



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월26일
(11) 등록번호 10-2355950
(24) 등록일자 2022년01월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7028576
(22) 출원일자(국제) 2017년03월03일
심사청구일자 2020년02월27일
(85) 번역문제출일자 2018년10월02일
(65) 공개번호 10-2018-0119653
(43) 공개일자 2018년11월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/020719
(87) 국제공개번호 WO 2017/152088
국제공개일자 2017년09월08일
- (30) 우선권주장
62/413,025 2016년10월26일 미국(US)
62/304,045 2016년03월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02016028656 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
제이엔 바이오사이언시즈 엘엘씨
미국 캘리포니아 마운틴뷰 로그 애비뉴 320 (우: 94043)
에브무노 테라퓨틱스 엘엘씨
미국 캘리포니아 버클리 채닝 웨이 914 (우: 94710)
- (72) 발명자
초, 제이., 윤
미국 94043 캘리포니아 마운틴 뷰 로그 애비뉴 320
츠루시타, 나오야
미국 94043 캘리포니아 마운틴 뷰 로그 애비뉴 320
듀라매드, 오마르
미국 94710 캘리포니아 버클리 차닝 웨이 914
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 17 항

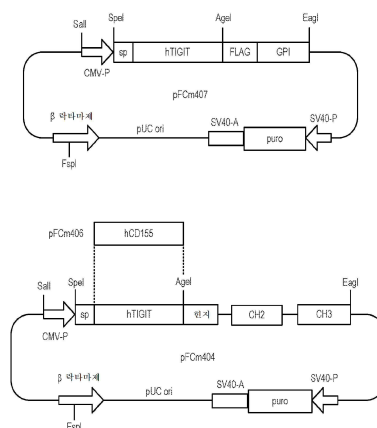
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 TIGIT에 대한 항체

(57) 요약

본 발명은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. 모노클로날 항체는 CD155에 대한 TIGIT의 결합을 억제함에 의해 T 세포 및 자연 살해 세포의 실질적인 활성화를 위한 능력을 갖는다. 모노클로날 항체는 다른 적용 중에서 암 및 감염성 질환의 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/39541 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61P 35/02 (2018.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

C07K 16/3061 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

TIGIT 폴리펩티드에 결합하는 모노클로날 항체로서,

- (a) SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3;
- (b) SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3; 또는
- (c) SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, SEQ ID NO: 35와 적어도 90%의 서열 동일성을 가지는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 37과 적어도 90%의 서열 동일성을 가지는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, SEQ ID NO: 35와 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 37과 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 가지는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 가지는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,

- (a) SEQ ID NO: 14의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 10의 성숙 중쇄 가변 영역; 또는
- (b) SEQ ID NO: 22의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 18의 성숙 중쇄 가변 영역; 또는
- (c) SEQ ID NO: 30의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 26의 성숙 중쇄 가변 영역을 포함하는, 모노클로날 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 다음 특성 중 하나 이상을 가지는, 모노클로날 항체:

- (a) CD155에 대한 TIGIT의 결합을 억제;
- (b) IL-2 생산에 의해 측정된 바와 같이 CD155를 발현하는 항원 제시 세포의 존재 하에 고유 T 세포 활성화를 증가;
- (c) IL-12 생산에 의해 측정된 바와 같이 항원-특이적 T 세포 활성화를 증가;
- (d) IL-2, IL-6, TNF α 또는 IFN γ 중 어느 하나의 생산에 의해 측정된 바와 같이 자연 살해 세포 활성화를 증가;
- (e) 적어도 하나의 전-염증성 사이토카인의 T-세포 생산을 증가; 및
- (f) 적어도 하나의 항-염증성 사이토카인의 T-세포 생산을 감소.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 40을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 41을 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되는, 모노클로날 항체.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 60을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되거나; 또는
- (b) 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 61을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되는, 모노클로날 항체.

청구항 9

제6항에 있어서, 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 40을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 41을 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되는, 모노클로날 항체.

청구항 10

제6항에 있어서,

- (a) 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 60을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되거나; 또는
- (b) 성숙 중쇄 가변 영역이 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO: 61을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결되는, 모노클로날 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 키메라, 인간화, 베니어드화, 또는 인간 항체이고/이거나; (i) 인간 IgG1 카파 아이소형을 갖거나; (ii) 무손상 항체이거나; 또는 (iii) 단일-사슬 항체, Fab 또는 F(ab')₂ 단편인, 모노클로날 항체.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제6항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제7항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제8항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제9항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

제10항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후 참조

[0002] 본 출원은 2016년 3월 4일 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/304,045 및 2016년 10월 26일 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/413,025에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 설명은 전문이 본원에 참조로서 포함된다.

배경 기술

[0003] 발명의 분야

[0004] 면역 체크포인트 분자에 특이적으로 결합하여, 면역 세포의 실질적인 활성화를 발생시키는 모노클로날 항체뿐만 아니라 다른 적용들 중에서, 암 및 감염성 질환의 치료를 위한 이의 용도가 특히 본원에 제공된다.

[0005] 배경

[0006] 항원-특이적 면역 반응은 양성 및 음성 조절인자의 다중 층에 의해 제어되는 복잡한 생물학적 과정이다. T 세포는 항원-제시 세포 상의 주조직적합성 복합체(MHC) 분자에 의해 제시된 이들의 인지체 펩티드 항원의 인지에 의해 T 세포 수용체(TCR)를 통해 처음에 자극된다. 최적의 T 세포 활성화는 CD28과 같은 보조자극 분자에 의해 제공되는 "제2 신호"를 필요로 한다. 면역 반응은 TNF 수용체 슈퍼-패밀리에 속하는 OX40, GITR 및 4-1BB와 같은 보조자극 분자에 의해 양성적으로 추가로 조절되고, PD-1 및 CTLA-4와 같은 체크포인트 분자에 의해 음성적으로 조절된다. 체크포인트 분자의 기능은 신체의 면역 시스템의 바람직하지 않은 과반응을 방지하는 것이다; 그러나, 이들은 또한 암 및 감염성 질환과 효과적으로 싸우는 면역 시스템의 능력을 제한한다. 길항성 모노클로날 IgG 항체에 의해 PD-1 또는 CTLA-4의 기능을 차단하는 것이 인간의 암 면역요법에 효과적이라고 보고되었다(검토를 위해. 문헌[Pardoll, *Nat. Rev. Cancer*, 12:252-264, 2012; Mahoney et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:561-584, 2015; Shin et al., *Curr. Opin. Immunol.* 33:23-35, 2015; Marquez-Rodas et al. *Ann. Transl. Med.* 3:267, 2015] 참조).

[0007] TIM-3, LAG-3, TIGIT, BTLA, 및 VISTA와 같은 다른 체크포인트 분자가 보고되었다(Mercier et al., *Front. Immunol.* 6:418, 2015). 세포질 꼬리에서 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITIM)를 갖는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원인 TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체)는 활성화된 T 세포 및 자연 살해(NK) 세포의 서브세트 상에서 발현된다(Yu et al., *Nat. Immunol.* 10:48-57, 2009). TIGIT는 CD155(PVR 및 nectin-5로도 불림), CD112(PVRL2 및 nectin-2로도 불림), 및 아마도 CD113(PVRL3 및 nectin-3로도 불림)과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Mercier et al., 상술함; Martinet et al., *Nat. Rev. Immunol.* 15:243-254, 2015). 항원-제시 세포 상에서 발현되는 고친화성 리간드 CD155와 TIGIT의 결합은 T 세포 및 NK 세포의 기능을 억제하는 것으로 보고되었다(Mercier et al., 상술함; Joller et al., *J. Immunol.* 186: 1338-1342, 2011; Stanitsky et al., *Eur. J. Immunol.* 43:2138-2150, 2013; Li et al., *J. Biol. Chem.* 289:17647-17657, 2014; Zhang et al. *Cancer Immunol. Immunother.* Epub on Feb. 3, 2016). TIGIT는 또한 수지상 세포에 의한 사이토카인 생성을 조절함에 의해 간접적으로 T 세포를 억제하는 것으로 보고되었다(Yu et al., 상술함).

[0008] 종양은 침윤성 T 세포가 고갈되고 NK 세포가 면역 반응으로부터 회피하기 위해 PD-1 및 TIGIT와 같은 체크포인트 분자에 의해 침묵하게 되는 고도로 억제성 미세환경을 구성한다(Johnston et al., *Cancer Cell.* 26:926-937, 2014; Chauvin et al., *J. Clin. Invest.* 125:2046-2058, 2015; Inozume et al., *J. Invest. Dermatol.* Epub on Oct 12, 2015). CD8+ T 세포 상에서 TIGIT의 높은-수준 발현은 AML 대상체의 빈약한 임상 결과와 관련이 있다고 보고되었다(Kong et al., *Clin. Cancer Res.* Epub on Jan. 13, 2016). AML 대상체로부터의 고갈된 TIGIT + CD8+ T 세포의 기능적 결합은 TIGIT 발현의 siRNA-매개 녹다운에 의해 역전되는 것으로 보고되었다(Kong et al., 상술함). 혈액의 HIV 감염 및 림프계 조직의 SIV 감염 동안 효과기 CD8+ T 세포는 더 높은 수준의 TIGIT 나타낸다고 또한 보고되었다(Chew et al., *PLOS Pathogens*, 12:e1005349, 2016). 또한, TIGIT의 생체외 항체 차단은 바이러스-특이적 CD8+ T 세포 효과기 반응을 회복시키는 것으로 보고되었다.

[0009] 개요

[0010] 본 발명은 특히 인간 TIGIT에 대한 결합에 대해 TIG1, TIG2 또는 TIG3 중 어느 하나와 경쟁하는 항체를 제공한

다. TIGIT에 대한 특이적 결합을 위해, 항체 TIG1은 SEQ ID NO:14의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:10의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 하고, 항체 TIG2는 SEQ ID NO:22의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:18의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 하고, 항체 TIG3은 SEQ ID NO:30의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:26의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 한다. 일부 항체는 TIG1, TIG2 또는 TIG3와 동일한 인간 TIGIT의 에피토프에 결합한다. 일부 항체는 CD155에 대한 인간 TIGIT의 결합을 억제한다. 일부 항체는 실질적으로 TIG1으로부터의 상응하는 3개의 경쇄 및 3개의 중쇄 CDR로부터의 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 항체는 TIG1, TIG2, 또는 TIG3의 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 항체는 TIG1(SEQ ID NO: 15-17 경쇄 및 11-13 중쇄), TIG2(SEQ ID NO: 23-25 경쇄, 19-21 중쇄) 또는 TIG3(SEQ ID NO: 31-33 경쇄 및 27-29 중쇄) 중 어느 하나의 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 3개의 중쇄 CDR 및 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.

[0011] 일부 모노클로날 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35 및 37 및/또는 SEQ ID NO:1의 잔기 49 및 51을 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합한다. 일부 모노클로날 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35, 37, 49 및 51을 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합한다. 일부 모노클로날 항체는 양쪽에서 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51로 구성된 펩티드 및 SEQ ID NO:1로부터의 5개 이하의 측점 아미노산에 결합한다. 일부 모노클로날 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51로 구성된 펩티드에 결합한다. 그러한 일부 모노클로날 항체는 SEQ ID NO:1의 3 내지 20개 인접 잔기로 구성된 에피토프에 결합한다.

[0012] 일부 항체는 키메라, 인간화, 베니어드(veneered) 또는 인간 항체이다. 일부 항체는 인간 IgG1 카파 아이소형을 갖는다. 일부 항체는 인간 IgG4 카파 아이소형을 갖는다. 항체는 무손상 항체 또는 단일-사슬 항체, Fab 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다.

[0013] 본 발명은 상기 항체 중 어느 하나 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 추가로 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 항체 중 어느 하나의 효과적인 요법을 암을 갖거나 암의 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체의 암을 치료하거나 예방하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 방법에서, 대상체는 급성 골수성 백혈병 또는 성인 T-세포 백혈병을 갖는다.

[0015] 다른 구체예에서, 본 발명은 면역 체크포인트 억제제와 함께 본원에 기재된 항체의 사용을 고려한다. 항원-특이적 T 세포 반응의 증폭을 발생시키는 면역 체크포인트의 차단은 인간 암 치료법에서 유망한 접근법인 것으로 나타났다. 일부가 다양한 유형의 종양 세포에서 선택적으로 상향조절되는, 차단을 위한 후보인 면역 체크포인트(리간드 및 수용체)의 예는 PD-1(프로그램된 세포 사멸 단백질 1); PD-L1(프로그램된 사멸 리간드-1); BTLA (B 및 T 림프구 약독화제); CTLA-4(세포독성 T-림프구 관련 항원 4); TIM-3(T-세포 막 단백질 3); LAG-3(림프구 활성화 유전자 3); T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제제(VISTA); CD96; A2aR(아데노신 A2a 수용체); A2bR(아데노신 A2b 수용체); CD73(엑토-5'-뉴클레오타이드); CD39(ENTPD1, NTPDase1); 아르기나제; 인돌아민-피롤 2,3-디옥시게나제(IDO); 트립토판 2,3-디옥시게나제(TDO); 및 살해 억제 수용체(Killer Inhibitory Receptors)를 포함한다. 면역 체크포인트 억제제, 및 이와 조합 요법은 본원의 다른 곳에서 상세하게 논의된다.

[0016] 본 발명은 상기 항체 중 어느 하나의 효과적인 요법을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 병원체에 감염된 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 방법에서, 병원체는 HIV 또는 SIV이다. 다른 방법에서, 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균, 또는 원생동물이다.

[0017] 추가적인 양태에서, D51을 포함하는 하나 이상의 아미노산 잔기 상에서 TIGIT 폴리펩티드에 결합하는 항-TIGIT 항체가 본원에 제공되고, TIGIT 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 베니어드 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 항체이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 L44, I47, 또는 H55를 포함하는 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합하지 않는다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:14의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:10의 성숙 중쇄 가변 영역을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:1에 상응하는 아미노산 서열 상에서 TIG1과 동일한 에피토프에 결합한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:15-17을 포함하는 3개의 경쇄 CDR 및 SEQ ID NO:11-13을 포함하는 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:35와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:37과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하고,

성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37의 아미노산 서열을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:40을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:41을 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다.

[0018]

추가 양태에서, 인간 TIGIT에 대한 결합에 대해 TIG1, TIG2 또는 TIG3 중 어느 하나와 경쟁하는 모노클로날 항체가 본원에 제공되고, 이 때 CD155에 대한 특이적 결합을 위해, 항체 TIG1은 SEQ ID NO:14의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:10의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 하고, 항체 TIG2는 SEQ ID NO:22의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:18의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 하고, 항체 TIG3은 SEQ ID NO:30의 성숙 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:26의 성숙 중쇄 가변 영역을 특징으로 한다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 TIGIT 상에서 TIG1, TIG2 또는 TIG3 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 인간 TIGIT에 대한 CD155의 결합을 억제한다. 일부 구체예에서, 항체는 TIG1, TIG2 또는 TIG3 중 어느 하나의 3개의 경쇄 및 3개의 중쇄 CDR에 상응하는 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 TIG1, TIG2 또는 TIG3 중 어느 하나의 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 TIG1(SEQ ID NO:15-17 경쇄 및 11-13 중쇄), TIG2(SEQ ID NO:23-25 경쇄, 19-21 중쇄) 또는 TIG3(SEQ ID NO:31-33 경쇄 및 27-29 중쇄) 중 어느 하나의 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 3개의 중쇄 CDR 및 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 베니어드 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 항체이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 인간 IgG1 카파 아이소형을 갖는다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 무손상 항체이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 단일-사슬 항체, Fab 또는 F(ab')₂ 단편이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:35와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:37과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:35와 적어도 95 또는 99% 서열 동일성을 갖고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37과 적어도 95 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 갖고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:40을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:41을 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:60을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:61을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:64를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:43과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:45와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:43과 적어도 95 또는 99% 서열 동일성을 갖고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:45와 적어도 95 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:43의 아미노산 서열을 갖고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:45의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:48을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:49를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:62를 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:65를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 일부 구체예에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:63을 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:65를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 또 다른 양태에서, SEQ ID NO:1의 잔기 35 및 37 및/또는 SEQ ID NO:1의 잔기 49 및 51을 포함하는 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체가 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35, 37, 49 및 51을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에서, 항체는 양쪽에서 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51로 구성된 펩티드 및 SEQ ID NO:1로부터의 5개 이하의 측점 아미노산에 결합한다. 일부 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51로 구성된 펩티드에 결합한다. 일부 구체예에서, 에피토프는 SEQ ID NO:1의 3 내지 20개 인접 잔기로 구성된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체는 하기 특성 중 하나 이상을 갖는다: (a) CD155에 대한 TIGIT의 결합을 임의로 15-100 ng/ml의 IC50으로 억제하고, (b) IL-2 생산에 의해 측정된 바와 같이 CD155를 발현하는 항원 제시 세포의 존재 하에 고유 T-

세포 활성화를 임의로 1.5-3배 증가시키고, (c) IL-12 생산에 의해 측정된 바와 같이 항원-특이적 T 세포 활성화를 임의로 1.5-3배 증가시키고, (d) IL-2, IL-6, TNF α 또는 IFN γ 중 어느 하나의 생산에 의해 측정된 바와 같이 자연 살해 세포 활성화를 임의로 1.5-3배 증가시키고, (e) 적어도 하나의 전-염증성 사이토카인의 T-세포 생산을 임의로 1.5-3배 증가시키고, (f) 적어도 하나의 항-염증성 사이토카인의 T-세포 생산을 임의로 1.5-3배 감소시킨다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본원에 제공된 항체 중 어느 하나 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0020] 추가 양태에서, 암을 갖거나 암의 위험이 있는 대상체에게 본원에 개시된 항체 중 어느 하나의 효과적인 요법 또는 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하거나 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 암은 급성 골수성 백혈병 또는 성인 T-세포 백혈병이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체에 의해 활성화되는 종양 침윤성 T 세포가 대상체에 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체에 의해 강화된, 암에 대한 면역 반응을 유도하는 백신이 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, 백신은 암 세포의 표면 상에 발현되는 항원 또는 이의 단편을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 암에 대한 세포독성이 항체에 의해 강화되는 자연 살해 세포가 대상체에 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 암 세포의 표면 상에 발현되는 항원에 대한 제2 항체가 대상체에 추가로 투여되어, 암에 대한 제2 항체의 효과기 매개된 세포독성이 항체에 의해 강화된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 면역 세포의 표면 상에 발현되는 항원에 대한 제2 항체가 대상체에 추가로 투여된다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 T-세포 또는 자연 살해 세포이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항원은 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 화학요법, 방사선, 세포-기반 요법, 및 수술로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 요법이 대상체에 추가로 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 하나 이상의 면역-체크포인트 수용체 또는 리간드의 억제제가 대상체에 추가로 투여된다. 일부 구체예에서, 억제제는 이필리무맙(ipilimumab), 니볼루맙(nivolumab), 펄브롤리주맙(pembrolizumab)(람브롤리주맙(lambrolizumab)) 및 아테졸리주맙(atezolizumab)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0021] 추가적인 양태에서, 본원에 개시된 항체 중 어느 하나의 효과적인 요법 또는 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 병원체에 감염된 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균, 또는 원생동물이다. 일부 구체예에서, 병원체는 HIV, SIV, 간염, 헤르페스 바이러스, 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코르노바이러스, 호흡기 융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 탕기 바이러스, 유두종바이러스, 물렁종 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스, 아르보바이러스 뇌염 바이러스, 클라미디아(chlamydia), 리케차(rickettsial) 박테리아, 마이코박테리아, 포도상구균, 연쇄상구균(treptocci), 폐렴구균, 수막구균, 코노코사이(conococci), 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실리, 콜레라, 파상풍, 보툴리누스중독, 탄저병, 페스트, 랩토스피라병, 및 라임병 박테리아이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 대상체는 항체에 의해 강화된, 병원체에 대한 면역 반응을 유도하는 백신으로 치료된다. 일부 구체예에서, 백신은 병원체의 단백질 또는 이의 단편을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 병원체에 대한 제2 항체가 대상체에 추가로 투여되고, 병원체에 대한 제2 항체의 효과기 매개된 세포독성은 항체에 의해 강화된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항바이러스제, 항기생충제, 항박테리아제, 또는 항진균제 중 하나 이상이 대상체에 추가로 투여된다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 항체 중 어느 하나의 치료적 유효량을 암을 갖는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료를 돕는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 암은 급성 골수성 백혈병 또는 성인 T-세포 백혈병이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체에 의해 활성화되는 종양 침윤성 T-세포가 대상체에 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항체에 의해 강화된, 암에 대한 면역 반응을 유도하는 백신이 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, 백신은 암 세포의 표면 상에 발현되는 항원 또는 이의 단편을 포함한다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 암에 대한 세포독성이 항체에 의해 강화되는 자연 살해 세포가 대상체에 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 암 세포의 표면 상에 발현되는 항원에 대한 제2 항체가 대상체에 추가로 투여되어, 암에 대한 제2 항체의 효과기 매개된 세포독성이 항체에 의해 강화된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 면역 세포의 표면 상에 발현되는 항원에 대한 제2 항체가 대상체에 추가로 투여된다. 일부 구체예에서, 면역 세포는

T-세포 또는 자연 살해 세포이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 항원은 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1이다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 화학요법, 방사선, 세포-기반 요법, 및 수술로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 요법이 대상체에 추가로 투여된다. 본원에 개시된 구체예 중 어느 하나의 일부 구체예에서, 하나 이상의 면역-체크포인트 수용체 또는 리간드의 억제제가 대상체에 추가로 투여된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 면역-체크포인트 수용체 또는 리간드는 CTLA-4, PD-1 및 PD-L1으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 억제제는 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙(람브롤리주맙) 및 아테졸리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0023] 본원에 기술된 각각의 양태 및 구체예는 구체예 또는 양태의 문맥으로부터 명확하게 또는 명백하게 배제되지 않는 한, 함께 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 재조합 TIGIT 및 CD155 단백질에 대한 발현 벡터의 개략적인 구조이다.

도 2는 항-TIGIT 항체에 의한 TIGIT-CD155 상호작용의 억제를 나타낸다.

도 3은 TIG1 VH의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 TIG1 VL의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 5는 TIG2 VH의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 6은 TIG2 VL의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 7은 TIG3 VH의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8은 TIG3 VL의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 9a는 HuTIG1 VH 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 인코딩된 아미노산 서열을 나타내는 한편, 도 9b는 HuTIG1 VL 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 인코딩된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 10은 발현 벡터 pHuTIG1.AA의 개략적인 구조를 도시한다.

도 11은 인간 TIGIT에 대한 HuTIG1-IgG1.AA의 결합에 대한 ELISA 분석의 결과를 도시한다.

도 12: 인간 TIGIT에 대한 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA의 결합에 대한 FACS 분석.

도 13은 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA에 의한 인간 TIGIT 및 인간 CD155 사이의 상호작용의 차단을 도시하는 그래프이다.

도 14a는 HuTIG3 VH 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 인코딩된 아미노산 서열을 나타내는 한편, 도 14b는 HuTIG3 VL 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 인코딩된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 15는 인간 TIGIT에 대한 HuTIG3-IgG1.AA의 결합에 대한 ELISA 분석을 나타낸다.

도 16은 항원-특이적 리콜 자극에서 TIG1에 의한 IL-2 생산의 증가를 나타낸다.

도 17은 항원-특이적 리콜 자극에서 TIG1에 의한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 증식의 증가를 나타낸다.

도 18은 K562 세포(상부) 상의 CD155 및 NK 세포(하부) 상의 TIGIT의 발현을 도시한다.

도 19는 K562 표적 세포에서 TIG1에 의해 향상된 NK 세포 매개 세포독성을 나타낸다.

도 20은 HuTIG1-IgG1.AA가 사이토카인 효과를 반응을 강화시킨다는 것을 나타낸다.

도 21은 인간 TIGIT의 그 세포 표면 상의 Jurkat-TIGIT 세포주 발현을 도시한다.

도 22는 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA가 CDC 활성을 유도하지 않음을 나타낸다.

도 23은 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA가 항-인간 TIGIT 항체에 대한 시험관 내 T-세포 길항 활성 검정에서 고유 T 세포 활성화를 증가시켰음을 보여준다.

도 24는 GM-CSF/IL-4 분화된 단핵구-유래 수지상 세포(moDC)가 CD112, CD155 및 PD-L1을 발현시켰음을 보여준다.

도 25는 HuTIG1-IgG1.AA, 항-PD-L1 항체 및 HuTIG1-IgG1.AA를 항-PD-L1 항체와 함께 첨가시 IFN γ 의 분비 향상을 나타낸다.

도 26A는 인간 림프구 및 골수 세포에서 TIGIT 및 CD96의 발현을 나타낸다. 도 26B는 다양한 발현 수준의 항-TIGIT 염색의 대표적인 히스토그램을 도시한다.

도 27은 유세포분석에 의한 HuTIG1-IgG1.AA 에피토프 맵핑을 나타낸다.

도 28은 막대 표시로 나타낸 넘버링된 에피토프 잔기 측쇄를 갖는 인간 TIGIT의 세포의 IgV 도메인의 리본 표시를 나타낸다.

도 29a 및 도 29b는 TIGIT 발현에 대한 CD4+ T 세포 서브세트 분석의 결과를 나타낸다.

도 30a 및 도 30b는 TIGIT 발현에 대한 CD8+ T 세포 서브세트 분석의 결과를 나타낸다.

도 31은 K562 표적 세포에서 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA에 의해 향상된 NK 세포-매개 세포독성을 나타낸다.

도 32A는 분리된 종양 샘플로부터의 종양 침윤성 림프구 상의 TIGIT의 발현을 나타낸다. 도 32B는 다양한 발현 수준의 항-TIGIT 염색의 대표적인 히스토그램을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 상세한 설명

[0026] 본 발명은 특히 TIGIT의 세포의 도메인에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 제공하며, 이는 세포질 꼬리에서 면역수용체 티로신-기반 억제성 모티프(ITIM)를 갖는 면역글로블린 슈퍼패밀리의 구성원이다. 모노클로날 항체는 CD155에 대한 TIGIT의 결합을 억제하여 T 세포 및/또는 NK 세포를 활성화시킬 수 있다. 모노클로날 항체는 다른 적용 중에서 암 및 감염성 질환의 치료에 사용될 수 있다.

[0027] I. 정의

[0028] 모노클로날 항체 또는 다른 생물학적 실체, 예를 들어, TIGIT의 단편은 전형적으로 분리된 형태로 제공된다. 이는 항체 또는 다른 생물학적 실체가 전형적으로 이의 생산 또는 정제로부터 발생하는 적어도 50% w/w 순수한 간섭 단백질 및 다른 오염물질이지만 모노클로날 항체가 과량의 약학적으로 허용되는 담체(들) 또는 이의 사용을 용이하게 하기 위해 의도된 다른 비히클과 조합될 가능성을 배제하지 않음을 의미한다. 때로 모노클로날 항체는 생산 또는 정제로부터의 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 99% w/w 순수한 간섭 단백질 및 오염물질이다. 종종 분리된 모노클로날 항체 또는 다른 생물학적 실체 제제는 이의 정제 후 잔류하는 주요 거대분자 종이다.

[0029] 모노클로날 항체의 이의 표적 항원에 대한 특이적 결합은, 예를 들어, 실시예 15의 검정에 의해 결정되는 적어도 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} M^{-1} 의 친화도(결합 상수 또는 K_a)를 의미한다. 특이적 결합은 크기에 있어서 검출 가능하게 더 높고 적어도 하나의 관련이 없는 표적에 대해 발생하는 비특이적 결합과 구별될 수 있다. 특이적 결합은 특정 작용기 사이의 결합 형성 또는 특정 공간 핏(예를 들어, 잠금 및 키 유형)의 결과일 수 있는 반면, 비특이적 결합은 일반적으로 반 데르 발스 힘의 결과이다. 그러나, 특이적 결합은 모노클로날 항체가 반드시 1개 및 단 1개의 표적에 결합한다는 것을 의미하지는 않는다.

[0030] 기본 항체 구조 단위는 서브유닛의 사합체이다. 각각의 사합체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 각 쌍은 1개의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄"(약 50-70 kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 항원 인지에 주로 관여하는 약 100 내지 110개 또는 그 초과 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 이 가변 영역은 초기에 절단 가능한 신호 펩티드에 연결되어 발현된다. 신호 펩티드가 없는 가변 영역은 때로 성숙 가변 영역으로 지칭된다. 따라서, 예를 들어, 경쇄 성숙 가변 영역은 경쇄 신호 펩티드가 없는 경쇄 가변 영역을 의미한다. 각 사슬의 카르복시-말단 부분은 효과기 기능에 주로 관여하는 불변 영역을 정의한다.

[0031] 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 항체 아이소형을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 결합되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. (일반적으로, 문헌[Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7] 참조)(모든 목적을 위해 그 전문이 참조로서 포함됨).

