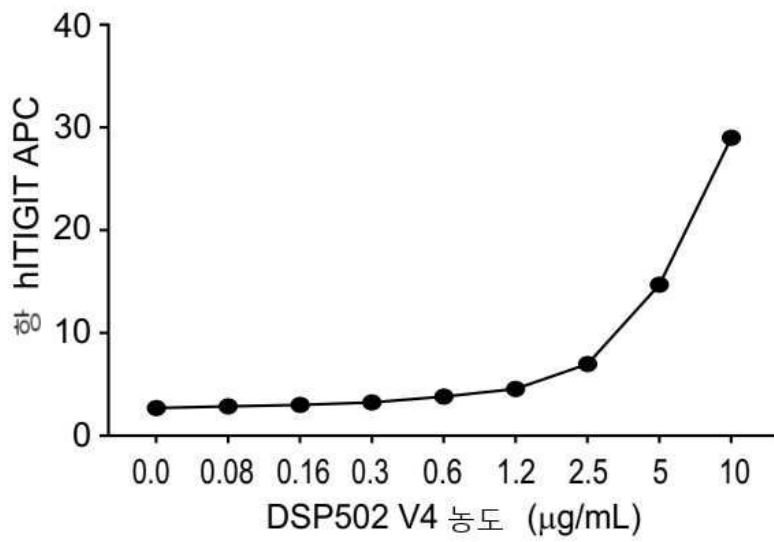
도면19a



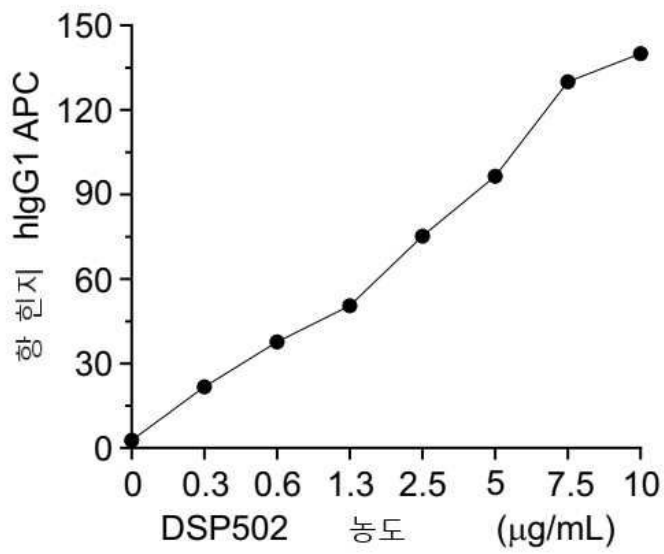
도면19b



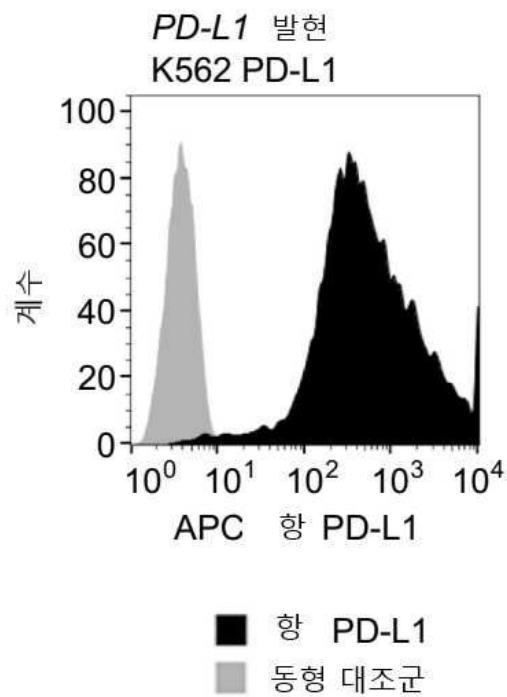
도면19c



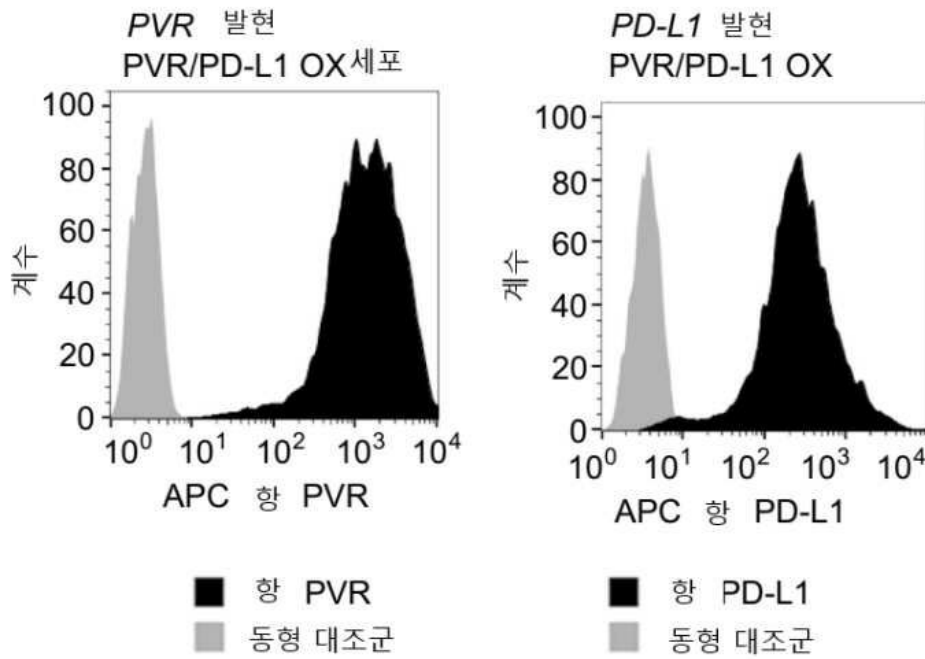
도면19d



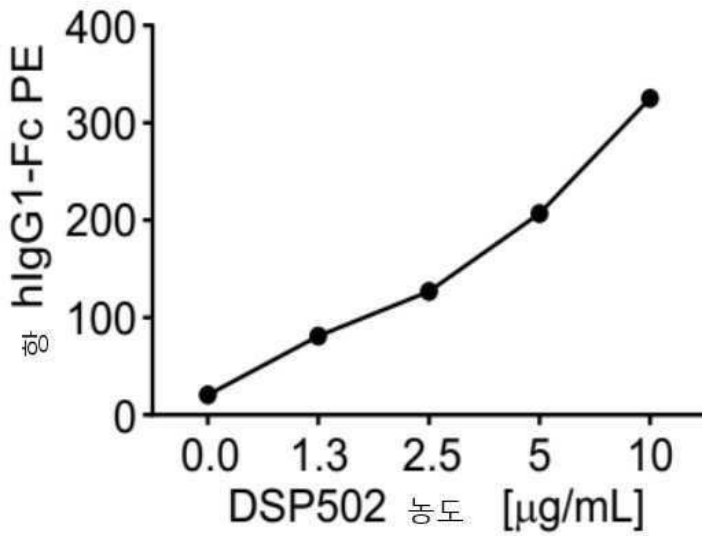
도면19e



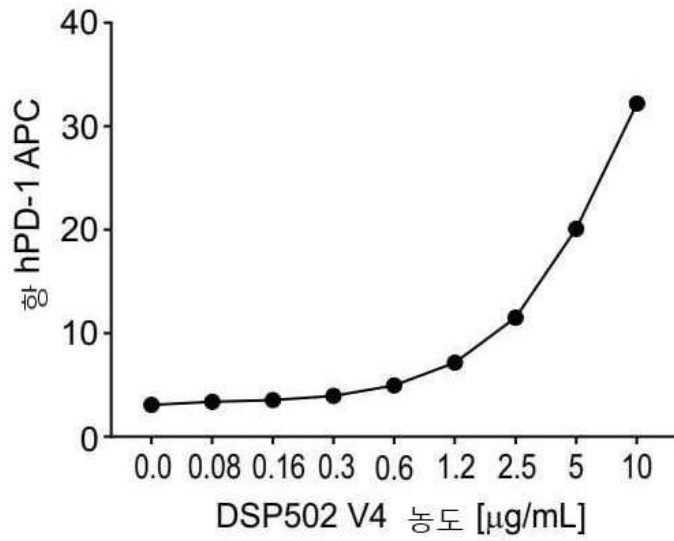
도면19f



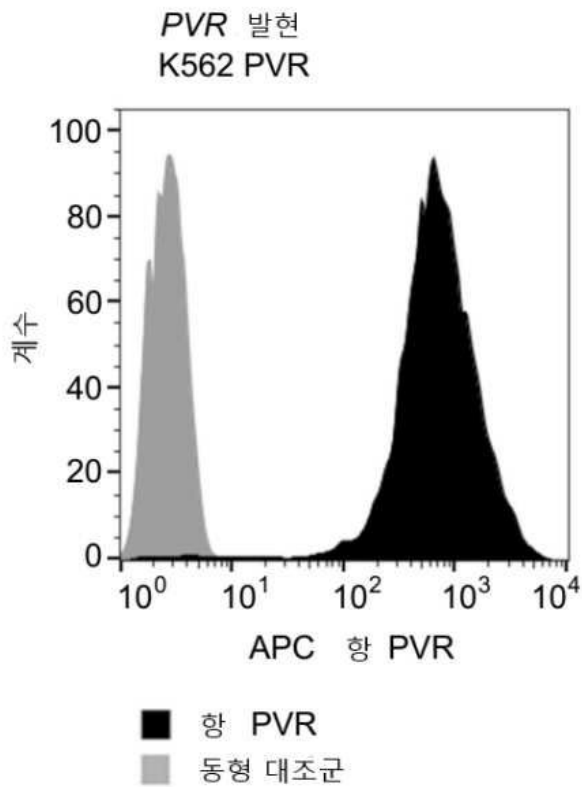
도면19g



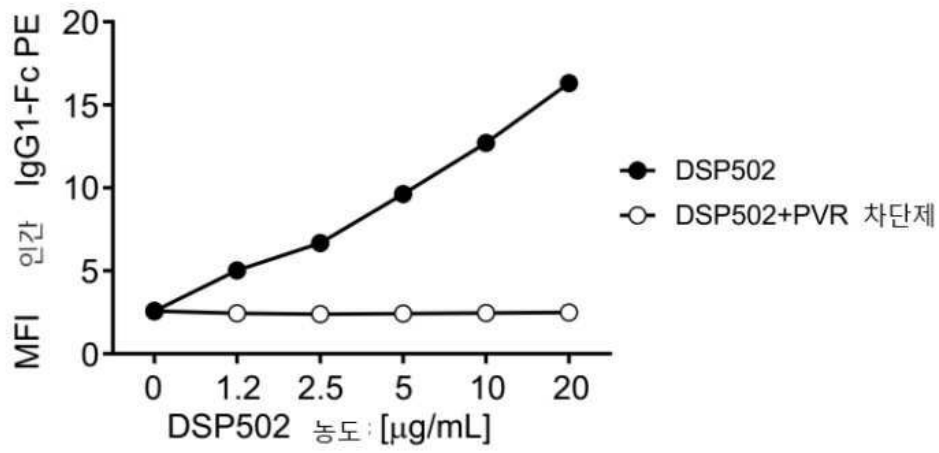
도면19h



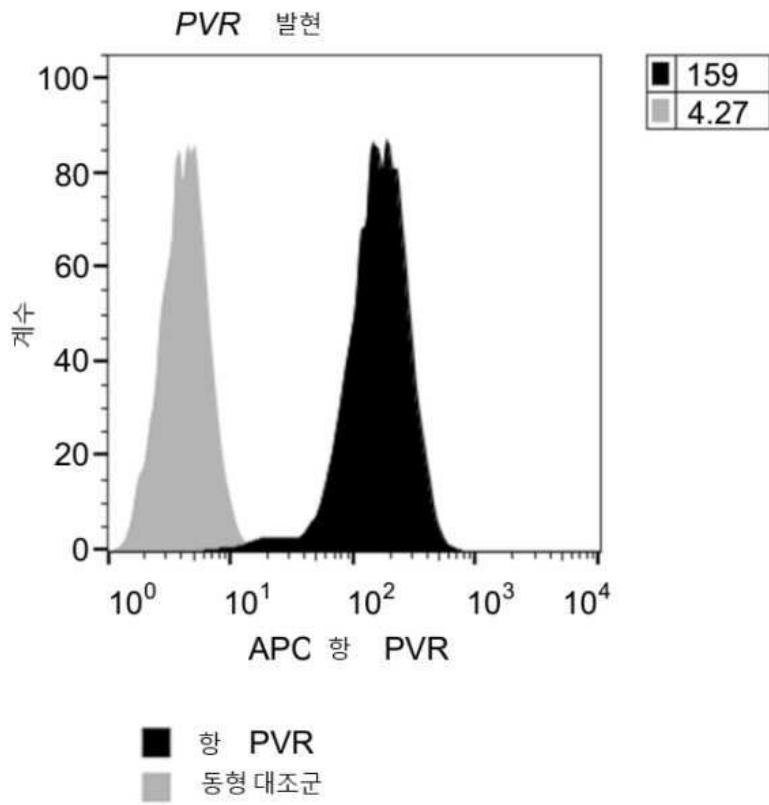
도면19i



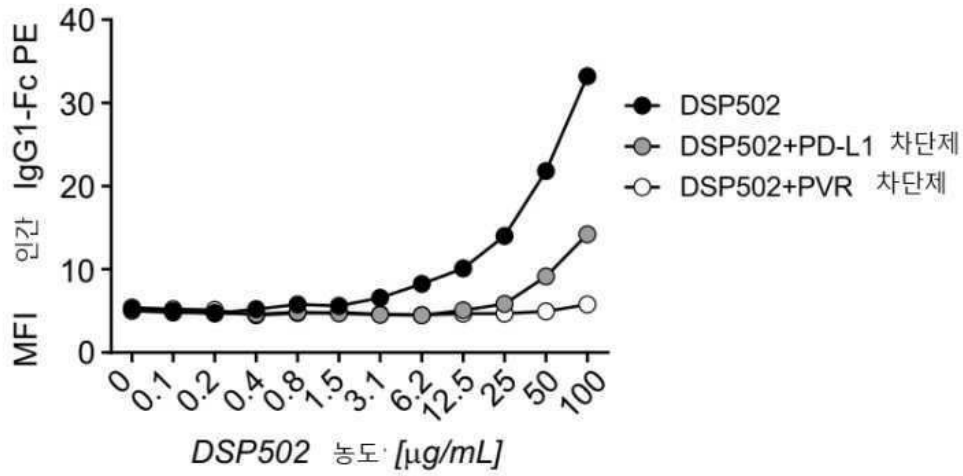
도면20a



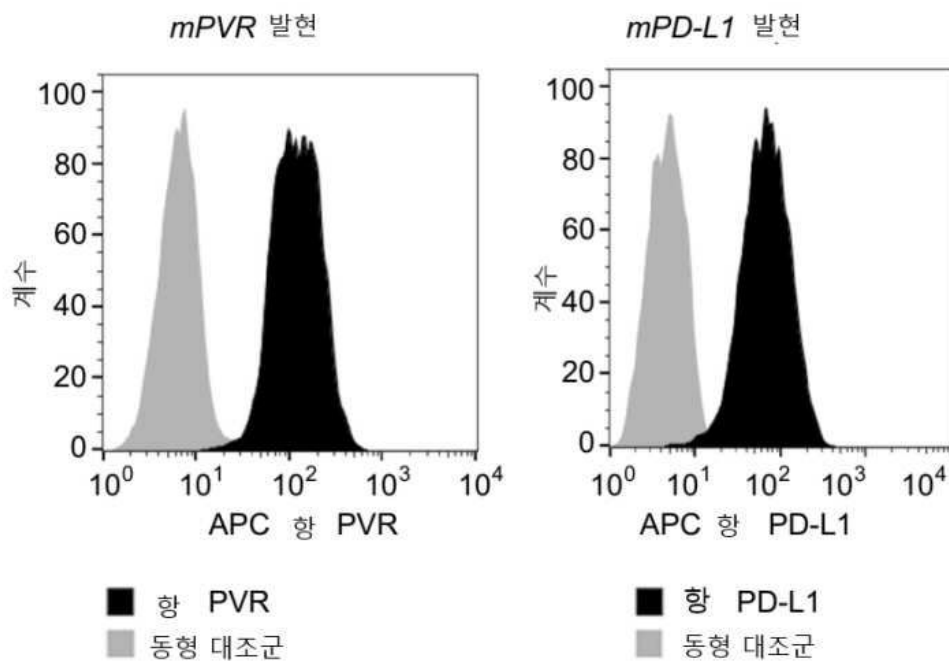
도면20b



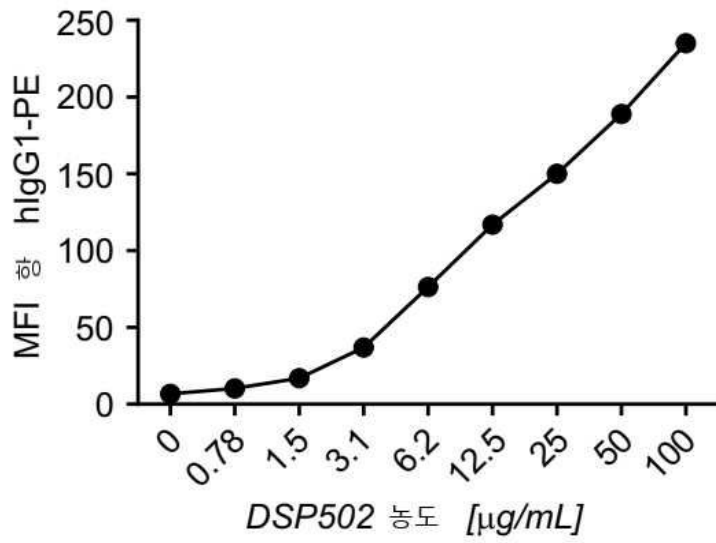
도면21a



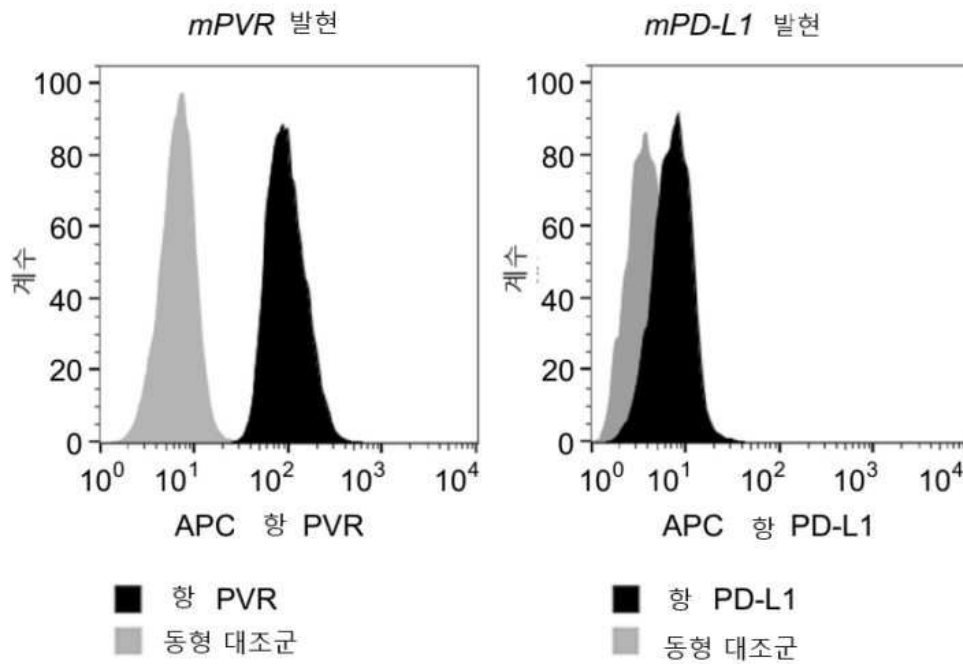
도면21b



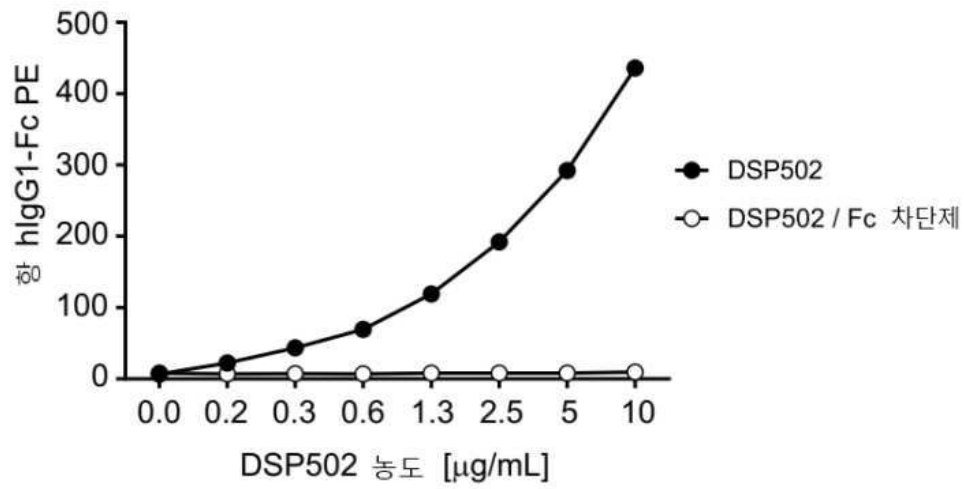
도면22a



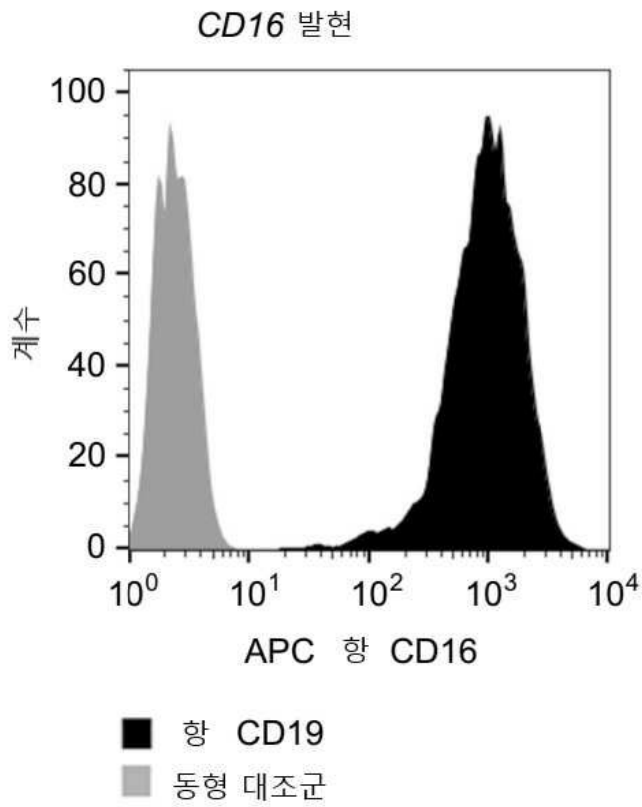
도면22b



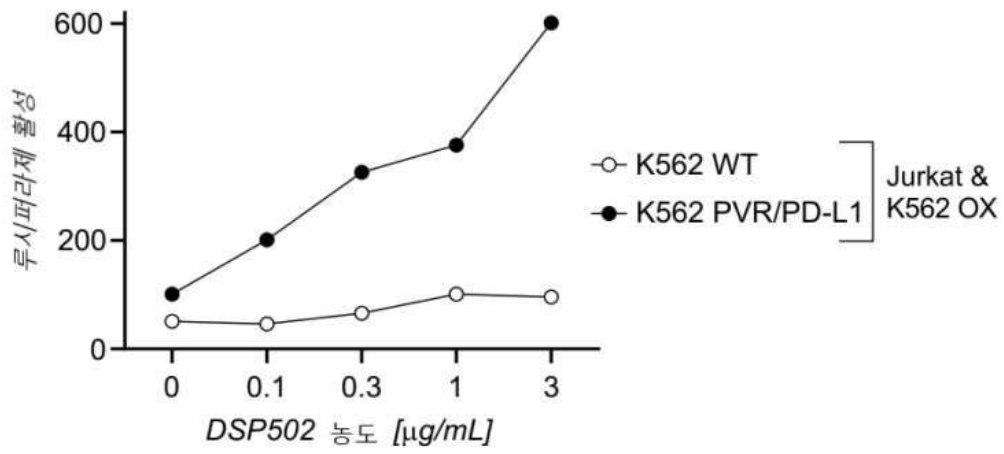
도면23a



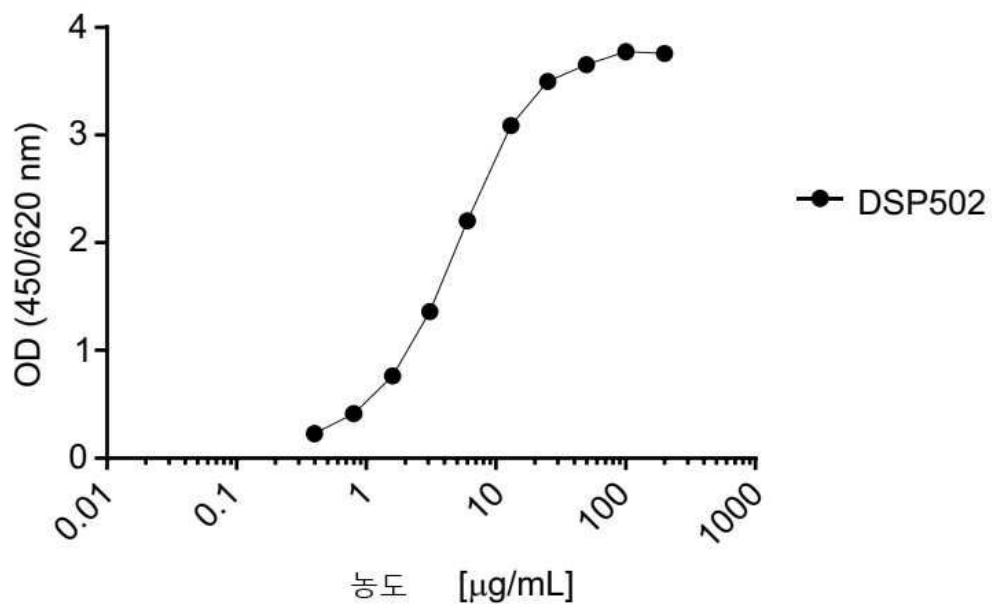
도면23b



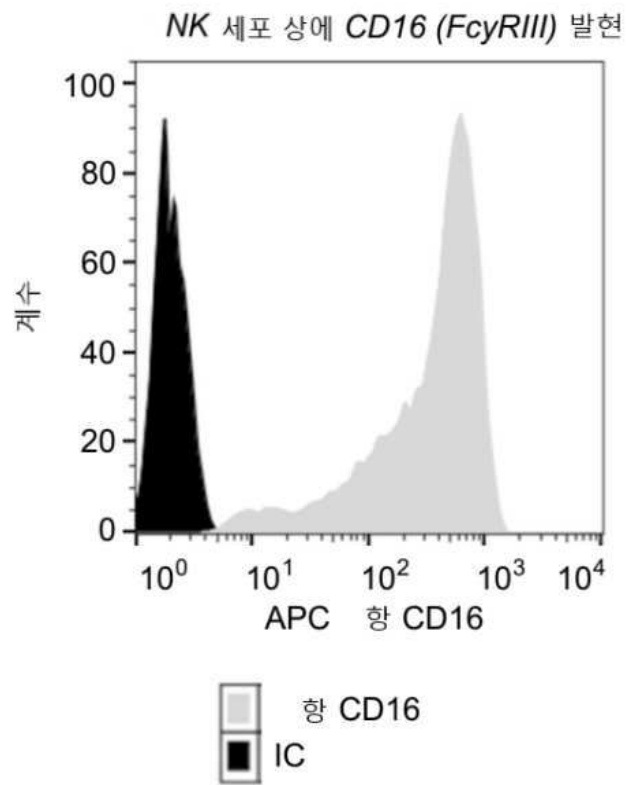
도면24



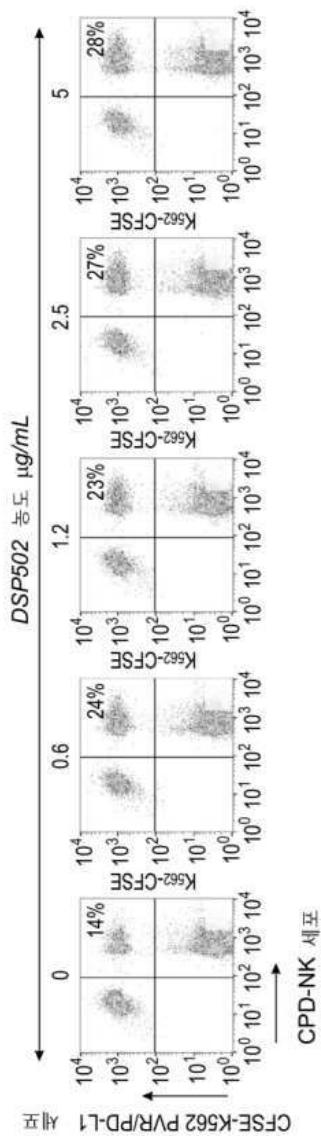
도면25a



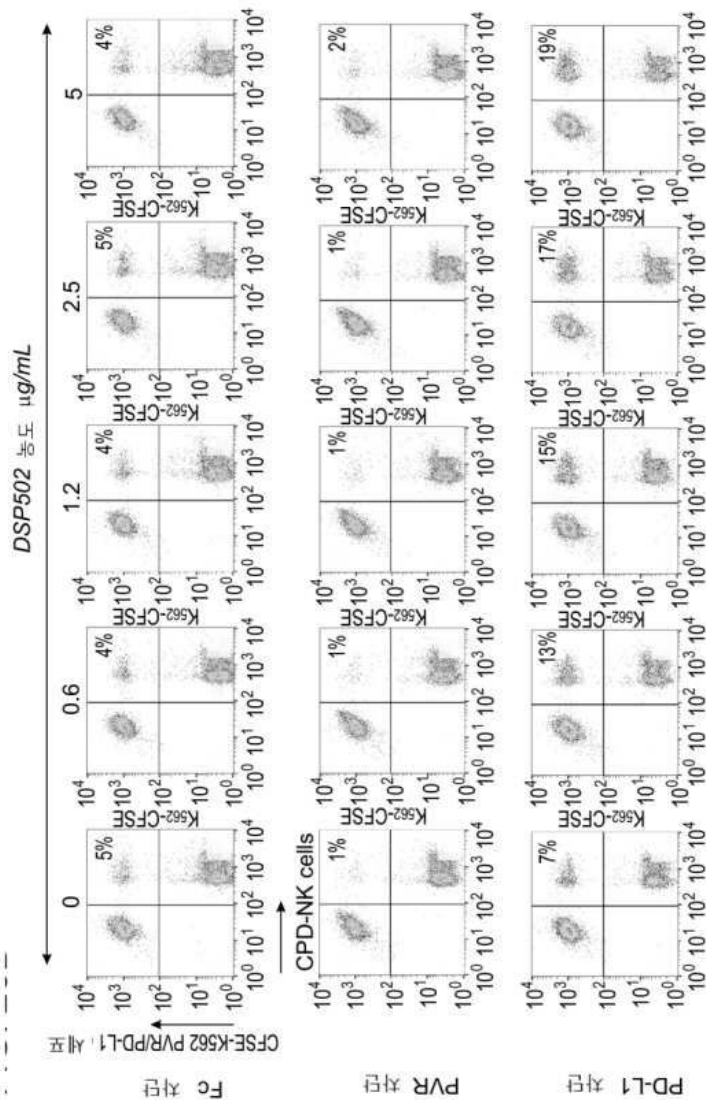
도면25b



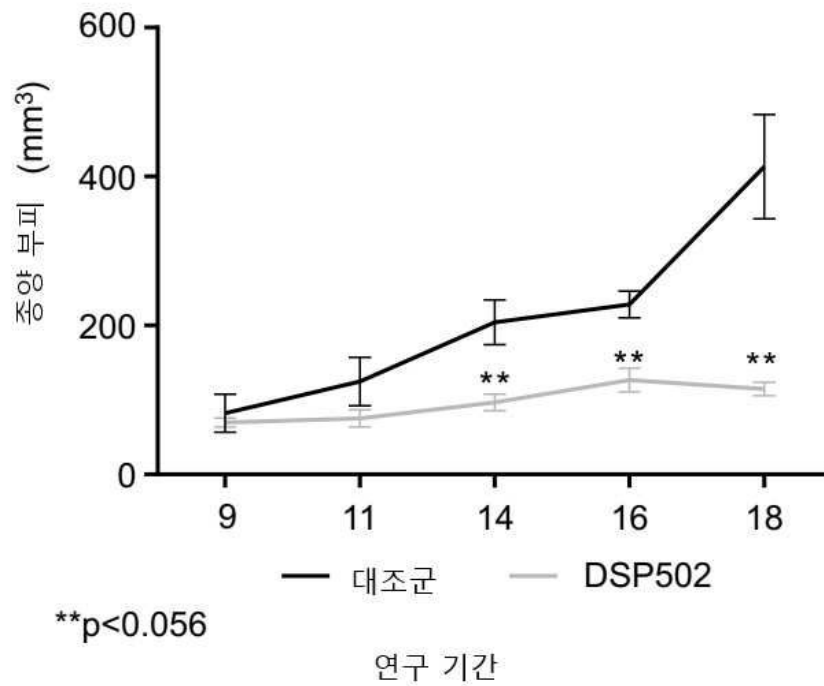
도면25c



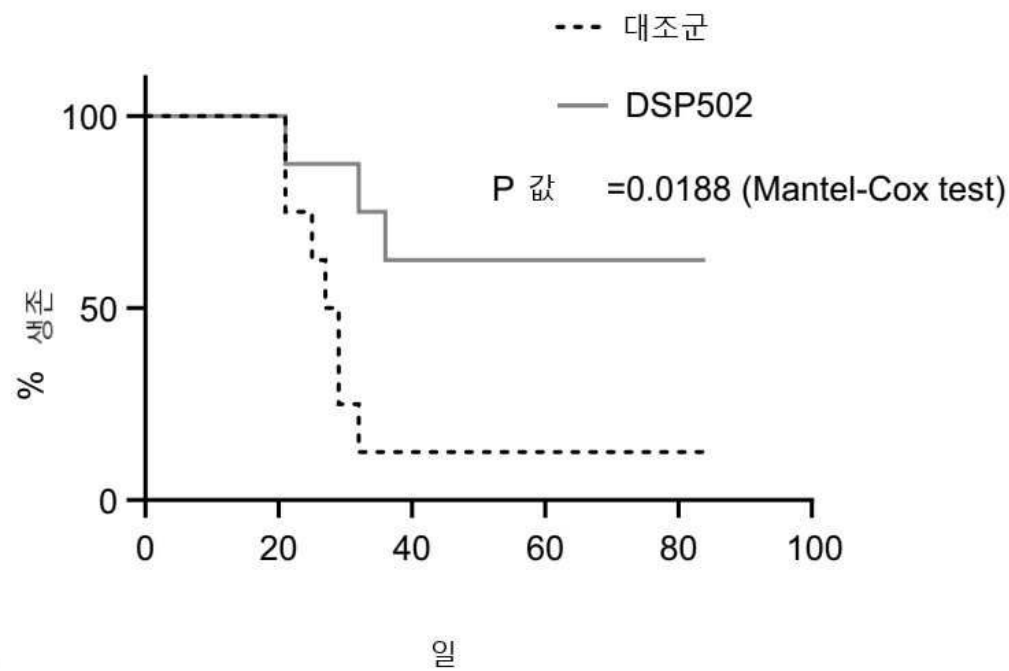
도면25d



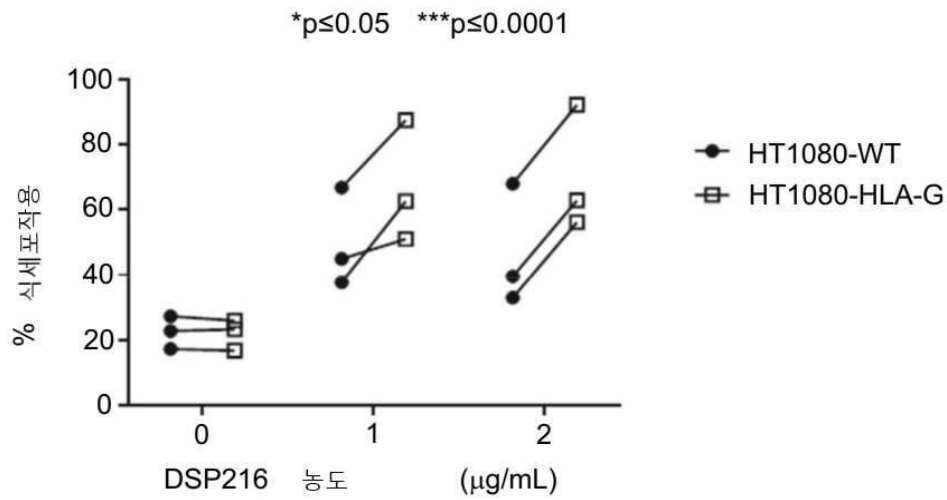
도면26



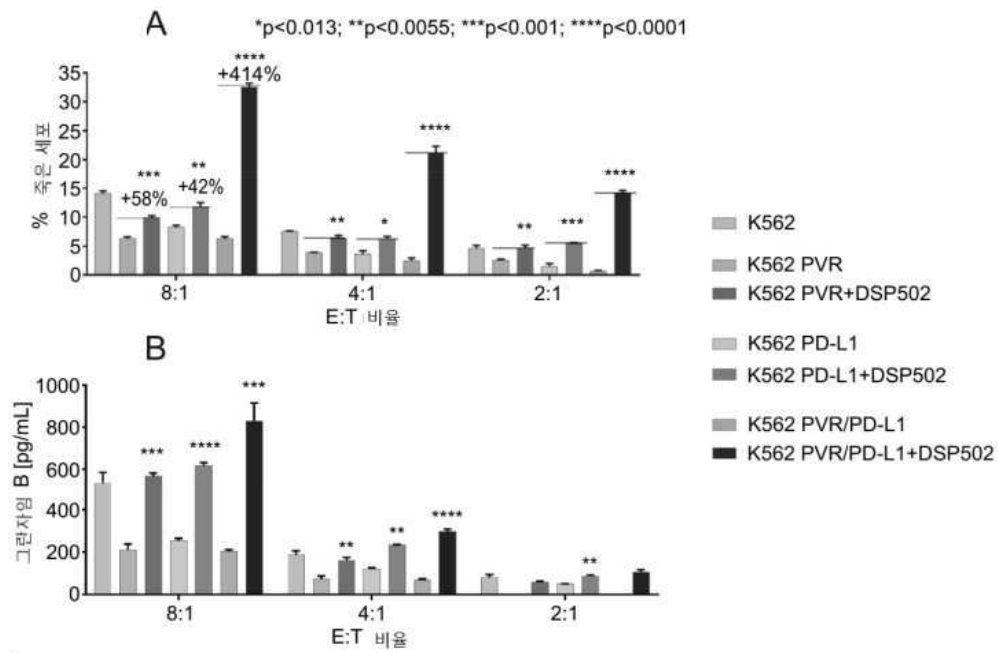
도면27



도면28



도면29



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> KAHN Medical Ltd.

Thomas Jefferson University

TAMIR, Ami

TYKOCINSKI, Mark L.

BREMER, Edwin

<120> TYPE I MEMBRANE PROTEINS HETERODIMERS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 89962

<150> US 63/136,687

<151> 2021-01-13

<150> US 63/139,331

<151> 2021-01-20

<160> 164

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRP Fc(IgG1 knob) 585AA first monomer of DSP120, DSP216, DSP403,

DSP503

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
 305 310 315 320

 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335
 Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 355 360 365
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 370 375 380

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 385 390 395 400
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 405 410 415
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 420 425 430
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 435 440 445

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 450 455 460
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 465 470 475 480
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
 485 490 495
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 500 505 510

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 515 520 525
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 565 570 575

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580 585

<210> 2

<211> 1755

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #1

<400> 2

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagc aggagagacc 60
gccacactga ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtg gaccaatcca gtggtttagg 120
ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg 180
accacagtga gcgacctgac caagcggaac aatatggatt tttccatcag aatcggaat 240
atcacacctg ccgacgcccg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctccccagac 300

gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gccttccgcc 360
ccagtgggtgt ctggaccagc agccagagcc accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420
gagtctcagc gctttagccc ccgggacatc accctgaagt ggttcaagaa cggaatgag 480
ctgtctgact ttcagaccaa cgtggacccc gtgggagagt ctgtgagcta ttccatccac 540
tctacagcca aggtgggtgt gacccgcgag gacgtgcaca gccaggatcat ctgcgaggtg 600
gcacactga cctgcaggg cgatcctctg aggggcacag ccaatctgag cgagaccatc 660
agagtcccc ctacactgga ggtgacccag cagcccgtgc gcgcagagaa ccaagtgaat 720

gtgacatgtc aggtgaggaa gttctaccct cagcgccctgc agctgacctg gctggagaac 780
ggcaactga gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
aattggatgt ctgggtgt ggtgaacgtg agcgcccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960
gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgcccaga ataccggcag caacgagcgg 1020
aatatctacg gaggaggagg cagcggagga ggaggctccg agcctaagag ctccgacaag 1080
accacacat gccaccatg tctgcacca gagctgtctg gaggaccttc cgtgttctg 1140

tttctccaa agccaaagga tacactgatg atctccagaa caccagaggt gacctgcgtg 1200
gtggtggacg tgtctcacga ggaccccgag gtgaagtta actggtacgt ggacggcgtg 1260
gaggtgcaca atgccaagac caagccaagg gaggagcagt acaactccac atatcgctg 1320
gtgtctgtgc tgaccgtgtc gcaccagat tggctgaacg gcaaggagta taagttaag 1380
gtgagcaata aggccctgcc cgcccctatc gagaagacca tctccaagc aaaggacag 1440
cccaggagc ctcagggtga cacactgcc ccttgccgag acgagctgac caagaaccag 1500
gtgtctctgt ggtgtctgtt gaagggttc taccatctg acatcgccgt ggagtgggag 1560

agcaatggcc agcccagaaa caattacaag accacaccac ccgtgctgga cagcgtggc 1620
tccttctttc tgiattccaa gctgacagt gacaagtctc ggtggcagca gggcaacgtg 1680
ttttctgtt ctgtgatgca cgaggccctg cacaatcact ataccagaa gagcctgtcc 1740
ctgtctcccg gcaag 1755

<210> 3

<211> 382

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 Fc (IgG1 hole) 382 AA second monomer of DSP120, DSP220, DSP402, DSP502

<400> 3

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

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

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

130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr		
145	150	155
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
	165	170
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	180	185
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		

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

260 265 270
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 275 280 285
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 290 295 300
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

325 330 335
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 340 345 350