- [0032] 각 경쇄/중쇄 쌍의 성숙 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 무손상 항체는 2개의 결합 부위를 갖는다. 이작용성 또는 이중특이적 항체를 제외하고, 2개의 결합 부위는 동일하다. 사슬은 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR이라고도 하는 3개의 과가변 영역에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반적인 구조를 나타낸다. 각 쌍의 2개의 사슬로부터의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬되어, 특정 에피토프에 대한 결합을 가능하게 한다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인에 대한 아미노산의 할당은 Kabat의 정의에 따른다(*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), or Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989)). Kabat은 또한 상이한 중쇄 사이 또는 상이한 경쇄 사이의 상응하는 잔기가 동일한 번호로 할당되는 널리 사용되는 넘버링 규정(Kabat 넘버링)을 제공한다.
- [0033] 용어 "항체"는 무손상 항체 및 이의 결합 단편을 포함한다. 따라서, 항체에 대한 임의의 언급은 문맥상 달리 요구하지 않는 한 무손상 형태의 항체 또는 결합 단편을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 전형적으로, 단편은 표적에 대한 특정 결합을 위해 단편이 유래된 무손상 항체와 경쟁하며 분리된 중쇄, 경쇄 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, Dab, 나노바디, 및 scFv, 디아바디, scFv-Fc, 미니바디, IgNAR, V-NAR, hcIgG, bis-scFv, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함한다. 단편은 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 무손상 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분리에 의해 생산될 수 있다. 용어 "항체"는 또한 이중특이적 항체를 포함한다. 이중특이적 또는 이작용성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다(예를 들어, 문헌[Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)] 참조).
- [0034] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 에피토프는 연속 아미노산 또는 하나 이상의 단백질의 삼차 폴딩에 의해 나란히 놓인 비연속 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프(선형 에피토프로도 알려짐)는 전형적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면 삼차 폴딩에 의해 형성되는 에피토프(입체형태 에피토프로도 알려짐)는 전형적으로 변성 용매로 처리시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간 입체형태로 적어도 3개, 및 보다 일반적으로, 적어도 5개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 입체형태를 결정하는 방법은, 예를 들어, X선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)]을 참조하라.
- [0035] 동일하거나 중첩 에피토프를 인지하는 항체는 표적 항원에 대한 다른 항체의 결합과 경쟁하는 한 항체의 능력을 나타내는 간단한 면역검정에 의해 확인될 수 있다. 항체의 에피토프는 또한 접촉 잔기를 확인하기 위해 이의 항원에 결합된 항체의 X-선 결정학에 의해 정의될 수 있다. 대안적으로, 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 두 항체는 동일한 에피토프를 갖는다. 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 두 항체는 중첩 에피토프를 갖는다.
- [0036] 항체 간의 경쟁은 시험 조건 하에 항체가 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 검정에 의해 결정된다(예를 들어, 문헌[Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990]) 참조). 과량의 시험 항체(예를 들어, 적어도 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x 또는 그 초과, 이러한 값들 사이에 속하는 숫자 포함)가 기준 항체의 결합을 적어도 50%, 그러나 바람직하게는 75%, 90%, 또는 99%만큼 억제하는 경우 시험 항체는 기준 항체와 경쟁한다. 다른 구체예에서, 과량의 시험 항체가 경쟁적 결합 검정으로 측정시 기준 항체의 결합을 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70% 중 어느 하나, 또는 바람직하게는 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%만큼 억제하는 경우 시험 항체는 기준 항체와 경쟁한다. 경쟁 검정(경쟁 항체)에 의해 확인된 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애가 발생할 정도로 기준 항체에 의해 결합되는 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 바람직하게는 경쟁은 실시예 14에서와 같이 평가된다.
- [0037] 용어 "대상체"는 인간 및 다른 포유동물 대상체를 포함한다. 일부 경우에, 본 발명의 방법은 마우스, 래트, 햄스터를 포함하는 설치류 뿐만 아니라, 영장류, 예를 들어, 원숭이를 비제한적으로 포함하는 동물 실험, 수의학 적 적용, 및 질병에 대한 동물 모델의 개발에 유용하다. 일부 구체예에서, 대상체는 예방적 또는 치료적 치료를 받거나 치료를 받을 후보이다.

- [0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, 기준 아미노산 서열의 아미노산 잔기에 "상응하는" 관심 아미노산 서열의 아미노산 잔기는 관심 서열의 아미노산 잔기가 기준 아미노산 서열의 열거된 잔기에 상동이거나 동등한 위치에 있는 것을 나타낸다. 당업자는 TIGIT 폴리펩티드와 같은 폴리펩티드의 특정 아미노산 잔기 위치가 상동 기준 서열의 특정 아미노산 잔기 위치에 상응하는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, TIGIT 폴리펩티드의 서열은 공지된 기술(예를 들어, 블라스트(BLAST, basic local alignment search tool), ClustalW2, 스트랩(STRAP, Structure based sequences alignment program) 등)을 사용하여 기준 서열의 것과 정렬될 수 있다. 또한, 상동성 폴리펩티드 잔기의 3차원 구조를 결정하는데 있어서 기준 서열의 결정 구조 좌표가 도움이 될 수 있다(Stengel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:5399-5404, 2012). 또 다른 양태에서, 동등한 잔기는 삼차 구조 수준에서 상동성을 결정함에 의해 확인될 수 있다. 그러한 방법을 사용하여, TIGIT 폴리펩티드 변이체의 아미노산 잔기는 기준 서열의 상응하는 아미노산 잔기 위치 넘버링에 따라 넘버링될 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열은 관심 TIGIT 변이체 또는 에피토프의 각 아미노산 잔기의 아미노산 잔기 위치 넘버링을 결정하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 한 아미노산 서열은 이것이 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 공유하는 경우 다른 아미노산 서열에 상응한다.
- [0039] 아미노산 치환을 보존적 또는 비보존적으로 분류하기 위해, 아미노산은 다음과 같이 그룹화된다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V(사슬 배향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환은 동일한 부류의 아미노산 간의 치환을 포함한다. 비보존적 치환은 이러한 부류 중 하나의 구성원을 다른 구성원으로 교환하는 것으로 구성된다.
- [0040] 백분율 서열 동일성은 Kabat 넘버링 규칙에 의해 최대로 정렬된 항체 서열로 결정된다. 정렬 후, 해당 항체 영역(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙 가변 영역)이 기준 항체의 동일 영역과 비교되는 경우, 해당 및 기준 항체 영역 사이의 백분율 서열 동일성은 해당 및 기준 항체 영역 둘 모두에서 동일한 아미노산에 의해 점유된 위치의 수를 2개의 영역의 정렬된 위치의 전체 수로 나누고(겹은 계수되지 않음), 100을 곱하여 백분율로 전환시킨 것이다.
- [0041] 하나 이상의 열거된 요소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 언급되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 포함하는 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분과 함께 함유할 수 있다.
- [0042] 문맥상 달리 명백하지 않는 한, 범위에 대한 언급은 범위 내의 모든 정수 및 그러한 정수로 정의된 모든 하위범위를 포함한다.
- [0043] **II. 표적 분자**
- [0044] 달리 명시하지 않는 한 TIGIT는 인간 TIGIT를 의미한다. 예시적인 인간 서열은 Swiss-Prot 수탁 번호 Q495A1로 지정된다. 완전한 인간 TIGIT 서열은 244개 아미노산을 갖고 이 중 아미노산 1-21은 신호 펩티드이고 22-244는 성숙 단백질을 구성한다(SEQ ID NO:1). 대략 잔기 22-141은 세포외 도메인을 구성한다(SEQ ID NO:3). 대략 잔기 142-162는 막횡단 도메인을 구성하고, 대략 잔기 163-244는 세포질 도메인을 구성한다.
- [0045] 달리 명시하지 않는 한 CD155는 이 단백질의 인간 형태를 지칭한다. 인간 CD155에 대한 예시적인 인간 서열은 417개 아미노산의 단백질인 Swiss-Prot P15151로 지정되고, 이 중 대략 잔기 1-20은 신호 펩티드이고, 21-343은 세포외 도메인이고(SEQ ID NO:6), 344-367은 막횡단 도메인이고, 368-417은 세포질 도메인이다.
- [0046] 문맥상 달리 명백하지 않는 한, 상기 단백질 중 하나에 대한 언급은 적어도 단백질의 세포외 도메인 및 일반적으로 절단 가능한 신호 펩티드 이외의 완전한 단백질을 의미한다.
- [0047] **III. 본 발명의 항체**
- [0048] A. 결합 특이성 및 기능적 성질
- [0049] 본 발명은 TIGIT 단백질의 세포외 도메인 내의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. TIG1, TIG2 및 TIG3으로 지정된 항체는 그러한 3개의 예시적인 마우스 항체이다. 이러한 항체의 중쇄 및 경쇄 성숙 가변 영역의 서열은 SEQ ID NO. 10 및 14, 18 및 22, 및 26 및 30으로 각각 지정된다. TIG1, TIG2, 및 TIG3은 인간 TIGIT의 세포외 도메인에 특이적으로 결합한다.
- [0050] 본 발명의 일부 항체는 TIG1, TIG2 또는 TIG3으로 지정된 항체와 동일하거나 중첩 에피토프에 결합한다. 그러한 결합 특이성을 갖는 다른 항체는 TIGIT 또는 요망되는 에피토프를 포함하는 이의 일부로 마우스를

면역화시키고, TIGIT의 세포의 도메인과의 결합에 대해, 임의로 TIG1, TIG2, 또는 TIG3와 경쟁하는 생성된 항체를 스크리닝함에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한 TIGIT 항원의 돌연변이된 형태에 대해 스크리닝되어, TIG1, TIG2 또는 TIG3와 같은 돌연변이 변화의 수집과 동일하거나 유사한 결합 프로파일을 나타내는 항체를 확인할 수 있다. 돌연변이는 TIGIT 항체의 세포의 도메인을 통틀어 또는 에피토프가 존재하는 것으로 알려진 이의 섹션을 통해, 한 번에 하나의 잔기씩, 또는 보다 넓게 이격된 간격을 두고 알라닌(또는 알라닌이 이미 존재한다면 세린)에 의한 체계적 대체 치환될 수 있다.

[0051] 실시예 16은 TIG1 항체의 에피토프를 형성하는 잔기인 SEQ ID NO:1의 잔기 35, 37, 49 및 51을 맵핑한다. 이러한 잔기 중 어느 하나에서의 알라닌 치환은 본질적으로 항체의 결합을 폐지한다. 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO:1의 잔기 35 및 37 및/또는 SEQ ID NO:1의 잔기 49 및 51을 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합하는 다른 항체, 및 바람직하게는 이러한 모든 잔기를 포함하는 에피토프를 포함한다. 에피토프는 선형(예를 들어, 3-20, 3-17, 또는 5-10개 연속 잔기) 또는 입체형태일 수 있다. 일부 그러한 항체는 양쪽에서 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51 및 SEQ ID NO:1로부터의 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 측접 아미노산으로 구성된 펩티드에 결합한다. 일부 그러한 항체는 SEQ ID NO:1의 잔기 35-51로 구성된 펩티드에 결합한다. 일부 그러한 항체는 그러한 펩티드로 면역화시키기에 의해 생성될 수 있다. 실시예 19는 또한 SEQ ID NO:1의 잔기 35, 37, 49 및 51 이외에, SEQ ID NO:1의 잔기 90이 TIGIT에 대한 인간화된(Hu) TIG1 항체의 결합에 중요하다는 것을 보여준다. 다른 구체예에서, 항체(예를 들어, HuTIG1 항체)는 SEQ ID NO:1의 아미노산 위치 35, 37, 49, 51, 및/또는 90에 상응하는 잔기 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합한다. 추가 구체예에서, 항체(예를 들어, HuTIG1 항체)는 SEQ ID NO:1의 아미노산 위치 34, 39, 44, 47, 52, 55, 86, 88, 92, 및/또는 96에 상응하는 하나 이상의 잔기에 결합하지 않는다.

[0052] 선택된 뮤린 항체(예를 들어, TIG1, TIG2 또는 TIG3)의 결합 특이성을 갖는 항체는 또한 파지 디스플레이 방법의 변형을 이용하여 생산될 수 있다. 문헌[Winter, WO 92/20791]을 참조하라. 이 방법은 인간 항체를 생산하는데 특히 적합하다. 이 방법에서, 선택된 뮤린 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나가 출발 물질로서 사용된다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역이 출발 물질로서 선택되면, 구성원이 동일한 경쇄 가변 영역(즉, 뮤린 출발 물질) 및 상이한 중쇄 가변 영역을 나타내는 파지 라이브러리가 작제된다. 중쇄 가변 영역은 예를 들어 재배열된 인간 중쇄 가변 영역의 라이브러리로부터 수득될 수 있다. TIGIT에 대해 강한 특이적 결합을 나타내는 파지(예를 들어, 적어도 10^8 , 바람직하게는 적어도 10^9 M^{-1})가 선택된다. 이후, 이 파지로부터의 중쇄 가변 영역은 추가 파지 라이브러리를 작제하기 위한 출발 물질로서 작용한다. 이 라이브러리에서, 각 파지는 동일한 중쇄 가변 영역(즉, 제1 디스플레이 라이브러리로부터 확인된 영역) 및 상이한 경쇄 가변 영역을 나타낸다. 경쇄 가변 영역은 예를 들어 재배열된 인간 가변 경쇄 영역의 라이브러리로부터 수득될 수 있다. 다시, TIGIT에 강한 특이적 결합을 나타내는 파지가 선택된다. 생성된 항체는 일반적으로 뮤린 출발 물질과 동일하거나 유사한 에피토프 특이성을 갖는다.

[0053] 일부 항체는 전적으로 또는 실질적으로 TIG1으로부터의 CDR H1, H2 및 H3을 포함하는 성숙 중쇄 가변 영역 및 CDR L1, L2 및 L3을 포함하는 성숙 경쇄 영역을 갖는다. 일부 항체는 전적으로 또는 실질적으로 TIG2로부터의 CDR H1, H2 및 H3을 포함하는 성숙 중쇄 가변 영역 및 CDR L1, L2 및 L3을 포함하는 성숙 경쇄 영역을 갖는다. 일부 항체는 전적으로 또는 실질적으로 TIG3로부터의 CDR H1, H2 및 H3을 포함하는 성숙 중쇄 가변 영역 및 CDR L1, L2 및 L3을 포함하는 성숙 경쇄 영역을 갖는다. CDR은 하기 표에 제시된 Kabat, Chothia, Kabat 및 Chothia 혼성, AbM 또는 Contact 정의를 포함하는 임의의 통상적인 정의에 의해 정의될 수 있다:

루프	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24--L34	L24--34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Kabat 넘버링)	H26--H35b	H26--H32...34	H30--H35B
H1	H31-H35 (Chothia 넘버링)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H10

[0054]

[0055] 다른 항체는 TIG1, TIG2 또는 TIG3와 같은 예시적인 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 cDNA의 돌연변이유발에 의해 수득될 수 있다. 성숙 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에서 TIG1, TIG2 또는 TIG3와 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 어느 하나만큼 동일하고 이의 기능적 성질을 유지하고/하거나, 소수의 기능적으로 중요하지 않은

아미노산 치환(예를 들어, 보존적 치환), 결실, 또는 삽입만큼 각각의 항체와 상이한 모노클로날 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 가변 영역 프레임워크에서 결합에 중요할 것 같은 아미노산은 하기 인간화에 대한 섹션에서 설명한 바와 같이 확인될 수 있다. TIG1, TIG2 또는 TIG3의 상응하는 CDR과 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 어느 하나만큼 동일한 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 적어도 1개 및 바람직하게는 6개 모두의 CDR(들)을 갖는 모노클로날 항체가 또한 포함된다.

[0056] 항체는 바람직하게는 하기 특징들, 즉, (i) 인간 CD155에 대한 인간 TIGIT의 결합 억제, (ii) CD112 및 CD113과 같은 다른 리간드에 대한 TIGIT의 결합 억제, (iii) 항원-특이적 T-세포 반응의 증가, (iv) 자연 살해 세포 활성화, (v) 고유 T-세포 활성화 자극, 및 (vi) T-세포 및 면역 시스템의 다른 세포에 의한 하나 이상의 면역자극 사이토카인의 생산 자극 및/또는 하나 이상의 면역억제 사이토카인의 생산 감소 중 하나 이상을 갖는다. 이러한 특성을 측정하기 위한 예시적인 검정은 실시예에 제공된다.

[0057] 바람직한 항체는 TIGIT가 CD155에 결합하는 것을 완전히 또는 부분적으로 억제한다. 일부 항체는 실시예에서 측정된 바와 같이 약 25-300 ng/ml, 25-75 ng/ml, 25-50 ng/ml, 40-75 ng/ml, 50-75 ng/ml, 50-90 ng/ml, 50-100 ng/ml, 75-100 ng/ml, 50-150, 75-175 ng/ml, 100-200 ng/ml, 125-225 ng/ml, 100-250 ng/ml, 150-300 ng/ml, 175-250 ng/ml, 200-300 ng/ml, 25-275 ng/ml, 250-300 ng/ml, 49 +/-10% ng/ml, 65 +/-10% ng/ml 또는 76 +/-10% ng/ml 중 어느 하나의 IC₅₀으로 그러한 상호작용을 억제할 수 있다. 다른 구체예에서, 항체는 CD155에 대한 TIGIT의 결합을, 이들 값 사이의 농도를 포함하여, 적어도 약 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 175 ng/ml, 200 ng/ml, 225 ng/ml, 250 ng/ml, 275 ng/ml, 또는 300 ng/ml, 또는 그 초과 중 어느 하나의 IC₅₀으로 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있다. 일부 항체는 실시예에서 측정된 바와 같이 항원-특이적 T-세포 반응을 1.5-3배, 예를 들어, 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3배 또는 그 초과 중 어느 하나만큼 증가시킬 수 있다. 일부 항체는 NK 세포에 의한 IL-2, IL-6, TNF α 및 IFN γ 중 1, 2, 3 또는 모두의 생산을 1.5 내지 3배, 예를 들어, 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3배 또는 그 초과 중 어느 하나만큼 증가시킬 수 있다. 일부 항체는 실시예에서 측정된 바와 같이 고유 T-세포 활성화를 1.5-3배, 예를 들어, 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3배 또는 그 초과 중 어느 하나만큼 증가시킬 수 있다. 일부 항체는 동물 모델 또는 임상 시험에서 제시된 것처럼 암 또는 감염성 질환을 억제할 수 있다. 인간 암 세포가 마우스 또는 래트와 같은 면역결핍 실험실 동물에 주입되는 암의 동물 모델이 널리 이용 가능하다.

[0058] 항체를 인간화하거나 키메라화하는 것은 마우스 항체에서 시작하는 것에 비해 생체 내 반감기를 증가시킨다. 결과적인 반감기는 인간에서 예를 들어 10-50일일 수 있다. 반감기는 문헌[Kim et al., *Eur J of Immunol* 24:542 (1994)]에 기술된 바와 같은 약동학적 연구에 의해 측정될 수 있다.

[0059] B. 비인간 항체

[0060] TIGIT에 대한 뮤린, 기니피그, 영장류, 토끼, 닭 또는 래트와 같은 다른 비인간 모노클로날 항체의 생산은, 예를 들어, 동물을 TIGIT 또는 이의 단편, 또는 TIGIT를 갖는 세포로 면역화시킴에 의해 달성될 수 있다. 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988)(모든 목적을 위해 참조로서 포함됨)]을 참조하라. 그러한 면역원은 천연 공급원으로부터, 펩티드 합성에 의해 또는 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 임의로, 면역원은 담체 단백질과 융합되거나 달리 복합체화되어 투여될 수 있다. 임의로, 면역원은 애주번트와 함께 투여될 수 있다. 여러 유형의 애주번트는 하기 설명된 대로 사용될 수 있다. 완전 프로인트 애주번트 뒤에 불완전 애주번트가 오는 것이 실험실 동물의 면역화에 바람직하다. 토끼 또는 기니피그는 전형적으로 폴리클로날 항체를 제조하는데 사용된다. 마우스는 전형적으로 모노클로날 항체를 제조하는데 사용된다. 항체는 TIGIT에 대한 특이적 결합에 대해 스크리닝된다. 임의로, 항체는 TIGIT의 특정 영역과의 결합에 대해 추가로 스크리닝된다. 그러한 스크리닝은 TIGIT의 결실 돌연변이체의 집합체에 대한 항체의 결합을 결정하고 결실 돌연변이체가 항체에 결합하는지를 결정함에 의해 달성될 수 있다. 결합은, 예를 들어, 웨스턴 블롯, FACS 또는 ELISA에 의해 평가될 수 있다.

[0061] C. 인간화된 항체

[0062] HAMA(인간 항-마우스(인간 항-래트 또는 인간 항-토끼 또는 인간 항-햄스터 등에도 적용 가능함)항체) 반응의 감소 또는 제거는 적합한 치료제의 임상적 개발의 중요한 측면이다. 예를 들어, 문헌[Khazzaeli et al., *J.*

Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495]을 참조하라. 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 HAMA 반응이 감소되거나 제거되도록 인간화된 항체를 제공한다. 이러한 항체의 변이체는 당업계에 공지된 일상적인 방법을 사용하여 추가로 수득될 수 있고, 이 중 일부는 하기에 추가로 기술된다.

[0063] 인간화된 항체는 비인간 "공여체" 항체로부터의 CDR이 인간 "수용체" 항체 서열로 이식된 유전적으로 조작된 항체이다(예를 들어, 문헌[Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557]을 참조하라). 수용체 항체 서열은, 예를 들어, 성숙 인간 항체 서열, 그러한 서열의 복합체, 인간 항체 서열의 컨센서스 서열, 또는 생식세포 영역 서열일 수 있다. 따라서, 인간화된 항체는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체로부터의 일부 또는 모든 CDR 및 가변 영역 프레임워크 서열, 및 존재시 전적으로 또는 실질적으로 인간 항체 서열로부터의 불변 영역을 갖는 항체이다. 유사하게, 인간화된 중쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체 중쇄로부터의 적어도 1, 2 및 일반적으로 3개 모두의 CDR, 및 존재하는 경우, 실질적으로 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 유사하게, 인간화된 경쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체 경쇄로부터의 적어도 1, 2 및 일반적으로 3개 모두의 CDR, 및 존재하는 경우, 실질적으로 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 나노바디 및 dAb 이외에, 인간화된 항체는 인간화된 중쇄 및 인간화된 경쇄를 포함한다. 여기서 본 출원의 다른 곳에서도 같이, 해당 항체의 CDR은 상응하는 잔기의 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%(Kabat에 의해 정의됨)가 개개 CDR 사이에서 동일할 때 실질적으로 기준 항체의 상응하는 CDR로부터 온 것이나; 해당 항체에서 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 CDR H2는 상응하는 잔기의 적어도 약 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%(Kabat에 의해 정의됨)가 개개 CDR 사이에서 동일할 때 실질적으로 기준 항체의 상응하는 CDR로부터 온 것이다. 항체 사슬의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체 사슬의 불변 영역은 Kabat에 의해 정의된 상응하는 잔기의 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 동일할 때 실질적으로 각각 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 온 것이다.

[0064] 비록 인간화된 항체가 종종 비인간(예를 들어, 마우스) 항체로부터의 6개 모두의 CDR(바람직하게는 Kabat에 의해 정의된 바와 같음)을 포함하지만, 이들은 또한 비인간 항체로부터의 전부가 아닌 CDR(예를 들어, 적어도 3, 4, 또는 5개)로 제조될 수 있다(예를 들어, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

[0065] 일부 항체에서, CDR의 단지 일부, 즉, SDR로 언급되는 결합에 필요한 CDR 잔기의 서브세트가 인간화된 항체에서 결합을 유지하는데 필요하다. 항원과 접촉하지 않고 SDR에 없는 CDR 잔기는 Chothia 과가변 루프 외부에 있는 Kabat CDR의 영역으로부터(Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), 분자 모델링에 의해 및/또는 경험적으로, 또는 문헌[Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004]에 기재된 바와 같이, 이전 연구(예를 들어, CDR H2의 잔기 H60-H65는 종종 필요하지 않음)에 기반하여 확인될 수 있다. 그러한 인간화된 항체에서, 하나 이상의 공여체 CDR 잔기가 부재하거나, 전체 공여체 CDR이 생략된 위치에서, 그 위치를 점유하는 아미노산은 수용체 항체 서열의 상응하는 위치(Kabat 넘버링에 의함)를 점유하는 아미노산일 수 있다. 포함시킬 CDR 내의 공여체 아미노산에 대한 수용체의 그러한 치환의 수는 경쟁적 고려사항의 균형을 반영한다. 그러한 치환은 인간화된 항체에서 마우스 아미노산의 수를 감소시키고, 결과로서 잠재적 면역원성을 감소시키는데 잠재적으로 유리하다. 그러나, 치환은 또한 친화성의 변화를 야기시킬 수 있고, 친화성의 유의한 감소는 회피되는 것이 바람직하다. CDR 내의 치환을 위한 위치 및 치환시킬 아미노산은 또한 경험적으로 선택될 수 있다.

[0066] 수용체는, 인간 면역글로불린 또는 인간 컨센서스 프레임워크에서 유래하든 간에, 선택된 인간 프레임워크 서열과 서열에 있어 동일할 수 있지만, 본 발명은 수용체 서열이 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열에 비해 선제성 아미노산 치환을 포함할 수 있다고 고려한다. 이러한 선제성 치환은 바람직하게는 최소이다; 일반적으로 인간 면역글로불린 서열 또는 컨센서스 프레임워크 서열에 비해 단지 4개, 3개, 2개 또는 하나의 아미노산 차이.

- [0067] 인간 수용체 항체 서열은 인간 수용체 서열 가변 영역 프레임워크 및 공여체 항체 사슬의 상응하는 가변 영역 프레임 워크 사이에 고도의 서열 동일성(예를 들어, 65-85% 동일성)을 제공하기 위해 많은 공지된 인간 항체 서열 중에서 임의로 선택될 수 있다.
- [0068] 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정 아미노산은 CDR 입체형태 및/또는 항원에 대한 결합에 대한 이들의 가능한 영향에 기반하여 치환을 위해 선택될 수 있다. 그러한 가능한 영향에 대한 조사는 모델링하거나, 특정 위치에서 아미노산의 특성을 시험하거나, 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이유발 효과의 실험적 관찰에 의해 이루어진다.
- [0069] 예를 들어, 아미노산이 비인간 가변 영역 프레임워크 잔기 및 선택된 인간 가변 영역 프레임워크 잔기 간에 상이한 경우, 인간 프레임워크 아미노산은 아미노산이,
- [0070] (1) 비공유적으로 항원에 직접 결합하고,
- [0071] (2) CDR 영역에 인접하고,
- [0072] (3) 달리 CDR 영역과 상호작용할 것(예를 들어, CDR 영역의 약 6Å 이내에 있음)이 합리적으로 예상될 때 비인간 항체로부터의 동등한 프레임워크 아미노산에 의해 치환될 수 있다.
- [0073] 치환을 위한 다른 후보는 그 위치에서 인간 면역글로불린에 대해 특이한 수용체 인간 프레임워크 아미노산이다. 이러한 아미노산은 비인간 공여체 항체의 동등한 위치로부터 또는 보다 전형적인 인간 면역글로불린의 동등한 위치로부터의 아미노산으로 치환될 수 있다. 치환을 위한 다른 후보는 그 위치에서 인간 면역글로불린에 대해 특이한 수용체 인간 프레임워크 아미노산이다.
- [0074] 바람직한 인간화된 항체는 SEQ ID NO:35와 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 미만으로 동일한 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:37과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 미만으로 동일한 성숙 경쇄 가변 영역을 갖는다. 바람직하게는 임의의 변이는 결합에 중요할 것으로 확인된 것 이외의 가변 영역 프레임워크 잔기에서 발생한다(식별번호 [0051] 참조). 바람직하게는 임의의 변이는 보존적 아미노산 치환이다. 바람직한 항체는 SEQ ID NO:35의 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:37의 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 전장 항체의 발현을 위해, 성숙 중쇄 가변 영역은 바람직하게는 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:40으로 구성되거나 이를 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 바람직하게는 SEQ ID NO:41로 구성되거나 이를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다.
- [0075] 또 다른 바람직한 인간화된 항체는 SEQ ID NO:43과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 미만으로 동일한 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:45와 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 미만으로 동일한 성숙 경쇄 가변 영역을 갖는다. 바람직하게는 임의의 변이는 결합에 중요할 것으로 확인된 것 이외의 가변 영역 프레임워크 잔기에서 발생한다(식별번호 [0051] 및 실시예 참조). 바람직하게는 임의의 변이는 보존적 아미노산 치환이다. 바람직한 항체는 SEQ ID NO:43의 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:45의 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 전장 항체의 발현을 위해, 성숙 중쇄 가변 영역은 바람직하게는 C-말단 리신이 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 것을 조건으로 SEQ ID NO:48로 구성되거나 이를 포함하는 중쇄 불변 영역에 연결되고, 성숙 경쇄 가변 영역은 바람직하게는 SEQ ID NO:49로 구성되거나 이를 포함하는 경쇄 불변 영역에 연결된다.
- [0076] D. 키메라 및 베니어드 항체
- [0077] 본 발명은 비인간 항체, 특히 실시예의 TIG1, TIG2, 및 TIG3 항체의 키메라 및 베니어드 형태를 추가로 제공한다.
- [0078] 키메라 항체는 비인간 항체(예를 들어, 마우스)의 경쇄 및 중쇄의 성숙 가변 영역이 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 조합된 항체이다. 그러한 항체는 비인간 항체의 결합 특이성을 실질적으로 또는 전적으로 보유하며, 약 2/3가 인간 서열이다.
- [0079] 베니어드 항체는 CDR의 일부 및 일반적으로 전부 및 비인간 항체의 비인간 가변 영역 프레임워크 잔기의 일부를 보유하지만 B- 또는 T-세포 에피토프에 기여할 수 있는 다른 가변 영역 프레임워크 잔기를 대체한, 예를 들어, 노출된 잔기(Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991)를 인간 항체 서열의 상응하는 위치로부터의 잔기로 대체한

인간화된 항체의 유형이다. 그 결과는 CDR이 전적으로 또는 실질적으로 비인간 항체로부터 오고 비인간 항체의 가변 영역 프레임워크가 치환에 의해 보다 인간-유사해지는 항체이다. 베니어드 형태의 TIG1, TIG2 또는 TIG3 항체가 본 발명에 포함된다.

[0080] E. 인간 항체

[0081] TIGIT에 대한 인간 항체는 하기 기술된 다양한 기술에 의해 제공된다. 일부 인간 항체는 상기 경쟁적 결합 실험, Winter의 파지 디스플레이 방법에 의해, 또는 달리, 특정 마우스 항체, 예를 들어, 실시예에 기재된 마우스 모노클로날 항체 중 하나와 동일한 에피토프 특이성을 갖도록 선택된다. 인간 항체는 또한 TIGIT의 단편만을 표적 항원으로서 사용하고/거나, TIGIT의 결실 돌연변이체의 집합체에 대한 항체를 스크리닝함에 의해 특정 에피토프 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0082] 인간 항체를 생산하는 방법은 문헌[Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Patent No. 4,634,664; and Engleman et al., US Patent 4,634,666]의 트리오마 방법, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전자이식 마우스의 이용(예를 들어, 문헌[Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)] 참조) 및 파지 디스플레이 방법(예를 들어, 문헌[Dower et al., WO 91/17271 and McCafferty et al., WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 and US 5,565,332] 참조)을 포함한다.

[0083] F. 불변 영역의 선택

[0084] 카메라, 인간화(베니어드 포함), 또는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 인간 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 불변 영역의 선택은, 부분적으로, 항체-의존성 보체 및/또는 세포 매개 세포독성이 필요한지 여부에 의존한다. 예를 들어, 인간 동위원소 IgG1 및 IgG3은 보체-매개 세포독성을 갖고 인간 아이소형 IgG2 및 IgG4는 그렇지 않다. 경쇄 불변 영역은 램다 또는 카파일 수 있다. 암 또는 TIGIT를 발현하지 않는 병원체에 대한 면역요법의 경우, 인간 IgG2 또는 IgG4 또는 감소된 효과기 기능을 갖는 약독화된 형태의 인간 IgG1이 종종 선호된다. 인간 IgG4의 경우, Fab-arm 교환을 방지하기 위해 중쇄에 S228P(Eu 넘버링)로 조작된 돌연변이를 포함시키는 것이 종종 선호된다. 그러나, TIGIT를 발현하는 암 세포(예를 들어, T-세포 또는 NK 세포의 종양)를 발현하는 암세포를 제거하거나 면역억제를 위해, 인간 IgG1 또는 IgG3이 종종 바람직하다.

[0085] 인간 불변 영역은 상이한 개체 사이의 동종이형 변이 및 동종동질이형 변이를 보여주고, 즉, 불변 영역은 하나 이상의 다형성 위치에서 상이한 개체에서 다를 수 있다. 동종동질이형체는 동종동질이형체를 인지하는 혈청이 하나 이상의 다른 아이소형의 비-다형성 영역에 결합한다는 점에서 동종이형체와 상이하다. 인간 불변 영역에 대한 언급은 임의의 천연 동종이형을 갖는 불변 영역 또는 천연 동종이형에서 다형성 위치를 점유하는 잔기의 임의의 과돌연변이를 포함한다.

[0086] 중쇄의 C-말단 리신과 같이 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카르복시 말단에 있는 하나 또는 수 개의 아미노산은 분자의 일부 또는 전부에서 결실되거나 유도체화될 수 있다. 보체-매개 세포독성 또는 ADCC와 같은 효과기 기능을 감소시키거나 증가시키거나(예를 들어, 문헌[Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; and Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005, 2006] 참조), 인간에서 반감기를 연장시키기 위해(예를 들어, 문헌[Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004] 참조) 불변 영역에서 치환이 이루어질 수 있다. 예시적인 치환은 항체의 반감기를 증가시키기 위해 위치 250에 Gln 및/또는 위치 428(Eu 넘버링)에 Leu를 포함한다.

[0087] 본 발명의 일부 항체는 돌연변이(들)가 없는 동일한 항체와 비교하여 CDC 및 ADCC 또는 ADCP와 같은 감소된 효과기 기능을 갖기 위해 불변 영역 돌연변이(들)의 도입에 의해 조작된다. 바람직하게는, 이러한 효과기 기능의 각각 또는 전부는 돌연변이가 없는 항체와 비교하여 적어도 50%, 75%, 90% 또는 95% 감소한다. 본 실시예는 CDC를 측정하는 방법을 보여준다. 다른 검정은 문헌[Shields et al, 2001 *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, p 6591-6604; Chappel et al, 1993 *J. Biol. Chem.*, Vol 268, p 25124-25131; Lazar et al, 2006 *PNAS*, 103; 4005-4010]에 기재되어 있다.

[0088] 위치 234, 235, 236 및/또는 237 중 어느 하나 또는 전부의 치환은 Fc γ 수용체, 특히 Fc γ RI 수용체에 대한 친화도를 감소시킨다(예를 들어, US 6,624,821 참조). 알라닌은 치환에 바람직한 잔기이며, L234A/L235A는 효과기 기능을 감소시키는데 바람직한 이중 돌연변이이다. 감소된 효과기 기능을 갖는 돌연변이의 다른 조합은

L234A/L235A/G237A, E233P/L234V/L235A/G236, A327G/A330S/P331S, K322A, L234A 및 L235A, L234F/L235E/P331S를 포함한다. 임의로, 인간 IgG2에서 위치 234, 236 및/또는 237은 알라닌으로 치환되고 위치 235는 글루타민으로 치환된다. (예를 들어, US 5,624,821 참조.) 보체 C1q 결합 부위에서 EU 인덱스 위치 330 및 331의 2개의 아미노산 치환은 보체 고정을 감소시킨다(문헌[Tao et al., *J. Exp. Med.* 178:661 (1993) and Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991)] 참조). 위치 233-236에서 IgG2 잔기 및 위치 327, 330 및 331에서 IgG4 잔기의 인간 IgG1으로의 치환은 ADCC 및 CDC를 크게 감소시킨다(예를 들어, 문헌[Armour KL. et al., 1999 *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24; and Shields RL. et al., 2001. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604] 참조). N297A, N297Q, 또는 N297G(Eu 넘버링) 돌연변이는 당화를 감소시켜 효과기 기능을 감소시킨다.

[0089] G. 재조합 항체의 발현

[0090] 키메라, 인간화(베니어드 포함) 및 인간 항체는 전형적으로 재조합 발현에 의해 생산된다. 재조합 폴리뉴클레오타이드 작제물은 전형적으로 자연-관련 또는 이종성 프로모터 영역을 포함하여, 항체 사슬의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함한다. 바람직하게는, 발현 조절 서열은 진핵 숙주 세포를 형질전환 또는 트랜스펙션시킬 수 있는 벡터의 진핵 프로모터 시스템이다. 일단 벡터가 적절한 숙주에 혼입되면, 숙주는 뉴클레오타이드 서열의 고수준 발현, 및 재조합 항체의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에 유지된다.

[0091] 포유동물 세포는 면역글로불린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 세그먼트 또는 이의 단편을 발현시키는데 바람직한 숙주이다. 문헌[Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)]을 참조하라. 무손상 이종성 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주는 당업계에서 개발되었고, CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, HEK293 세포, L 세포, 및 Sp2/0 및 NS0를 포함하는 비-항체-생산 골수종을 포함한다. 바람직하게는, 세포는 비인간 세포이다. 이러한 세포를 위한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예를 들어, 복제 기점, 프로모터, 인핸서(Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), 및 필수적인 처리 정보 부위, 예를 들어, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 발현 조절 서열은 내인성 유전자, 사이토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다. 문헌[Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992)]을 참조하라.

[0092] 일단 발현되면, 항체는 HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로, 문헌[Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)] 참조).

[0093] IV. 치료 적용

[0094] 항체는 암 및 감염성 질환의 치료에서 면역 반응을 향상시키는데 이용될 수 있다. 본 발명의 항체에 의해 치료될 수 있는 장애는 혈액 악성종양 및 고형 종양을 포함하는 암을 비제한적으로 포함한다. 그러한 암은 TIGIT 또는 CD155를 발현하거나 발현하지 않을 수 있다. TIGIT에 대한 항체는 TIGIT를 발현하지 않는 암에 효과적인데, 그 이유는 CD155와 TIGIT 상호작용의 억제제는 그러한 암에 대한 면역 반응을 자극하기 때문이다. 혈액 악성종양의 예는 급성 골수성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, T-세포 대형 과립 림프구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 단핵세포 백혈병, 호지킨 및 비호지킨 림프종 및 다발성 골수종을 포함하는 백혈병, 림프종 및 골수종을 포함한다. 고형 종양의 예는 난소암, 자궁내막암, 유방암, 폐암(소세포 또는 비소세포), 결장암, 전립선암, 자궁경부암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포 암종(간암), 신세포 암종(신장암), 두경부 종양, 중피종, 흑색종, 육종, 및 뇌 종양(예를 들어, 신경아교종, 예를 들어, 아교모세포종)을 비제한적으로 포함한다.

[0095] 본 발명의 방법은 애주번트 환경에서 실시될 수 있다. "애주번트 환경"은 대상체가 증식성 질환, 특히 암의 병력을 갖고, 일반적으로(만드시 그런 것은 아님) 치료에 반응한 임상 환경을 지칭하며, 수술, 방사선요법, 및/또는 화학요법을 비제한적으로 포함한다. 그러나, 증식성 질환의 병력으로 인해, 이러한 대상체는 그 질환을 발병할 위험이 있다고 간주된다. "애주번트 환경"에서의 치료 또는 투여는 치료의 후속 방식을 지칭한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 항체 중 어느 하나의 치료적 유효량을 애주번트 환경에서 암을 갖거나 암의 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다..

[0096] 본원에 제공된 방법은 또한 "네오애주번트(neoadjuvant) 환경"에서 실시될 수 있는데, 즉, 이 방법은 일차/최종 치료 전에 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 대상체는 이전에 치료를 받았다. 다른 양태에서, 대상체는 이전에 치료를 받지 않았다. 일부 양태에서, 치료는 제1선 요법이다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 항체 중 어느 하나의 치료적 유효량을 네오애주번트 환경에서 암을 갖거나 암의 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[0097] 본 발명의 항체에 의해 치료될 수 있는 다른 장애는 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물, 및 다른 병원체(예를 들어, 간염(A, B, 또는 C), 헤르페스 바이러스(예를 들어, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코르노바이러스, 호흡기 융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기 바이러스, 유두종바이러스, 물렁종 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스, HIV, SIV, 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스, 클라미디아, 리케차 박테리아, 마이코박테리아, 포도상구균, 연쇄상구균, 폐렴구균, 수막구균 및 코노코사이, 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실리, 콜레라, 파상풍, 보툴리누스중독, 탄저병, 페스트, 렙토스피라병, 및 라임병 박테리아의 감염성 질환을 포함한다.

[0098] A. 항체의 투여

[0099] 본원에 기재된 항체는 발병을 지연시키고/거나, 중증도를 감소시키고/거나, 추가의 악화를 억제하고/거나 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 개선시키는 투여량, 투여 경로 및 투여 빈도를 의미하는 효과적인 요법으로 투여된다. 대상체가 이미 장애로 고통받고 있다면, 요법은 치료적으로 효과적인 요법으로서 지칭될 수 있다. 대상체가 일반적인 집단에 비해 장애의 위험은 높지만 아직 증상을 경험하지 않은 경우, 요법은 예방적으로 효과적인 요법으로서 지칭될 수 있다. 일부 경우에, 치료적 또는 예방적 효능은 병력 대조군 또는 동일한 대상체의 과거 경험과 비교하여 개별 대상체에서 관찰될 수 있다. 다른 경우에, 치료적 또는 예방적 효능은 치료되지 않은 대상체의 대조군 집단에 비해 치료된 대상체 집단에서의 전임상 또는 임상 시험에서 입증될 수 있다.

[0100] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 중 어느 하나는 본원에 기재된 항체 중 하나 이상의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본원에서 사용된 항암 요법(예를 들어, 본원에 기재된 항-TIGIT 항체 중 어느 하나)의 "치료적 유효량" 또는 "치료적으로 효과적인 투여량"은 이로운 또는 바람직한 결과를 초래하기에 충분한 양이다. 치료적 사용을 위해, 이로운 또는 바람직한 결과는 암으로 인한 하나 이상의 증상의 감소, 암으로 고통받는 대상체의 삶의 질 향상, 암 치료에 필요한 다른 약물의 용량 감소, 예를 들어, 표적화를 통해, 다른 약물의 효과 향상, 질병의 진행 지연, 및/또는 생존 연장과 같은 임상 결과를 포함한다. 효과적인 투여량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 항암 요법의 효과적인 투여량은 치료적 또는 예방적 치료를 직접적으로 또는 간접적으로 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 관점에서 이해되는 바와 같이, 항암 요법의 치료적으로 효과적인 투여량은 다른 항암 요법과 함께 달성되거나 그렇지 않을 수 있다.

[0101] 본원에 기재된 항체 중 어느 하나에 대한 예시적인 투여량은 약 0.1-20 mg/체중 kg 또는 0.5-5 mg/체중 kg(예를 들어, 약 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 또는 20 mg/kg) 또는, 고정 투여량으로서, 10-1500 mg(예를 들어, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 또는 1500 mg 이상의 값 미만 중 어느 하나, 이러한 숫자 사이의 값 포함)이다. 투여량은, 다른 요인들 중에서, 치료가 예방적인지 치료적인지 여부 및 장애가 급성인지 만성인지 여부에 상관없이, 대상체의 상태 및 만약에 있다면, 종래 치료에 대한 반응에 의존한다.

[0102] 투여는 비경구, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 척수강내, 복강내, 종양내, 국소, 비내 또는 근내 투여일 수 있다. 정맥내 또는 피하 투여에 의한 전신 순환계로의 투여가 선호된다. 정맥내 투여는, 예를 들어, 30-90분과 같은 기간에 걸친 주입에 의해 이루어질 수 있다.

[0103] 투여 빈도는 다른 요인들 중에서 순환계에서 항체의 반감기, 대상체의 상태 및 투여 경로에 의존한다. 빈도는 대상체의 상태 변화 또는 치료되는 장애의 진행에 따라 매일, 매주, 매월, 분기별, 또는 불규칙한 간격일 수 있다. 정맥내 투여를 위한 예시적인 빈도는 치료의 연속 원인에 대해 매주 내지 분기마다 이루어지지만, 투여 빈도는 또한 더 많거나 적을 수 있다. 피하 투여의 경우, 예시적인 투여 빈도는 매일 또는 매달 이루어지지만, 투여 빈도는 또한 더 많거나 적을 수 있다.

[0104] 투여되는 투여량의 수는 장애가 급성 또는 만성인지 여부 및 치료에 대한 장애의 반응에 의존한다. 급성 장애 또는 만성 장애의 급성 악화의 경우, 1 내지 10회 용량이 종종 충분하다. 때로 급성 장애 또는 만성 장애의 급성 악화에 대해 단일 볼루스 용량이, 임의로 분할된 형태로, 충분하다. 치료는 급성 장애 또는 급성 악화의 재발에 대해 반복될 수 있다. 만성 장애의 경우, 항체는 적어도 1, 5 또는 10년, 또는 대상체의 일생 동안 규칙적

인 간격으로, 예를 들어, 매주, 2주, 매월, 분기별, 6개월마다 투여될 수 있다.

[0105] 항-TIGIT 항체를 포함하는 치료는 암을 갖는 대상체의 중앙 무진행 생존 또는 전반적인 생존 시간을 대조 대상체에 비해 적어도 약 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%만큼, 그러나 바람직하게는 적어도 약 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100%만큼 증가시킴에 의해 질환을 완화시킬 수 있거나, 이러한 시간을 2주, 1, 2 또는 3개월, 또는 바람직하게는 4 또는 6개월 또는 심지어 9개월 또는 1년만큼 증가시킬 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항-TIGIT 항체를 포함하는 치료는 대상체의 전체 반응률, 부분 반응률, 또는 객관적인 반응률(전체+부분)을 대조 대상체에 비해 적어도 약 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%만큼, 그러나 바람직하게는 적어도 약 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100%만큼 증가시킬 수 있다. 대조 대상체는 항-TIGIT 항체를 제외하고 항-TIGIT 항체를 투여받은 대상체와 동일한 치료를 받는다. 따라서, 대조 대상체는 플라시보 단독 또는 플라시보와 항-TIGIT 항체 이외의 일부 화학요법제의 조합물을, 만약 그러한 것이 항-TIGIT 항체를 투여받은 대상체에도 수용된다면, 투여받을 수 있다.

[0106] 본원에 기재된 항-TIGIT 항체는 CD155-발현 세포(예를 들어, 비제한적으로, K562 세포)의 NK 세포-매개 세포독성을 본원에 기재된 항-TIGIT 항체 중 하나의 부재 하에서의 CD155-발현 세포의 NK-매개 세포독성의 양에 비해 약 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35% 이상 중 어느 하나만큼 향상시킬 수 있다.

[0107] 전형적으로, 임상 시험(예를 들어, II 상, II/III 상 또는 III 상 시험)에서, 대상체의 대조군에 비해, 항-TIGIT 항체로 치료된 대상체의 중앙 무진행 생존 및/또는 반응률에서의 증가는, 예를 들어, $p=0.05$ 또는 0.01 또는 심지어 0.001 수준에서 통계적으로 유의하다. 전체 및 부분 반응률은, 예를 들어, 국립 암 연구소(National Cancer Institute) 및/또는 식품 의약품 안전청(Food and Drug Administration)에 의해 열거되거나 허용된 암에 대한 임상 시험에 일반적으로 사용되는 객관적인 기준에 의해 결정되고, 예를 들어, 특히 종양 부피, 종양 수, 전이, 생존 시간, 및 삶의 질 척도를 포함할 수 있다.

[0108] 비경구 투여용 약학적 조성물은 바람직하게는 멸균되고 실질적으로 등장성이며 GMP 조건 하에 제조된다. 약학적 조성물은 단위 투여 형태(즉, 단일 투여용 투여량)으로 제공될 수 있다. 약학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 선택된 투여 경로에 좌우된다. 주사를 위해, 항체는 수용액, 바람직하게는 행크 용액, 링거 용액, 또는 생리 식염수 또는 아세테이트 완충제(주사 부위의 불편함을 감소시키기 위해)와 같은 생리학적으로 양립 가능한 완충제에서 제형화될 수 있다. 용액은 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로 항체는 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어, 살균 무-발열원 수에 의해 구성하기 위한 동결건조된 형태로 존재할 수 있다. 액체 제형 중 항체의 농도는, 예를 들어, 약 10-150 mg/ml로 달라질 수 있다. 일부 제형에서, 농도는 약 25-50 mg/ml이다.

[0109] B. 조합 요법

[0110] 본 발명은 하나 이상의 활성 치료제(예를 들어, 화학요법제) 또는 다른 예방적 또는 치료적 양상(예를 들어, 방사선)과 함께 항-TIGIT 항체의 사용을 고려한다. 이러한 조합 요법에서, 다양한 활성제는 빈번하게 상이하고 보완적인 작용 메커니즘을 갖는다. 이러한 조합 요법은 하나 이상의 제제의 용량 감소를 허용함에 의해, 하나 이상의 제제와 관련된 부작용을 감소시키거나 제거함으로써 특히 유리할 수 있다. 또한, 그러한 조합 요법은 근본적인 질환, 장애, 또는 상태에 대해 상승작용적인 치료 또는 예방 효과를 가질 수 있다.

[0111] 본원에 사용되는 "조합물"은 별도로 투여되는, 예를 들어, 별도 투여를 위해 별도로 제형화될 수 있는 요법(예를 들어, 키트로 제공될 수 있음), 및 단일 제형으로 함께 투여될 수 있는 요법(즉, "공동-제형")을 포함하고자 한다.

[0112] 특정 구체예에서, 본원에 개시된 임의의 항-TIGIT 항체는 순차적으로 투여되거나 적용되고, 예를 들어, 하나의 제제는 하나 이상의 다른 제제에 앞서 투여된다. 다른 구체예에서, 항체는 동시에 투여되고, 예를 들어, 2개 이

상의 제제가 동시에 또는 대략 동시에 투여되고; 2개 이상의 제제는 2개 이상의 별도 제형에 존재하거나 단일 제형(즉, 공동-제형)으로 조합될 수 있다. 2개 이상의 제제가 순차적으로 또는 동시에 투여되는지 여부에 관계 없이, 본 발명의 목적을 위해 이들은 함께 투여되는 것으로 간주된다.

[0113] 본 발명의 항체는 상황에 적합한 임의의 방법으로 적어도 하나의 다른 (활성) 제제와 함께 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 활성제 및 본 발명의 적어도 하나의 항-TIGIT 항체로의 치료는 일정 기간 동안 유지된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IGIT 항체로의 치료가 일정한 투여 요법으로 유지되는 동안, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단된다(예를 들어, 대상체가 안정한 경우). 추가 구체예에서, 본 발명의 항-TIGIT 항체로의 치료가 감소되는 동안(예를 들어, 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 요법), 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단된다(예를 들어, 대상체가 안정한 경우). 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되고(예를 들어, 대상체가 안정한 경우) 본 발명의 항-TIGIT 항체로의 치료는 증가한다(예를 들어, 고용량, 더 빈번한 투여 또는 더 긴 치료 요법). 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 유지되고 본 발명의 항-TIGIT 항체로의 치료는 감소되거나 중단된다(예를 들어, 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 요법). 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료 및 본 발명의 항-TIGIT 항체로의 치료는 감소되거나 중단된다(예를 들어, 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 요법).

[0114] 본 발명의 항체로의 치료는 치료되는 장애에 효과적인 다른 치료와 조합될 수 있다. 증식성 질환, 암, 종양, 또는 전암성 질환, 장애 또는 상태를 치료하는데 사용될 때, 본 발명의 항체는 화학요법, 방사선(예를 들어, 국소 방사선 요법 또는 전신 방사선 요법), 줄기 세포 치료, 수술 또는 다른 생물학제로의 치료와 조합될 수 있다.

[0115] 특정 구체예에서, 본 발명은 종양 성장의 부가적 또는 상승작용적 억제를 달성하기 위해 신호 전달 억제제(STI)와 함께 본원에 개시된 항-TIGIT 항체의 투여를 포함하는 종양 성장의 종양 억제를 위한 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "신호 전달 억제제"는 신호전달 경로에서 하나 이상의 단계를 선택적으로 억제하는 제제를 지칭한다. 본 발명의 신호 전달 억제제(STI)는 (i) BCR-Ab1 키나제 억제제(예를 들어, 이마티닙 메실레이트 (GLEEVEC)); (ii) 키나제 억제제 및 항체를 포함하는 표피 성장 인자(EGF) 수용체 억제제; (iii) HER-2/neu 수용체 억제제(예를 들어, HERCEPTIN); (iv) Akt 패밀리 키나제 또는 Akt 경로의 억제제(예를 들어, 라파마이신); (v) 세포 주기 키나제 억제제(예를 들어, 플라보피리돌); 및 (vi) 포스포타이딘 이노시톨 키나제 억제제를 포함한다. 면역조절에 관여하는 제제는 또한 암 환자에서 종양 성장의 억제를 위해 본원에 개시된 항-IGIT 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0116] 화학요법제의 예는 비제한적으로 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로포스포미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어, 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리메틸올로멜라민; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로르암부실, 클로르나파진, 콜로포스포미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펀, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들어, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사산물, 예를 들어, 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메토평렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-메르캅토평린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신체, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충물, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스포미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다물; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데

신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드(Ara-C); 사이클로포스파미드; 티오테과; 톡소이드(즉, 탁산), 예를 들어, 파클리탁셀, 탁술, 및 도세탁셀; 클로르암부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토프린; 메토티렉세이트; 백금 및 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나렐빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포아이스오머라제 억제제; 캄프토테신, 디플루오로메틸로르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라마이신; 카페시타빈;), 항대사산물(예를 들어, 아자티오프린); 안트라사이클린; 식물 알칼로이드(예를 들어, 빈카 알칼로이드 포함); 및 상기 중 임의의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0117] 화학요법제는 또한, 예를 들어, 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤, 및 토레미펜을 포함하는 항-에스트로겐; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린과 같은 항안드로겐; 및 상기 중 임의의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체와 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항호르몬 제제를 포함한다. 특정 구체예에서, 조합 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬 제제의 투여를 포함한다.

[0118] 본원에 개시된 항-TIGIT 항체와 함께 사용될 수 있는 추가의 치료 양상은 방사선요법, 종양 항원에 대한 모노클로날 항체, 모노클로날 항체 및 독소의 복합체, T-세포 애즈버트, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포 요법) 또는 세포-세포 기반 요법을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "세포 기반 요법"은, 예를 들어, 손상되거나 포만한 성체 세포 집단 또는 조직을 보수하거나 병원체 또는 증식성 세포(예를 들어, 암 세포)에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해, 요망되는 치료 효과를 달성할 목적으로 세포의 도입을 포함하는 임의의 요법을 지칭한다. 다른 구체예에서, 세포 기반 요법은, 예를 들어, 손상되거나 포만한 성체 세포 집단 또는 조직을 보수하거나 병원체 또는 증식성 세포(예를 들어, 암 세포)에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해, 요망되는 치료 효과를 달성하는데 필요한 특정 세포 유형으로 분화할 수 있는 비분화된 세포(예를 들어, 줄기 세포 또는 다른 다능성 또는 전능성 세포)의 도입을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체는 또한 생체 외 종양에 호닝하기 위해(honing to) 임의로 증식되거나 선택된 종양 침윤성 T-세포 또는 자연 살해 세포와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 항체는 이러한 세포의 활성화에 기여한다.

[0119] 바람직한 조합은 대조군 정상 조직과 비교하여 암 세포 상에 우선적으로 발현되는 표면 항원을 겨냥하는 제2 항체와 함께 본 발명의 항체이다. 암 치료를 위해 본 발명의 항체와 조합 요법으로 투여될 수 있는 항체의 일부 예는 HER2 항원에 대한 Herceptin®(트라스투주맵), VEGF에 대한 Avastin®(베바시주맵), 또는 EGF 수용체에 대한 항체, 예를 들어 (Erbix®), 세특시맵 및 Vectibix®(파니투무맵)을 포함한다. 투여될 수 있는 다른 제제는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, 4-1BB, BTLA, VISTA, TIM-3 및 LAG-3 중 어느 하나의 항체 또는 다른 억제제; 또는 다른 하류 신호전달 억제제, 예를 들어, mTOR 및 GSK3β 억제제; 및 사이토카인, 예를 들어, 인터페론-γ, IL-2, 및 IL-15를 포함한다. 추가 제제의 일부 구체적인 예는 이필리무맵, 파조파닙, 수니티닙, 다사티닙, 캄브롤리주맵, INCR024360, 다브라페닙, 트라메티닙, 아테졸리주맵(MPDL3280A), 타르세바, 코비메티닙, 및 니볼루맵을 포함한다. 조합 요법을 위한 제2 항체 또는 다른 제제의 선택은 치료되는 암에 의존한다. 임의로, 암은 적절한 항체의 선택을 유도하기 위해 항원의 발현 또는 우선적 발현에 대해 시험된다. 제2 항체의 아이소형은 바람직한 것은 ADCC, CDC 및 식균 작용과 같은 효과기 기능을 촉진하기 위한 인간 IgG1이다.

[0120] 본 발명의 항체는 또한 암에 대한 면역 반응을 유발하는 백신과 함께 투여될 수 있다. 그러한 면역 반응은 본 발명의 항체에 의해 향상된다. 백신은 임의로 담체 분자에 연결된, 면역 반응을 유도하는데 효과적인 그 단편의 암 표면 상에 발현된 항원을 포함할 수 있다.

[0121] 본 발명은 면역 체크포인트 억제제와 함께 본원에 기재된 항-TIGIT 항체의 사용을 고려한다.

[0122] 모든 암의 특징인 엄청난 수의 유전적 및 후성적 변형은 면역계가 종양 세포를 이들의 정상 대응부와 구별하는데 사용할 수 있는 다양한 세트의 항원을 제공한다. T 세포의 경우, T-세포 수용체(TCR)에 의한 항원 인지를 통해 시작되는, 반응의 최대 진폭(예를 들어, 사이토카인 생산 또는 증식의 수준) 및 품질(예를 들어, 발생한 면역 반응의 유형, 예를 들어, 사이토카인 생산의 패턴)은 보조-자극 및 억제 신호(면역 체크포인트) 사이의 균형에 의해 조절된다. 정상적인 생리 조건 하에, 면역 체크포인트는 면역 시스템이 병원성 감염에 반응할 때 자가면역의 예방(즉, 자기-관용의 유지) 및 또한 손상으로부터 조직을 보호하기 위해 중요하다. 면역 체크포인트 단백질의 발현은 중요한 면역 내성 메커니즘으로서 종양에 의해 탈조절될 수 있다.

[0123] 일부가 다양한 유형의 종양 세포에서 선택적으로 상향조절되는, 차단을 위한 후보인 면역 체크포인트(리간드 및 수용체)의 예는 PD-1(프로그램된 세포 사멸 단백질 1); PD-L1(프로그램된 사멸 리간드-1); BTLA(B 및 T 림프구

약독화제); CTLA-4(세포독성 T-림프구 관련 항원 4); TIM-3(T-세포 막 단백질 3); LAG-3(림프구 활성화 유전자 3); T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제제(VISTA); CD96; A2aR(아데노신 A2a 수용체); A2bR(아데노신 A2b 수용체); CD73(엑토-5'-뉴클레오타이드); CD39(ENTPD1, NTPDase1); 아르기나제; 인돌아민-피롤 2,3-디옥시 게나제(IDO); 트립토판 2,3-디옥시게나제(TDO); 및 구조적 특징에 기반하여 2개의 부류인 i) 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR), 및 ii) C-타입 렉틴 수용체(타입 II 막형단 수용체 패밀리의 구성원)로 나눌 수 있는 살해 억제 수용체를 포함한다. 다른 잘 정의되지 않은 면역 체크포인트는 문헌에 기재되어 있고, 수용체(예를 들어, 2B4(CD244로도 공지됨) 수용체) 및 리간드(예를 들어, B7-H3(CD276으로도 공지됨) 및 B7-H4(B7-S1, B7x 및 VCTN1으로도 공지됨)와 같은 특정 B7 패밀리 억제성 리간드) 둘 모두를 포함한다. 문헌[Pardoll, (April 2012) *Nature Rev. Cancer* 12:252-64]을 참조하라.

[0124] 본 발명은 전술한 면역-체크포인트 수용체 및 리간드 뿐만 아니라 아직 설명되어야 할 면역-체크포인트 수용체 및 리간드의 억제제와 함께 본원에 개시된 임의의 항-TIGIT 항체의 사용을 고려한다. 면역 체크포인트의 특정 조절인자는 현재 이용 가능하지만, 다른 것들은 후기 개발 중에 있다. 예를 들어, 2011년에 흑색종 치료를 위해 승인되었을 때, 완전히 인간화된 CTLA-4 모노클로날 항체 이필리무맙(YERVOY; Bristol-Myers Squibb)은 미국에서 규정상 승인을 받은 첫 번째 면역 체크포인트 억제제가 되었다. CTLA-4 및 항체(CTLA-4-Ig; abatacept (ORENCIA; Bristol-Myers Squibb))를 포함하는 융합 단백질은 류마티스 관절염의 치료에 이용되었고, 다른 융합 단백질은 엡스타인 바 바이러스에 민감해진 신이식 환자에서 효과적인 것으로 나타났다. 항-PD-1 항체는 개발 중이며(예를 들어, 니볼루맙(Bristol-Myers Squibb) 및 펌브롤리주맙(람브롤리주맙)(Merck)), 및 항-PD-L1 항체는 또한 평가 중이다(예를 들어, MPDL3280A(Roche)). 니볼루맙 및 펌브롤리주맙은 흑색종, 폐암 및 신장암을 갖는 환자에서 가능성을 나타내었다.

[0125] 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충 질환, 장애 및 상태 뿐만 아니라 이와 관련된 장애와 같은 감염성 질환을 치료 또는 예방하는데 유사한 조합 요법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 병원체에 대해 유도된 항체 또는 병원체에 대한 백신, 예를 들어, 라우스 육종 바이러스에 대한 팔리비주맙과 조합될 수 있다. 백신은 면역 반응을 유도하는데 효과적인 병원체의 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 본 발명의 항체는 병원체에 대해 유도된 항체 또는 백신의 면역 반응을 향상시킨다. 본 발명의 항체는 또한 생체 외에서 증식된 T-세포 또는 자연 살해 세포와 함께 투여될 수 있다.