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 355 360 365
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 4

<211> 1146

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of# 3

<400> 4

gattcacccg atagaccttg gaaccacact accttctccc cgcacctgct ggtggtgaca 60
 gagggcgaca atgccacett cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc ttctgtgctg 120
 aattggtaca ggatgagccc ctccaaccag acagataagc tggccgcatt tccagaggac 180

cgcagccagc caggacagga ttcccgggtc agagtgaccc agctgcctaa tggccgggac 240
 ttccatgt ctgtggtgag agcccggaga aacgatagcg gcacatacct gtgcggagcc 300
 atctccctgg ccctaagc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc 360
 gagaggaggg cagagggtgcc aacagcacac ctttctccaa gccccgggcc tgcaggacag 420

ggaggaggag gctccggcgg cggcgggtct gagccaaaga gctccgacaa gaccacaca 480
 tgcccacat gtccagcacc agagctgctg ggaggaccta gcgtgttcct gtttctcca 540
 aagccaaagg atacctgat gatctctagg accccagagg tgacatgcgt ggtgggtggac 600
 gtgagccacg aggaccccg ggtgaagttt aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 660
 aacgccaaga caaagcctag ggaggagcag tacaattcta cctatcgctg ggtgagcgtg 720
 ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgtccaac 780
 aaggccctgc ctgcccgaat cgagaagacc atctctaagg caaagggaca gccccgggag 840

cctcaggtgt gcacctgcc cccatgcaga gacgagctga caaagaatca ggtgtccctg 900
 tcttgtgccg tgaagggtt ctacccagc gacatcgagc tggagtggga gtccaacgga 960
 cagcctgaga acaattataa gaccacacca cccgtgctgg actctgatgg cagcttcttt 1020
 ctggtgtcca agctgaccgt ggacaagtct cgggtggcagc agggcaacgt gtttagctgc 1080
 tccgtgatgc acgaagcact gcacaaccac tacaccaga agtcactgtc actgtccca 1140
 ggaaag 1146

<210> 5

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRP alpha (IgG4 knob) 582 AA first monomer of DSP120V1,
 DSP216V1, DSP403V1, DSP503V1

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

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

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
305 310 315 320
Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
325 330 335
Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
340 345 350
Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
355 360 365
Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
370 375 380
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
385 390 395 400
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
405 410 415
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
420 425 430
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
435 440 445
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
450 455 460
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
465 470 475 480
Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
485 490 495
Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
500 505 510
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
515 520 525
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
530 535 540
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