[0126] 그러한 조합 요법은 다음을 비제한적으로 포함하는 다양한 바이러스 생명-주기 단계를 표적화하고 상이한 작용 메커니즘을 갖는 항바이러스제를 포함한다: 바이러스 탈외피의 억제제(예를 들어, 아만타딘 및 리만티딘); 역전사효소 억제제(예를 들어, 아시클로버, 지도부딘, 및 라미부딘); 인테그라제를 표적화하는 제제; 바이러스 DNA 에 전사 인자의 부착을 차단하는 제제; 번역에 영향을 주는(예를 들어, 포미버르센) 제제(예를 들어, 안티센스 분자); 번역/리보자임 기능을 조절하는 제제; 프로테아제 억제제; 바이러스 어셈블리 조절인자(예를 들어, 리팜 피신); 항레트로바이러스제, 이를 테면, 예컨대, 뉴클레오시드 유사체 역전사효소 억제제(예를 들어, 아지도티 미딘(AZT), ddI, ddC, 3TC, d4T); 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제(예를 들어, 에파비렌즈, 네비라핀); 뉴클레오타이드 유사체 역전사효소 억제제; 및 바이러스 입자의 방출을 막는 제제(예를 들어, 자나미버 및 오셀타미버). 특정 바이러스 감염(예를 들어, HIV)의 치료 및/또는 예방은 종종 항바이러스제의 그룹("콕테일")을 수반한다.

[0127] 본원에 기재된 임의의 항-TIGIT 항체와 함께 사용하기 위해 고려되는 다른 항바이러스제는 비제한적으로 다음을 포함한다: 아바카버, 아데포버, 아만타딘, 암프레나버, 암플리겐, 아르비들, 아타자나버, 아트리플라, 보세프레 버에르테트, 시도포버, 콤비버, 다루나버, 텔라버딘, 디다노신, 도코사놀, 에독수딘, 엠트리시타빈, 엔푸버타이드, 엔테카버, 팜시클로버, 포삼프레나버, 포스카르네트, 포스포네트, 간시클로버, 이바시타빈, 이무노버, 이독수리딘, 이미퀴모드, 인디나버, 이노신, 다양한 인터페론(예를 들어, 페그인터페론 알파-2a), 로피나버, 로비리드, 마라비록, 모록시딘, 메티사존, 넬피나버, 넥사버, 펜시클로버, 페라미버, 플레코나릴, 포도필로톡신, 랄테그라버, 리바비린, 리토나버, 피라미딘, 사퀴나버, 스타부딘, 텔라프레버, 테노포버, 티프라나버, 트리플루리딘, 트리지버, 트로만타딘, 트루바다, 발라시클로버, 발간시클로버, 비크리비록, 비다라빈, 비라미딘, 및 잘시타빈.

[0128] 본 발명은 항기생충제와 함께 본원에 개시된 임의의 항-IGIT 항체의 사용을 고려한다. 그러한 제제는 비제한적으로 티아벤다졸, 피란텔 파모에이트, 메벤다졸, 프라지퀀텔, 니클로사미드, 비티오놀, 옥삼니퀸, 메트리포네이트, 이버멕틴, 알벤다졸, 에플로르니틴, 멜라르소프롤, 펜타미딘, 벤즈니다졸, 니푸르티모스, 및 니트로이미다졸을 포함한다. 당업자는 기생충 장애의 치료를 위한 유용성을 발견할 수 있는 다른 제제를 알고 있다.

- [0129] 본 발명의 구체예는 박테리아 장애의 치료 또는 예방에 유용한 제제와 함께 본원에 개시된 임의의 항-IGIT 항체의 사용을 고려한다. 항박테리아제는 작용 메커니즘에 기반하고, 화학 구조에 기반하고, 활성 스펙트럼에 기반하는 것을 포함하는 다양한 방식으로 분류될 수 있다. 항박테리아제의 예는 박테리아 세포 벽(예를 들어, 세팔로스포린 및 페니실린) 또는 세포 막(예를 들어, 폴리믹신)을 표적화하거나, 필수 박테리아 효소를 방해하는(예를 들어, 설폰아미드, 리파마이신, 및 퀴놀론) 것들을 포함한다. 단백질 합성을 표적화하는 대부분의 항박테리아제(예를 들어, 테트라사이클린 및 매크롤리드)는 정균성인 반면, 아미노글리코시드와 같은 제제는 살균성이다. 항박테리아제를 분류하는 또 다른 방법은 이들의 표적 특이성에 기반한다; "좁은-스펙트럼" 제제는 특정 유형의 박테리아(예를 들어, 스트렙토코커스와 같은 그람-양성 박테리아)를 표적화하는 반면, "넓은-스펙트럼" 제제는 광범위한 박테리아 범위에 대한 활성을 갖는다. 당업자는 특정 박테리아 감염에 사용하기에 적합한 항박테리아제의 유형을 알고 있다.
- [0130] 본 발명의 구체예는 진균 장애의 치료 또는 예방에 유용한 제제와 함께 본원에 개시된 임의의 항-IGIT 항체의 사용을 고려한다. 항진균제는 폴리엔(예를 들어, 암포테리신, 니스타틴, 및 피마리신); 아졸(예를 들어, 플루코나졸, 이트라코나졸, 및 케토코나졸); 알릴아민(예를 들어, 나프티핀 및 테르비나핀) 및 모르폴린(예를 들어, 아모롤핀); 및 항대사산물(예를 들어, 5-플루오로시토신)을 포함한다.
- [0131] 본 발명은 상기 개시된 제제(및 제제 부류의 구성원)의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.
- [0132] TIGIT에 대한 항체는 약학적 조성물의 성분으로서 공동-요법에 사용하기 위해 기재된 임의의 제2 항체 또는 제제와 조합될 수 있다. 약학적 조성물에서, 제제는 기재된 바와 같은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 조합될 수 있다.
- [0133] **V. 기타 적용**
- [0134] 항-TIGIT 항체는 임상 진단 또는 치료의 맥락에서 또는 연구에서 TIGIT를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 대상체가 치료를 받을 수 있는 암 또는 감염성 질환을 앓고 있다는 표시로서 T 세포, 자연 살해 세포 및 암 세포상의 TIGIT의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 암 또는 감염성 질환으로 고통받는 대상체의 T 세포, 자연 살해 세포 및/또는 암 세포 상에서 TIGIT의 발현은 또한 암 또는 감염성 질환이 본 발명의 항체로 치료될 수 있다는 표시를 제공한다. 항체는 또한 T 세포, 자연 살해 세포 및 암 세포, 및 다양한 자극에 대한 이들의 반응을 검출함에 있어서 실험실 연구용 연구 시약으로도 판매될 수 있다. 그러한 용도로, 모노클로날 항체는 형광 분자, 스핀-표지된 분자, 효소 또는 방사성동위원소로 표지될 수 있고, TIGIT에 대한 검정을 수행하기 위해 모든 필요한 시약을 갖는 키트의 형태로 제공될 수 있다. 항체는 또한 TIGIT를, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하기 위해 이용될 수 있다.
- [0135] **VI. 키트**
- [0136] TIGIT에 대한 항체는 키트의 성분으로서 공동-요법에 사용하기 위해 기재된 임의의 제2 항체 또는 제제와 조합될 수 있다. 본원에 기술된 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 항체 뿐만 아니라 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체(예를 들어, 비제한적으로, 포스페이트 완충된 염수 용액, 물, 멸균수, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 레시틴, 아라키스유, 참기름, 에멀전, 예를 들어, 오일/물 에멀전 또는 물/오일 에멀전, 마이크로에멀전, 나노담체 및 다양한 유형의 습윤제)를 함유하는 하나 이상의 키트를 제공한다. 알콜, 오일, 글리콜, 보존제, 착향제, 착색제, 현탁제 등과 같은 첨가제가 또한 담체, 희석제, 또는 부형제와 함께 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 한 구체예에서, 본원에 개시된 항체 조성물에 사용하기에 적절한 약학적으로 허용되는 담체는 무균, 병원체 비함유, 및/또는 관련 감염의 위험 및 다른 과도한 부작용 없이 대상체에게 투여하기에 안전하다. 키트에서, 개개 제제는 조합 이후 투여를 위한 지침서 또는 별도 투여를 위한 지침서와 함께 별도의 바이알에 제공될 수 있다. 키트는 또한 본원에 개시된 임의의 항-TIGIT 항체의 적절한 취급 및 보관을 위한 서면 지침서를 포함할 수 있다.
- [0137] 본 명세서 전반에 걸쳐 제공된 모든 최대 수치 제한은, 모든 더 낮은 수치 제한이 본원에 명시적으로 기재된 것처럼, 그러한 더 낮은 수치 제한을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서 전반에 걸쳐서 제공된 모든 최소 수치 제한은, 모든 보다 높은 수치 제한이 본원에 명시적으로 기재된 것처럼, 그러한 높은 수치 제한을 포함할 것이다. 본 명세서 전반에 걸쳐 제공된 모든 수치 범위는, 모든 보다 좁은 수치 범위가 모두 본원에 명시적으로 기재된 것처럼, 상기 더 넓은 수치 범위 내에 속하는 모든 더 좁은 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0138] 상기 또는 하기에 인용된 모든 특허 출원, 웹사이트, 다른 간행물, 수탁 번호 등은 각각의 개별 항목이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 포함된다고 지시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 포

함된다. 상이한 버전의 서열이 상이한 시간에 수탁 번호와 관련되는 경우, 본 출원의 유효 출원일에 있는 수탁 번호와 관련된 버전을 의미한다. 유효 출원인은 실제 출원일 또는 만약 해당되는 경우 수탁 번호를 언급하는 우선권 출원의 출원일 중 더 빠른 것을 의미한다. 마찬가지로 상이한 버전의 간행물, 웹사이트 등이 상이한 시간에 공개된 경우, 달리 명시되지 않는 한 출원의 유효 출원일에서의 가장 최근에 공개된 버전을 의미한다. 본 발명의 임의의 특징, 단계, 요소, 구체예, 또는 양태는 특별히 달리 지시되지 않는 한 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다.

[0139] 본 발명은 명료성과 이해를 목적으로 예시 및 실시예로서 일부 상세하게 설명되었지만, 첨부된 청구범위 내에서 특정 변경 및 수정이 실시될 수 있음이 명백할 것이다.

[0140] 실시예

[0141] 하기 실시예는 인간 TIGIT에 대한 모노클로날 항체의 생산, 특성규명, 및 인간화에 대해 논의하고 또한 본 출원에 기술된 항체에 의한 결합 특성이 결정될 수 있는 예시적인 방법을 제공한다.

[0142] 실시예 1: 재조합 인간 TIGIT 단백질의 발현

[0143] 이 작업에서의 유전자 클로닝, 돌연변이유발 및 플라스미드 작제는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어, 문헌 [Sambrook and Russel (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Kostelny et al. (*Int. J. Cancer* 93:556-565, 2001) and Cole et al. (*J. Immunol.* 159:3613-3621, 1997)]에 기재된 대로 수행되었다.

[0144] 인간 면역글로불린 γ 1 사슬의 Fc 영역에 융합된 인간 TIGIT의 세포외 영역(hTIGIT-Fc; SEQ ID NO:59)을 생산하기 위한 포유동물 발현 벡터 pFCm404(도 1)는 다음의 유전적 성분을 함유한다. 도 1에서 pFCm404의 SalI 부위로부터 시계 방향으로 진행하면, 플라스미드는 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 주요 즉시 초기 프로모터 및 인핸서(도 1에서 CMV-P)로 시작하는 hTIGIT-Fc에 대한 전사 단위를 함유한다. CMV 프로모터 뒤에는 신호 펩티드의 코딩 영역(sp; SEQ ID NO:2), 인간 TIGIT의 세포외 영역(hTIGIT; SEQ ID NO:3), 폴리펩티드 링커(SEQ ID NO:4) 및 인간 γ 1 Fc 영역(SEQ ID NO:5), 및 이어서 인간 γ 1 중쇄 유전자의 폴리아데닐화 부위가 따라온다. hTIGIT-Fc 유전자 뒤에는 SV40 초기 프로모터(SV40-P), 푸로마이신에 대한 내성을 위한 푸로마이신 N-아세틸-트랜스퍼라제 유전자(puro), 및 SV40 폴리아데닐화 부위를 함유하는 세그먼트(SV40-A)가 따라온다. 마지막으로, pFCm404는 박테리아 복제 기점(pUC ori) 및 β 락타마제 유전자(β 락타마제)를 포함하는 플라스미드 pUC19의 일부를 함유한다. 도면의 화살표는 전사의 방향을 나타낸다. 관련 제한 효소 부위가 도면에 표시되어 있다.

[0145] pFCm404에서 인간 TIGIT의 세포외 영역의 코딩 영역은 인간 CD155(hCD155; SEQ ID NO:6)의 세포외 영역을 인코딩하는 DNA 단편으로 대체되어, 새로운 발현 벡터 pFCm406을 생성하였다(도 1). 인간 γ 1 Fc 영역에 융합된 인간 CD155의 세포외 영역(hCD155-Fc; SEQ ID NO:7)은 pFCm406으로부터 발현된다.

[0146] pFCm404의 AgeI 및 EagI 부위 사이의 γ 1 Fc 영역의 코딩 영역을 FLAG 펩티드(FLAG; SEQ ID:8)를 인코딩하는 DNA 단편에 이어 인간 CD55의 글리코실포스파티딜이노시톨 결합 신호(GPI; SEQ ID:9)로 대체하여, 새로운 발현 벡터 pFCm407을 생성하였다(도 1). pFCm406에 의해 인코딩된 FLAG 및 GPI에 융합된 인간 TIGIT의 세포외 영역(hTIGIT-GPI)은 세포 표면 상에 발현된다.

[0147] 배양 상청액에서 hTIGIT-Fc 및 hCD155-Fc를 안정하게 생산하는 세포주를 수득하기 위해, 각각 발현 벡터 pFCm404 및 pFCm406을 마우스 골수종 세포주 NS0의 염색체에 도입시켰다(European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). NS0 세포를 7.5% CO2 인큐베이터에서 37°C에서 10% 우태아 혈청(FBS)을 함유하는 DME 배지에서 성장시켰다. NS0으로의 안정한 트랜스펙션은 문헌[Bebbington et al. (*Bio/Technology* 10: 169-175, 1992)]에 기재된 바와 같은 전기천공에 의해 수행되었다. 트랜스펙션 전에, 발현 벡터를 FspI를 사용하여 선형화하였다. 약 10^7 개 세포를 10 μ g의 선형화된 플라스미드로 트랜스펙션하고, 10% FBS를 함유하는 DME 배지에 현탁시키고, 여러 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 24시간 후, 선택 배지(10% FBS 및 3 μ g/ml 푸로마이신을 함유하는 DME 배지)를 적용하였다. 선택 개시 약 10일 후, 배양 상청액을 코팅을 위한 염소 항-인간 감마 사슬 항체 및 Fc 융합 단백질의 검출을 위한 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-인간 감마 사슬을 이용하여 ELISA에 의해 Fc 융합 단백질의 생산에 대해 검정하였다.

[0148] 높은 수준의 Fc 융합 단백질을 생산하는 NS0 안정한 형질감염체를 하이브리도마-SFM 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에 적응시키고 증식시키고, 물러 보틀에서 성장 소진시켰다. 원심분리 및 여과 후, 배양 상청액을 단백질-A 세파로스 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 로딩하였다. Fc 융합 단백질을 0.1 M

글리신-HCl(pH 3.0)로 용리시키기 전에 컬럼을 포스페이트-완충된 염수(PBS)로 세척하였다. 1 M Tris-HCl(pH 8)로 중화시킨 후, 용리된 Fc 융합 단백질의 완충제를 투석에 의해 PBS로 변경하였다.

[0149] 표면에 hTIGIT-GPI를 발현하는 세포주를 얻기 위해, 발현 벡터 pFcM407을 NS0 세포에 안정하게 트랜스펙션시켰다. 세포 표면에서 hTIGIT-GPI의 발현은 래트 항-FLAG 모노클로날 항체 및 PE-표지된 염소 항-래트 IgG, Fc-특이적 항체를 사용하여 유세포분석에 의해 모니터링되었다. 세포 표면에서 높은 수준의 hTIGIT-GPI를 발현하는 NS0 세포주(NS0-hTIGIT)를 항-TIGIT 항체의 스크리닝에 사용하였다.

[0150] 실시예 2: 항-TIGIT 모노클로날 항체의 생성 및 특성규명

[0151] 항-인간 TIGIT 모노클로날 항체를 생산하는 마우스 하이브리도마는 GenomONE CF EX Cell Fusion Reagent(Cosmo Bio, Carlsbad, CA)와 같은 표준 하이브리도마 기술에 따라 JN Biosciences(Mountain View, CA)에서 생성되었다. 면역원으로서, 인간 TIGIT-Fc 융합 단백질 및 NS0-hTIGIT 세포를 사용하였다.

[0152] 하이브리도마 세포의 배양 상청액에서 분리된 마우스 항체는 다음 특성을 갖는 항체를 확인하기 위해 일련의 스크리닝으로 처리되었다: (1) 정제된 hTIGIT-Fc 융합 단백질에 결합, (2) NS0-hTIGIT 세포에 결합, (3) NS0 세포에 비결합, (4) 피토헤마글루티닌-처리된 인간 말초혈 단핵 세포에서 유래된 CD3+ T 세포에 결합 및 (5) NS0-hTIGIT 세포에 대한 hCD155-Fc 융합 단백질의 결합 차단. hTIGIT-Fc에 결합하는 제1 특성은 마우스 항-TIGIT 항체의 확인을 위해 마우스 카파 및 람다 경쇄(SouthernBiotech, Birmingham, AL)에 대한 HRP-컨쥬게이션된 염소 항체를 사용하여 ELISA에 의해 시험되었다. 제2, 제3 및 제4 특성은 세포-결합된 마우스 항체의 검출을 위해 PE-표지된 염소 항-마우스 감마 사슬 항체(SouthernBiotech)를 사용하여 유세포분석에 의해 조사되었다. 제5 특성은 하기 기재된 대로 유세포분석에 의해 분석되었다. 3개의 마우스 모노클로날 항체(TIG1, TIG2 및 TIG3)는 이러한 다섯가지 특성을 모두 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. TIG1, TIG2 및 TIG3 모노클로날 항체를 상기 기재된 대로 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의해 하이브리도마 세포의 배양 상청액으로부터 정제하였다. TIG1, TIG2 및 TIG3의 아이소형은 각각 마우스 IgG2b/카파, IgG2a/카파 및 IgG2a/카파이다.

[0153] TIGIT와 CD155 사이의 상호작용을 차단하는 TIG1, TIG2 및 TIG3의 활성을 유세포분석에 의해 분석하였다. NS0-hTIGIT 세포를 경쟁자로서 다양한 농도의 항-TIGIT 모노클로날 항체의 존재(또는 부재) 하에 포화 농도 이하의 hCD155-Fc와 함께 인큐베이션하였다. NS0-hTIGIT 세포에 결합된 hCD155-Fc의 검출은 DyLight488-표지된 염소 항-인간 IgG, Fc-특이적 항체로 수행되었다(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). 도 2에 나타난 바와 같이, TIG1, TIG2 및 TIG3은 NS0-hTIGIT 세포에 대한 hCD155-Fc의 결합을 용량-의존적인 방식으로 억제하였다. hCD155-Fc와 NS0-hTIGIT 세포 사이의 상호작용을 차단하는 반최대 억제 농도(IC₅₀)는 TIG1의 경우 49 ng/ml, TIG2의 경우 197 ng/ml, 및 TIG3의 경우 460 ng/ml였다. TIGIT에 대한 CD155의 결합의 95% 초과를 차단하는데 필요한 항체 농도는 TIG1의 경우 0.63 µg/ml, TIG2의 경우 1.25 µg/ml 및 TIG3의 경우 2.5 µg/ml였다.

[0154] 실시예 3: 항-TIGIT 모노클로날 항체의 V 유전자 시퀀싱

[0155] 마우스 항-TIGIT 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역(각각 VH 및 VL) 서열의 결정은 문헌[Tsurushita et al (Methods 36:69-83, 2005)]에 기재된 절차에 따라 수행되었다. 공급업체의 프로토콜에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 약 10⁷개 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 5'-RACE에 대한 올리고 dT-프라이밍된 cDNA를 공급업체의 프로토콜에 따라 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, Mountain View, CA)를 사용하여 합성하였다. VH 및 VL cDNA를 각각 마우스 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에 특이적으로 어닐링하는 3' 프라이머(Tsurushita et al., 상기), 및 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit에 제공된 5' 프라이머를 사용하여 Phusion DNA 중합효소(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)로 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭시켰다. 증폭된 VH 및 VL 유전자를 CloneJet PCR Cloning Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 클로닝하고 CloneJet PCR Cloning Kit에 제공된 프라이머로 시퀀싱하였다. 여러 VH 및 VL 클론을 시퀀싱하고 전형적인 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 상동인 독특한 서열을 확인하였다.

[0156] TIG1의 성숙 VH의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 10)은 도 3에 제시된다. TIG1 VH의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 NFGMH(SEQ ID NO:11), FISSGSSSIYYADTVKG(SEQ ID NO:12) 및 MRLDYIAMDY(SEQ ID NO:13)이다.

[0157] TIG1의 성숙 VL의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 14)은 도 4에 제시된다. TIG1 VL의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 RASKSISKYLA(SEQ ID NO:15), SGSTLQS(SEQ ID NO:16) 및 QQHNEYPTWT(SEQ ID NO:17)이다.

[0158] 성숙 TIG2 VH의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 18)은 도 5에 제시된다. TIG2 VH의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 EYTMH(SEQ ID NO:19), GINPNNGGTSYNQKFKG(SEQ ID NO:20) 및 PGWYNYAMDY(SEQ ID NO:21)이다.

- [0159] 성숙 TIG2 VL의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 22)은 도 6에 제시된다. TIG2 VL의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 KASQGVSTAVA(SEQ ID NO:23), SASRYT(SEQ ID NO:24) 및 QQHYITPWT(SEQ ID NO:25)이다.
- [0160] 성숙 TIG3 VH의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 26)은 도 7에 제시된다. TIG3 VH의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 DYDMS(SEQ ID NO:27), YISDGGYNTYYPDTVKG(SEQ ID NO:28) 및 QILLRYFDY(SEQ ID NO:29)이다.
- [0161] 성숙 TIG3 VL의 아미노산 서열(SEQ ID NO:30)은 도 8에 제시된다. TIG3 VL의 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 KSSQLLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:31), WASTRES(SEQ ID NO:32) 및 QQYHSYPWT(SEQ ID NO:33)이다.
- [0162] 도 3 내지 8에서 CDR 서열의 할당 및 아미노산 위치의 넘버링은 Kabat 등(1991)에 따른다. CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 도면에서 밑줄로 표시된다.
- [0163] 실시예 4: 인간화된 TIG1 항체의 작제 및 발현
- [0164] TIG1 VH 및 VL의 인간화는 문헌[Queen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033, 1989)]에 기재된 대로 문헌[Tsurushita et al. (*Methods* 36:69-83, 2005)]의 절차에 따라 수행되었다. 간단히 말해, TIG1의 가변 영역의 3차원 분자 모델은 JN Biosciences의 독자적인 알고리즘을 사용하여 처음으로 구축되었다. 다음으로, TIG1의 상보성 결정 영역(CDR)의 구조 형성에 중요한 프레임워크 아미노산 잔기가 분자 모델을 사용하여 확인되었다. 동시에, TIG1 VH 및 VL과 각각 상동성이 높은 cDNA-유래된 인간 VH 및 VL 아미노산 서열이 선택되었다. 마지막으로, CDR 구조를 유지하는데 중요한 프레임워크 아미노산 잔기와 함께 CDR 서열이 TIG1 VH 및 VL로부터 상응하는 선택된 인간 프레임워크 서열로 그래프팅되었다.
- [0165] 설계된 인간화된 TIG1 VH(HuTIG1 VH)의 아미노산 서열은 MDSRLNLVFLVLILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHVVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGMVTVSS(SEQ ID NO: 34)이다. 성숙 HuTIG1 VH 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHVVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGMVTVSS(SEQ ID NO:35)는 SEQ ID NO:34의 위치 20에서 시작한다.
- [0166] 설계된 인간화된 TIG1 VL(HuTIG1 VL)의 아미노산 서열은 MRFQVQLGLLLLWISGAQCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:36)이다. 성숙 HuTIG1 VL 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:37)는 SEQ ID NO:36의 위치 21에서 시작한다.
- [0167] HuTIG1 VH를 인코딩하는 유전자는 코딩 영역의 3' 말단에 스플라이스 공여체 신호, 단편의 5' 말단에 SpeI 부위, 및 단편의 3' 말단에 HindIII 부위를 포함하는 엑손으로 합성되었다. SpeI 및 HindIII 부위에 축적한 합성 HuTIG1 VH 유전자의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:38)을 유추된 아미노산 서열(SEQ ID NO:34)과 함께 도 9a에 나타낸다.
- [0168] HuTIG1 VL을 인코딩하는 유전자는 코딩 영역의 3' 말단에 스플라이스 공여체 신호, 단편의 5' 말단에 NheI 부위, 및 단편의 3' 말단에 EcoRI 부위를 포함하는 엑손으로 합성되었다. NheI 및 EcoRI 부위에 축적한 합성 HuTIG1 VL 유전자의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:39)을 유추된 아미노산 서열(SEQ ID NO:36)과 함께 도 9b에 나타낸다.
- [0169] 마우스 항-인간 TIGIT 모노클로날 항체 TIG1의 인간화된 IgG1/카파 형태(HuTIG1-IgG1.AA)의 생산을 위한 포유동물 발현 벡터 pHuTIG1.AA(도 10)는 다음의 유전적 성분을 함유하도록 작제되었다. 도 10의 SalI 부위로부터 시계 방향으로 진행하면, 벡터는 항체 중쇄 유전자의 전사를 개시하기 위해 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 주요 즉시 초기 프로모터 및 인핸서(도면에서 CMV-P)로 시작하는 중쇄 전사 단위를 함유한다. CMV 프로모터 뒤에는 SpeI 및 HindIII 부위에 축적한 TIG1의 인간화된 형태의 중쇄 가변 영역(HuTIG1 VH)을 인코딩하는 엑손, 개재 인트론과 함께 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 엑손을 포함하는 인간 γ 1 중쇄 불변 영역을 함유하는 유전체 서열, 및 인간 γ 1 중쇄 유전자의 폴리아데닐화 부위가 따라온다. pHuTIG1.AA에서 인코딩된 CH2 영역은 효과기 기능의 제거를 위해 위치 234 및 235(Eu 넘버링)에서 알라닌 잔기로의 아미노산 치환(L234A/L235A)을 지닌다(Hezareh et al., *J. Virol.* 75:12161-12168, 2001). 중쇄 유전자 서열 후, 경쇄 전사 단위는 CMV 프로모터 및 인핸서(CMV-P)로 시작하여, NheI 및 EcoRI 부위에 축적한 TIG1의 인간화된 형태의 경쇄 가변 영역(HuTIG1 VL)을 인코딩하는 엑손, 그 앞에 있는 인트론의 일부와 함께 인간 카파 사슬 불변 영역 엑손(C κ)을 함유하는 유전체 서열, 및 C κ 엑손 다음에 인간 카파 사슬 유전자의 폴리아데닐화 부위가 이어진다. 이후 경쇄 유전자 뒤에는 SV40 초기

프로모터(SV40-P), 푸로마이신에 대한 내성을 위한 푸로마이신 N-아세틸-트랜스퍼라제 유전자(puro), 및 SV40 폴리아데닐화 부위를 함유하는 세그먼트(SV40-A)가 따라온다. 마지막으로, pHuTIG1.AA는 박테리아 복제 기점(pUC ori) 및 β 락타마제 유전자(β 락타마제)를 포함하는 플라스미드 pUC19의 일부를 함유한다. 도면의 화살표는 전사의 방향을 나타낸다.

[0170] pHuTIG1.AA에서 인코딩된 HuTIG1-IgG1.AA의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHVVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK(SEQ ID NO:40)이다.

[0171] C-말단 리신은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다.

[0172] pHuTIG1.AA에서 인코딩된 HuTIG1-IgG1.AA의 성숙 카파 경쇄의 아미노산 서열은 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVPFIPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRKAVQWQVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:41)이다.

[0173] 발현 벡터 pHuTIG1.AA를 중국 햄스터 난소 세포주 CHO-K1(ATCC, Manassas, VA)의 염색체에 도입하여 HuTIG1-IgG1.AA를 안정하게 생산하는 세포주를 수득하였다. CHO-K1 세포를 SFM4CHO 배지(GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT)에서 37°C에서 7.5% CO₂ 인큐베이터에서 성장시켰다. CHO-K1로의 안정한 트랜스펙션은 전기천공에 의해 수행되었다. 트랜스펙션 전에, pHuTIG1.AA를 FspI를 사용하여 선형화시켰다. 전형적인 실험에서, 약 10⁷ 개 세포를 20 μ g의 선형화된 플라스미드로 트랜스펙션하고, SFM4CHO 배지에 현탁시키고, 적절한 세포 희석 후에 여러 96-웰 플레이트에 100 μ l/웰로 플레이팅하였다. 48시간 후, 20 μ g/ml의 푸로마이신을 함유하는 SFM4CHO 배지를 안정한 형질감염체의 분리를 위해 100 μ l/웰로 첨가하였다. 선택 개시 약 10일 후, 형질감염체의 배양 상청액을 항체 생산에 대해 검정하였다.

[0174] HuTIG1-IgG1.AA의 발현은 샌드위치 ELISA에 의해 측정되었다. 전형적인 실험에서, ELISA 플레이트를 염소 항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 항체로 코팅하고, 세척 완충제(0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 세척하고, ELISA 완충제(2% 탈지유 및 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 차단하였다. 세척 완충제로 세척한 후, ELISA 완충제에서 적절하게 희석된 시험 샘플을 ELISA 플레이트에 적용하였다. 적절한 인간화된 IgG1/ κ 항체를 표준 으로서 사용하였다. ELISA 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 결합된 항체를 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-인간 카파 사슬 폴리클로날 항체를 사용하여 검출하였다. 플레이트를 실온에서 0.5시간 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 100 μ l/웰의 ABTS 기질(Sigma-Aldrich)을 첨가함에 의해 발색을 개시하고 100 μ l/웰의 2% 옥살산으로 중단시켰다. 흡광도를 405 nm에서 판독하였다.