545	550	555	560
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
	565	570	575
Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	580		
<210> 6			
<211> 1746			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> NA of#5			
<400> 6			
gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagc aggagagacc			60
gccacactga gatgcaccgc cacaagcctg atcccagtagg gaccaatcca gtggtttagg			120
ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagggtg			180
accacagtgt ccgacctgac caagcggaac aatatggatt tttctatcag aatcggcaat			240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcagaaaggg cagcccagac			300
gatgtggagt ttaagtccgg agcaggaacc gagctgtctg tgagagcaaa gcctagcgcc			360
ccagtgggtgt ccggaccagc agcaagggca accccacagc acacagtgtc cttcacctgt			420
gagtcccacg gcttttctcc acgcgatatc aactgaagt ggttcaagaa cggcaatgag			480
ctgagcgact ttcagaccaa cgtggatccc gtggcgaggt ctgtgagcta ctccatccac			540
tctacagcca aggtgggtgt gacccgggag gacgtgcaca gccaggatcat ctgcgaggtg			600
gcacacgtga cctgcagggt cgatcctctg agaggcacag ccaatctgtc cgagaccatc			660
agggtgcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtag gggcagagaa ccaagtgaat			720
gtgacatgtc aggtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggagaac			780
ggcaatgtga gccgcaccga gacagcctcc accgtgacag agaacaagga cggcacatat			840
aattggatga gctggctgtc ggtgaacgtg tccgccaca gggacgatgt gaagctgacc			900
tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgtcc			960
gcccacccta aggagcagggt ctctaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagaga			1020
aatatctacg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca			1080
tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggaccta gcgtgttctt gtttccccct			1140
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtgggtggac			1200

gtgtctcagg aggatcccg ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggagggtcac 1260
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttactcta cataccgcgt ggtgagcgtg 1320
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1380
aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaagggag 1440

cctcaggtgt gcacactgcc accctctcag gaggagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500
tggtgtctgg tgaagggtt ctaccaagc gacatcgccg tggagtggga gtccaatggc 1560
cagcccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtctg actctgatgg cagcttcttt 1620
ctgtattcta ggctgacagt ggataagac cgctggcagg agggcaacgt gtttagctgt 1680
tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tataccaga agtctctgag cctgtccctg 1740
ggcaag 1746

<210> 7

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 (IgG4 hole) 379 AA Second monomer of DSP120V1, DSP402V1,
DSP502V2, DSP502V3

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

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

355

360

365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

370

375

<210> 8

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#7

<400> 8

gactctccag ataggccttg gaatccccct accttttagcc ccgccctgct ggtggtgaca 60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc ttctgtgctg 120
aattggtaga ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
cgcagccagc caggacagga ttcccgggtc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac 240
tttcacatgt ctgtggtgcg cgcccggaga aacgatagcg gcacatacct gtgcggagca 300

atctccctgg caccaaaggc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc 360
gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccattctcta gccaaggcc agcaggacag 420
ggaggaggag gctctggagg aggaggatcc gagtctaagt acggaccacc atgacctcca 480
tgtctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttcc tgtttccacc taagcctaag 540
gacacctga tgatctccag aacccccgag gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgtctcag 600
gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac gtggatggcg tggaggtgca caacgccaag 660
acaaagcccc gggaggagca gtttaattct acctacagag tggtagcgt gctgacagtg 720

ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag tataagtga aggtgagcaa caaggcctg 780
cctagctcca tcgagaagac catctccaag gccaaggcc agccaagaga gccccaggtg 840
tacacctgc caccagcca gtgcgagatg acaaagaatc aggtgagcct gtctgtgcc 900
gtgaagggt tctacctag cgacatcgca gtggagtggg agtccaacgg acagccagag 960
aacaattata agaccacacc tccagtgtg gactccgatg gctctttctt tctggtgtcc 1020
cggctgaccg tggataagag ccggtggcag gagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1080
cacgaggccc tgcacaacca ctatacacag aagtcctgt ctctgagcct gggcaag 1137

<210> 9

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT Fc (IgG1 Knob) 354 AA first monomer of DSP205, DSP404,
DSP502

<400> 9

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225 230 235 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
245 250 255

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
260 265 270

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
275 280 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

Gly Lys

<210> 10

<211> 1062

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#9

<400

> 10

atgacggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc	60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag	120
gaccagctgc tggccatctc taatgccgat ctgggctggc acatcagccc atcctttaag	180
gatagggtgg caccaggacc aggctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac	240
acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcccgatg gcacctatac aggcagaatc	300
tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggcag cggaggagga	360
ggctccgagc ctaagtctc tgacaagacc cacacatgcc ccccttgtcc tgcaccagag	420

ctgctgggcg gaccttccgt gttcctgttt ccaccaagc caaaggatac cctgatgac 480
tccaggaccc ctgaggtgac atgcgtggtg gtggacgtgt ctcacgagga ccccgaggtg 540
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaatg ccaagacaaa gcctcgggag 600
gagcagtaca atccaccta tagagtgggtg tctgtgctga cagtgtgca ccaggattgg 660
ctgaacggca aggagtataa gtgtaagggtg agcaataagg ccctgccgc ccctatcgag 720
aaaaccatca gcaaggcaaa gggacagcca agggagccac aggtgtacac cctgcctcca 780
tgccgcgacg agctgacaaa gaaccagggtg agcctgtggt gtciggtgaa gggcttctat 840

ccatctgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatggccagc ccgagaacaa ttacaagacc 900
acaccccctg tgetggactc cgatggctct tttttctgt atagcaagct gaccgtggac 960
aagtccagat ggcagcaggg caactgttt tcttcagcg tgatgcacga ggccctgcac 1020
aatcactaca cacagaagtc cctgtctctg agccccggca ag 1062

<210> 11

<211> 645

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB Fc (IgG1 hole) 645 AA second monomer of DSP205, DSP216,
DSP412

<400> 11

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

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

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

Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala
115 120 125
Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln
130 135 140
Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe
145 150 155 160
Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr
165 170 175
Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu
180 185 190
Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val
195 200 205
Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys
210 215 220
Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu
225 230 235 240
Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
245 250 255
Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
260 265 270
Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
275 280 285
Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
290 295 300
Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
305 310 315 320
Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
325 330 335
Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
340 345 350
Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala

355 360 365
 His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
 370 375 380
 Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly

 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys
 405 410 415
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 420 425 430
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 435 440 445
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

 450 455 460
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 465 470 475 480
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 500 505 510
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

 515 520 525
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 530 535 540
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 545 550 555 560
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 565 570 575
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

 580 585 590
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 595 600 605

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
610 615 620

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
625 630 635 640

Leu Ser Pro Gly Lys

645

<210

> 12

<211> 1935

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NA of #11

<400> 12

cagaccggca caatccaaa gccaccctg tgggccgagc ctgattccgt gatcacccag 60
ggctctccag tgacactgtc ctgccagggc tctctggagg cccaggagta ccggctgtat 120
agagagaaga agtctgccag ctggatcacc cggatcagac ctgagctggt gaagaacggc 180
cagtttcaca tccaagcat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
tcccgggcca gatggagcga gctgtccgac cctctggtgc tggatcatgac cggcgccctat 300
cctaagccaa cactgagcgc ccagccatcc cctgtggtga ccagcggcgg cagagtgaca 360

ctgcagtgtg agtcccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
gagcacccac agtgtctgaa cagccagcca cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480
tccgtgggac ccgtgagccc aaaccggaga tggagccacc ggtgctacgg ctatgacctg 540
aatagccctt acgtgtggtc tagcccatcc gatctgctgg agctgctggt gcccggcgtg 600
tccaagaagc ctccctgtc tgtgcagcca ggaccagtgg tggcaccagg agagtctctg 660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagagag 720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag ccacaggccg gcctgagcca ggccaacttt 780

acactgggcc cagtgagcag gtcctatggc ggacagtaca ggtgctatgg agcacacaat 840
ctgtcctctg agtgttctgc cccagcgac cccctggaca tctgatcac cgccagatc 900
aggggcacac ccttcatctc cgtgcagcct ggaccaaccg tggcctctgg cgagaacgtg 960
acactgctgt gccagtcttg gcgccagttc cacacctttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020
gcagacgcac cactgaggct gcgcagcatc cagagtacc ccaagtatca ggccgagttt 1080
ccaatgtctc cagtgaccag cgcccacgca ggcacataca ggtgttatgg cagcctgaac 1140

agcgaccctt acctgctgag ccacccttcc gagccactgg agctgggtgt gagcggagga 1200

ggaggctccg gaggaggagg ctctggcggc ggcggcagcg agcctaagag ctccgacaag 1260

accacacat gccacattg tccagcacct gagctgctgg gaggaccatc cgtgttcctg 1320

tttccacca agcctaagga taccctgatg atctctcgca cccctgaggt gacatgcgtg 1380

gtggtggacg tgagccacga ggaccccgag gtgaagtta actggtacgt ggacggcgtg 1440

gaggtgcaca atgccaagac aaagccccgg gaggagcagt acaacagcac ctatagagtg 1500

gtgtccgtgc tgacagtgtc gcaccaggat tggctgaacg gcaaggagta caagtgtaa 1560

gtgtccaata aggccttgc agccccatc gagaagacca tctctaaggc aaaggacag 1620

cccaggagc ctcagggtg caccctgcct ccaagccgag acgagctgac aaagaaccag 1680

gtgtctctga gctgtgccgt gaagggttc taccatctg acatcgccgt ggagtgggag 1740

agcaatggcc agcccagaaa caattataag accacacccc ctgtgctgga ctctgatggc 1800

agcttctttc tgggtgtcaa gctgaccgtg gataagtcta ggtggcagca gggcaacgtg 1860

ttttctgtt ctgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acacacagaa gacgtgtcc 1920

ctgtctcccg gcaag 1935

<210> 13

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT Fc (IgG4 knob) 351 AA first monomer of DSP205V1

<400> 13

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95
 Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

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

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

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

 305 310 315 320
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 325 330 335

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

340

345

350

<210> 14

<211> 1053

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#13

<400> 14

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaag 180

gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctglat ctaccacaca tatctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgcctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggctc cggaggagga 360

ggctctgaga gcaagtacgg accacattgc ccacatgtc cagcacctga gtctgaggga 420

ggacctagcg tgttctgtt tcctccaaag ccaaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 480

cctgaggtga catgcgtggt ggtggacgtg tcccaggagg accccgaggt gcagttcaac 540

tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaat gccaagacaa agcccaggga ggagcagttt 600

aactccacct accgcgtggt gtctgtgctg acagtgtgc accaggactg gctgaacggc 660

aaggagtata agtctaaggt gtctaataag ggcctgccct cctctatcga gaaaaccatc 720

agcaaggcca agggccagcc aagagagcca caggtgtgca ccctgccacc tcccaggag 780

gagatgacaa agaaccaggt gtctctgtgg tgtctggtga agggcttcta cccatctgac 840

atgcctgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca attacaagac cacaccacc 900

gtgctggaca gcgatggctc cttctttctg tatagccggc tgaccgtgga taagtccaga 960

tggcaggagg gcaactgttt ttctgtctct gtgatgcacg aggcctgca caatcactat 1020

acacagaaga gcctgtccct gtctctgggc aag 1053

<210> 15

<211> 642

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB Fc (IgG4 hole) 642 AA second monomer of DSP205V1, DSP216V1,

DSP412V1

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val

195 200 205

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

210 215 220

Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu

225 230 235 240

Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
245 250 255

Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
260 265 270

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
275 280 285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
290 295 300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
305 310 315 320

Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
325 330 335

Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
340 345 350

Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
355 360 365

His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
370 375 380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
405 410 415

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
420 425 430

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
450 455 460

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

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

485 490 495
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
500 505 510
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
515 520 525
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

530 535 540
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
545 550 555 560
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
565 570 575
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
580 585 590
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp

595 600 605
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
610 615 620
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
625 630 635 640
Gly Lys

<210> 16

<211> 1926

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#15

<400> 16

cagaccggca caatccetaa gccaacctg tgggccgagc ctgatagcgt gatcacccag 60

ggctccccag tgacactgag ctgccagggc tcctggagg cacaggagta cggctgtat 120

agagagaaga agtctgccag ctggatcacc cggatcagac ctgagctggt gaagaacggc 180

cagttccaca tccatctat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240

agccggggcca gatggtctga gctgagcgac ccctggtgc tggatcatgac cggagcctat 300

cccaagccta cactgtctgc ccagccaagc ccagtggatga cctctggcgg cagagtgaca	360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420
gagcaccac agtgtctgaa tagccagcca cacgccaggg gcagctccg cgccatcttc	480
agcgtgggac ccgtgagccc aaaccggaga tggcccacc gctgctacgg ctatgacctg	540
aacagccctt acgtgtggc tagcccaagc gatctgtggt agctgctggt gcccgcgctg	600
agcaagaagc ctccctgtc tgtgcagcct ggaccagtgg tggcacctgg agagtccctg	660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggtttg tgctgtataa ggaggagag	720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag ccacaggccg gcctgtccca ggccaacttc	780
accctgggcc cagtgagccg gtcctatggc ggccagtaca gatgctatgg cgccacaat	840
ctgtcctctg agtgttccg cccaagcgac ccctggaca tcctgatcac cggccagatc	900
aggggcacac cttttatcag cgtgcagcca ggacctaccg tggcctccg cgagaacgtg	960
acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgcagacaaa ggcaggagca	1020
gcagacgcac cactgaggt gcgtccatc cacgagtacc ccaagtatca ggccgagttc	1080
ccaatgtccc cagtgcctc tgcccagca ggcacataca ggtgttatgg cagcctgaac	1140
agcgaccctt acctgctgc tcacctagc gagccactgg agctggtggt gtctggagga	1200
ggaggcagcg gcggaggagg ctccggaggc ggcggtcttg agagcaagta tggaccacct	1260
tgcccacat gtccagcacc agagttcgag ggaggaccaa gcgtgttctt gtttctcca	1320
aagcctaagg acacctgat gatctccgc accctgagg tgacatgctt ggtggtggac	1380
gtgtctcagg aggacccga ggtgcagttt aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac	1440
aatgccaaga ccaagcccg ggaggagcag ttcaactcta cctacagagt ggtgagcgtg	1500
ctgacagtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat	1560
aagggcctgc ctactccat cgagaaaacc atcagcaagg caaagggaca gcccaggag	1620
cctcaggtgt atacctgcc ccttcccag tgcgagatga caaagaacca ggtgtccctg	1680
tcttgtgccg tgaagggtt ttacctatc gacatcgccg tggagtggga gtctaattggc	1740
cagcccagaga acaattataa gaccacacca cccgtgctgg actccgatgg ctctttcttt	1800
ctggtgagca ggctgaccgt ggataagtcc cgctggcagg agggcaacgt gttcagctgc	1860
tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacacacaga agtctctgag cctgtccctg	1920
ggcaag	1926
<210> 17	
<211> 585	
<212> PRT	

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRP alpha Fc (IgG1 knob as IgG4) 585AA first monomer of DSP216V2

<400> 17

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

1 5 10 15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro

20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu

35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser

50 55 60
Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn

65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys

85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu

100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala

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

130 135 140
Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu

145 150 155 160
Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser

165 170 175
Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val

180 185 190
His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp

195 200 205
Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro

210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
 245 250 255
 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335
 Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 355 360 365
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 370 375 380
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 385 390 395 400
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 405 410 415
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 420 425 430
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 435 440 445
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 450 455 460
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

465 470 475 480
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 485 490 495
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

 515 520 525
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 565 570 575
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580 585