[0175] HuTIG1-IgG1.AA를 많이 생산하는 CHO-K1 안정한 형질감염체를 세포 생존율이 50% 미만이 될 때까지 SFM4CHO에서 증식시켰다. 원심분리 및 여과 후, 배양 상청액을 단백질 A 컬럼(HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 로딩하였다. 컬럼을 PBS로 세척한 다음 항체를 0.1 M 글리신-HCl(pH 3.0)로 용리시켰다. 용리된 항체의 완충제를 1M 트리스-HCl로 중화시킨(pH 8) 다음 투석에 의해 PBS로 변경시켰다. 항체 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정함에 의해 결정되었다(1 mg/ml = 1.4 OD).

[0176] 실시예 5: HuTIG1-IgG1.AA의 특성규명

[0177] 인간 TIGIT에 대한 HuTIG1-IgG1.AA의 결합을 ELISA에 의해 검사하였다. ELISA 플레이트를 PBS 중 5 μ g/ml의 hTIGIT-Fc(100 μ l/웰)로 4°C에서 밤새 코팅하고, 세척 완충제(0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 세척하고, 200 μ l/웰의 SuperBlock 차단 완충제(Thermo Fisher Scientific)로 차단시켰다. 웰을 세척 완충제로 세척 후, 2.5 μ g/ml에서 시작하는 HuTIG1-IgG1.AA 및 SuperBlock 차단 완충제 중 연속 2배 희석액을 플레이트-결합된 인간 TIGIT에 대한 결합을 위해 첨가하였다. ELISA 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 결합된 항체를 ELISA 완충제에서 1/2,000-희석된 100 μ l/웰의 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-인간 카파 사슬 폴리클로날 항체(Southern Biotech)로 검출하였다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 100 μ l/웰의 ABTS 기질로 발색을 개시하고 100 μ l/웰의 2% 옥살산으로 중단시켰다. 흡광도를 405 nm에서 판독하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, HuTIG1-IgG1.AA는 인간 TIGIT에 용량-의존적인 방식으로 결합하였다. TIGIT와의 결합에 대한 HuTIG1-IgG1.AA의 반최대 유효 농도(EC₅₀)는 65 ng/ml였다. 이는 HuTIG1-

IgG1.AA가 인간 TIGIT에 대한 좋은 결합제임을 보여준다.

[0178] 인간 TIGIT에 대한 HuTIG1-IgG1.AA의 결합을 또한 유세포분석에 의해 검사하였다. NS0-hTIGIT 세포(8×10^5 개 세포)를 10 μ g/ml에서 출발하는 다양한 농도의 HuTIG1-IgG1.AA 및 연속 2배 희석액의 존재(또는 부재) 하에 160 μ l의 FACS 완충제(0.5% 소 혈청 알부민 및 0.05% 소듐 아지드를 함유하는 PBS)에서 20분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. FACS 완충제로 세척한 후, NS0-hTIGIT 세포에 대한 HuTIG1-IgG1.AA 결합을 FACS 완충제에서 PE-표지된 염소 항-인간 IgG 항체로 검출하였다. 20분 동안 인큐베이션하고 FACS 완충제로 세척한 후, 각 항체 농도에서의 평균 채널 형광(MCF)을 얻기 위해 FACScan 유세포분석기(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 유세포분석을 수행하였다. 도 12는 각 항체 농도(가로축)에서의 MCF(세로축)의 플롯을 도시한다. EC₅₀ 값은 60 ng/ml였다. 이는 HuTIG1-IgG1.AA가 세포 표면에 발현된 인간 TIGIT에 대한 좋은 결합제임을 보여준다.

[0179] 인간 TIGIT와 인간 CD155 사이의 상호작용을 차단하는 HuTIG1-IgG1.AA의 활성은 NS0-hTIGIT 세포를 이용하여 유세포분석으로 분석되었다. NS0-hTIGIT 세포(10^6 개 세포)를 10 μ g/ml에서 출발하는 다양한 농도의 HuTIG1-IgG1.AA 및 연속 2배 희석액의 존재(또는 부재) 하에 200 μ l의 FACS 완충제 중 포화 농도 이하(125 ng/ml)의 FITC-표지된 hCD155-Fc 용합 단백질(hCD155-Fc-FITC)과 함께 20분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. FACS 완충제로 세척한 후, NS0-hTIGIT 세포를 FACScan 유세포분석기(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 유세포 분석으로 처리하였다. 세포에 대한 hCD155-Fc-FITC의 결합을 조사하기 위해, 각 항체 농도에서 MCF를 측정하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, HuTIG1-IgG1.AA는 세포 표면에서 hCD155-Fc-FITC와 TIGIT 사이의 상호작용을 용량-의존적인 방식으로 차단하였다. TIGIT-CD155 상호작용을 차단하는 HuTIG1-IgG1.AA의 반최대 억제 농도(IC₅₀)는 67 ng/ml였다. 이는 HuTIG1-IgG1.AA가 CD155와 TIGIT 사이의 상호작용의 효과적인 차단제임을 나타낸다.

[0180] 실시예 6: 인간화된 TIG3 항체의 작제 및 발현

[0181] TIG3 VH 및 VL의 인간화는 실시예 4에 기술된 일반적인 절차에 따라 수행되었다. 설계된 인간화된 TIG3 VH(HuTIG3 VH)의 아미노산 서열은 MNFGLRLIFLVLTLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO: 42)이다. 성숙 HuTIG3 VH 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO:43)는 SEQ ID NO:42의 위치 20에서 시작한다.

[0182] 설계된 인간화된 TIG3 VL(HuTIG3 VL)의 아미노산 서열은 MDSQAQVLMLLLWVSGTCGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYCQQYHSYPWFYGGGTVKVEIK(SEQ ID NO:44)이다. 성숙 HuTIG3 VL 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYCQQYHSYPWFYGGGTVKVEIK(SEQ ID NO:45)는 SEQ ID NO:44의 위치 21에서 시작한다.

[0183] HuTIG3 VH를 인코딩하는 유전자는 코딩 영역의 3' 말단에 스플라이스 공여체 신호, 단편의 5' 말단에 SpeI 부위, 및 단편의 3' 말단에 HindIII 부위를 포함하는 엑손으로 합성되었다. 합성 HuTIG3 VH 유전자의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:46)은 유추된 아미노산 서열(SEQ ID NO:42)과 함께 도 14a에 나타낸다.

[0184] 인간화된 TIG3 VL(HuTIG3 VL)을 인코딩하는 유전자는 코딩 영역의 3' 말단에 스플라이스 공여체 신호, 단편의 5' 말단에 NheI 부위, 및 단편의 3' 말단에 EcoRI 부위를 포함하는 엑손으로 합성되었다. 합성 HuTIG3 VL 유전자의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:47)은 유추된 아미노산 서열(SEQ ID NO:44)과 함께 도 14b에 나타낸다.

[0185] 항-인간 TIGIT 모노클로날 항체 TIG3의 인간화된 IgG1/카파 형태(HuTIG3-IgG1.AA)의 생산을 위한 포유동물 발현 벡터 pHuTIG3.AA는 pHuTIG1.AA를 다음과 같이 변형시킴으로써 작제되었다: (1) HuTIG1 VH 유전자를 SpeI 및 HindIII 부위 사이에서 HuTIG3 VH 유전자로 대체하고, (2) HuTIG1 VL 유전자를 NheI 및 EcoRI 부위 사이에서 HuTIG3 VL 유전자로 대체하였다. PHuTIG3.AA에서 인코딩된 CH2 영역은 효과기 기능을 제거하기 위해 위치 234 및 235(Eu 넘버링)에서 알려진 잔기로의 아미노산 치환을 지닌다(L234A/L235A).

[0186] pHuTIG3.AA에서 인코딩된 HuTIG3-IgG1.AA의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열은 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:48)이다.

[0187] C-말단 리신은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다.

[0188] pHuTIG3.AA에서 인코딩된 HuTIG3-IgG1.AA의 성숙 카파 경쇄의 아미노산 서열은 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSYPWTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:49)이다.

[0189] 지수적으로 성장하는 100 ml의 Expi293 세포(Thermo Fisher Scientific)로의 pHuTIG3.AA의 일시적 트랜스펙션은 공급업체의 프로토콜에 따라 수행되었다. HuTIG3-IgG1.AA를 많이 생산하는 CHO-K1 안정한 형질감염체를 또한 상기 기술된 대로 pHuTIG3.AA의 전기천공에 의해 생성하고 세포 생존율이 50% 미만일 때까지 SFM4CHO에서 증식시켰다. HuTIG3-IgG1.AA를 일시적으로 트랜스펙션된 Expi293 세포 및 안정하게 트랜스펙션된 CHO-K1 세포 각각의 배양 상청액으로부터 상기 기술된 대로 단백질 A 친화성 컬럼에 의해 정제하였다.

[0190] 실시예 7: HuTIG3-IgG1.AA의 특성규명

[0191] 인간 TIGIT에 대한 HuTIG3-IgG1.AA의 결합을 실시예 5에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 조사하였다. 도 15에 나타난 바와 같이, HuTIG3-IgG1.AA는 인간 TIGIT에 용량-의존적인 방식으로 결합하였다. TIGIT와의 결합에 대한 HuTIG3-IgG1.AA의 반최대 유효 농도(EC₅₀)는 85 ng/ml였다. 이는 HuTIG3-IgG1.AA가 인간 TIGIT에 대한 좋은 결합제임을 보여준다.

[0192] 인간 TIGIT에 대한 HuTIG3-IgG1.AA의 결합을 또한 실시예 5에 기재된 바와 같이 유세포분석에 의해 조사하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, HuTIG3-IgG1.AA는 인간 TIGIT에 용량-의존적인 방식으로 결합하였다. TIGIT와의 결합에 대한 HuTIG3-IgG1.AA의 반최대 유효 농도(EC₅₀)는 370 ng/ml였다. 이는 HuTIG3-IgG1.AA가 인간 TIGIT에 대한 좋은 결합제임을 보여준다.

[0193] TIGIT와 CD155의 상호작용을 차단하는 HuTIG3-IgG1.AA의 활성을 실시예 5에 기재된 바와 같이 NS0-hTIGIT 세포 및 FITC-표지된 hCD155-Fc를 사용하여 유세포분석에 의해 분석하였다. 도 13에 나타난 바와 같이, HuTIG3-IgG1.AA는 TIGIT와 CD155 사이의 상호작용을 용량-의존적인 방식으로 차단하였다. TIGIT-CD155 상호작용을 차단하는 HuTIG3-IgG1.AA의 반최대 억제 농도(IC₅₀)는 279 ng/ml였다. 이는 HuTIG3-IgG1.AA가 CD155와 TIGIT 사이의 상호작용의 효과적인 차단제임을 나타낸다.

[0194] 실시예 8: 인간 T 세포에서 과상풍 독소이드에 대한 IL-2 사이토카인 반응은 TIGIT 차단에 의해 향상된다

[0195] 항원-특이적 T 세포 반응을 향상시키는 무린 항-TIGIT 항체의 능력을 과상풍 독소이드에 대한 시험관 내 항원-특이적 리콜 검정을 사용하여 조사하였다(예를 들어, 문헌[Piersma et al., *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2827-36] 참조). 과상풍 독소이드에 대한 충분한 백신 보호는 면역계가 CD4+ 및 CD8+ T 세포 기억 반응을 유도하게 하는 부스터 주사에 의해 달성된다. 효과의 대응적인 척도로서(예를 들어, 문헌[Plotkin et al., *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jul; 17(7): 1055-1065; Goulon et al. Nov. 1972 *Presse Med*. 1:3049-3050] 참조), 0.1 IU/mL의 항-과상풍 독소이드의 혈청 수준은 유지된 면역 반응을 나타낸다.

[0196] 과상풍 독소이드로 백신접종된 인간 지원자로부터 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 수득하였고(iQ Biosciences), 지원자의 과상풍 혈액 역가는 ELISA(Genway)에 의해 1.0 IU/ml 초과인 것으로 확인되었다. 800,000개 PBMC를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Nunc)에서 10% 우태아 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에서 배양하였다. 2 µg/ml의 과상풍 독소이드(List Biological Laboratories)를 3.3 µg/ml 또는 10 µg/ml의 마우스 항-PD-1 항체(Biolegend, clone EH12.2H7) 또는 항-TIGIT 항체(TIG1)의 존재 하에 4일 동안 37°C에서 5% CO2 인큐베이터에서 PBMC를 함유하는 웰에 첨가하였다. 대조군으로, 2 µg/ml의 과상풍 독소이드를 임의의 항체 없이 PBMC에 첨가하였다. 배양된 웰로부터의 상청액을 수확하고, T 세포 활성화를 나타내는 사이토카인인 IL-2를 사이토카인 비드 어레이(BD Pharmingen, CBA Th1/Th2 Cytokine Kit)에 의해 유세포분석(BD FACSCalibur)으로 측정하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, 단독의 과상풍 독소이드 자극에 의한 IL-2 생산은 31 pg/ml였다. 각각 3.3 µg/ml 및 10 µg/ml의 마우스 항-TIGIT 항체 TIG1의 존재 하에 IL-2 생산은 70 pg/ml 및 86 pg/ml로 추가로 향상되었다. 과상풍 독소이드 자극에 의한 IL-2 생산은 각각 3.3 µg/ml 및 10 µg/ml의 마우스 항-PD-1 항체 EH12.2H7의 존재 하에 39 pg/ml 및 57 pg/ml로 또한 향상되었다. 이러한 데이터는 TIG1이 항원 특이적 T 세포 사이토카

인 반응을 향상시키는 기능적 능력을 가지고 있음을 나타낸다.

[0197] 실시예 9 : 과상풍 독소이드에 대한 인간 T 세포 증식 반응은 TIGIT 차단에 의해 향상된다

[0198] 항원-특이적 T 세포 반응을 향상시키는 무린 항-TIGIT 항체의 능력을 과상풍 독소이드에 대한 시험관 내 항원-특이적 리콜 검정을 사용하여 조사하였다(예를 들어, 문헌[Piersma et al., *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2827-36] 참조). 과상풍 독소이드로 백신접종된 인간 지원자로부터의 PBMC를 실시예 8에 기재된 바와 같이 수득하였다(iQ Biosciences). PBMC는 유세포분석에 의해 염료 희석을 사용하여 다수 세대를 추적하기 위해 세포의 시험관 내 및 생체 내 표지에 사용되는 시약인 카르복시플루오레세인 석시니미딜 에스테르(CFSE)(ThermoFisher)로 표지되었다. 250,000개 CFSE-표지된 PBMC를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Nunc)에서 AIM-V 배지(Invitrogen)에서 배양하였다. 2 µg/ml의 과상풍 독소이드(Astarte Biologics, LLC)를 각 웰에서 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 또는 10 µg/ml의 마우스 항-PD-1 항체(Biolegend clone EH12.2H7) 또는 TIG1의 존재 하에 각 웰에 첨가하였다. 세포를 37°C에서 4일 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 4일에, IL-2[50 유닛/ml](Peprotech)를 배양액에 첨가하고, 6일에, PBMC를 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포에서 CFSE 희석에 대해 유세포분석(BD FACSCalibur)에 의한 증식 측정을 위해 수집하였다.

[0199] 도 17(상부 패널)에 나타낸 바와 같이, 과상풍 독소이드는 공여체 1 및 2로부터 유래된 인간 CD4+ T 세포의 4.5% 및 6.5%의 증식을 각각 유도 하였다. TIG1의 첨가는 시험된 모든 항체 농도(2.5 µg/ml, 5 µg/ml and 10 µg/ml)에서 CD4+ T 세포 증식을 추가로 향상시켰고, 그러한 용량 범위에서 항-PD-1 항체와 유사한 증식 효과가 관찰되었다.

[0200] 도 17(하부 패널)에 나타낸 바와 같이, 과상풍 독소이드는 공여체 1 및 2로부터 유래된 인간 CD8+ T 세포의 15% 및 15.5%의 증식을 각각 유도하였다. TIG1의 첨가는 시험된 모든 항체 농도(2.5 µg/ml, 5 µg/ml 및 10 µg/ml)에서 CD8+ T 세포 증식을 추가로 향상시켰고, 그러한 용량 범위에서 항-PD-1 항체 EH12.2H7과 유사한 증식 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 TIG1이 항원 특이적 T 세포 증식 반응을 향상시키는 능력을 가짐을 입증한다.

[0201] 실시예 10: TIGIT 차단에 의해 인간 일차 효과기 세포 및 K562 표적 세포에 의한 NK 세포-매개 세포독성의 증가

[0202] 인간 NK 세포는 만성 골수성 백혈병(CML) 세포주인 K562와 같은 MHC I이 결여된 표적 세포에 자연 세포독성을 유도할 수 있다(예를 들어, [Nagel et al., *Cancer Res* 1981;41:2284-2288; Andersson et al., *Int J Cancer*. 1979 Feb;23(2):143-7.; Lozzio et al., *Leuk Res*. 1979;3(6):363-70] 참조). K562 세포(ATCC)에서의 CD155(PVR)의 발현은 상업용 항체(Biolegend 항-CD155 클론 SKII.4)를 사용하여 확인되었다. 도 18(상부 패널)에 나타낸 바와 같이, 98%의 K562 세포가 높은 수준의 CD155(검정색 히스토그램)를 발현하는 것으로 밝혀졌다. 상업용 항체(eBiosciences 항-TIGIT 클론 MBSA43 및 Biolegend 항-CD56 클론 HCD56)를 이용한 PBMC(iQ Biosciences) 중 인간 CD56-양성 NK 세포에서 TIGIT 발현도 3명의 대표적인 인간 공여체에서 확인되었다(도 18, 하부 패널).

[0203] NK 세포에 의해 매개된 K562 세포의 용해를 TIG1의 유무와 함께 측정하였다. PBMC를 인터루킨-2(IL-2)[200 유닛/ml](Peprotech)의 존재 하에 AIM-V 배지(Invitrogen)에서 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 밤새 배양하였다. 다음 날, K562 세포를 CFSE 표지하고, PBMC(표적:PBMC; 1개의 K562 세포 대 약 5% NK 세포를 함유하는 포함하는 100개의 PBMC)와 1:100으로 37°C에서 4시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 10 µg/ml TIG1의 존재 하에 공동-배양하였다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 수확하고, 5 nM Sytox Red(ThermoFisher)로 염색하여 죽은 표적 세포를 (CFSE+ Sytox Red+)에 의해 구별하였다. NK 세포에 의해 용해된 K562 표적 세포의 백분율을 유세포분석(FACSCalibur; FlowJo Analysis)에 의해 결정하였다. 도 19에 나타낸 바와 같이, 2% K562 세포를 TIG1 없이 용해시켰다. TIG1을 첨가했을 때, 4.4% K562 세포가 용해되었다. TIG1의 첨가는 K562 세포의 NK 세포 매개 자연 세포독성을 2배만큼 향상시켰는데, 이는 TIG1이 인간 효과기 세포의 서브세트에 의한 표적 세포 사멸 수준을 증가시키는 능력을 갖는다는 것을 입증한다.

[0204] 실시예 11: SEB-유도된 인간 T-세포 사이토카인 생산은 TIGIT 차단에 의해 향상된다

[0205] SEB(스태필로코커스 엔테로톡신 B)와 같은 슈퍼항원은 TCR의 $\alpha\beta$ 요소에 항원 제시 세포 상의 MHC 클래스 II 분자를 연결함에 의해 T-세포를 활성화시켜, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-6(IL-6), 종양 괴사 인자 알파(TNF α), 및 인터페론 감마(IFN γ)를 포함하는 사이토카인의 생산을 발생시킨다(예를 들어, 문헌[Krakauer et al., *Toxins* (Basel). 2010 Aug; 2(8): 1963-1983]) 참조). SEB는 T 세포의 0.1-0.001%가 활성화될 수 있는 전형적

인 리콜 항원-유도된 T 세포 반응과 비교하여, 각각의 특정 현혈자에서 발견되는 $v\beta 3$, $v\beta 12$, $v\beta 14$, 및 $v\beta 17$ 을 갖는 T 세포의 분획에 따라 인간 혈액에서 T-세포의 최대 10-20%를 활성화할 수 있다. 따라서, SEB는 T 세포 기반 사이토카인 분비 검정에 사용되어 인간 전혈 세포(WBC)로의 TIGIT 차단에 의한 표적 조절의 수준을 결정할 수 있다.

[0206] 갓 분리된 WBC 샘플(Stanford Blood Center)은 용혈의 시각적 징후가 없는 채혈(draw) 4시간 이내에 소독 해파린을 사용하여 수득되었다. 250 μ l를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Nunc)에서 웰에 분취시키고, 인간화된 항-PD-1 모노클로날 항체 또는 10 μ g/ml HuTIG1-IgG1.AA의 존재 하에 1 μ g/ml의 최종 농도의 SEB(Toxin Technology)로 24시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 자극시켰다. 24시간 후, 96-웰 플레이트를 간단히 원심분리하여 수집을 위한 혈장 층을 분리하였다. 혈장 샘플 수집 후, IL-2, IL-6, TNF α 및 IFN γ 의 발현 수준을 사이토카인 비드 어레이(Biolegend, LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel)에 의해 유세포분석(BD FACSCalibur)에 의해 측정하고, 정량적 측정을 위해 Biolegend 소프트웨어로 분석하였다.

[0207] IL-2, IL-6, TNF α 및 IFN γ 각각의 발현 수준의 변화를 결정하기 위해, 시험 항체(플러스 SEB)의 존재 하에 사이토카인 수준을 각각의 공여체에 대한 항체의 부재 하에서의 사이토카인 수준으로 나눈다. 따라서, 2배 변화(예를 들어, 항-TIGIT의 존재 하에 검출됨)는 실험에서 측정된 사이토카인의 절대 농도가 SEB-자극된 대조 조건에서 발견되는 양의 2배임을 의미한다. 도 20에 나타낸 바와 같이, 건강한 공여체 혈액 세포에 의한 SEB-자극된 IL-2, IL-6, TNF α , 또는 IFN γ 생산은 10 μ g/ml의 인간화된 항-PD-1 또는 10 μ g/ml의 HuTIG1-IgG1.AA의 존재 하에 향상되었다. 이러한 조건 하에, WBC에 의한 SEB-유도된 사이토카인 생산 및 HuTIG1-IgG1.AA에 의한 이의 조절은 사이토카인 효과기 반응의 강화의 관독 값이다. HuTIG1-IgG1.AA는 여기에 제시된 검정에서 IL-2, IL-6, TNF α 및 IFN γ 의 생산을 자극함에 의해 입증된 바와 같이 면역 반응을 강화시킬 수 있었다.

[0208] 실시예 12: HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA 매개된 보체-의존성 세포독성의 특성규명

[0209] 보체-의존성 세포독성(CDC)은 보체의 존재 하에 표적 분자를 발현하는 세포의 용해를 지칭한다(예를 들어, 문헌[Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163]) 참조). 고전적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템(C1q)의 제1 구성요소가 세포 표면의 인지체 항원에 결합된(적절한 서브부류의) 항체에 결합함에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 인간 T 세포 Jurkat 이중 리porter 부모 세포주(Dual Jurkat, Invivogen)를 표면에 인간 TIGIT(Jurkat-TIGIT)를 안정하게 발현하도록 조작하였다. 도 21에 나타낸 바와 같이, Jurkat-TIGIT 세포의 표면에서 TIGIT의 발현은 상업용 PE-표지된 항-TIGIT 항체(eBiosciences clone MSBA43)에 의해 유세포분석에 의해 확인되었다. 따라서, Jurkat-TIGIT는 막 결합된 TIGIT를 구성적으로 발현하는 표적 세포로 사용되어 보체의 존재 하에 항체 결합된 CDC 활성을 받을 수 있다.

[0210] CDC 검정은 50 μ g/ml까지 농도가 증가하는 HuTIG1-IgG1.AA, HuTIG3-IgG1.AA, 또는 토끼 항-흉선세포 글로불린(ATG)(Fresenius Biotech GmbH)의 존재 하에 Jurkat-TIGIT 세포 및 인간 보체에 의해 수행되었다. ATG는 Jurkat 세포와 이의 반응성 및 문서화된 Jurkat 세포와의 보체-의존성 세포독성 활성으로 인해 양성 대조군으로 사용되었다(예를 들어, 문헌[Eiermann et al., *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 Jun;10(3):385-90.; Ayuk et al., *AntiCancer Research* 29: 1355-1360 (2009)] 참조). 10% 우태아 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI 1640 배지(Invitrogen) 중 50,000개 Jurkat-TIGIT 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Nunc)에 시딩하였다. 처리 항체를 50 μ g/ml의 최고 농도에서 시작하여 3배 희석 시리즈를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션되게 하였다. 이 1시간 인큐베이션 후, 인간 보체를 첨가하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 추가 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션되게 하였다. 이 3시간 인큐베이션이 완료된 후, 5 μ g/ml의 프로피듐 아이오다이드(ThermoFisher)를 첨가하고, 샘플을 유세포분석(BD FACSCalibur)에 의해 분석하여 프로피듐 아이오다이드 양성(propidium iodide positivity)의 백분율을 세포 사멸에 대한 관독 값으로 결정하였다.

[0211] 표준화된 변화를 결정하기 위해, 생존율을 유세포분석에 의해 측정하고 프로피듐 아이오다이드 양성 세포의 백분율을 죽은 세포로 평가하였다. 처리되지 않은 샘플 값은 100%로 표준화되었다. 항체의 존재 하에 샘플의 생존율을 표준화된 미처리로 나누어 생존력의 배수 변화를 제공한다. 도 22에 나타낸 바와 같이, HuTIG1-IgG1.AA도 HuTIG3-IgG1.AA도 50 μ g/ml까지는 CDC 활성을 유도하지 않았다. 이러한 데이터는 TIGIT에 대한 HuTIG1-IgG1.AA는 물론 HuTIG3-IgG1.AA의 결합도 T 세포의 보체 매개된 세포 사멸을 발생시키지 않음을 입증한다.

[0212] 실시예 13: HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA의 Jurkat 이중 리porter 세포주 특성규명

[0213] 인간 TIGIT 수용체를 차단한 기능적 결과는 NF- κ B 컨센서스 전사 반응 요소의 5개 복사체 및 c-Rel 결합 부위의 3개 복사체에 융합된 IFN β 최소 프로모터에 의해 유도되는 분비된 루시퍼라제 리porter 유전자를 염색체에서

운반하는 Jurkat-TIGIT 리포터 세포주를 사용하여 분석되었다. Jurkat-TIGIT 세포는 5개의 IFN-자극된 반응 요소와 함께 ISG54 최소 프로모터의 제어 하에 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP) 리포터 유전자를 또한 발현한다.

[0214] 검정은 T 효과기 세포(Jurkat-TIGIT) 및 항원-제시 세포를 나타내는 2개의 세포주를 포함한다. T 효과기 세포는 T 세포 수용체(TCR)의 하류에서 활성화되는 루시퍼라제 리포터를 안정하게 발현한다. 항원 제시 세포(인공 항원-제시 세포, 또는 "aAPC")는 Jurkat-TIGIT와 같은 T 효과기 세포에 항원-독립적 방식으로 결합하여 활성화시키는 T 세포 활성화인자 단백질을 안정하게 발현한다 (Promega). aAPC 세포는 CD155를 발현하도록 추가로 조작된다. T 효과기 세포가 이의 상응하는 aAPC 세포와 함께 공동-배양될 때, TIGIT와 CD155의 상호작용은 T 효과기 세포의 활성화를 억제하고 루시퍼라제의 발현을 감소시킨다. 항-TIGIT 차단 항체의 첨가는 루시퍼라제 활성의 발현을 허용하는 억제 신호를 방출한다.

[0215] 이 검정에서, 인간 CD155 및 T 세포 활성화인자 단백질(TCR 활성화인자 CD155 CHO-K1)(Promega)을 발현하는 16,000개 aAPC를 96-웰 플레이트의 반-영역에 플레이팅하고, 5% CO2 인큐베이터에서 24시간 동안 37℃로 인큐베이션한다. 다음 날, 50,000개 인간 Jurkat-TIGIT 세포를 2배 희석 시리저로 10 µg/ml에서 출발하는 HuTIG1-IgG1.AA 또는 HuTIG3-IgG1.AA의 부재 또는 존재 하에 TCR 활성화인자 CD155 CHO-K1 세포와 추가 24시간 동안 공동-배양하였다. 상청액을 수집하고 분비된 루시퍼라제를 QUANTI-Luc(Invivogen) 및 다중모드 플레이트 판독기(Perkin Elmer EnSpire)를 사용하여 상대 광 유닛으로 측정하였다. 상대 광 유닛 배수 변화를 결정하기 위해, 다양한 농도의 항-TIGIT 항체의 존재 하에 TCR 활성화인자 CD155 CHO-K1과 함께 공동-배양된 Jurkat-TIGIT의 상대 광 유닛을 항체의 부재 하에서의 상대 광 유닛으로 나눈다. 따라서, 일례로서, 2배 증가(예를 들어, 항-TIGIT의 존재 하에 검출됨)는 실험에서 측정된 상대 광 유닛이 TCR-활성인자로만 자극된 대조 조건에서 발견된 양의 2배인 것을 의미한다.

[0216] 도 23에 나타난 바와 같이, HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA 둘 모두는 0.6 µg/ml 내지 10 µg/ml의 각 차단 TIGIT 항체의 존재 하에 유도된 상대 광 유닛을 약 1.5 내지 2.5배만큼 증가시킴에 의해 결정된 바와 같이 고유 T 세포 활성화 신호전달을 증가시킬 수 있었다. 이러한 데이터는 항-TIGIT 항체가 TIGIT의 기능을 차단하고 고유 T 세포 활성을 증가시킴에 의해 길항 활성을 갖는다는 것을 입증한다.

[0217] 실시예 14: TIGIT에 대한 경쟁 결합

[0218] 유세포분석을 이용하여 인간 TIGIT와의 결합에 대해 TIG1과 경쟁하는 항체를 확인한다. TIG1은 Pierce FITC Antibody Labeling Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 형광 염료 FITC로 표지된다. 결과적인 FITC-표지된 TIG1과 인간 TIGIT의 결합은 NS0-hTIGIT 세포를 사용하여 유세포분석에 의해 검사된다. 100,000개 NS0-hTIGIT 세포를 200 µl의 FACS 완충제(0.5% 소 혈청 알부민 및 0.05% 소듐 아지드를 함유하는 PBS)에서, 10 µg/ml에서 시작하는 다양한 농도의 FITC-표지된 TIG1 및 2배 연속 희석액과 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한다. 2 ml의 FACS 완충제로 세척한 후, NS0-hTIGIT 세포를 0.2 ml의 FACS 완충제에 현탁시키고 FACScan 유세포분석기(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 유세포분석으로 처리하였고, 각 항체 농도에서의 평균 채널 형광(MCF)이 얻어진다. 최대 형광 수준의 90%가 달성되는 포화-이하 농도(sub-saturating concentration)가 FITC-표지된 TIG1에 대해 결정된다.