<210> 18

<211> 1755

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#17

<400> 18

gaggaggagc tgcaggtcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagc aggagagacc 60
 gccacactga ggtagcacgc cacaagcctg atcccagtagg gaccaatcca gtggtttagg 120
 ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg 180
 accacagtga gcgacctgac caagcggaac aatatggatt tttccatcag aatcggaat 240
 atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctccccagac 300
 gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gccttcgcc 360

 ccagtgggtg ctggaccagc agccagagcc accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420
 gagtctcacg gctttagccc ccgggacatc accctgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480
 ctgtctgact ttcagaccaa cgtggacccc gtgggcgagt ctgtgagcta ttccatccac 540
 tctacagcca aggtgggtgct gacccgcgag gacgtgcaca gccaggtcat ctgcgaggtg 600
 gcacacgtga ccctgcaggg cgatcctctg aggggcacag ccaatctgag cgagaccatc 660

agagtgtccc ctacactgga ggtgacccag cagcccgctgc gcgcagagaa ccaagtgaat 720
gtgacatgtc aggtgaggaa gttctaccct cagcgctgc agctgacctg gctggagaac 780

ggcaacgtga gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
aattggatgt ctggctgct ggtgaacgtg agcgccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
tgccagtggt agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960
gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagcgg 1020
aatatctacg gaggaggagg cagcggagga ggaggctccg agcctaagag ctccgacaag 1080
accacacat gccccaccatg tctgcacca gagctgctgg gaggaccttc cgtgttcctg 1140
tttctccaa agccaaagga tacactgatg atctccagaa caccagaggt gacctgcgtg 1200

gtggtggacg tgtctcacga ggaccccgag gtgaagtta actggtacgt ggacggcgtg 1260
gaggtgcaca atgccaagac caagccaagg gaggagcagt acaactccac atatcgctg 1320
gtgtctgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaggagta taagtgtgag 1380
gtgagcaata aggccctgcc cgcccctatc gagaagacca tctccaagc aaagggacag 1440
cccagggagc ctcagggtg cactctgcc cttcccgcg acgagctgac caagaaccag 1500
gtgtctctgt ggtgtctggt gaagggttc taccatctg acatcgccgt ggagtgggag 1560
agcaatggcc agcccagaa caattacaag accacaccac ccgtgctgga cagcgatggc 1620

tccttttttc tgiattccaa gctgacagtg gacaagtctc ggtggcagca gggcaacgtg 1680
ttttctgtt ctgigtatga cgaggccctg cacaatcact ataccagaa gaggctgtcc 1740
ctgtctcccg gcaag 1755

<210> 19

<211> 645

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 FC (IgG1 hole as IgG4) 645 AA second monomer of DSP216V2

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

290 295 300
 Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
 325 330 335

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

 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys
 405 410 415
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 420 425 430
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 435 440 445
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 450 455 460

 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 465 470 475 480
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 500 505 510
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 515 520 525

 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 530 535 540

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 545 550 555 560
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 565 570 575
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 580 585 590

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 595 600 605
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 610 615 620
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 625 630 635 640
 Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 20

<211> 1935

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220

><223> NA of#19

<400> 20

cagaccggca caatcccaaa gccaccctg tgggccgagc ctgattccgt gatcaccag 60
 ggctctccag tgacactgtc ctgccagggc tctctggagg cccaggagta ccggctgtat 120
 agagagaaga agtctgccag ctggatcacc cggatcagac ctgagctggt gaagaacggc 180
 cagtttcaca tccaagcat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
 tcccgggcca gatggagcga gctgtccgac cctctggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300
 cctaagccaa cactgagcgc ccagccatcc cctgtggtga ccagcggcgg cagagtgaca 360
 ctgcagtgtg agtcccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420

gagcaccac agtgtctgaa cagccagcca cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480
 tccgtgggac ccgtgagccc aaaccggaga tggagccacc ggtgctacgg ctatgacctg 540
 aatagccctt acgtgtggtc tagcccatcc gatctgctgg agctgctggt gcccggcgtg 600
 tccaagaagc cticcctgtc tgtgcagcca ggaccagtgg tggcaccagg agagtctctg 660
 accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720

agggatctga ggcagctgcc aggcagacag ccacaggccg gcctgagcca ggccaacttt 780
acactgggcc cagtgagcag gtcctatggc ggacagtaca ggtgctatgg agcacacaat 840

ctgtcctctg agtgttctgc ccccagcgac cccctggaca tctgatcac cggccagatc 900
aggggcacac ccttcatctc cgtgcagcct ggaccaaccg tggcctctgg cgagaacgtg 960
acactgctgt gccagtcttg gcgccagttc cacaccttcc tctgacaaa ggcaggagca 1020
gcagacgcac cactgaggct gcgcagcatc cagagtacc ccaagtatca ggccgagttt 1080
ccaatgtctc cagtgaccag cgcccacgca ggcacataca ggtgttatgg cagcctgaac 1140
agcgaccctt acctgctgag ccaccttcc gagccactgg agctggtggt gagcggagga 1200
ggaggctccg gaggaggagg ctctggcggc ggccggcagcg agcctaagag ctccgacaag 1260

accacacat gccaccttg tccagcacct gagctgctgg gaggaccatc cgtgttctctg 1320
tttccacca agcctaagga taccctgatg atctctcgca cccctgaggt gacatgcgtg 1380
gtggtggacg tgagccacga ggaccccgag gtgaagtta actggtacgt ggacggcgtg 1440
gaggtgcaca atgccaagac aaagccccgg gaggagcagt acaacagcac ctatagagtg 1500
gtgtccgtgc tgacagtgtc gcaccaggat tggctgaacg gcaaggagta caagtgtgag 1560
gtgtccaata aggccctgcc agcccccatc gagaagacca tctctaaggc aaagggacag 1620
cccagggagc ctcaggtgta taccctgcct ccaagccgct gcgagctgac aaagaaccag 1680

gtgtctctga gctgtgccgt gaagggttc taccatctg acatcgccgt ggagtgggag 1740
agcaatggcc agcccgagaa caattataag accacacccc ctgtgctgga ctctgatggc 1800
agcttctttc tgggtgtcaa gctgaccgtg gataagtcta ggtggcagca gggcaacgtg 1860
ttttctgtt ctgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acacacagaa gacccgtgcc 1920
ctgtctcccg gcaag 1935

<210> 21

<211> 645

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 Fc (IgG1 knob) 645 AA first monomer of DSP220

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

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

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

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

 Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
 260 265 270
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro

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

 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
 325 330 335
 Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
 340 345 350
 Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
 355 360 365
 His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
 370 375 380

 Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys
 405 410 415
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 420 425 430
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 435 440 445

 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 450 455 460
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 465 470 475 480
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 500 505 510

 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 515 520 525

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
530 535 540

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
545 550 555 560

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
565 570 575

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
580 585 590

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
595 600 605

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
610 615 620

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
625 630 635 640

Leu Ser Pro Gly Lys
645

<210> 22

<211> 642

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 Fc IgG4 knob 642 AA first monomer of DSP220V1

<400> 22

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser
1 5 10 15

Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu
20 25 30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp
35 40 45

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

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr
65 70 75 80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met
 85 90 95
 Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala Gln Pro Ser Pro Val
 100 105 110
 Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala
 115 120 125
 Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln
 130 135 140
 Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr
 165 170 175
 Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu
 180 185 190
 Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val
 195 200 205
 Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys
 210 215 220
 Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu
 225 230 235 240
 Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
 245 250 255
 Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
 260 265 270
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
 275 280 285
 Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
 290 295 300
 Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr

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

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

355 360 365
His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr

370 375 380
Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly

385 390 395 400
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys

405 410 415
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly

420 425 430
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

435 440 445
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu

450 455 460
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

465 470 475 480
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

485 490 495
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

500 505 510
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

515 520 525
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys

530 535 540
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

545 550 555 560
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

565 570 575

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

610 615 620
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Lys

<210> 23

<211> 1926

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#22

<400> 23

cagaccggca caatcccca gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag	60
ggctccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta cggctgtat	120
agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc	180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat	240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccttggtgc tggcatgac cggcgctat	300
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgtga cctctggcgg cagagtgaca	360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagccccggg gcagctccag agccatcttc	480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggteccaca ggtgtacgg ctatgacctg	540
aacagcccat acgtgtggtc tagccctct gatctgtgg agctgtggt gcctggcgtg	600
agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cagtccttg	660
acctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag	720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtcca ggcaacttt	780
acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat	840
ctgtcctctg agtgttctgc cccagcgac ccctggaca tcctgatcac cggccagatc	900
aggggcacac cattcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg	960

acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacacctttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020

gcagacgcac ctctgagget gcgtccatc cagcagtagc caaagtatca ggccgagttt 1080

ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccacgca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140

agcgaccctt acctgctgag ccacctttcc gagccactgg agctgggtgt gtccggcggc 1200

ggcggctctg gcggaggagg cagcggagga ggaggatccg agtctaagta cggaccacca 1260

tgccctccat gtctgcacc agagttcgag ggaggacat ccgtgttcct gtttcacct 1320

aagcctaagg acacctgat gatctccaga acccccagg tgacatgcgt ggtggaggac 1380

gtgtctcagg aggatcctga ggtgcagttc aattggtagc tggatggcgt ggaggtgcac 1440

aacgccaaga caaagccccc ggaggagcag tttaatagca cctacagagt ggtgtccgtg 1500

ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaac 1560

aagggcctgc ctagctccat cgagaagacc atctccaagg ccaagggcca gccaagagag 1620

ccacaggtgt gcacctgcc accaagccag gaggagatga caaagaatca ggtgtccctg 1680

tgggtgtctg tgaagggtt ctacctttcc gacatcgccg tggagtggga gtctaacggc 1740

cagccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtgag actctgatgg cagcttcttt 1800

ctgtattctc ggctgacctg ggataagagc agatggcagg agggcaacgt gttcagctgc 1860

tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tatacacaga agtctctgag cctgtccctg 1920

ggcaag 1926

<210> 24

<211> 375

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIGLEC10 Fc (IgG1 knob) 375 AA first monomer of DSP402, DSP412

<400> 24

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Leu Ser Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

20 25 30

Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

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

305 310 315 320
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 25

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIGLEC10 Fc (IgG4) 367 AA first monomer of DSP402V1, DSP412V1

<400> 25

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

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

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

130 135 140
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val

145 150 155 160
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

165 170 175
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

180 185 190
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

195 200 205
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

210 215 220
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

225 230 235 240
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

245 250 255
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

260 265 270
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

275 280 285
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

290 295 300
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

305 310 315 320
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

325 330 335
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

340 345 350
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

355 360 365

<210> 26

<211> 1101

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#25

<400> 26

```

gatggccggt tttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtctatc      60
agcgtgccat gctccttctc ttaccccaga caggactgga ccggtcttac acccgcttac      120
ggctattggt ttaaggccgt gaccgagaca acaaagggcg cccctgtggc cacaaaccac      180

cagagcagag aggtggagat gtccaccggg ggcagattcc agctgacagg cgaccccgcc      240
aagggcaatt gtagcctggt catcagggac gccagatgc aggatgagtc tcagtacttc      300
tttaggtgg agcgcggcag ctacgtgcgc tataacttta tgaatgatgg cttctttctg      360
aaggtgaccg ccctgacaca gaaggaggga ggaggctccg gcggaggagg cagcgagtcc      420
aagtatggac caccttgccc accatgtcct gcaccagagt tcgaggagg acctagcgtg      480
ttcctgtttc ctcaaagcc aaaggacacc ctgatgatca gcaggactcc tgaggtgaca      540
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac ccgaggtgc agttcaactg gtatgtggat      600

ggcgtggagg tgcacaatgc caagacaaag ccacgggagg agcagtttaa ctctacctac      660
agagtggatga gcgtgctgac agtgctgcac caggattggc tgaacggcaa ggagtataag      720
tgtaagggtgt ctaataaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggcaaag      780
ggacagcccc gggagcctca ggtgtgcacc ctgccccctt cccaggagga gatgacaaag      840
aaccaggtgt ctctgtggtg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag      900
tgggagtcca atggccagcc cgagaacaat tacaagacca caccaccgt gctggactcc      960
gatggctctt tctttctgta ttccaggctg accgtggata agtctcgtg gcaggagggc     1020

aacgtgtttt cttgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca atcactatac acagaagtec     1080
ctgtctctga gcctgggcaa g                                     1101

```

<210> 27

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc linker (knob V1 only in DSP216V2) 232 aa

<400> 27

```

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

```

[illegible]

<220><223> hIgG1 Fc linker (hole V1 only in DSP216V2) 232 aa

<400> 28

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 Cys Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225

230

<210> 29

<211> 375

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIGLEC10 Fc (IgG1 hole) 475 AA first monomer of DSP404, DSP403

<400> 29

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Leu Ser Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

20 25 30

Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro Ala

65 70 75 80

Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp Glu

85 90 95

Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr Asn

100 105 110

Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

130 135 140

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

180 185 190

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 30

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIGLEC10 Fc (IgG4 hole) second monomer of DSP404V1, DSP403V1

<400> 30

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val
20 25 30
Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn
35 40 45
Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala
50 55 60
Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp
65 70 75 80
Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr
85 90 95
Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp
115 120 125
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Glu Ser Lys Tyr
130 135 140
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
145 150 155 160
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
165 170 175
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
180 185 190
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
195 200 205
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
210 215 220
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
225 230 235 240
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
245 250 255
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

260 265 270
 Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 275 280 285
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

290 295 300
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 325 330 335
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

355 360 365
 Lys

<210> 31

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT No I42D Fc (IgG4 knob) 351 AA first monomer of DSP502V2

<400> 31

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 Ser Asn

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

85 90 95
Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His

100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

115 120 125
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val

130 135 140
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

145 150 155 160
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

165 170 175
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

180 185 190
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

195 200 205
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

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

225 230 235 240
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

245 250 255
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

260 265 270
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

275 280 285
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

290 295 300
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

305 310 315 320
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

325 330 335

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

340

345

350

<210> 32

<211> 1053

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of#31

<400> 32

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcatc 60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120
gaccagtgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaaag 180
gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240
acaggcgagt acttctglat ctaccacaca tatctgatg gcacctatac aggcagaatc 300
tttctggagg tgcctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggctc cggaggagga 360
ggctctgaga gcaagtacgg accaccttgc ccacatgtc cagcacctga gtctgaggga 420

ggacctagcg tgttctgtt tcttccaaag ccaaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 480
cctgagggtga catgcgtggt ggtggacgtg tcccaggagg accccgaggt gcagttcaac 540
tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaat gccaagacaa agcccaggga ggagcagttt 600
aactccacct accgcgtggt gtctgtgctg acagtgtgc accaggactg gctgaacggc 660
aaggagtata agtgaaggt gtctaataag ggcctgccct cctctatcga gaaaaccatc 720
agcaaggcca agggccagcc aagagagcca caggtgtgca ccctgccacc ttcccaggag 780
gagatgacaa agaaccaggt gtctctgtgg tctctggtga agggcttcta cccatctgac 840

atgccctggt agtgggagag caatggccag cccgagaaca attacaagac cacaccaccc 900
gtgctggaca gcgatggctc cttctttctg tatagccggc tgaccgtgga taagtccaga 960
tggcaggagg gcaactgttt ttctgtctct gtgatgcacg aggcctgca caatcactat 1020
acacagaaga gcctgtccct gtctctgggc aag 1053

<210> 33

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT WT Fc (IgG4 knob) 355AA first monomer of DSP502V3

<400> 33

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser

115 120 125

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

260 265 270
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

275 280 285
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

290 295 300
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

305 310 315 320
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

325 330 335
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

340 345 350
Leu Gly Lys

355

<210> 34

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NA of #33

<400> 34

atgatgaccg gcaactattga aactaccggc aacatctctg ccgagaaggc cggcagcatc 60

atcctccagt gccacctgag cagcaccaca gcccaggtga cacaggtgaa ctgggagcag 120

caggaccagc tgcctggccat ctgtaatgcc gatctgggct ggcacatcag cccttccttc 180

aaggacaggg tggcccttgg cccaggcctg ggcctgaccc tccagagcct gaccgtgaat 240

gacacaggcg agtacttctg catctaccac acatatccag atggcaccta tacaggccgg 300

atctttctgg aggtgctgga gtctagcgtg gcagagcacg gcgccagagg cggaggaggc 360

agcggaggag gaggtctga gagcaagtac ggcctcctt gccaccatg tccagcacct 420

gagtttgagg gcggcccttc cgtgttctg tttctccaa agccaaagga caccctgatg 480

atcagcagga cccagaggt gacatgcgtg gtggtggacg tgtcccagga ggaccccag 540

gtgcagtcca actggtatgt ggatggcgtg gaggtgcaca atgccaagac aaagcccagg 600

gaggagcagt ttaactccac ctaccgcgtg gtgtctgtgc tgacagtgt gcaccaggat 660
 tggctgaacg gcaaggagta taagtgaag gtgtctaata agggcctgcc ttcctctatc 720
 gagaaaacca tcagcaaggc aaaggacag ccacgcgagc cacaggtgtg caccctgccc 780
 ccttcccagg aggagatgac aaagaaccag gtgtctctgt ggtgtctggt gaagggttc 840
 taccctctg acatcgccgt ggagtgggag agcaatggcc agcctgagaa caattacaag 900
 accacaccac ccgtgctgga cagcgatggc tccttcttcc tgtatagccg gctgaccgtg 960
 gataagtcca gatggcagga gggcaacgtg ttcagctgct ccgtgatgca cgaagcactg 1020

cacaatcatt acactcagaa gtcctgtgcc ctgtcactgg gcaag 1065

<210> 35

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT Fc (IgG1 Hole) 354 AA second monomer of DSP503

<400> 35

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145 150 155 160
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
165 170 175
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
180 185 190
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
195 200 205
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
210 215 220
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225 230 235 240
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
245 250 255
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
260 265 270
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
275 280 285
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350
Gly Lys

<210> 36

<211> 351

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT Fc (IgG4 Hole) 351 AA second monomer of DSP503V1

<400> 36

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

145 150 155 160

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

165 170 175

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

180 185 190

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

<210> 37

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 37

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> 38

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

atgcagatcc cacagggccc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggt tcttagactc ccagacagg ccttgaacc cccccacctt ctcccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaagcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gccttcccc aggaccgag ccagcccggc caggactgcc gcttcctgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aaggcgaga gtgccacag cccacccag cccctcacc 480
aggccagccg gccagttcca aacctggtg gttggtgtc tggcggcct gctgggcagc 540

ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgtccc gggccgcacg agggacaata 600
ggagccaggc gcaccggcca gccctgaag gaggaccct cagccgtgcc tgtgttctct 660
gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccgagcc cccgtgccc 720
tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtcttc ctagcggaat gggcacctca 780
tccccgccc gcaggggtc agctgacggc cctcgagtg cccagccact gaggcctgag 840
gatggacact gctcttgccc cctctga 867

<210> 39

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

<210> 40

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 40

cccggtcgtt tcttggaactc tccagacaga ccttggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120

gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccttagca accagaccga caagctggcc 180
gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactctc gggtcagagt taccagctg 240
cctaaccgcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300
tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggtcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca 420
agacctgtg gccagtttca gacactcgtg 450

<210> 41

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 ECM KNOWN FRAGMENT

<400> 41

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

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

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln

165

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 ECM KNOWN FRAGMENT

<400> 42

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> 43

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 150 aa ORIGINAL PD1 DOMAIN

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115	120	125	
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly			
130	135	140	
Gln Phe Gln Thr Leu Val			
145	150		
<210>	44		
<211>	450		
<212>	DNA		
<213>	Artificial sequence		
<220><223>	na pf SEQ ID NO 43		
<400>	44		
ccaggatggt tcttagactc tccagatagg ccttggaatc cccctacctt tagccccgcc		60	
ctgctggtgg tgacagaggg cgataacgcc accttcacat gctcttttag caacacctcc		120	
gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga caagctggca		180	
gcatttcctg aggaccgctc ccagccaggc caggattgcc ggttcagagt gaccacgtg		240	
ccaaatggca gggactttca catgagcgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttccggcaca		300	
tacctgtgcg gagcaatctc tctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca		360	
gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacaccatc tctagccca		420	
aggccagcag gacagttcca aacctggtg		450	
<210>	45		
<211>	150		
<212>	PRT		
<213>	Artificial sequence		
<220><223>	150 aa ORIGINAL PD1 DOMAIN with CYS93>Ser substitution		
<400>	45		
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr			
1	5	10	15
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe			
	20	25	30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr			
	35	40	45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu			

50	55	60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu		
65	70	75
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>	46	
<211>	450	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	na of SEQ ID NO	45
<400>	46	
ccaggatggt	tcttagactc	tccagatagg
ctgctggtgg	tgacagaggg	cgataacgcc
gagtctttcg	tgctgaattg	gtacaggatg
gcatttcctg	aggaccgctc	ccagccaggc
ccaaatggca	gggactttca	catgagcgtg
tacctgtgcg	gagcaatctc	tctggcacca
gagctgaggg	tgaccgagag	gagggccgag
aggccagcag	gacagttcca	aaccttggtg
<210>	47	
<211>	140	
<212>	PRT	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	140 aa	-5-5 in PD1 DOMAIN

<400> 47

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

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

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

130 135 140

<210> 48

<211> 419

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 47

<400> 48

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
cgctcccagc caggccagga ttgccggttc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac 240
tttcacatga gcgtggtgcg gcgccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300

atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtcctga gggcagagct gagggtgacc 360

gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatctccta gccaaggcc agcaggaca 419

<210> 49

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

<210> 50

<211> 419

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 49

<400> 50

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60

gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
cgctcccagc caggccagga tctccggttc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac 240
tttcacatga gcgtggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300
atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gaggccctga gggcagagct gaggggtgacc 360
gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatctccta gccaaggcc agcaggaca 419

<210> 51

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc linker (knob) 232 aa

<400> 51

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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 52

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc linker (hole) 232 aa

<400> 52

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

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 53
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 128 aa PD1 segment
 <400> 53
 Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu

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

 65 70 75 80

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

<210> 54

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #53

<400> 54

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc	60
accttcacct gttccttcag caacacctcc gaggctctcg tgctgaactg gtacagaatg	120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc	180
caggactgcc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt	240
gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg ggcctatctc tctggctccc	300
aaggctcaga tcaaagagtc tctgcggggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag	360
gtgccaccg ctcatcctc acct	384

<210> 55

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 135 aa PD1 segment

<400> 55

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

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

115 120 125
Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130 135

<210> 56

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #55

<400> 56

ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180
caggactgcc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
aaggctcaga tcaaagagtc tctgcggggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
gtgccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgccg gccag 405

<210> 57

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 133 aa PD1 segment

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro

130

<210> 58

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #57

<400> 58

gactccctg acagacctg gaaccctcca acctctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat ccctcacct 399

<210> 59

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130 135

<210> 60

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #59

<400> 60

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactctc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggtccc 300
aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
gtgccaccg ctcatccctc acctctcca agacctgctg gccag 405

<210> 61

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 62

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #61

<400> 62

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gticcctcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactctc gggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcctccctc acct 384

<210> 63

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro

130

<210> 64

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #63

<400> 64

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg      120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac      180
agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac      240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc      300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca      360
gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat ccttcacct                                399

```

<210> 65

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-12

<400> 65

```

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

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

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

```

115 120 125

<210> 66

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #65

<400> 66

tggaaccctc caaccttctc tcccgtctcg ctggtggtta ccgagggcga caatgccacc 60

ttcacctggt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120

cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180

gactgtcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240

cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctcccaag 300

gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgtc atccctcacc t 381

<210> 67

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 68

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #67

<400> 68

tggaaacctc caaccttctc tcccgtcttg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttctgagg acagatctca gccaggccag 180
gactctcggt tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtcgctcgtg 240
cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctcccaag 300
gtcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgctc atccctcacc t 381

<210> 69

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-5

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130

<210> 70

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #69

<400> 70

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc	60
ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tcttctgtgc tgaactggta cagaatgtcc	120
cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc ttctctgagg acagatctca gccaggccag	180

gactgtcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
cccacgcctc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402

<210> 71

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 71

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

1 5 10 15
Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
 20 25 30

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe
 50 55 60
 Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
 65 70 75 80
 Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser
 85 90 95
 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 100 105 110
 Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130

<210> 72

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #71

<400> 72

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

cccaccgtc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402

<210> 73

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-7

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala

130 135

<210> 74

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #73

<400> 74

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240

ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 75

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 75

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

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

65	70	75	80
Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr			
	85	90	95
Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser			
	100	105	110
Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr			
	115	120	125
Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala			
	130	135	

<210> 76

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #75

<400> 76

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc	60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg	120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgaccc agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 77

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg

130 135

<210> 78

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #77

<400> 78

gactctccag acagaccttg gaaccttcca accttctctc ccgtctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cactgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcgggtc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaaga 408

<210> 79

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln

145

<210> 80

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #79

<400> 80

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60

ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120

gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180

gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240

cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300

tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggtcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360

gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcacccctc accttctcca 420

agacctgctg gccag 435

<210> 81

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu

65 70 75 80
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85 90 95
Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

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

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

130 135 140

<210> 82

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #81

<400> 82

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60

ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120

gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180

gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240

cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300

tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360

gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgccaccg ctcacccctc accttctcca 420

agacctgct 429

<210> 83

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 83

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

1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu

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

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

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

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

Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
 260 265 270
 Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu
 275 280 285
 Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
 290 295 300
 Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
 305 310 315 320
 Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp
 325 330 335
 Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His
 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
 355 360 365
 Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val
 370 375 380
 Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys
 385 390 395 400
 Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn
 405 410 415
 Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn
 435 440 445
 Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser
 450 455 460
 Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg
 465 470 475 480
 Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr
 485 490 495
 Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys

500

<210> 84

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NA OF #83

<400> 84

```

atggagcccc ccggccccgc ccccgccgc ctcgggccgc tgctctgcct gctgctcgcc      60
gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac      120

aagtcctgat cagttgcagc tggagagtcg gccattctgc actgcactgt gacctcctg      180
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac cagcccggga attaatctac      240
aatcaaaaag aaggccactt ccccgccgta acaactgttt cagagtccac aaagagagaa      300
aacatggact tttccatcag catcagtaac atcacccag cagatgccgg cacctactac      360
tgtgtgaagt tccgaaaagg gagccctgac acggagttaa agtctggagc aggcactgag      420
ctgtctgtgc gtgccaacc ctctgcccc gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca      480
cctcagcaca cagttagctt cacctgcgag tcccacggct tctcaccag agacatcacc      540

ctgaaatggt tcaaaaatgg gaatgagctc tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgta      600
ggagagagcg tgcctacag catccacagc acagccaagg tggctgtgac ccgcgaggac      660
gttactctc aagtcacttg cgaggtggcc cacgtcacct tgcaggggga ccctcttcgt      720
gggactgcca acttgtctga gaccatccga gtccacca ccttggaggt tactcaacag      780
cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag      840
agactacagc tgacctggtt ggagaatgga aacgtgtccc ggacagaaac ggctcaacc      900
gttacagaga acaaggatgg tacctacaac tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct      960

gcccacaggg atgatgtgaa gtcacctgc caggtggagc atgacgggca gccagcggtc      1020
agcaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc caccgaagg agcagggctc aaataccgcc      1080
gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac atctatatg tggcgggtgt ggtgtgcacc      1140
ttgctggtgg ccctactgat ggccgcccctc tacctcgtcc gaatcagaca gaagaaagcc      1200
cagggctcca ctctttctac aaggttgcat gagcccgaga agaagccag agaaataaca      1260
caggacacaa atgatatcac atatgcagac ctgaacctgc ccaaggggaa gaagcctgct      1320
ccccaggctg cggagcccaa caaccacag gagtatgcca gcattcagac cagcccgag      1380