[0219] 포화-이하 농도의 FITC-표지된 TIG1을 200 µl의 FACS 완충제에서 200배 더 높은 농도의 시험 항체의 존재(또는 부재) 하에 100,000개 NS0-hTIGIT 세포와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한다. 예를 들어, 0.1 µg/ml의 FITC-표지된 TIG1이 NS0-hTIGIT 세포에 결합하는데 사용될 때, 20 µg/ml의 시험 항체가 세포 현탁액에 첨가된다. 배경 대조군으로서, 100,000개 NS0-hTIGIT 세포를 임의의 항체 없이 인큐베이션한다. 2 ml의 FACS 완충제로 세척한 후, NS0-hTIGIT 세포를 0.2 ml의 FACS 완충제에 현탁시키고 유세포분석으로 처리한다.

[0220] FITC-표지된 TIG1과 함께 인큐베이션된 NS0-hTIGIT 세포의 MCF[MCF A]를 100%로 표준화하고, 항체 없이 인큐베이션된 NS0-hTIGIT 세포의 MCF[MCF B]를 0%로 표준화한다. FITC-표지된 TIG1 및 시험 항체와 함께 인큐베이션된 NS0-hTIGIT 세포의 MCF [MCF C]는 다음 식에 의해 표준화된다: $100 \times ([MCF C] - [MCF B]) / ([MCF A] - [MCF B])$. FITC-표지된 TIG1 및 시험 항체와 함께 인큐베이션된 NS0-hTIGIT 세포의 표준화된 MCF가 20% 미만일 때, 시험 항체는 인간 TIGIT에 대한 결합에 대해 TIG1과 경쟁하는 것으로 결정된다.

[0221] 동일한 검정을 사용하여 TIG2 또는 TIG3와 경쟁하는 항체를 확인할 수 있다.

[0222] 실시예 15: 친화성 측정

[0223] 모노클로날 항체의 항원-결합 친화성은 Biacore T100(GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA),

ProteOn XPR36(BioRad, Hercules, CA), Octet RED384(ForteBio, Menlo Park, CA) 및 IBIS MX96(Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, UT)(Yang et al., Anal. Biochem. 508:78-96, 2016)과 같은 표지-비함유 광학 표면 플라즈몬 공명(SPR) 바이오센서에 의해 측정될 수 있다. TIG1, TIG2 및 TIG3 각각의 항원-결합 친화성은 Yang 등(상술함)에 의해 기재된 바와 같이 Biacore T100을 사용하여 측정된다. 단백질 A/G(Thermo Fisher Scientific)는 표준 커플링 프로토콜을 사용하여 CM5 센서 칩(GE Healthcare Life Sciences)의 플로우 셀에 고정된다. 시험 항체(TIG1, TIG2 또는 TIG3)는 CM5 센서 칩 상에 단백질 A/G에 의해 포집된다. 다양한 농도의 재조합 인간 TIGIT, 예를 들어, His 태깅된 재조합 인간 TIGIT(Creative BioMart, Shirley, NY)를 센서 칩 상에서 시험 항체에 결합하기 위한 플로우로서 사용한다. 시험 항체 및 인간 TIGIT 사이의 상호작용의 on-rate(k_a) 및 off-rate(k_d)는 BIAevaluation 소프트웨어(GE Healthcare Life Sciences)를 사용하여 취득된다. 결합 상수(K_a)는 on-rate(k_a)를 TIG1, TIG2 및 TIG3 각각에 대한 off-rate(k_d)로 나눔에 의해 계산된다. 해리 상수(K_d)는 off-rate(k_d)를 on-rate(k_a)로 나눔에 의해 계산된다.

[0224] HuTIG1-IgG1.AA에 대한 바이오센서 연구는 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.005% Tween-20 및 0.2 mg/ml BSA 중 BioRad ProteOn XPR36 시스템 상에서 25°C로 수행되었다. HuTIG1-IgG1.AA를 3.7, 1.2 및 0.4 nM으로 희석하고 약 10,000 RU의 GE의 항-인간 IgG 항체로 코팅된 GLM 센서 칩 상에 5분 동안 포집하였다. His-태깅된 가용성 재조합 인간 TIGIT(Cat # TIT-H52H3, Acro Biosystems, Newark, DE)를 1.2 nM까지의 3배 희석 시리즈에서 가장 높은 농도로서 100 nM에서 시험하였다. 3개의 상이한 밀도 항체 표면으로부터의 데이터는 국소 R_{max} 를 사용하여 1:1 상호작용 모델에 전체적으로 피팅되었다. 취득된 on-rate(k_a) 및 off-rate(k_d)는 각각 $(4.42 \pm 0.02) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 및 $(4.09 \pm 0.02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이다. 계산된 해리 상수(K_d)는 $925 \pm 7 \text{ pM}$ 이다.

[0225] 실시예 16: 에피토프 맵핑

[0226] TIGIT 분자에서 TIG1, TIG2 및 TIG3 각각에 의해 인지되는 에피토프를 국소화하기 위해, 중첩-확장 PCR 방법을 이용한 부위-지정 돌연변이유발에 의해 단일 아미노산 치환 돌연변이체를 TIGIT의 세포외 영역(SEQ ID NO:3)에서 생성하였다(Higuchi, R., 1989, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Erlich, H. A., ed., Stockton Press, New York, NY, pp 61-70). TIGIT의 세포외 영역에서 다음 6개의 돌연변이체가 검정에 사용되었다: Q35A(SEQ ID NO:50), N37A(SEQ ID NO:51), Q39A(SEQ ID NO:52), N49A(SEQ ID NO:53), D51A(SEQ ID NO:54) 및 F86A(SEQ ID NO:55). 각 돌연변이의 명칭에서 왼쪽에 있는 문자, 가운데에 있는 숫자, 및 오른쪽에 있는 문자는 각각 야생형 TIGIT의 아미노산 잔기, TIGIT의 세포외 영역(SEQ ID NO:3)에서 N-말단 메티오닌 잔기로부터의 계수에 의한 위치, 및 돌연변이체의 아미노산을 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드이다. 이러한 6개 돌연변이체 각각은 TIGIT-CD155 복합체의 계면 부근에 아미노산 치환을 지닌다(Stengel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109:5399-5404, 2012).

[0227] 포유동물 발현 벡터 pFCm179는 (i) 푸로마이신 N-아세틸 트랜스퍼라제 유전자가 이. 콜라이(*E. coli*) 크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 유전자로 대체되고, (ii) 인간 TIGIT의 세포외 영역이 인간 IL-15로 대체되는 것을 제외하고, pFCm404(도 1)과 동일한 구조를 갖는다. 인간 TIGIT의 세포외 영역의 6개 알려진 치환 돌연변이체를 인코딩하는 DNA 단편은 IL-15-코딩 영역을 대체하기 위해 pFCm179에 개별적으로 도입되었다. 생성된 발현 벡터인 pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A, pFCm179-N49A, pFCm179-D51A 및 pFCm179-F86A는 각각 TIGIT-코딩 영역에 Q35A, N37A, Q39A, N49A, D51A 및 F86A 돌연변이체를 지니고, 각각의 돌연변이체에 특이적인 단일 아미노산 치환을 제외하고, pFCm404에서 인코딩되는 TIGIT-Fc 융합 단백질의 동일한 서열을 발현한다.

[0228] 야생형 및 돌연변이체 TIGIT-Fc 융합 단백질은 인간 배아 신장 세포주 HEK293에서 일시적으로 발현되었다. HEK293 세포를 7.5% CO2 인큐베이터에서 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 37°C로 성장시켰다. 야생형 및 돌연변이체 TIGIT-Fc 융합 단백질의 발현 벡터(pFCm404, pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A, pFCm179-N49A, pFCm179-D51A 및 pFCm179-F86A)를 폴리에틸렌민 방법(Durocher et al. Nucl. Acids Res. 30: e9, 2002)을 사용하여 HEK293 세포로 개별적으로 트랜스펙션시켰다. 배양 상청액 중 TIGIT-Fc 융합 단백질의 생산 수준을 ELISA에 의해 측정하였다. 간단히 말해, ELISA 플레이트를 PBS 중 1/2,000-희석된 100 μl /웰의 염소 항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 항체(Sigma-Aldrich)로 4°C에서 밤새 코팅하고, 세척 완충제로 세척하고, 200 μl /웰의 ELISA 완충제로 20분 동안 실온에서 차단하였다. 세척 완충제로 세척한 후, ELISA 완충제(100 μl /웰)에서 적절하게 희석된 일시적으로 트랜스펙션된 HEK293 세포의 배양 상청액을 ELISA 플레이트에 적용하였다. 정제된 hTIGIT-Fc를 표준물질로 사용하였다. ELISA 플레이트를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 결합된 Fc 융합 단백질을 ELISA 완충제에서 1,2000-희석된 100 μl /웰의 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-인간 IgG 폴리클로날 항체(SouthernBiotech)를 사용하여 검출하였다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고

세척 완충제로 세척한 후, 100 μ l/웰의 ABTS 기질(Sigma-Aldrich)을 첨가함에 의해 발색을 개시하고 100 μ l/웰의 2% 옥살산으로 중단시켰다. 흡광도를 405 nm에서 판독하였다.

[0229] 마우스 TIG1, TIG2 및 TIG3 항체 각각의 TIGIT 돌연변이체에 대한 결합을 ELISA에 의해 검사하였다. ELISA 플레이트를 PBS 중 1/2,000-희석된 100 μ l/웰의 염소 항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 항체(Sigma-Aldrich)로 4℃에서 밤새 코팅하고, 세척 완충제로 세척하고, 200 μ l/웰의 ELISA 완충제로 20분 동안 실온에서 차단하였다. 세척 완충제로 세척한 후, ELISA 완충제(100 μ l/웰) 중 야생형 TIGIT 또는 6개의 TIGIT 돌연변이체 중 하나를 지니는 0.5 μ g/ml의 일시적으로 발현된 TIGIT-Fc 융합 단백질을 실온에서 30분 동안 인큐베이션하기 위해 이중으로 ELISA 플레이트에 적용하였다. 음성 대조군으로서, 트랜스펙션되지 않은 HEK293 세포의 배양 상청액을 사용하였다. 세척 완충제로 세척한 후, ELISA 완충제(100 μ l/웰) 중 100 μ l/웰의 200 ng/ml의 시험 항체(TIG1, TIG2 또는 TIG3)를 적용하였다. ELISA 플레이트를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 결합된 항체를 ELISA 완충제에서 1/2,000-희석된 100 μ l/웰의 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 카파 사슬 폴리클로날 항체(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)를 사용하여 검출하였다. 플레이트를 실온에서 0.5시간 동안 인큐베이션하고 세척 완충제로 세척한 후, 100 μ l/웰의 ABTS 기질(Sigma-Aldrich)을 첨가함에 의해 발색을 개시하고 100 μ l/웰의 2% 옥살산으로 중단시켰다. 흡광도를 405 nm에서 판독하였다.

[0230] 표 1. TIGIT 돌연변이체에 대한 TIG1, TIG2 및 TIG3의 결합

TIGIT 돌연변이체	TIGIT에 대한 상대적인 결합(%)		
	TIG1	TIG2	TIG3
Q35A (SEQ ID NO: 50)	-0.1	29.1	57.8
N37A (SEQ ID NO:51)	0.8	75.1	83.5
E39A (SEQ ID NO:52)	71.1	69.1	94.2
N49A (SEQ ID NO:53)	0.5	42.6	37.2
D51A (SEQ ID NO:54)	1.8	61.0	41.1
F86A (SEQ ID NO:55)	49.5	40.5	43.2

[0231]

[0232] TIG1, TIG2 및 TIG3 각각에 대해, 각 TIGIT 돌연변이체에 대한 상대적인 결합을 하기 식으로 계산하였다. 야생형 TIGIT-Fc 융합 단백질에 의한 평균 흡광도[Abs A]를 100%로 표준화하고, 트랜스펙션되지 않은 HEK293 세포의 배양 상청액에 의한 평균 흡광도[Abs B]를 0%로 표준화하였다. 돌연변이체 TIGIT-Fc 융합 단백질의 평균 흡광도[Abs C]는 하기 식에 의해 표준화되었다: $100 \times ([\text{Abs C}] - [\text{Abs B}] / ([\text{Abs A}] - [\text{Abs B}]))$. 결과는 표 1에 요약되어 있다. 아미노산 잔기가 위치 35, 37, 49 또는 51에서 알라닌으로 치환되었을 때 TIG1의 상대적인 결합은 5% 미만이었으며, 이는 이러한 4개 위치에 있는 아미노산 잔기가 TIG1과 TIGIT의 결합에 중요하다는 것을 나타낸다. 이 검정에 사용된 TIGIT 돌연변이체 중 어느 것도 TIGIT에 대한 TIG2 및 TIG3의 결합을 폐지하지 않았다.

[0233] 실시예 17: HuTIG1-IgG1.AA, 항-PD-L1 항체 및 HuTIG1-IgG1.AA를 항-PD-L1 항체와 함께 첨가시 IFN γ 의 분비 향상

[0234] 인간 PBMC를, 밀도 구배 배지(Lymphoprep; STEMCELL, 07801) 상에 혈액을 층화하고 간기로부터 원심분리 후 PBMC를 수집함에 의해 백혈구 연층으로부터 먼저 분리하였다. 다음 단계에서, 인간 단핵구를 CD14 양성 선별(EasySep Human CD14 양성 선별 키트; STEMCELL; Cat# 18058)에 의해 제조업체의 프로토콜에 따라 PBMC로부터 분리하고 5% FBS 및 0.1 μ g/ml의 GM-CSF(R&D; Cat# 215-GM-050/CF) 및 0.1 μ g/ml의 IL-4(R&D; Cat# 204-IL-050/CF)가 보충된 RPMI 배지에서 6일 동안 배양하였다. 분화된 단핵구-유래된 수지상 세포(moDC)를 수거하고, CD155, CD112 및 PD-L1의 발현에 대해 유세포분석에 의해 검사하였다(도 24).

[0235] 4명의 다른 공여체로부터 얻은 인간 CD4+ 세포를 음성 고갈(RosetteSep 인간 CD4 T 세포 풍부화 콕테일; STEMCELL; #15062)에 의해 백혈구 연층으로부터 분리하고, 순도를 유세포분석을 사용하여 결정하였다.

[0236] MoDC 및 CD4+ 세포를 1:4 비로 조합하고(25,000 moDC; 100,000 CD4+ 세포), HuTIG1-IgG1.AA(5 μ g/ml 또는 15 μ g/ml) 또는 항-PD-L1 항체(10 μ g/ml; 클론 243.55.S1; SEQ ID NO: 56 & 57) 또는 둘 모두의 HuTIG1-IgG1.AA(15 μ g/ml) 및 항-PD-L1 항체(10 μ g/ml)의 존재 하에 혈청 비함유 배지(X-Vivo-20; LONZA; Cat# 04-448Q)에서 4일 동안 배양한 후 혈구계산 비드 어레이(CBA; Human IFN γ Flex Set; BD; Cat# 560111)를 사용하여 IFN γ 정량하였다. 인간 IgG1 Fc(25 μ g/ml; BioXcell; Cat# BE0096)를 대조군으로 사용하였다.

[0237] 도 25에 도시된 바와 같이, HuTIG1-IgG1.AA 및 항-PD-L1 항체 차단은 적절한 아이소형 대조군 항체와 비교하여 IFN γ 의 생산을 독립적으로 증가시켰다. HuTIG1-IgG1.AA와 항-PD-L1 항체의 조합은 어느 한 단독의 모노요법과

비교하여 IFN γ 의 생산을 유의하게 및 상승적으로 향상시켰다.

[0238] 실시예 18: HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA는 인간 림프구 및 골수 세포에서 발현된 TIGIT를 검출한다

[0239] 10명의 공여체로부터 분리된 총 인간 PBMC를 T 세포, B 세포, NK 세포 및 골수-계통 서브세트를 묘사하는 직접 컨주게이션된 항체로 공동-염색 하였다. 살아 있는/죽은 Fixable Aqua Dead Cell Stain 키트를 사용하여 죽은 세포를 제외시켰다. TIGIT의 발현은 Alexa647 염료에 컨주게이션된 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA 항체를 사용하여 결정되었다. 시판되는 항-CD96 항체(클론 NK92.39)를 사용하여 CD96의 발현을 결정하였다. 도 26A에서, 플러스(+) 기호는 배경 이상의 발현을 나타내고 (+++)는 관찰된 가장 높은 발현을 나타낸다. 플러스/마이너스(+/-) 기호는 지정된 집단 내의 세포의 서브세트만이 배경 이상의 TIGIT 또는 CD96을 발현시킴을 나타내고, 마이너스(-) 기호는 배경 이상의 발현이 결여됨을 나타낸다. 모든 경우에, 배경은 표적 항체(즉, HuTIG1-IgG1.AA, HuTIG3-IgG1.AA, 항-CD96 항체)를 제외하고 염색 패널에 사용된 모든 형광색소가 첨가된 변형된 Fluorescence Minus One(FMO) 방법을 이용하여 결정되었다. 오히려, 표적 항체는 동일한 컨주게이션의 IgG 특이적 아이소형 대조군 항체로 대체되었다. 도 26B는 도 26A에서 CD96의 발현 수준을 할당하는데 사용된 다양한 발현 수준에서 PBMC 중 항-TIGIT 항체 염색의 대표적인 히스토그램을 도시한다. 오른쪽 히스토그램은 변형된 FMO를 나타낸다. 어두운 히스토그램은 HuTIG1-IgG1.AA 또는 HuTIG3-IgG1.AA 염색을 나타낸다.

[0240] 흑색종, 결장직장암, 비소세포 폐 암종, 및 신장 투명 세포 암종으로부터 분리된 종양 세포를 상업적 공급원으로부터 구입하고, T 세포 및 항원-제시 세포 서브세트를 묘사하는 직접 컨주게이션된 항체로 염색하였다. 백혈구를 범(pan) 아이소형 항-CD45 항체(클론 HI30)를 사용하여 확인하였다. 살아 있는/죽은 Fixable Aqua Dead Cell Stain 키트를 사용하여 죽은 세포를 제외시켰다. TIGIT의 발현은 Alexa647 염료에 컨주게이션된 HuTIG1-IgG1.AA 항체를 사용하여 결정되었다. 모든 경우에, 배경은 표적 항체(즉, HuTIG1-IgG1.AA)를 제외하고 염색 패널에 사용된 모든 형광색소가 첨가된 변형된 Fluorescence Minus One(FMO) 방법을 이용하여 결정되었다. 오히려, 표적 항체는 동일한 컨주게이션의 IgG 특이적 아이소형 대조군 항체로 대체되었다. 도 32B는 도 32A에 나타난 다양한 발현 수준에서 종양 침윤성 림프구(TIL)에 대한 항-TIGIT 염색의 대표적인 히스토그램을 도시한다. 오른쪽 히스토그램은 변형된 FMO를 나타낸다. 어두운 히스토그램은 HuTIG1-IgG1.AA 염색을 나타낸다.

[0241] 실시예 19: 유세포분석에 의한 항-인간 TIGIT 항체 HuTIG1-IgG1.AA의 에피토프 매핑

[0242] 인간 TIGIT cDNA를 9개 잔기 헤마글루티닌(HA) 펩티드 태그를 갖는 pcDNA3.1 (+)로 클로닝하고, 이어서 10개 잔기 펩티드 링커를 21개 잔기 천연 신호 펩티드 뒤에 그리고 성숙 TIGIT 단백질의 N-말단(SEQ ID NO:58) 앞에 삽입하였다. 인간 TIGIT의 세포외 영역에서 관심 아미노산 잔기(T34, Q35, N37, E39, L44, I47, N49, D51, L52, H55, F86, I88, H90, Y92 및 T96)를 한 번에 하나의 아미노산씩 알라닌으로 돌연변이시켰다. 플라스미드를 정제하고, Eugene 6(Promega) 트랜스펙션 시약을 사용하여 제조업체의 권고에 따라 CHO-K1 세포로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. HA-태깅된 인간 TIGIT 돌연변이체 발현은 항-HA 항체 검출에 의해 확인되었다.

[0243] 항-hTIGIT 항체 결합 에피토프의 유세포분석을 위해, 단일 아미노산 변이가 있거나 없는 HA-태깅된 인간 TIGIT 단백질을 CHO-K1 세포로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후, 트랜스펙션된 세포를 HBSS 완충제(Thermo Fisher Scientific, Cat# 14175095)에 현탁시키고, 50 μ L 부피로 다양한 농도의 HuTIG1-IgG1.AA 항체와 함께 인큐베이션하였다. 4°C에서 1시간 인큐베이션 후, 세포를 세척하고 항체에 의해 결합된 세포를 검출하기 위해 50 μ L의 Alexa488 컨주게이션된 항-인간 IgG(H+L) 이차 항체(Thermo Fisher Scientific, Cat#A-11013)와 함께 2차 인큐베이션을 수행하였다. 세포를 양성 대조군으로서 항-HA 항체(Sigma, Cat# H7411)와 함께 인큐베이션하고, 트랜스펙션되지 않은 CHO-K1 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 세포를 Attune NxT 세포분석기(Thermo Fisher Scientific)에서 분석하고, 데이터를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 처리하였다. 각각의 돌연변이체에 대해, 포화 항체 결합 MFI(평균 형광 강도)를 100% POC(대조군의 비율)로 표준화하였고, 일차 항체 결합 대조군 MFI는 0% POC로 표준화하지 않았다. 이후 데이터를 하기 식을 사용하여 GraphPad Prism 7 곡선 피팅을 사용하여 4개 파라미터 비선형 S자형 곡선에 피팅시켰다: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$.

[0244] 이 검정에서, HuTIG1-IgG1.AA는 야생형 인간 TIGIT에 $\text{EC}_{50} = 1.28\text{nM}$ 으로 결합하였다. 15개 단일-점 알라닌 TIGIT 돌연변이체 중 5개는 10배 넘게 감소한 결합 친화도로 HuTIG1-IgG1.AA에 결합하였다. 돌연변이 N49A, D51A, H90A, N37A 또는 Q35A를 갖는 인간 TIGIT(SEQ ID NO:3)는 각각 $\text{EC}_{50} = 17.7$ 내지 176 nM 범위의 감소된 효능으로 HuTIG1-IgG1.AA에 결합하였다(도 27). 이러한 모든 잔기는 TIGIT IgV 세포외 도메인의 전면 β -시트 구조에서 한 개별 영역으로 공동-배치된다(도 28).

[0245] 실시예 20: 비-인간 영장류의 전혈로부터의 T-세포 서브세트의 생체 외 면역 표현형 검사에서 HuTIG1-IgG1.AA를

투여하였다

- [0246] 약동학적 연구는 Charles River Laboratories(Reno, NV)에 의해 수행되었다. 이 연구의 목적은 TIGIT에 대한 수용체 점유성의 간접적인 평가를 위해 10 mg/kg의 항-TIGIT(HuTIG1-IgG1.AA) 항체의 단일 용량으로 처리된 시노물구스 원숭이로부터의 생체 외 전혈 샘플을 검사하는 것이었다.
- [0247] 3개의 실험적으로 나이브(naive)한 암컷 시노물구스 원숭이(#67, #68 & #69)에게 10 mg/kg의 HuTIG1-IgG1.AA 항체의 단일 정맥내 용량을 투여하였다. 소변 배파린 샘플 중 전혈은 투여 전, 투여 후 1, 2, 7, 14, 21 및 28 일 시점에 해당하는 마지막 샘플링 시점으로부터 24시간 이내에 받았다. 전혈 유세포분석 연구를 위해, BioLegend로부터의 형광 표지된 항-인간 TIGIT(클론 MBSA43)를 사용하여 비-인간 영양류와 교차-반응하는 것으로 밝혀진 바와 같이 시노물구스 원숭이 혈액 림프구 세포 서브세트에서 TIGIT의 발현 수준을 결정하였다(*PLoS Pathog.* 2016 Jan; 12(1); BioLegend). 살아 있는 세포를 FACSCalibur에 의해 획득하였고 FlowJo 소프트웨어에 의해 분석하였다.
- [0248] 항-TIGIT(MBSA43)는 투여 전 전혈 샘플 염색시 CD4+ 및 CD8+ T-세포 서브세트 둘 모두에 결합할 수 있었다. 투여 후, 항-TIGIT(MBSA43)는 조사된 상이한 원숭이에 따라 14일 또는 21일까지 이러한 T-세포 서브세트에서 TIGIT 발현을 검출할 수 없었고, 수준은 조사된 상이한 동물에 따라 21일 또는 28일까지 투여 전 검출 수준으로 돌아온다(도 29B 및 30B). 이렇게 TIGIT 발현을 검출할 수 없는 것은 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 빈도(각각 도 29A 및 30A)에서의 현저한 변화 때문이 아니었고, 이는 표면 TIGIT가 치료 항체(HuTIG1-IgG1.AA)에 의해 점유되었고 T-세포 서브세트 고갈 때문이 아님을 시사한다.
- [0249] 이러한 데이터는 항-TIGIT 항체 HuTIG1-IgG1.AA가 시노물구스 원숭이와 교차-반응성을 시사하고, BioLegend로부터의 항-인간 TIGIT(클론 MBSA43)를 사용하여, TIGIT 수용체 점유성의 평가를 제공한다.
- [0250] 실시예 21: K562 표적 세포에서 HuTIG1-IgG1.AA 및 HuTIG3-IgG1.AA에 의해 향상된 NK 세포 매개 세포독성
- [0251] PBMC 대신에 정제된 NK 세포를 사용하여 실시예 10에 기술된 NK 세포-매개 세포독성 검정을 반복하였다. 이러한 실험을 위한 충분한 적절한 정제된 NK 세포를 얻기 위해, 높은 NK 세포 빈도, 충분한 TIGIT 표면 발현, 및 충분한 CD226 발현을 갖는 공여체 PBMC에 대해 스크리닝하는 것이 중요하다. 말초혈 LeukoPak(100억개 이상의 세포로 구성됨)을 얻었고, NK 세포 분리는 Miltenyi autoMACS Pro Separator를 사용하여 제조업체의 지시(Miltenyi Biotec, catalog#130-092-657)에 따라 수행되었다. 정제된 NK 세포를 6-웰 플레이트에서 인터루킨-2(IL-2)[200 유닛/ml]를 함유하는 배지에 재현탁시켰다. 6-웰 플레이트를 37°C에서 5% CO2 인큐베이터에 24시간 동안 두고, 이후 웰로부터 수확한 세포로 자연 세포독성 연구를 수행하였다.
- [0252] 정제된 NK 세포에 의해 매개된 K562 세포의 용해를 항-TIGIT 항체(TIG1)의 유무와 함께 측정하였다. NK 세포를 인터루킨-2(IL-2)[200 유닛/ml](Peprotech)의 존재 하에 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에서 37°C에서 5% CO2 인큐베이터에서 밤새 배양하였다. 다음 날, K562 세포를 CFSE 표지하고, 10 µg/ml 리톡산 또는 인간화된 항-IGIT 항체(HuTIG1-IgG1.AA 또는 HuTIG3-IgG1.AA)의 존재 하에 NK 세포와 1:20으로(표적:NK; 1개 K562 세포 대 20개 NK 세포) 4시간 동안 37°C에서 5% CO2 인큐베이터에서 공동-배양하였다. 리톡산은 K562 세포가 CD20을 발현하지 않기 때문에 음성 대조군으로 사용되었다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 수확하고, 5 nM Sytox Red(ThermoFisher)로 염색하여 죽은 표적 세포를 (CFSE+ Sytox Red+)에 의해 구별하였다. NK 세포에 의해 용해된 K562 표적 세포의 백분율을 유세포분석(FACSCalibur; FlowJo Analysis)에 의해 결정하였다.
- [0253] 도 31에 나타난 바와 같이, 정제된 NK 세포를 사용하는 경우, 항-TIGIT 항체의 첨가는 K562 세포의 NK 세포 매개된 자연 세포독성을 향상시켰고, 이는 항-TIGIT 항체(HuTIG1-IgG1.AA 또는 HuTIG3-IgG1.AA)가 인간 효과기 세포의 서브세트에 의해 표적 세포 사멸 수준을 증가시키는 능력('항체 없음' 또는 리톡산 표준화된 백분율에 비해, 각각 28% 또는 19%만큼)을 가짐을 입증한다.