ccgcgtcgg aggacacctt cacctatgct gacctggaca tggccacct caaccggacc      1440

```

cccaagcagc cggcccccaa gcctgagccg tcctttctcag agtacgccag cgtccaggtc 1500
 ccgaggaagt ga 1512

<210> 85
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> ORIGINAL SIRPa DOMAIN (343AA)
 <400> 85

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

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn

225 230 235 240

Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser

305 310 315 320

Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly

325 330 335

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr

340

<210> 86

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NA OF #85

<400> 86

gaggaggagc tgcaggatgat tcagcctgac aagtcctgat cagttgcagc tggagagtcg 60

gccattctgc actgcaactgt gacctccctg atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga 120

ggagctggac cagccccgga attaatctac aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta 180

acaactgttt cagagtccac aaagagagaa aacatggact tttccatcag catcagtaac 240

atcaccccag cagatgccgg cacctactac tgtgtgaagt tccggaaagg gagccctgac 300

acggagttaa agtctggagc aggcactgag ctgtctgtgc gtgccaaacc ctctgcccc 360

gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca cctcagcaca cagttagctt cacctgcgag 420

tcccacggct tctcaccag agacatcacc ctgaaatggt tcaaaaatgg gaatgagctc 480

tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgta ggagagagcg tgtcctacag catccacagc 540

acagccaagg tggctgtgac ccgcgaggac gttcactctc aagtcacttg cgaggtggcc 600

cacgtcacct tgcaggggga ccctcttctg gggactgcca acttgtctga gaccatccga 660

gttccacca ccttggaggt tactcaacag cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc 720

acctgccagg ttaggaagtt ctacccccag agactacagc tgacctggtt ggagaatgga 780

aacgtgtccc ggacagaaac ggcctcaacc gttacagaga acaaggatgg tacctacaac 840

tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct gccacaggg atgatgtgaa gctcacctgc 900

caggtggagc atgacgggca gccagcggtc agcaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc 960

cacccaagg agcagggctc aaataccgcc gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac 1020

atctatatt 1029

<210> 87

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 116 aa SIRPa segment

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100

105

110

Ser Val Arg Ala

115

<210> 88

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #87

<400> 88

gaagaggaac tgcaagtgat ccagcctgac aagtcctgtc tgggtggctgc tggcgaaacc 60

gccacactga gatgtaccgc cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120

ggcgctggac ctggcagaga gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180

accacgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggaac 240

atcacccctg ctgatgccgg cacctactac tgcgtgaagt tccggaaggg ctcccctgac 300

gacgtcgagt ttaaattccg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

<210> 89

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
 115 120 125

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

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

 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
 305 310 315 320

 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly

	325	330	335
Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr			
	340		
<210>	90		
<211>	1029		
<212>	DNA		
<213>	Artificial sequence		
<220><223>	NA OF #89		
<400>	90		
gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtcctgtc tgggtggctgc tggcgaaacc			60
gccacactga gatgtaccat cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga			120
ggcgcctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg			180
accaccggtg ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac			240
atcacccctg ctgatgccgg cacctactac tgcatcaagt tccggaaggg ctcccctgac			300
gacgtcgagt ttaaatacgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagctaa accttctgct			360
cccgtgggtg ctggccctgc cgctagagct acacctcagc acaccgtgtc ttttacctgc			420
gagtcccacg gcttcagccc tagagacatc accctgaagt ggttcaagaa cggcaacgag			480
ctgtccgact tcagaccaa cgtggaccct gtgggagagt ccgtgtccta ctccatccac			540
tctaccgcca aggtgggtgct gacccgagag gacgtgcaca gccaagtgat ctgtgaagtg			600
gcccacgtga cctccaggg cgatcctttg agaggcaccg ccaacctgtc cgagacaatc			660
agagtgcctc ctacactgga agtgaccag cagcctgtgc gggccgagaa tcaagtgaac			720
gtgacctgcc aagtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggaaaac			780
ggcaatgtgt ccagaaccga gacagcctcc accgtgaccg agaacaagga tggcacctac			840
aattggatgt cctggctgct cgtgaacgtg tccgctcaca gagatgacgt gaagctgaca			900
tgccaggtgg aacacgatgg ccagcctgcc gtgtctaagt ccacgacct gaaagtgtct			960
gctcacccca aagagcaggg ctccaatacc gccgctgaga acaccggctc caacgagaga			1020
aacatctac			1029
<210>	91		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	Artificial sequence		
<220><223>	116 amino acids sequence of SIRPa with 4 point mutations		

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala

115

<210> 92

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #91

<400> 92

gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtcctgtc tgggtggctgc tggcgaaacc 60

gccacactga gatgtacat cactctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120

ggcgctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagt 180

accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac 240

atcacccctg ctgatgccgg cacctactac tgcataaagt tccggaaggg ctcccctgac 300

gacgtcgagt ttaaattccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

<210> 93

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> aa SIRPa segment - addition K at the C-ter of SEQ ID 87 (117 aa
SIRPa segment)

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys

115

<210> 94

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA OF #93

<400> 94

gaagaggaac tgcaagtgat ccagcctgac aagtcctgtc tgggtggctgc tggcgaaacc 60

gccacactga gatgtaccgc cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120

ggcgctggac ctggcagaga gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180

accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggaac 240

atcacccctg ctgatgccgg cacctactac tgcgtgaagt tccggaaggg ctcccctgac 300

gacgtcgagt ttaaattccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagctaa g 351

<210> 95

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LILRB2 Full ECD AA SEQUENCE

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val

195 200 205

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

210

215

220

Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro

275

280

285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro

290

295

300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val

305

310

315

320

Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr

325

330

335

Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu

340

345

350

Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro Ile Ser Thr Pro Ala

405

410

415

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

420

425

430

Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val

435

440

<210> 96

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val

195 200 205

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

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

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

<210> 97

<211> 1194

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 97

cagaccggca caatcccaaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60

ggctccccc tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta cggctgtat 120

agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac cggagctggt gaagaacggc 180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccctgggtg tggtcatgac cggcgcctat 300

ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgggtga cctctggcgg cagagtgaca 360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540
aacagcccat acgtgtggtc tagccctctt gatctgtctg agctgctggt gcctggcgtg 600
agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cgagtctctg 660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720

agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtccca ggcaaacttt 780
acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840
ctgtcctctg agtgttctgc cccagcgcac cccctggaca tcctgatcac cggccagatc 900
aggggcacac cattcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960
acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacacctttc tgcagacaaa ggcaggagca 1020
gcagacgcac ctctgaggtt gcgtccatc cacgagtacc caaagtatca ggccgagttt 1080
ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccagcga ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140

agcgaccctt acctgctgag ccacccttcc gagccactgg agctggtggt gtcc 1194

<210> 98

<211> 198

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

[illegible]

gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480

tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggctccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540

aacagcccat acgtgtgggc tagccctct gatctgctgg agctgctggt gcct 594

<210> 100

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10 full length (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 100

Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gly Ser Gln Ala

1 5 10 15

Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln

35 40 45

Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro

85 90 95

Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp

100 105 110

Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr

115 120 125

Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu Cys Pro Pro Pro

165 170 175

Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Pro
180 185 190

Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro Arg Pro Gln Asp
195 200 205

His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser Arg Lys Gly Val
210 215 220

Ser Ala Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp

225 230 235 240

Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln
245 250 255

Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu
260 265 270

Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp
275 280 285

Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg

290 295 300

Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg
305 310 315 320

Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu
325 330 335

Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser
340 345 350

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

355 360 365

Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser
370 375 380

Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
385 390 395 400

Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
405 410 415

Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly

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

 485 490 495
 Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 500 505 510
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 515 520 525
 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
 530 535 540
 Ser Thr Ala Phe Ser Asn Gly Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ile Thr Ala

 545 550 555 560
 Leu Leu Phe Leu Cys Leu Ala Leu Ile Ile Met Lys Ile Leu Pro Lys
 565 570 575
 Arg Arg Thr Gln Thr Glu Thr Pro Arg Pro Arg Phe Ser Arg His Ser
 580 585 590
 Thr Ile Leu Asp Tyr Ile Asn Val Val Pro Thr Ala Gly Pro Leu Ala
 595 600 605
 Gln Lys Arg Asn Gln Lys Ala Thr Pro Asn Ser Pro Arg Thr Pro Leu

 610 615 620
 Pro Pro Gly Ala Pro Ser Pro Glu Ser Lys Lys Asn Gln Lys Lys Gln
 625 630 635 640
 Tyr Gln Leu Pro Ser Phe Pro Glu Pro Lys Ser Ser Thr Gln Ala Pro
 645 650 655
 Glu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Asn Phe
 660 665 670

Pro Gly Val Arg Pro Arg Pro Glu Ala Arg Met Pro Lys Gly Thr Gln

675 680 685

Ala Asp Tyr Ala Glu Val Lys Phe Gln

690 695

<210> 101

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 NO MUTATION (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 101

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

20 25 30

Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro Ala

65 70 75 80

Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp Glu

85 90 95

Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr Asn

100 105 110

Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln Lys

115 120 125

<210> 102

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 NO MUTATION (Q96LC7-1 Uniprot) NA SEQUENCE

<400> 102

gatggccggt ttigatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtgcatc 60
agcgtgccat gtccttctc ttacccaga caggactgga ccggctctac accgcctac 120

ggctattggt ttaaggccgt gaccgagaca acaaagggcg cccctgtggc cacaaaccac 180
cagagc 186

<210> 103

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 plus C36S (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 103

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Leu Ser Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

20 25 30

Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro Ala

65 70 75 80

Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp Glu

85 90 95

Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr Asn

100 105 110

Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln Lys

115 120 125

<210> 104

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 plus C36S (Q96LC7-1 Uniprot) NA SEQUENCE

<400> 104

gatggccggt ttigatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtctatc 60
 agcgtgccat gtccttctc ttaccccaga caggactgga ccggctctac accgcctac 120

ggctattggt ttaaggccgt gaccgagaca acaaagggcg ccctgtggc caciaaacac 180
 cagagcagag aggtggagat gtccaccgga ggcagattcc agctgacagg cgaccccgcc 240
 aagggcaatt gtagcctggt catcaggga gcccagatgc aggatgagtc tcagtacttc 300
 tttagggtag agcgccgag ctacgtgagc tataacttta tgaatgatgg cttctttctg 360
 aaggtgaccg ccctgacaca gaag 384

<210> 105
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Siglec 10 full ECD, AA 17-550 (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 105

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

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

Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val
 130 135 140

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

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

 Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp
 260 265 270
 Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg
 275 280 285
 Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg
 290 295 300
 Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu
 305 310 315 320

 Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser
 325 330 335
 Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu
 340 345 350
 Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser
 355 360 365
 Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
 370 375 380

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

385 390 395 400
 Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
 405 410 415
 Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu
 420 425 430
 Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
 435 440 445

 Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu
 450 455 460
 Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro
 465 470 475 480
 Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 485 490 495
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 500 505 510

 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
 515 520 525
 Ser Thr Ala Phe Ser Asn
 530
 <210> 106
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> TIGIT full length (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE
 <400> 106
 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> 107

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 NO MUTATIONS (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE

<400> 107

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

<210> 108

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, ECD AA 22-134 NO MUTATIONS (Q495A1 Uniprot ID) NA SEQUENCE

<400> 108

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcatc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctg caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctcccttaag 180

gatagggtgg cacttgacc aggcctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tctctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgetggagtc tagcgtggcc gagcac 336

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 plus I42A C69S (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE

<400> 109

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

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

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

<210> 110

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 plus I42A C69S (Q495A1 Uniprot ID) NA SEQUENCE

<400> 110

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaag 180

gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tctctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcac 336

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 C69S (Q495A1 Uniprot ID in DSP 502V2) 112 AA,

SEQUENCE

<400> 111

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 Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

<210> 112

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 C69S (Q495A1 Uniprot ID in DSP 502V2)336 NA,

SEQUENCE

<400> 112

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaaggaggagg cagcatcatc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaag 180

gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgaccctgc agagcctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcac 336

<210> 113

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, ECD AA 22-137 (Q495A1 Uniprot ID in DSP 502V3) 116 AA,
SEQUENCE

<400> 113

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

115

<210> 114

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, ECD AA 22-137 (Q495A1 Uniprot ID in DSP 502V3) 348 NA,
SEQUENCE

<400> 114

atgatgaccg gcaactattga aactaccggc aacatctctg ccgagaaggg cggcagcatc 60

atcctccagt gccacctgag cagcaccaca gcccaggtga cacaggtgaa ctgggagcag 120

caggaccagc tgctggccat ctgtaatgcc gatctgggct ggcacatcag cccttccttc 180

aaggacaggg tggcccttgg cccaggcctg ggcctgaccc tccagagcct gaccgtgaat 240

gacacaggcg agtacttctg catctaccac acatatccag atggcaccta tacaggccgg 300

atctttctgg aggtgctgga gtctagcgtg gcagagcacg gcgccaga 348

<210> 115

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT full ECD AA 22-141 (Q495A1 Uniprot ID) 120 AA, SEQUENCE

<400> 115

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> 116

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> artificial signal peptide

<400> 116

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

1 5 10 15

Asp Gly Val His Ala

20

<210> 117

<

211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 117

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

1 5 10 15

<210> 118

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 118

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 119

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 120

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 120

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5
 <210> 121
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker amino acid sequence
 <400> 121
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker amino acid sequence
 <400> 122
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5
 <210> 123
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker amino acid sequence
 <220><221> REPEAT
 <222> (6)..(10)
 <223> may be absent
 <220><221> REPEAT
 <222> (11)..(15)
 <223> may be absent
 <220><221> REPEAT
 <
 <222> (16)..(20)
 <223> may be absent
 <400> 123
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 124

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<220><221> REPEAT

<222> (6)..(10)

<223> may be absent

<220><221> REPEAT

<222> (11)..(15)

<223> may be absent

<400> 126

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

1 5 10 15

<210> 127

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<220><221> REPEAT

<222> (12)..(16)

<223> may be absent

<220><221> REPEAT

<222> (17)..(21)

<223> may be absent

<220><221> REPEAT

<222> (22)..(26)

<223> may be absent

<400> 127

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

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

20 25

<210> 128

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 128

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

1 5 10

<210> 129

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 129

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

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

 35 40 45

<210> 130

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 130

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 131

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 131

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 132

<

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 132

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

1 5 10

<210> 133

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 133

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

1 5 10

<210> 134

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc linker 229 aa

<400> 134

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> 135

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc linker (knob) 229 aa

<400> 135

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 136

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc linker (hole) 229 aa

<400> 136

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

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

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

210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 137

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc linker , (AA 99-330 fromP01857-1 plus C220S (kabat)
 substitution 232 amino acids.

<400> 137

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 Lys
225 230
<210> 138
<211> 359
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> short SIRPa- Fc (IgG1 knob)359 AA, first monomer of DSP216V3
<400> 138
Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

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

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

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

100 105 110

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

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys

260 265 270
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
275 280 285
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