[0254]

서열

SEQ ID NO: 1: 성숙 인간 TIGIT 의 아미노산 서열:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPS
PPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG

SEQ ID NO: 2: 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 상류에 있는 신호 펩티드의 아미노산
서열: MGWSWIFFFLSGTASVLS

SEQ ID NO: 3: 인간 TIGIT(hTIGIT)의 세포외 영역의 아미노산 서열:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 4: hTIGIT 의 바로 하류에 있는 폴리펩티드 링커의 아미노산 서열:
TGGG

SEQ ID NO: 5: 인간 $\gamma 1$ Fc 영역의 아미노산 서열:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 6: 인간 CD155 의 세포외 영역의 아미노산 서열:

DVVVQAPTQVPGLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVAFHQQTQ
GPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWL
RVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPGF
LSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDN
NWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPINNTL
ICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRNA

SEQ ID NO: 7: 인간 $\gamma 1$ Fc 영역 사슬에 융합된 인간 CD155 의 세포외 영역의

[0255]

아미노산 서열(hCD155-Fc):

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVVFHQTQ
GPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWL
RVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDDLGGMPNTSQVPGF
LSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPEVSISGYDN
NWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLRPVDKPINNTL
ICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRNATGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 8: FLAG 펩티드(FLAG)의 아미노산 서열: DYKDDDDK

SEQ ID NO: 9: 인간 CD55 의 글리코실포스파티딜이노시톨 결합 신호(GPI)의
아미노산 서열: PNKGSGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT

SEQ ID NO: 10: TIG1 VH 의 아미노산 서열:

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHVWRQAPEKGLEWVAFISSGSS
SIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARMRLDYYAMDYWGQ
GTSVTVSS

SEQ ID NO: 11: TIG1 VH CDR1 의 아미노산 서열: NFGMH

SEQ ID NO: 12: TIG1 VH CDR2 의 아미노산 서열: FISSGSSSIYYADTVKG

SEQ ID NO: 13: TIG1 VH CDR3 의 아미노산 서열: MRLDYYAMDY

SEQ ID NO: 14: TIG1 VL 의 아미노산 서열:

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKGKTNKLLIYSGSTLQSGIPS
RFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAMYYCQHNYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 15: TIG1 VL CDR1 의 아미노산 서열: RASKSISKYLA

SEQ ID NO: 16: TIG1 VL CDR2 의 아미노산 서열: SGSTLQS

[0256]

SEQ ID NO: 17: TIG1 VL CDR3 의 아미노산 서열: QQHNEYPWT

SEQ ID NO: 18: TIG2 VH 의 아미노산 서열:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKNLEWIGGINPNNG
GTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCARPGWYNYAMDYWG
QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 19: TIG2 VH CDR1 의 아미노산 서열: EYTMH

SEQ ID NO: 20: TIG2 VH CDR2 의 아미노산 서열: GINPNNGTSYNQKFKG

SEQ ID NO: 21: TIG2 VH CDR3 의 아미노산 서열: PGWYNYAMDY

SEQ ID NO: 22: TIG2 VL 의 아미노산 서열:

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQGVSTAWAYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYHCQQHYITPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 23: TIG2 VL CDR1 의 아미노산 서열: KASQGVSTAVA

SEQ ID NO: 24: TIG2 VL CDR2 의 아미노산 서열: SASYRYT

SEQ ID NO: 25: TIG2 VL CDR3 의 아미노산 서열: QQHYITPWT

SEQ ID NO: 26: TIG3 VH 의 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFAFSDDYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISDGGY
NTYYPDVTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCARQILLRYYFDYWGQGT
TLTVSS

SEQ ID NO: 27: TIG3 VH CDR1 의 아미노산 서열: DYDMS

SEQ ID NO: 28: TIG3 VH CDR2 의 아미노산 서열: YISDGGYNTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 29: TIG3 VH CDR3 의 아미노산 서열: QILLRYYFDY

SEQ ID NO: 30: TIG3 VL 의 아미노산 서열:

DIVMSQSPSLAVSVGEKVTMTCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYHSYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 31: TIG3 VL CDR1 의 아미노산 서열: KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO: 32: TIG3 VL CDR2 의 아미노산 서열: WASTRES

SEQ ID NO: 33: TIG3 VL CDR3 의 아미노산 서열: QQYHSYPWT

SEQ ID NO: 34: 설계된 인간화된 TIG1 VH(HuTIG1 VH)의 아미노산 서열:

MDSRLNLVFLVLILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWV
RQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARMLRDYYAMDYWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 35: 성숙 HuTIG1 VH 의 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSS
IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMLRDYYAMDYWGQ
GMVTVSS

SEQ ID NO: 36: 설계된 인간화된 TIG1 VL(HuTIG1 VL)의 아미노산 서열:

MRFQVQVLGLLLWISGAQCIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQ
QKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYP
WTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37: 성숙 HuTIG1 VL 의 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 38: pHuTIG1.AA 에서 합성 HuTIG1 VH 유전자의 뉴클레오티드 서열:

ACTAGTACCACCATGGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCCTTGTCCTATTCTGAA
AGGCGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCC
TGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTG
GAATGCACTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATTCA
TTAGTAGTGGCAGTAGTTCCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTAC
CATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAG
GGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAATGAGACTGGATTACTATGCT
ATGGACTACTGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGTATGGCC
TCTAAGCTT

[0258]

SEQ ID NO: 39: pHuTIG1.AA 에서 합성 HuTIG1 VL 유전자의 뉴클레오타이드 서열:

GCTAGCACCAACCATGAGGTTCCAGGTTTCAGGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGA
TCTCAGGAGCCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTTTCTGCA
TCTGTTGGAGATAGAGTCACTATTACTTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAAT
ATCTGGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTC
TGGGTCCACTTTGCAATCTGGAGTTCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGT
ACAGATTTCACTCTACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACCTATT
ACTGTCAACAGCATAATGAATACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAAGTCG
AAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

SEQ ID NO: 40: pHuTIG1.AA 에서 인코딩된 HuTIG1-IgG1.AA 의 성숙 감마 중쇄의
아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSS
IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMLDYIAMDYWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 41: pHuTIG1.AA 에서 인코딩된 HuTIG1-IgG1.AA 의 성숙 카파 경쇄의
아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 42: 설계된 인간화된 TIG3 VH(HuTIG3 VH)의 아미노산 서열:

MNFGRLRLIFLVTLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWV
RQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARQILLRYYFDYWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 43: 성숙 HuTIG3 VH 의 아미노산 서열:

[0259]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSQDYMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGG
YNTYYPDITVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQ
GTTTVTVSS

SEQ ID NO: 44: 설계된 인간화된 TIG3 VL(HuTIG3 VL)의 아미노산 서열:

MDSQAQVLMLLLLWVSGTCGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKN
YLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC
QQYHSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 45: 성숙 HuTIG3 VL의 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA
STRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 46: pHuTIG3.AA 에서 합성 HuTIG3 VH 유전자의 뉴클레오티드 서열:

ACTAGTACCACCATGAACCTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGCTCTACTCTGAA
AGGCGTGAACCTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGTGCAGCC
TGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTGCTTTCAGTGACTAT
GACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATAC
ATTAGTGATGGCGGTTATAACACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCA
CCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGA
GGGCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTGCAAGACAAATTCTGCTGCGGTACTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTTA
AAACAAGCTT

SEQ ID NO: 47: pHuTIG3.AA 에서 합성 HuTIG3 VL 유전자의 뉴클레오티드 서열:

GCTAGCACCAACCATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTATGCTGCTGCTGCTCTGGG
TTTCTGGAACCTGTGGGGACATTCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC
CTCAGTTGGAGACAGGGTACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTTCTGTAT
AGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGGCT
CCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTAGTCGCT
TCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCC
TGAAGACTTCGCAGTTTATTACTGTGCAATATCATAGCTATCCCTGGACCTTC
GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

SEQ ID NO: 48: pHuTIG3.AA 에서 인코딩된 HuTIG3-IgG1.AA 의 성숙 감마 중쇄의

[0260]

아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGG
YNTYYPDYTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49: pHuTIG3.AA 에서 인코딩된 HuTIG3-IgG1.AA 의 성숙 카파 경쇄의
아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA
STRESGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFAVYYCQYHSYPWTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 50: Q35A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:
MMTGTIETGNISAEEKGSIIQCHLSSTTAQVTAVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 51: N37A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:
MMTGTIETGNISAEEKGSIIQCHLSSTTAQVTQVAWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 52: Q39A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:
MMTGTIETGNISAEEKGSIIQCHLSSTTAQVTQVNWAEQQDQLLAICNADLGWHIS
PSFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGA
RFQIPTG

SEQ ID NO: 53: N49A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:

[0261]

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICAADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 54: D51A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:
MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNAALGWHISP
SFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 55: F86A 돌연변이를 갖는 인간 TIGIT 의 세포외 영역의 아미노산 서열:
MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYACIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTG

SEQ ID NO: 56: 성숙 항-인간 PD-L1 항체 중쇄의 아미노산 서열:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 57: 성숙 항-인간 PD-L1 항체 경쇄의 아미노산 서열:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLFPTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
PPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 58: 성숙 인간 TIGIT 에 융합된 신호, HA 태그 및 링커 펩티드의 아미노산
서열:
MRWCLLIWAQGLRQAPLASGYPDYAGGGGSGGGGSMMTGTIETTGNISAE
KGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLGL

[0262]

TLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLV
VICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPA
GLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSSFFTETG

SEQ ID NO: 59: 인간 면역글로불린 $\gamma 1$ 사슬의 Fc 영역에 융합된 인간 TIGIT 의
세포외 영역의 아미노산 서열(hTIGIT-Fc):

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISP
SFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR
FQIPTGTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 60: HuTIG1-IgG1.Q 의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWRQAPGKGLEWVAFISSGSSS
IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYYAMDYWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 61: HuTIG1-IgG4.P의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWRQAPGKGLEWVAFISSGSSS
IY
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYYAMDYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 62: HuTIG3-IgG1.Q의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGG
YNTYYPDYTKGRTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 63: HuTIG3-IgG4.P의 성숙 감마 중쇄의 아미노산 서열:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGG
YNTYYPDYTKGRTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 64: HuTIG1-IgG1.Q 및 HuTIG1-IgG4.P의 성숙 카파 경쇄의 아미노산
서열:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 65: HuTIG3-IgG1.Q 및 HuTIG3-IgG4.P의 성숙 카파 경쇄의 아미노산
서열:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA

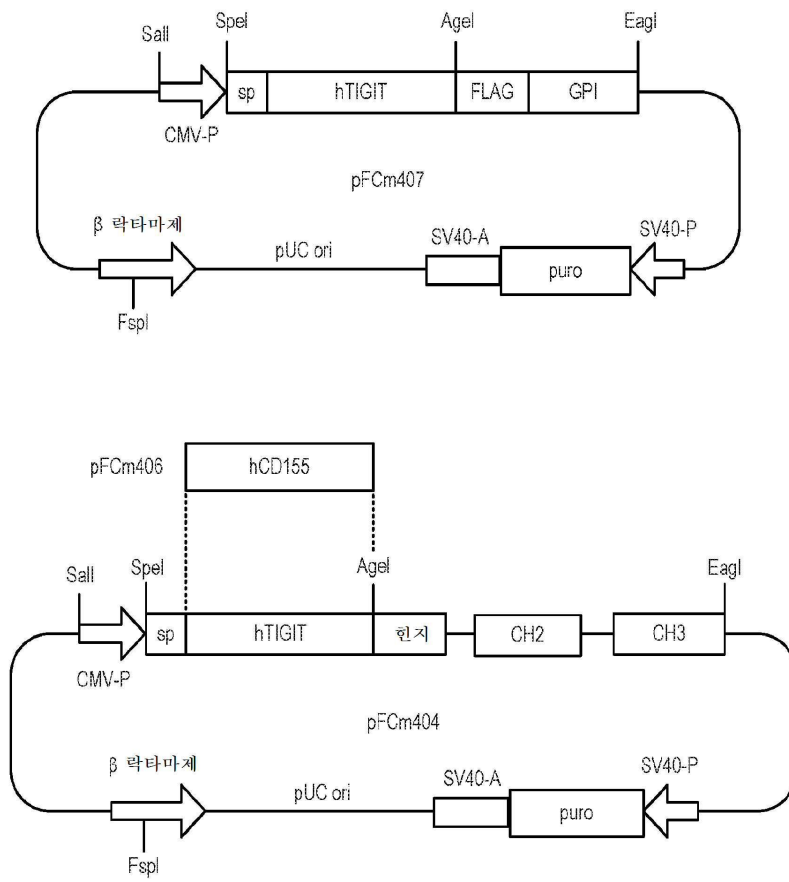
STRESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQYHSYPWTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0264]

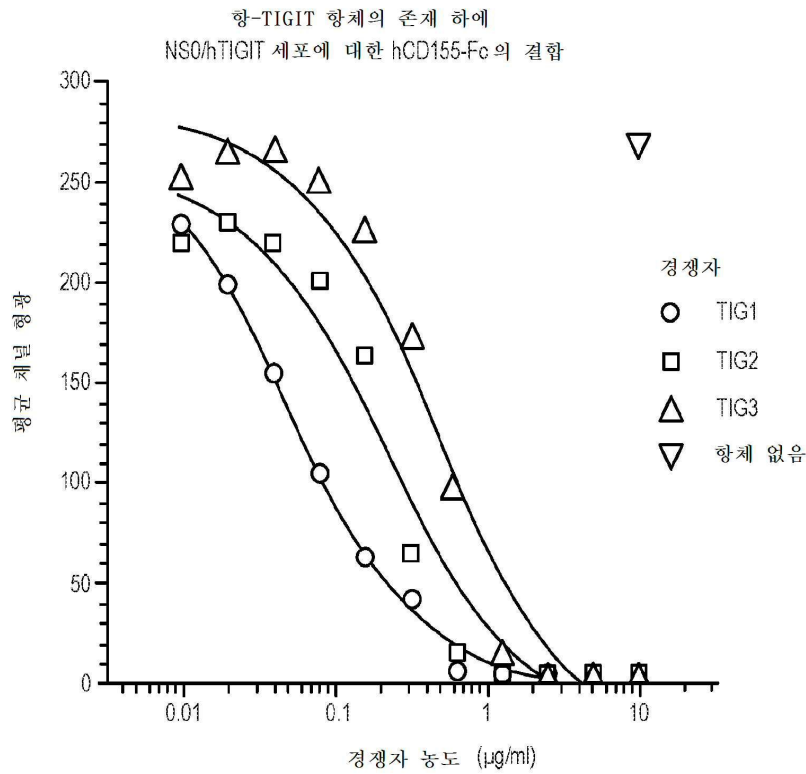
[0265]

도면

도면1



도면2



도면3

TIG1 VH

1	2	3
123456789	0123456789	0123456789
DVQLVESGG	GLVQPGGSRK	LSCAASGFTF
		<u>SNFGMHVVRQ</u>
		CDR1

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
	^a		
APEKGLEWVA	<u>FISSGSSSIYY</u>	ADTVKGRFTI	SRDNPKNLTF
	CDR2		

		1	1
8	9	0	1
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
^{abc}		^{ab}	
LQMTSLRSEDAM	YYCARMRLDY	<u>YAMDYWGQGTSV</u>	TVSS
	CDR3		

도면4

TIG1 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DVQITQSPS	YLAAS PGETI	TINCRASKSI	<u>SKYLAWYQEK</u>
			CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGKTNKLLIY	<u>SGSTLQSGIP</u>	SRFSGSGSGT	DFTLTISSE
	CDR2		

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
PEDFAMYYCQ	<u>QHNEYPWTFG</u>	GGTKLEIK
	CDR3	

도면5

TIG2 VH

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
EVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKTSGYTF	<u>TEYTMHWWKQ</u>
			CDR1

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
	a		
SHGKNLEWIG	<u>GINPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKGRATL</u>	TVDKSSSTAY
	CDR2		

		1	1
8	9	0	1
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
abc		ab	
MELRSLTSDDSAV	YYCARPGWYN	<u>YAMDYWGQGTSV</u>	TVSS
		CDR3	

도면6

TIG2 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DIVMTQSHK	FMSTSVGDRV	NITCKASQGV	STAVAWYQQK

CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGQSPKLLIY	SASYRYTGVP	DRFTGSGSGT	DFTFTISSVQ

CDR2

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
AEDLAVYHCQ	QHYITPWTFG	GGTKLEIK

CDR3

도면7

TIG3 VH

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
EVQLVESGG	GLVKPGGSLK	LSCAASGFAF	SDYDMSWVRQ

CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	a		
TPEKRLEWWA	YISDGGYNTYY	PDTVKGRETI	SRDNAKNTLY

CDR2

		1	1
8	9	0	1
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
abc		ab	
LQMSSLSKSEDAI	YYCARQILLR	YYFDYWGGQTTL	TVSS

CDR3

도면8

TIG3 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456777777789	0123456789
		abcdef	
DIVMSQSPS	SLAVSVGEKV	TMTCKSSQSLLYSSNQ	KNYLAWYQQK
		CDR1	

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGQSPKLLIY	WASTRESGVP	DRFTGSGSGT	DFTLTISSVK
	CDR2		

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
AEDLAVYYCQ	QYHSYPWIFG	GGTKLEIK
	CDR3	

도면9a

HuTIG1 VH 유전자

```

ACTAGTACCACCATGGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCTTGTCCTTATTCTGAAAGGC
      M D S R L N L V F L V L I L K G

GTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGGTCC
      V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGGAATGCACTGGGTT
      L R L S C A A S G F T F S N F G M H W V

CGACAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATTATTAGTAGTGGCAGTAGTTCC
      R Q A P G K G L E W V A F I S S G S S S

ATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
      I Y Y A D T V K G R F T I S R D N A K N

AGCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCA
      S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A

AGAATGAGACTGGATTACTATGCTATGCACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTC
      R M R L D Y Y A M D Y W G Q G T M V T V

TCCTCAGGTAAGTATGGCCTCTAAGCTT (SEQ ID NO:38)

S S (SEQ ID NO:34)

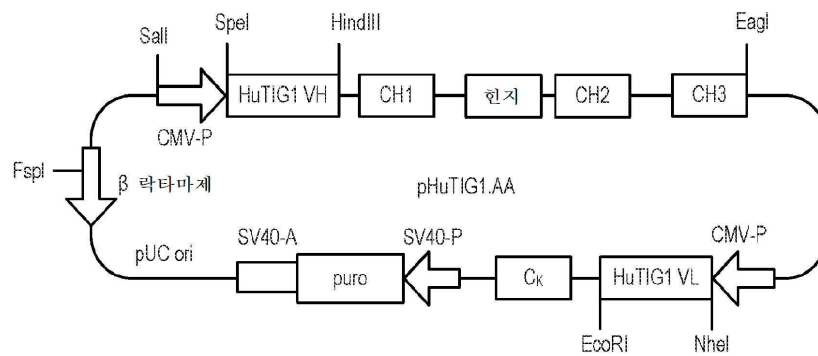
```

도면9b

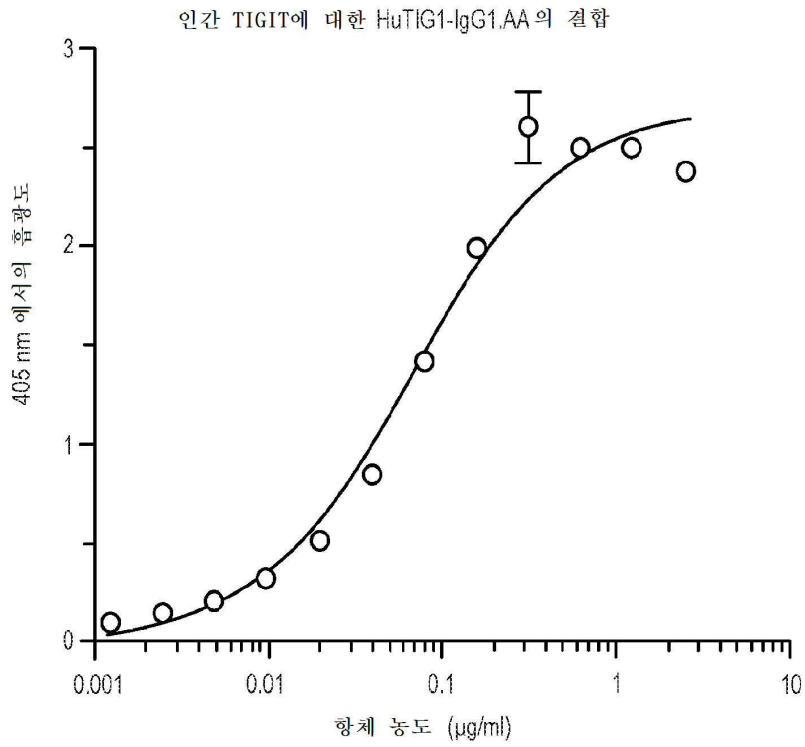
HuTIG1 VL 유전자

GCTAGCACCAACCATGAGGTTCCAGGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGATCTCA
M R F Q V Q V L G L L L L W I S
GGAGCCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTTTCTGCATCTGTTGGA
G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GATAGAGTCACTATTACTTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATCTGGCCTGGTAT
D R V T I T C R A S K S I S K Y L A W Y
CAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTCTGGGTCCACTTTGCAATCT
Q Q K P G K A P K L L I Y S G S T L Q S
GGAGTTCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGT
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCCTGG
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H N E Y P W
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGTCGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO:39)
T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:36)

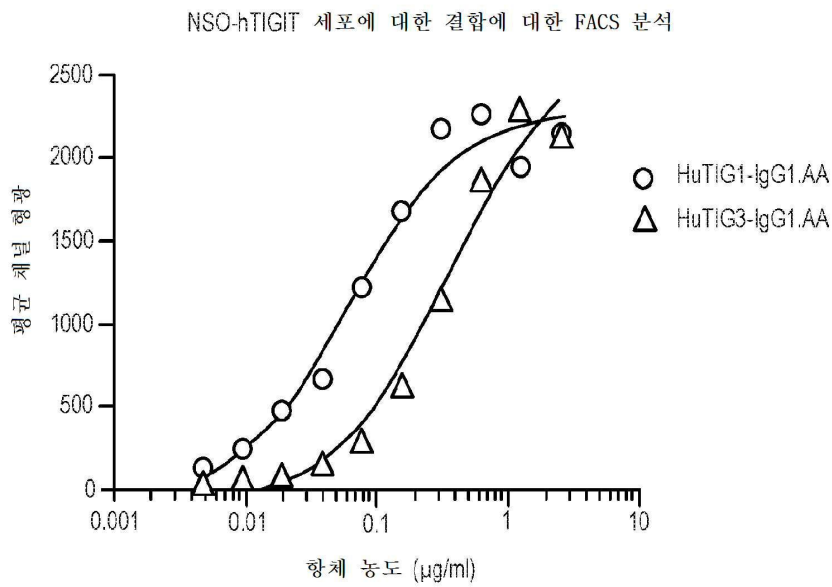
도면10



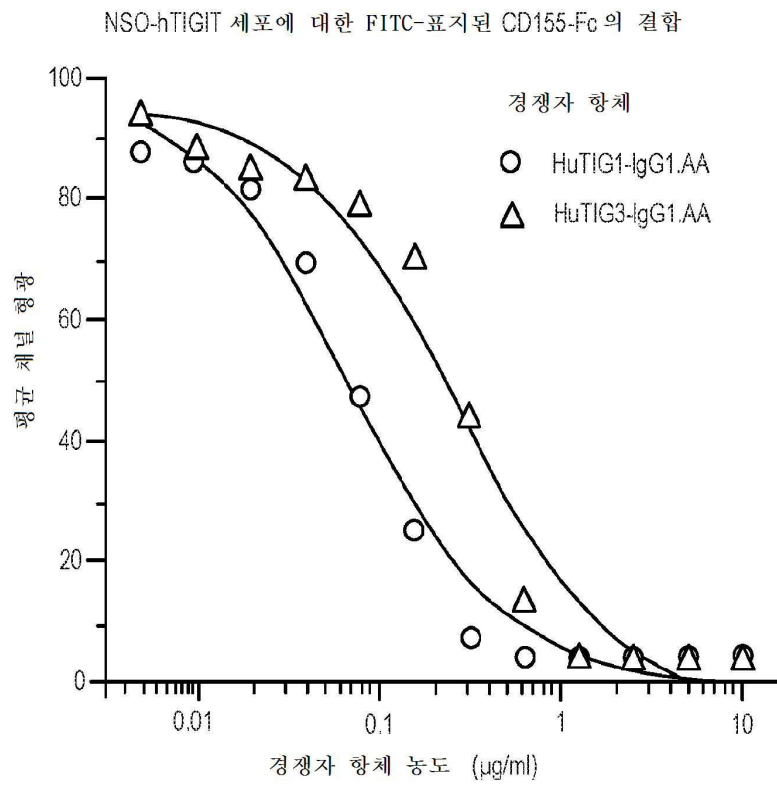
도면11



도면12



도면13



도면14a

HuTIG3 VH 유전자

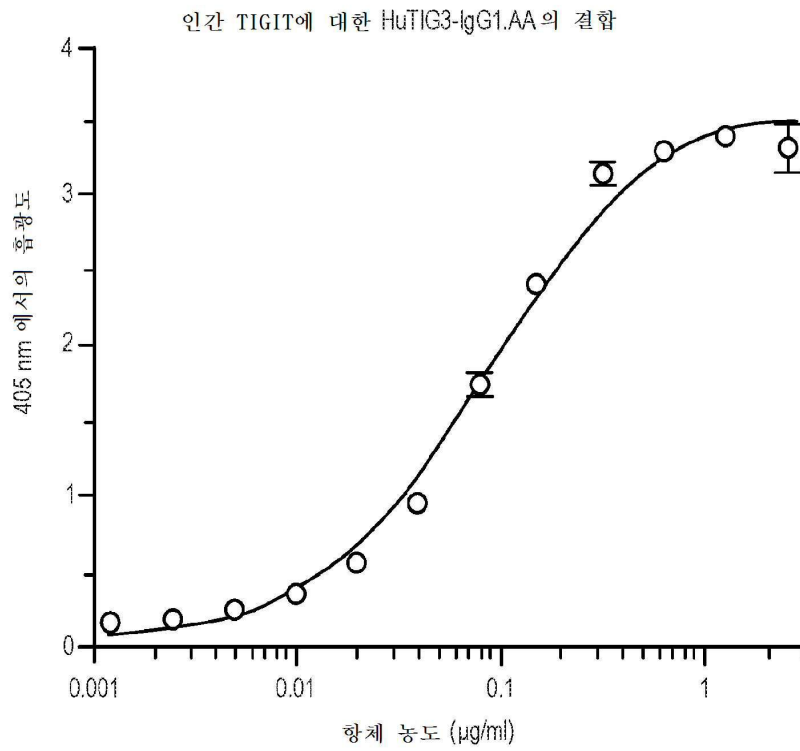
ACTAGTACCACCATGAACTTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCTTACTCTGAAAGGC
M N F G L R L I F L V L T L K G
GTGAACTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V N C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTTCAGTGACTATGACATGTCTTGGGTT
L R L S C A A S G F A F S D Y D M S W V
CGCCAGGCTCCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGTGATGGCGGTTATAAC
R Q A P G K G L E W V A Y I S D G G Y N
ACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N
TCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACAAATTCTGCTGCGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTC
R Q I L L R Y Y F D Y W G Q G T T V T V
TCCTCAGGTGAGTCCTTAAACAAGCTT (SEQ ID NO:46)
S S (SEQ ID NO:42)

도면14b

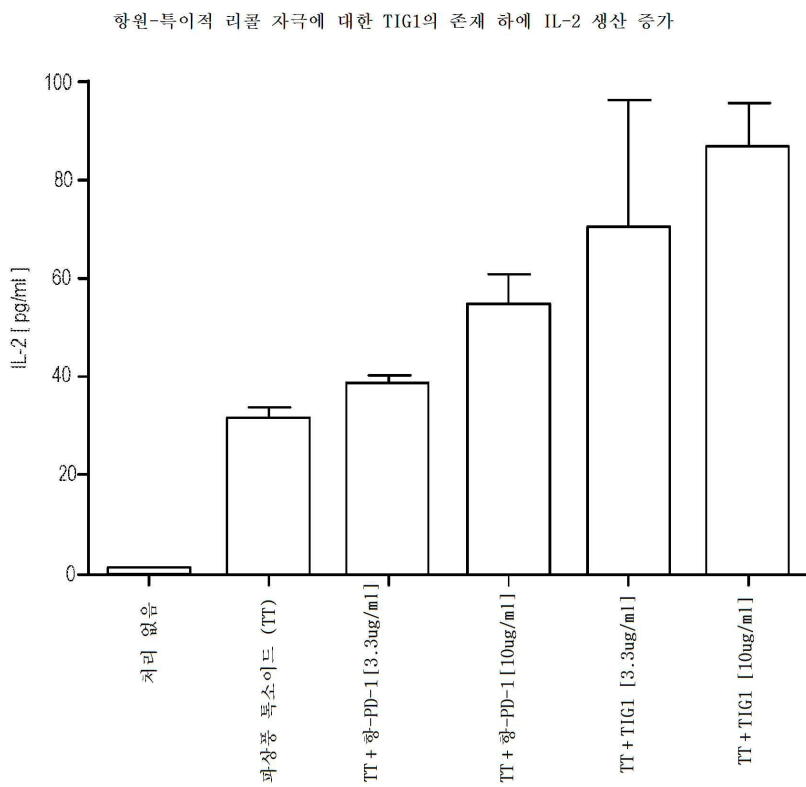
HuTIG3 VL 유전자

GCTAGCACCACCATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATGCTGCTGCTGCTCTGGGTTTCT
M D S Q A Q V L M L L L L W V S
GGAACCTGTGGGGACATTCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCAGTTGGA
G T C G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GACAGGGTTACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTTCTGTATAGTAGCAATCAAAAG
D R V T I T C K S S Q S L L Y S S N Q K
AACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGGCTCCTAAACTGCTGATTTACTGG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W
GCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D
TTCACCTCTACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTCGCAGTTTATTACTGTCAGCAA
F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q
TATCATAGCTATCCCTGGACCTTCGGCGGAGGCAACCAAGGTGGAATCAAACGTAAGTAG
Y H S Y P W T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:44)
AATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO:47)