290 295 300
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
305 310 315 320
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
325 330 335
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
340 345 350
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 139

<211> 1077

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #138

<400> 139

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagc aggagagacc	60
gccacactga ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtagg gaccaatcca gtggtttagg	120
ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg	180
accacagtga gcgacctgac caagcggaac aatatggatt tttccatcag aatcggaat	240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctcccagac	300
gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gggaggagga	360
ggcagcggag gaggaggctc cgagcctaag agtccgaca agaccacac atgccacca	420
tgtctgcac cagagctgct gggaggacct tccgtgttcc tgtttctcc aaagccaaag	480
gatacactga tgatctccag aacaccagag gtgacctgcg tggtagtgga cgtgtctcac	540
gaggaccccg aggtgaagtt taactggtac gtggacggcg tggaggtgca caatgccaa	600
accaagccaa gggaggagca gtacaactcc acatatcgcg tggtagtctgt gctgaccgtg	660
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag tataagtga aggtgagcaa taaggccctg	720

ccccccccta tcgagaagac catctccaag gcaaaggac agcccaggga gcctcaggtg 780

tacacactgc ccccttgccg cgacgagctg accaagaacc aggtgtctct gtggtgtctg 840

gtgaagggt tctaccatc tgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg ccagcccag 900

aacaattaca agaccacacc acccgtgctg gacagcgtg gctccttctt tctgtattcc 960

aagctgacag tggacaagtc tcgggtggcag cagggaacg tgttttctg ttctgtgatg 1020

cagaggccc tgcacaatca ctatacccag aagagcctgt ccctgtctcc cggcaag 1077

<210> 140

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> short SIRPa- Fc (IgG4 knob)356 AA, first monomer of DSP216V4

<400> 140

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

115 120 125

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu

130 135 140

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

145 150 155 160
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 165 170 175
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 180 185 190

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

 Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 305 310 315 320

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350
 Ser Leu Gly Lys
 355
 <210> 141
 <211> 1068
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> NA of #140

<400> 141

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagacc	60
gccacactga ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggttttagg	120
ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg	180
accacagtga gcgacctgac caagcggaac aatatggatt tttccatcag aatcggaat	240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctccccagac	300
gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gggaggagga	360
ggatccggag gaggaggatc cgagtctaag tatggaccac catgccctcc atgtccagca	420
cctgagtttg agggaggacc tagcgtgttc ctgtttcccc ctaagccaaa ggacacactg	480
atgatctcca ggacaccaga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgtctca ggaggatccc	540
gaggtgcagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc acaatgcaa gaccaagcct	600
agggaggagc agtttaactc tacataccgc gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcaccag	660
gatttgctga acggcaagga gtataagtgt aaggtgagca ataaggcct gccaaagctcc	720
atcgagaaga ccatctccaa ggcaaaggga cagccaaggg agcctcaggt gtgcacactg	780
ccacctctc agggaggagt gaccaagaac caggtgagcc tgtggtgtct ggtgaagggc	840
ttctacccaa gcgacatcgc cgtggagtgg gagtccaatg gccagcccga gaacaattac	900
aagaccacac ctccagtgtt ggactctgat ggcagcttct ttctgtattc taggctgaca	960
gtggataaga gccgctggca ggagggaac gtgttttagct gttccgtgat gcacagggcc	1020
ctgcacaatc actataccca gaagtctctg agcctgtccc tgggcaag	1068

<210> 142

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRPa- Fc (IgG1 knob LALA)358 AA, first monomer of DSP216V5

<400> 142

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

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

290	295	300	
His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser			
305	310	315	320
Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly			
	325	330	335
Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	340	345	350
Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	355	360	365
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	370	375	380
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
385	390	395	400
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	405	410	415
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	420	425	430
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	435	440	445
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	450	455	460
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
465	470	475	480
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu			
	485	490	495
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	500	505	510
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	515	520	525
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	530	535	540

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

545 550 555 560

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

565 570 575

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

580 585

<210> 143

<211> 1755

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #142

<400> 143

gaggaggagc tgcaggtcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagg aggagagacc 60

gccacactga ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggtttagg 120

ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg 180

accacagtga ggcacctgac caagcgggaa aatatggatt ttccatcag aatcggcaat 240

atcacacctg ccgagccggg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctccccagac 300

gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gccttcggcc 360

ccagtgggtg ctggaccagc agccagagcc accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420

gagtctcagc gcttttagccc ccgggacatc accctgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480

ctgtctgact ttcagaccaa cgtggacccc gtgggcgagt ctgtgagcta ttccatccac 540

tctacagcca aggtggtgct gaccgcgag gacgtgcaca gccaggtcat ctgcgaggtg 600

gcacacgtga ccctgcaggg cgatcctctg aggggcacag ccaatctgag cgagaccatc 660

agagtcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtgc gcgcagagaa ccaagtgaat 720

gtgacatgtc aggtgaggaa gttctaccct cagcgctgc agctgacctg gctggagaac 780

ggcaacgtga gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840

aattggatgt cttggctgct ggtgaacgtg agcggccaca gggacgatgt gaagctgacc 900

tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960

gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgcccaga ataccggcag caacgagcgg 1020

aatatctacg gaggaggagg cagcggagga ggaggctccg agcctaagag ctccgacaag 1080

accacacat gccaccatg tcctgcacca gaggcagcag gaggaccttc cgtgttcctg 1140

tttctccaa agccaaagga tacactgatg atctccagaa caccagaggt gacctgcgtg 1200

gtggtggacg tgctcacga ggaccccgag gtgaagtta actggtacgt ggacggcgtg 1260
gaggtgcaca atgccaagac caagccaagg gaggagcagt acaactccac atatcgctg 1320

gtgtctgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaggagta taagtgtgag 1380
gtgagcaata aggccctgcc cgccctatc gagaagacca tctccaaggc aaaggacag 1440
cccaggagc ctcaggtgta cacactgcc ccttgccgac acgagctgac caagaaccag 1500
gtgtctctgt ggtgtctggt gaagggttc taccatctg acatcgccgt ggagtgggag 1560
agcaatggcc agcccagaaa caattacaag accacaccac ccgtgctgga cagcgatggc 1620
tccttctttc tgtattccaa gctgacagtg gacaagtctc ggtggcagca gggcaacgtg 1680
ttttctgtt ctgtgatgca cgaggccctg cacaatcact ataccagaa ggcctgtcc 1740

ctgtctcccg gcaag 1755

<210> 144
<211> 359
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> short SIRPa- Fc (IgG1 knob LALA)359 AA, first monomer of
DSP216V6
<400> 144

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

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

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

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

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

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

 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 325 330 335
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 340 345 350

 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 145

<211> 1077

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #144

<400> 145

gaggaggagc tgcaggtcat ccagcccgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagacc	60
gccacactga ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggttttagg	120
ggagcaggcc ctggcagaga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagagtg	180
accacagtga gcgacctgac caagcggaac aatatggatt ttccatcag aatcggcaat	240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctccccagac	300
gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgcgggcaaa gggaggagga	360
ggcagcggag gaggaggctc cgagcctaag agctccgaca agaccacac atgcccacca	420
tgtcctgcac cagaggcagc aggaggacct tccgtgttcc tgtttcctcc aaagccaaag	480
gatacactga tgatctccag aacaccagag gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgtctcac	540
gaggacccc aggtgaagtt taactggtac gtggacggcg tggaggtgca caatgccaa	600
accaagccaa gggaggagca gtacaactcc acatatcgcg tgggtgtctgt gctgaccgtg	660
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag tataagtga aggtgagcaa taaggccctg	720
cccgcccta tcgagaagac catctccaag gcaaaggac agcccaggga gcctcaggtg	780
tacacactgc ccccttgccg cgacgagctg accaagaacc aggtgtctct gtggtgtctg	840
gtgaagggt tctaccatc tgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg ccagcccag	900
aacaattaca agaccacacc acccgtgctg gacagcgatg gctccttctt tctgtattcc	960
aagctgacag tggacaagtc tcggtggcag cagggaacg tgttttctg ttctgtgatg	1020
cacgagccc tgcacaatca ctatacccag aagagcctgt cctgtctcc cggcaag	1077

<210> 146

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT- Fc (IgG1 knob LALA)354 AA, first monomer of DSP502V4

<400> 146

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

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

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

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

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

 245 250 255

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

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

<210> 147

<211> 1062

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #146

<400> 147

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60
 ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120
 gaccagctgc tggccatctc taatgccgat ctgggctggc acatcagccc atcctttaag 180
 gatagggtgg caccaggacc aggcctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240
 acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcccgatg gcacctatac aggcagaatc 300
 tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggcag cggaggagga 360
 ggctccgagc ctaagtcttc tgacaagacc cacacatgcc ccccttgtcc tgcaccagag 420
 gcagcaggcg gaccttccgt gtctctgttt ccaccaagc caaaggatac cctgatgatc 480
 tccaggaccc ctgaggtgac atgcgtggtg gtggacgtgt ctcacgagga ccccaggtg 540
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaatg ccaagacaaa gcctcgggag 600
 gagcagtaca actccaccta tagagtgggtg tctgtgctga cagtgtctga ccaggattgg 660
 ctgaacggca aggagtataa gtgtaagggtg agcaataagg ccctgcccgc ccctatcgag 720

aaaaccatca gcaaggcaaa gggacagcca agggagccac aggtgtacac cctgcctcca 780
 tgccgcgacg agctgacaaa gaaccaggtg agcctgtggt gtctggtgaa gggcttctat 840
 ccatctgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatggccagc ccgagaacaa ttacaagacc 900

acacccctg tgctggactc cgatggctct ttttttctgt atagcaagct gaccgtggac 960
 aagtccagat ggcagcaggg caacgtgttt tcttcagcgt tgatgcacga ggccctgcac 1020
 aatcactaca cacagaagtc cctgtctctg agccccggca ag 1062

<210> 148

<211> 382

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1- Fc (IgG1 hole LALA)382 AA, second monomer of DSP502V4

<400> 148

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr

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

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

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

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

<210> 149

<211> 1146

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #148

<400> 149

gattcacccg atagaccttg gaaccacact accttctccc ccgcctgct ggtggtgaca 60

gagggcgaca atgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120

aattggtaca ggatgagccc ctccaaccag acagataagc tggccgcatt tccagaggac 180

cgcagccagc caggacagga ttcccgggtc agagtgacct agctgcctaa tggccgggac 240

tttcatatgt ctgtggtgag agcccggaga aacgatagcg gcacatacct gtgcggagcc 300

atctccctgg ccctaaggc acagatcaag gattccctga gggcagagct gagggtgacc 360

gagaggaggg cagaggtgcc aacagcacac ccttctccaa gccccggcc tgcaggacag 420

ggaggaggag gctccggcgg cggcgggtct gagccaaaga gctccgacaa gaccacaca 480

tgcccacat gtccagcacc agaggcagca ggaggacctt gcgtgttctt gtttctcca 540

aagccaaagg atacctgat gatctctagg accccagagg tgacatgctt ggtggtggac 600

gtgagccacg aggacccega ggtgaagttt aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 660

aacgccaaga caaagcctag ggaggagcag tacaattcta cctatcgctt ggtgagcgtg 720

ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagttaa ggtgtccaac 780

aaggccctgc ctgcccctat cgagaagacc atctctaagg caaagggaca gccccgggag 840

cctcaggtgt gcacctgcc ccctagcaga gacgagctga caaagaatca ggtgtccctg 900

tcttgtgccg tgaagggttt ctaccccagc gacatcgagc tggagtggga gtccaacgga 960

cagcctgaga acaattataa gaccacacca ccgtgctgg actctgatgg cagcttcttt 1020

ctggtgtcca agctgacctt ggacaagtct cggtggcagc agggcaacgt gtttagctgc 1080

tccgtgatgc acgaagcact gcacaaccac tacaccaga agtcactgtc actgtcccca 1140

ggaag 1146

<210> 150

<211> 645

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2- Fc (IgG1 hole LALA)382 AA, second monomer of DSP216V5

and DSP216V6

<400> 150

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

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

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

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

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

Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
260 265 270

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
275 280 285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
290 295 300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
305 310 315 320

Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
325 330 335

Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
340 345 350

Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
355 360 365

His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
370 375 380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys
405 410 415

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
420 425 430

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
435 440 445

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
450 455 460

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
465 470 475 480

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Leu Ser Pro Gly Lys

645

<210> 151

<211> 2019

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #150

<400> 151

tctagagcca ccatggagtc cccagcacag ctgctgttcc tgctgctgct gtggctgcct	60
gacggagtgc acgcacagac cggcacaatc ccaaagccca ccctgtgggc cgagcctgat	120
tccgtgatca cccagggctc tccagtgaca ctgtcctgcc agggctctct ggaggcccag	180
gagtaccggc tgtatagaga gaagaagtct gccagctgga tcacccggat cagacctgag	240
ctggtgaaga acggccagtt tcacatccca agcatcacct gggagcacac aggccggtac	300
ggatgccagt actattcccg ggccagatgg agcgagctgt ccgacctct ggtgctggtc	360

atgaccggcg cctatcctaa gccaacactg agcgcccagc catcccctgt ggtgaccagc 420
ggcggcagag tgacactgca gtgtgagtcc caggtggcct tcggcggcctt tatcctgtgc 480
aaggagggcg aggaggagca cccacagtgt ctgaacagcc agccacacgc ccggggcagc 540
tccagagcca tcttctccgt gggacccgtg agcccaaacc ggagatggag ccaccggtgc 600
tacggctatg acctgaatag cccttacgtg tggcttagcc catccgatct gctggagctg 660
ctggtgcccc gcgtgtccaa gaagccttcc ctgtctgtgc agccaggacc agtgggtgca 720

ccaggagagt ctctgacct gcagtgcgtg agcgacgtgg gctacgatcg gtctgtgctg 780
tataaaggagg gagagagga tctgaggcag ctgccaggca gacagccaca ggccggcctg 840
agccaggcca acittacact gggcccagtg agcaggctct atggcggaca gtacagggtgc 900
tatggagcac acaatctgtc ctctgagtgt tctgccccca gcgacccctt ggacatcctg 960
atcacggccc agatcagggg cacacccttc atctccgtgc agcctggacc aaccgtggcc 1020
tctggcgaga acgtgacact gctgtgccag tcttggcgcc agttccacac ctttctgctg 1080
acaaaggcag gaggcagaga cgcaccactg aggctgcgca gcatccacga gtacccaag 1140

tatcaggccg agtttccaat gtctccagt accagcgccc acgcaggcac atacaggtgt 1200
tatggcagcc tgaacagcga cccctacctg ctgagccacc cttccgagcc actggagctg 1260
gtggtgagcg gaggaggagg ctccggagga ggaggctctg gcggcggcgg cagcgagcct 1320
aagagctccg acaagaccca cacatgccc cttgttccag cacctgaggc agcaggagga 1380
ccatccgtgt tctgtttcc acccaagcct aaggataccc tgatgatctc tcgcaccctt 1440
gaggtgacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc ccgaggtgaa gtttaactgg 1500
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 1560

agcacctata gagggtgtc cgtgtgaca gtgtgcacc aggatggct gaacggcaag 1620
gagtacaagt gtaaggtgtc caataaggcc ctgccagccc ccatcgagaa gaccatctct 1680
aaggcaaagg gacagcccag ggagcctcag gtgtgcaccc tgcctccaag ccgcgacgag 1740
ctgacaaaga accaggtgtc tctgagctgt gccgtgaagg gcttctaccc atctgacatc 1800
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaatt ataagaccac acccctgtg 1860
ctggactctg atggcagctt ctttctggtg tccaagctga ccgtggataa gtctaggtgg 1920
cagcagggca acgtgttttc ctgttctgtg atgcacgagg ccctgcacaa tcactacaca 1980

cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaag tgagatatac 2019

<210> 152

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 Fc Hole LALA, Fc (AA 99-330) C220S L234A, L235A plus Hole

T366S and L368A Y407V) and Y349C (the numbers from KABAT) used in

DSP216V5, DSP216V6 and DSP502V4

<400> 152

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu 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> 153

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #152

<400> 153

gagcctaaga gctccgacaa gaccacacaca tgcccacctt gtccagcacc tgaggcagca 60

ggaggaccat ccgtgttctt gtttccaccc aagcctaagg atacctgat gatctctcgc 120

acccttgagg tgacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccccg ggtgaagttt 180

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag 240

tacaacagca cctatagagt ggtgtccgtg ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaac 300

ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaat aaggccctgc cagcccccat cgagaagacc 360

atctctaagg caaagggaca gcccaggag cctcaggtgt gcaccctgcc tccaagccgc 420

gacgagctga caaagaacca ggtgtctctg agctgtgccg tgaagggtct ctacccatct 480

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc cagcccgaga acaattataa gaccacacc 540

cctgtgctgg actctgatgg cagcttcttt ctggtgtcca agctgaccgt ggataagtct 600

aggtggcagc agggcaacgt gttttcctgt tctgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 660

tacacacaga agagcctgtc cctgtctccc ggcaag 696

<210> 154

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG1 Fc knob LALA (Fc IgG1 (AA 99-330) P01857-1 C220S (kabat)

plus Knob T366W (kabat) and S354C (kabat) plus L234A, L235A

(kabat), used in DSP216v5 and DSP502V4

<400> 154

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 155

<211> 698

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA of #154

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 155

nagagcctaa gagctccgac aagaccacaca catgccacc atgtcctgca ccagaggcag 60

caggaggacc ttccgtgttc ctgtttctc caaagccaaa ggataactg atgatctcca 120

gaacaccaga ggtgacctgc gtgggtgtgg acgtgtctca cgaggacccc gaggtgaagt 180

ttaactggta cgtggacggc gtggagggtgc acaatgccaa gaccaagcca agggaggagc 240

agtacaactc cacatatcgc gtgggtgtctg tctgaccgt gctgcaccag gattggctga 300

acggcaagga gtataagtgt aaggtagca ataaggccct gcccgccct atcgagaaga 360

ccatctccaa ggcaaaggga cagcccaggg agcctcaggt gtacacactg ccccttgcc 420

gcgacgagct gaccaagaac cagggtgtctc tgtgtgtct ggtgaagggc ttctacccat 480

ctgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg gccagccga gaacaattac aagaccacac 540

caccgtgct ggacagcgt ggctccttct ttctgtattc caagctgaca gtggacaagt 600

ctcgggtggca gcagggaac gtgttttct gttctgtgat gcacgaggcc ctgcacaatc 660

actataccca gaagagcctg tcctgtctc ccggcaag 698

<210> 156

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc

<400> 156

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 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> 157

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4-SPLE- Fc knob

<400> 157

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15
Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210

> 158

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc knob

<400> 158

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 159

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc hole

<400> 159

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

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

165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu

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

195 200 205

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

210

215

220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 160

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc knob only

<400> 160

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 Asp Glu Leu Thr

130

135

140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145

150

155

160

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

165

170

175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 161

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 Fc hole only

<400> 161

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 Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 162

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG1 C220S Fc Hole

<400> 162

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

165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 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> 163

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4-SPLE- Fc knob NO Y349C

<400> 163

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

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

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

 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 164
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <
 220><223> hIgG4-SPLE- Fc Hole NO E356C
 <400> 164
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

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

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

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

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