도면15

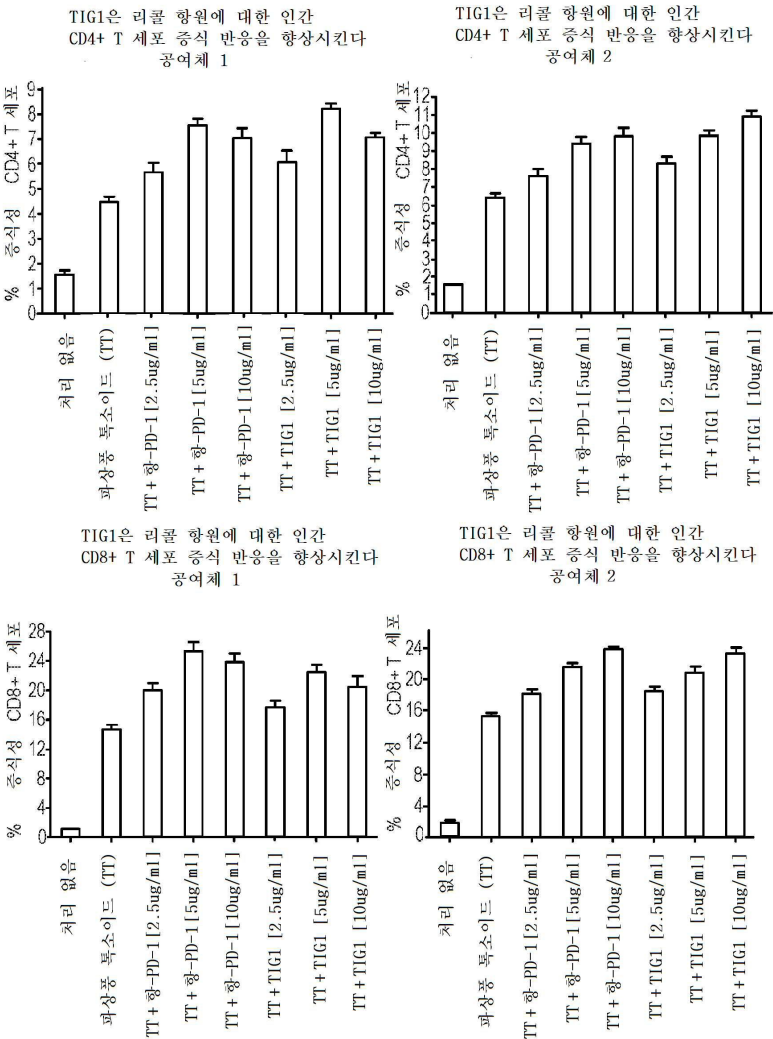


도면16

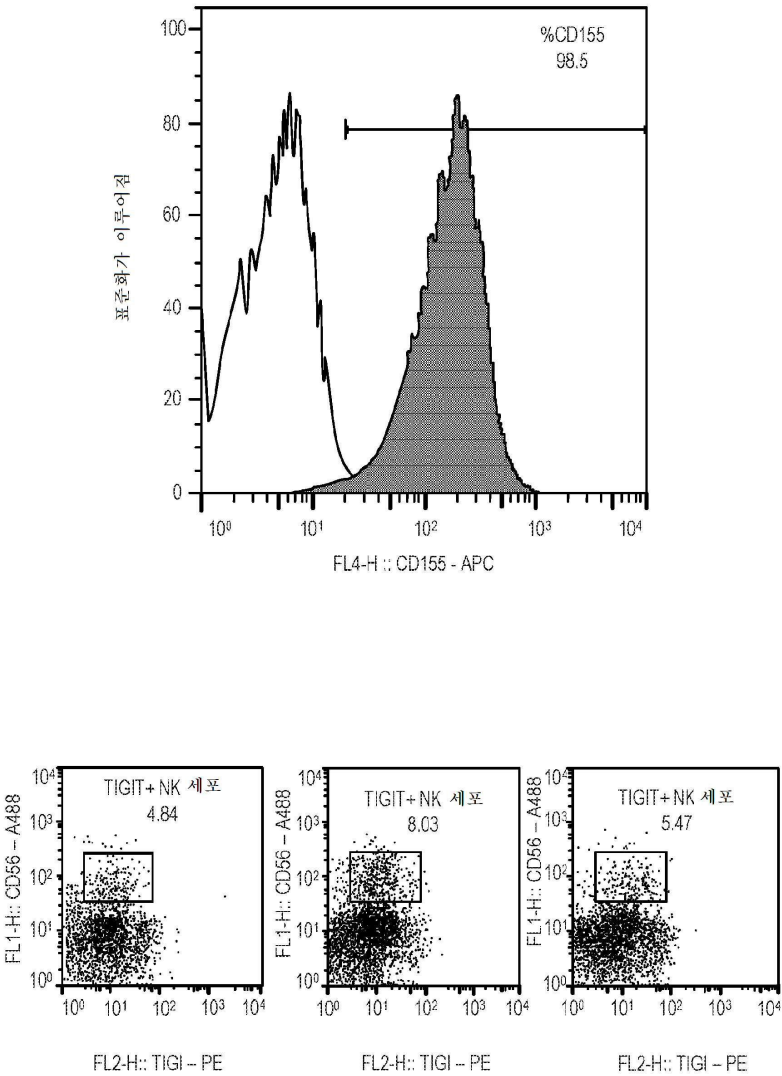


도면17

항원-특이적 리콜 자극에 대한 TIG1에 의한 CD4+ & CD8+ T 세포 증식 증가



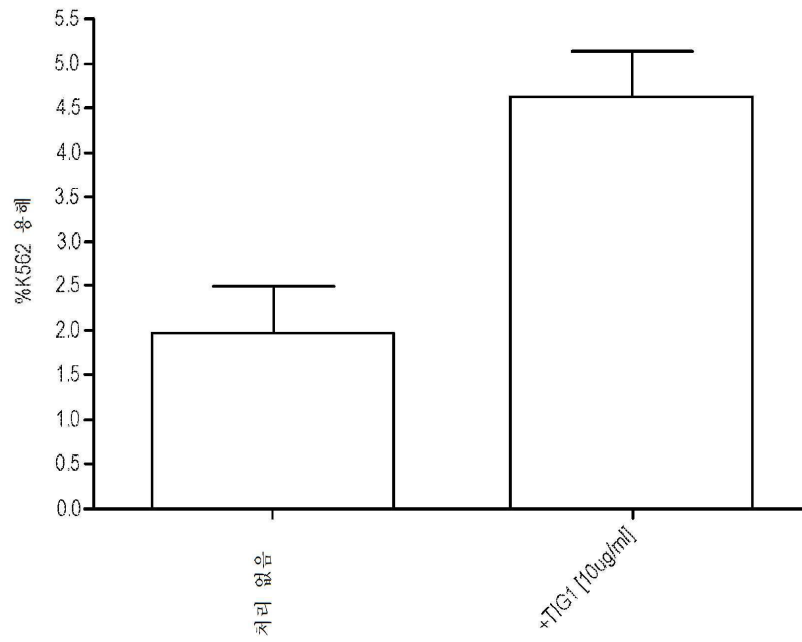
도면18



도면19

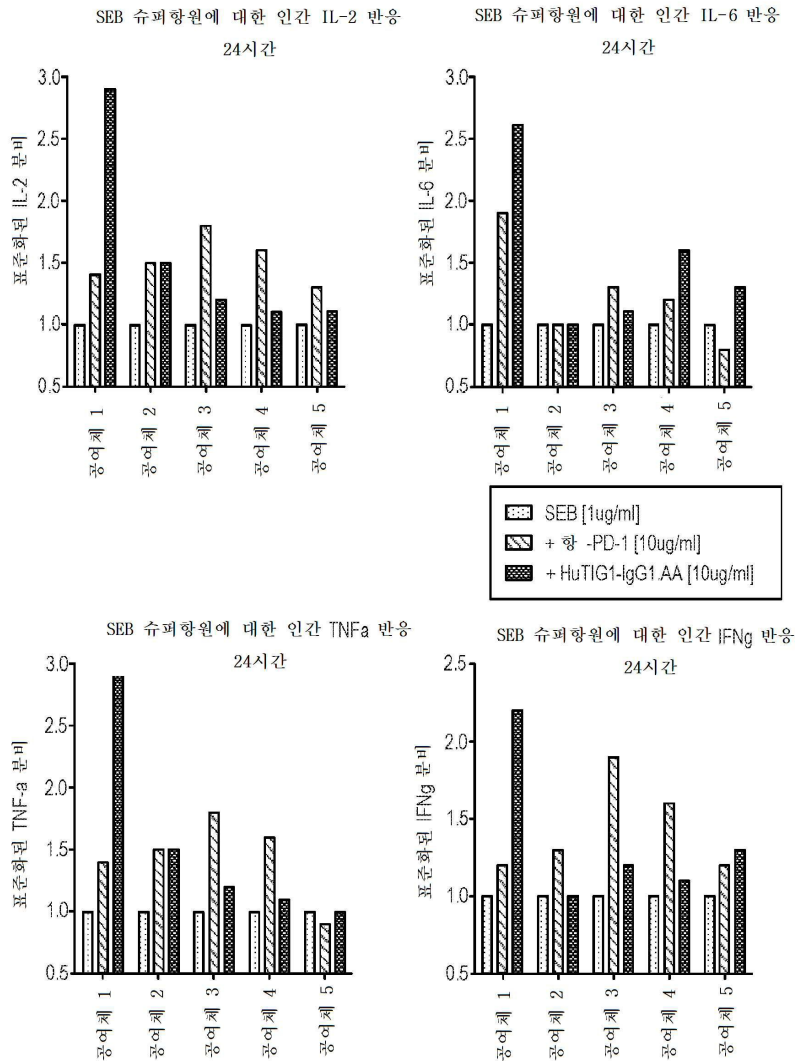
K562 표적 세포에서 TIG1에 의한 NK 세포 매개 세포독성 향상

K562 세포에 대한 TIG1의 존재 하에 NK 세포 자연 세포독성 증가



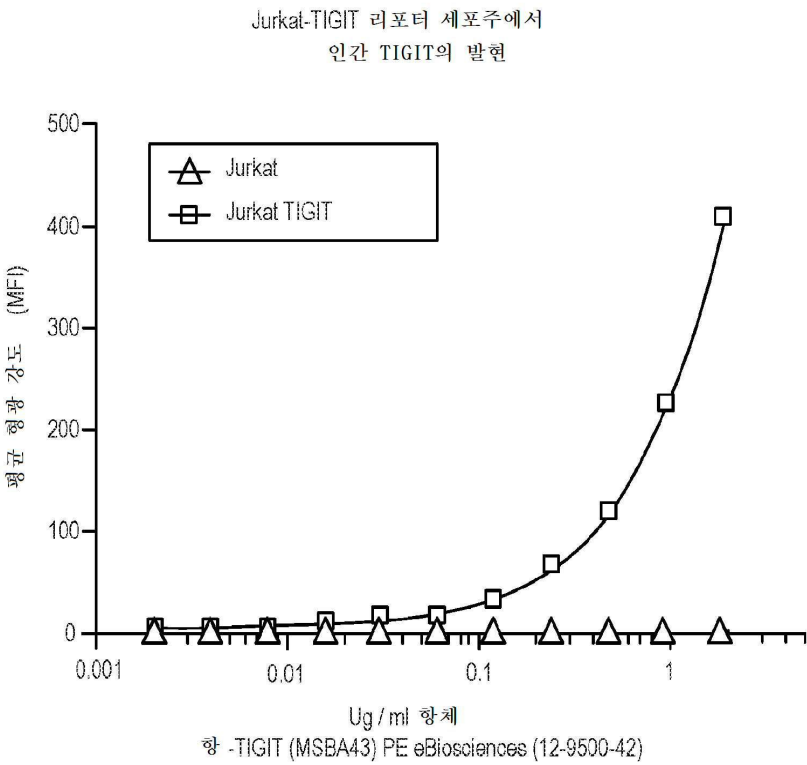
도면20

HuTIG1-IgG1.AA는 사이토카인 효과기 반응을 증강시킨다



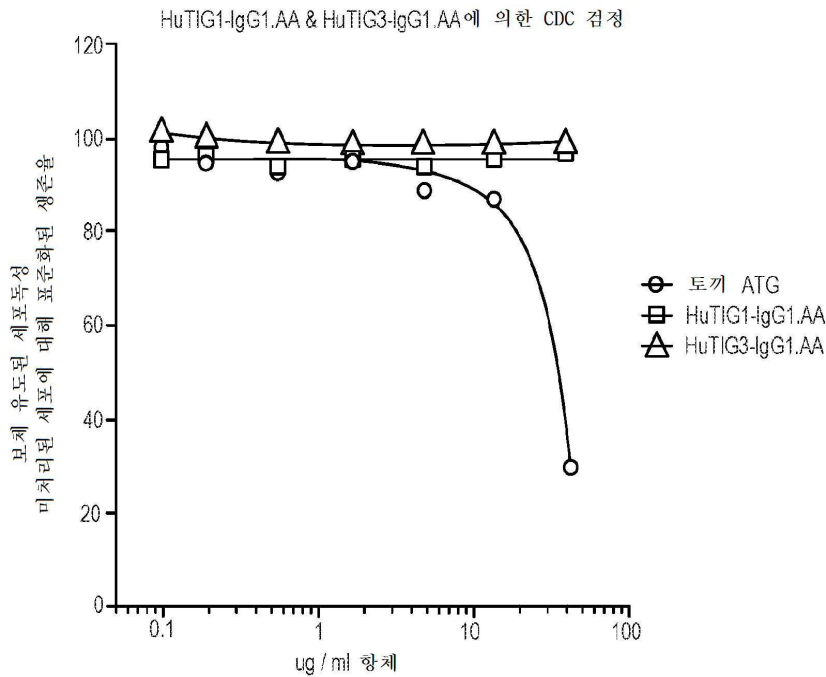
도면21

Jurkat-TIGIT 세포주는 이의 세포 표면에 인간 TIGIT를 발현시킨다



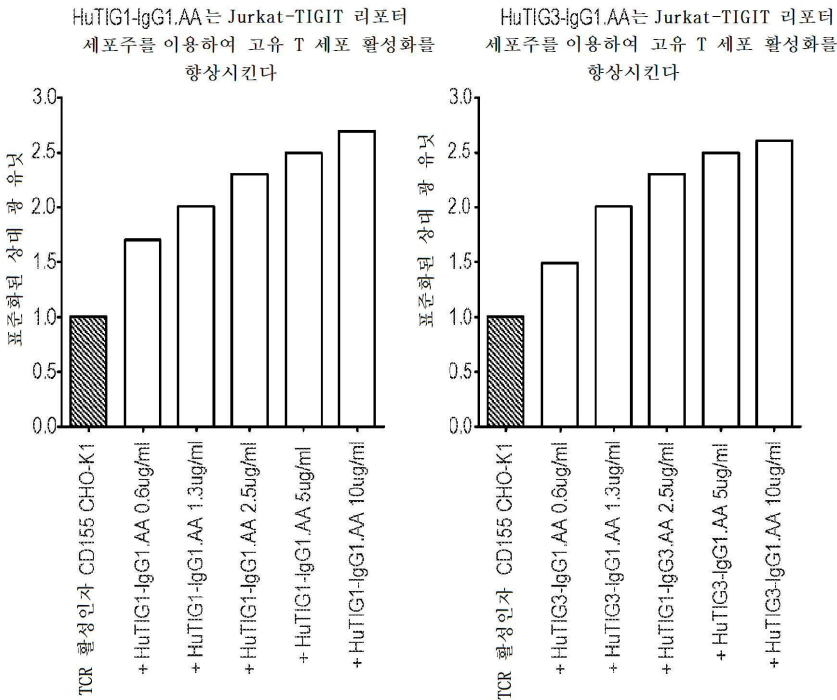
도면22

HuTIG1-IgG1.AA & HuTIG3-IgG1.AA 는 CDC 활성을 유도하지 않는다.

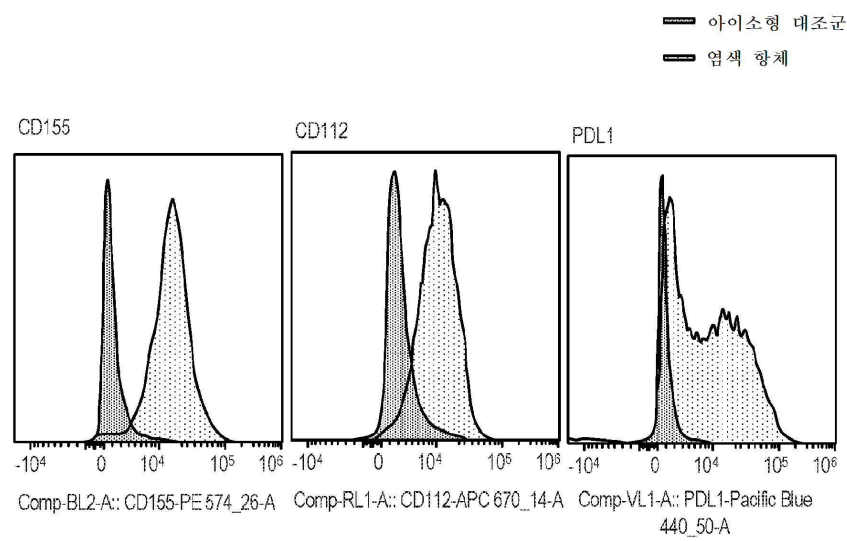


도면23

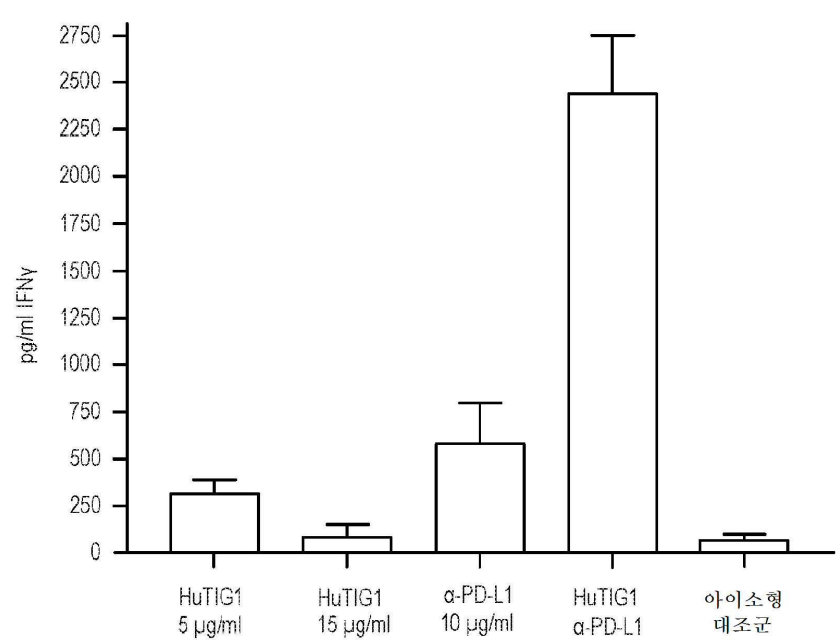
항-인간 TIGIT 항체에 대한 시험관 내 T-세포 길항 활성 검정



도면24

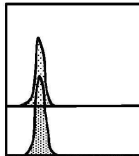
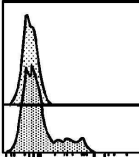
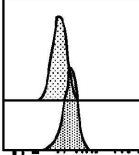
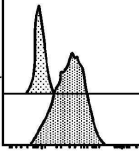


도면25

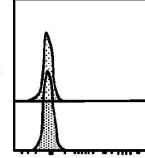


도면26

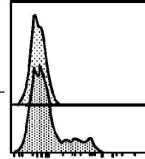
				α-TIGIT		
		서브세트	세포 표면 마커	HuTIG1	HuTIG3	α-CD96
림프구	B 세포	B1	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	-	-	-
		나이프	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻	-	-	-
		기억/형질	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺	-	-	-
	NK 세포	CD56hi	CD56 ⁺ CD16 ⁻	-	-	+
		CD56lo	CD56 ⁺ CD16 ⁺	+++	+++	+
	γδ T 세포		TCRγδ ⁺	-	-	+
	CD4 T 세포	나이프	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	-	-	+/-
		효과기	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	-	-	-
		EM	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	+/-	+/-	+
		CM	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	+/-	+/-	+
		CD25 ⁺ Treg	CD4 ⁺ CD25RA ⁺ CD127 ⁻	+++	+++	+
	CD8 T 세포	나이프	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	-	-	-
		효과기	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	+++	+++	-
		EM	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	+/-	+/-	+
골수	수지상 세포	플라스마 시토이드	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	-	-	-
		BDCA3 ⁺	CD56 ⁻ CLEC9a ⁺ CD141 ⁺ HLA-DR ⁺	-	-	-
		골수	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD33 ⁺ HLA-DR ⁺	-	-	-
	단핵구	고전적	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	-	-	+
		염증성	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
		CD16hi CD14lo	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD33 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+

발현 수준	
-	
+/-	
+	
+++	

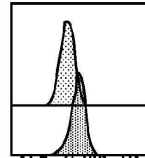
발현 수준



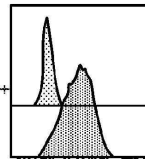
-



+/-



+

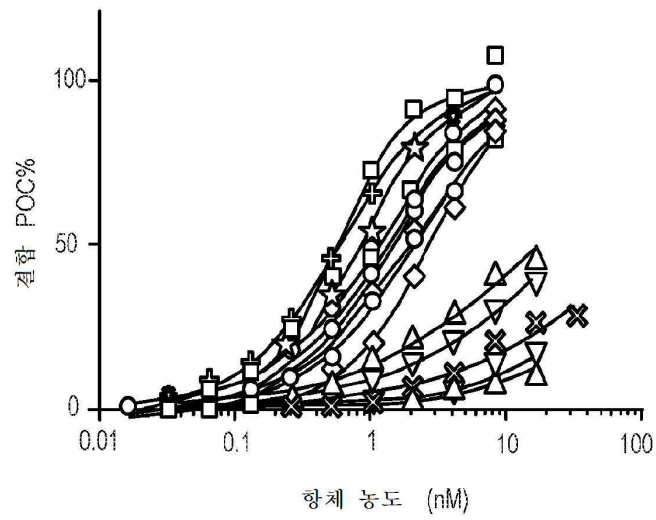


+++

도 26A

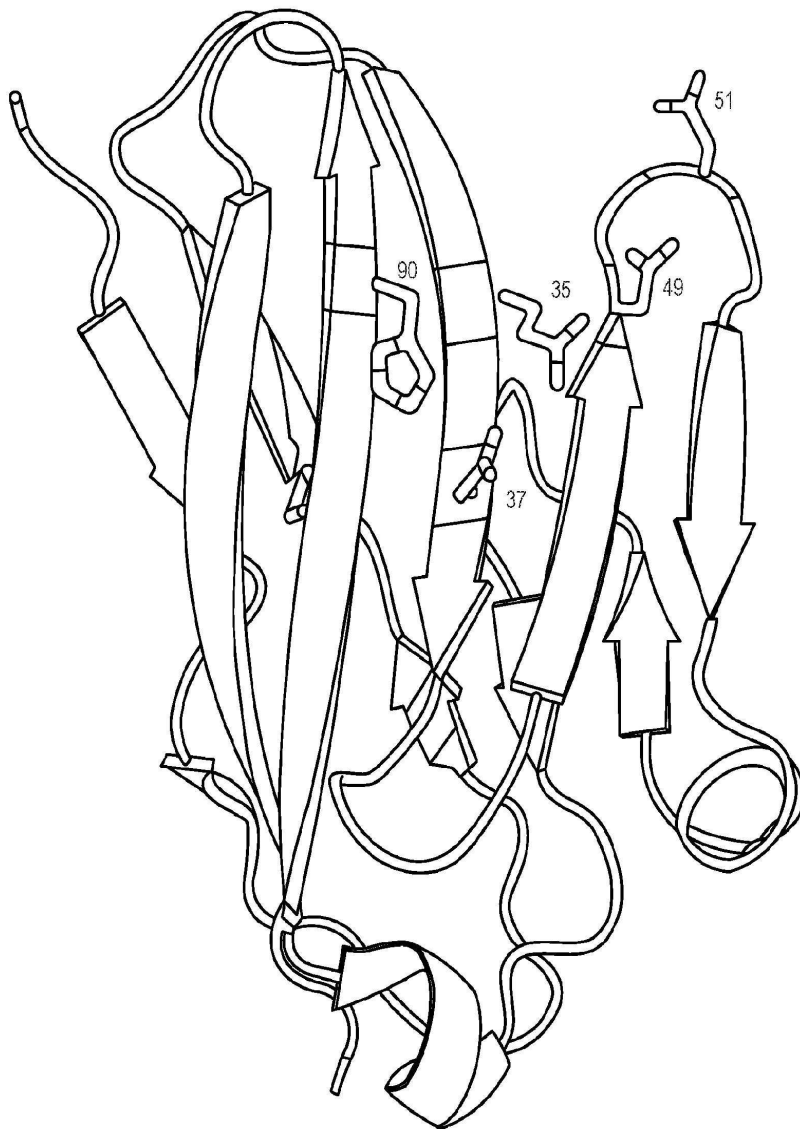
도 26B

도면27

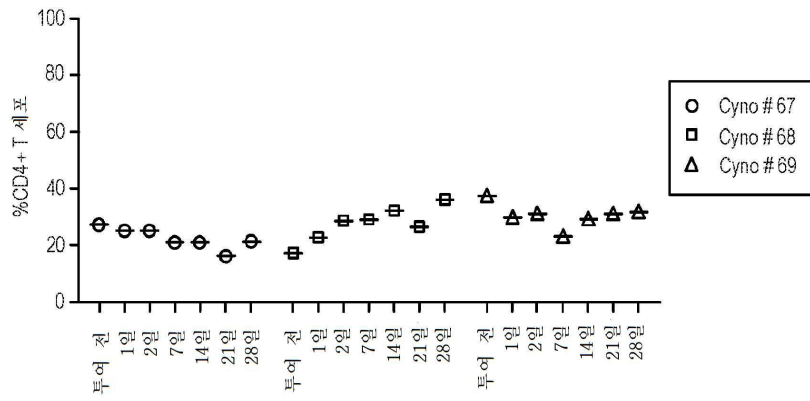


○ WT	◇ L52A	EC50
□ T34A	● H55A	WT 1.28
△ Q35A	★ F86A	T34A 0.577
▽ N37A	✦ I88A	Q35A 176
◇ E39A	✕ H90A	N37A 126
○ L44A	○ Y92A	E39A 1.58
□ I47A	◇ T96A	L44A 1.23
△ N49A		I47A 1.27
▽ D51A		N49A 17.7
		D51A 30.5
		L52A 2.67
		H55A 1.19
		F86A 0.844
		I88A 0.591
		H90A 104
		Y92A 2.12
		T96A 1.36

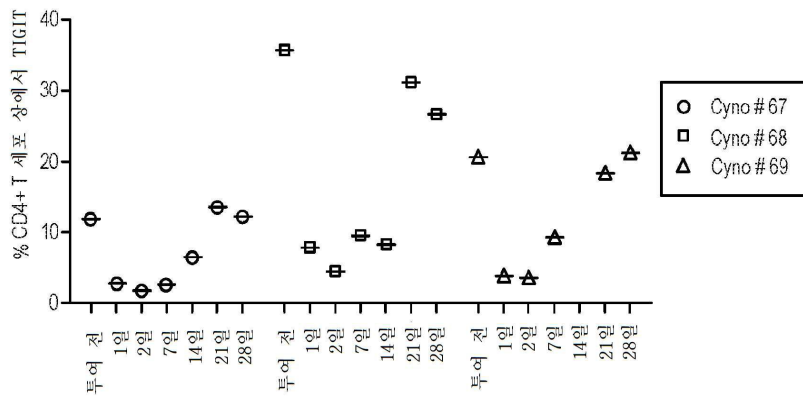
도면28



도면29

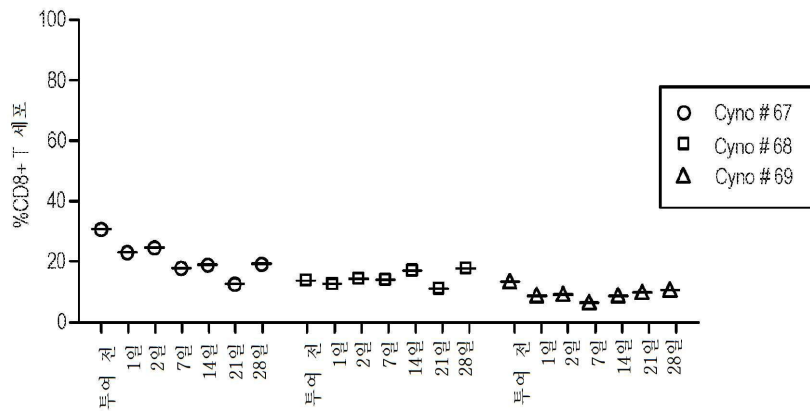


도 29A

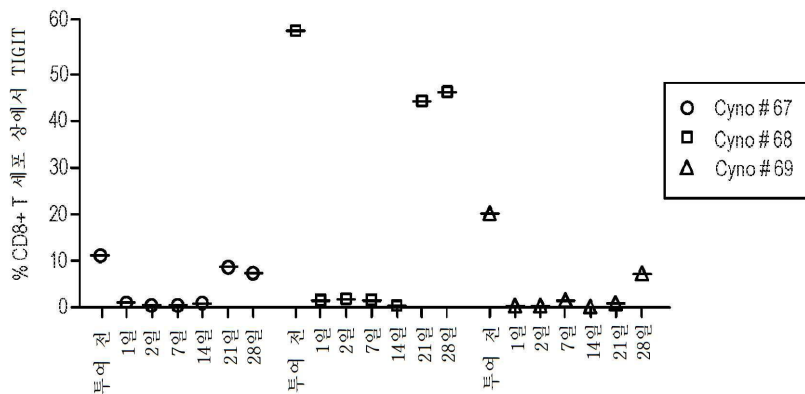


도 29B

도면30

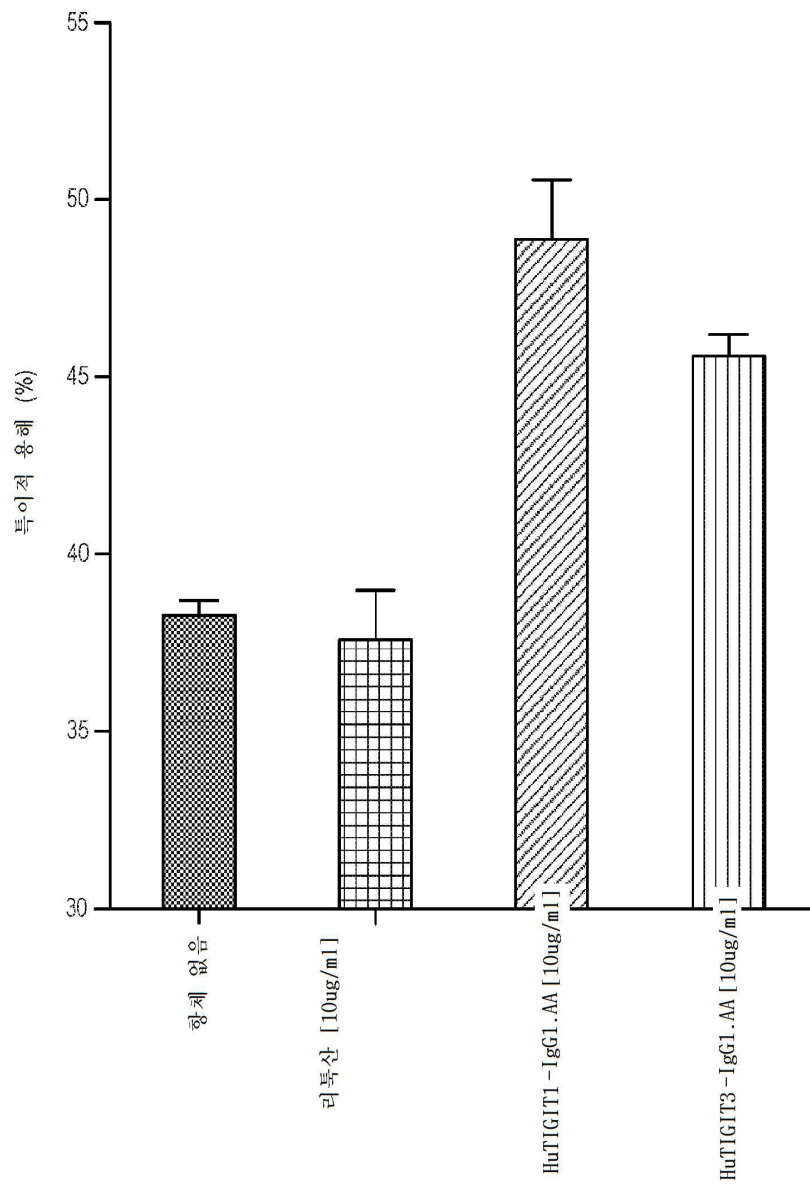


도 30A

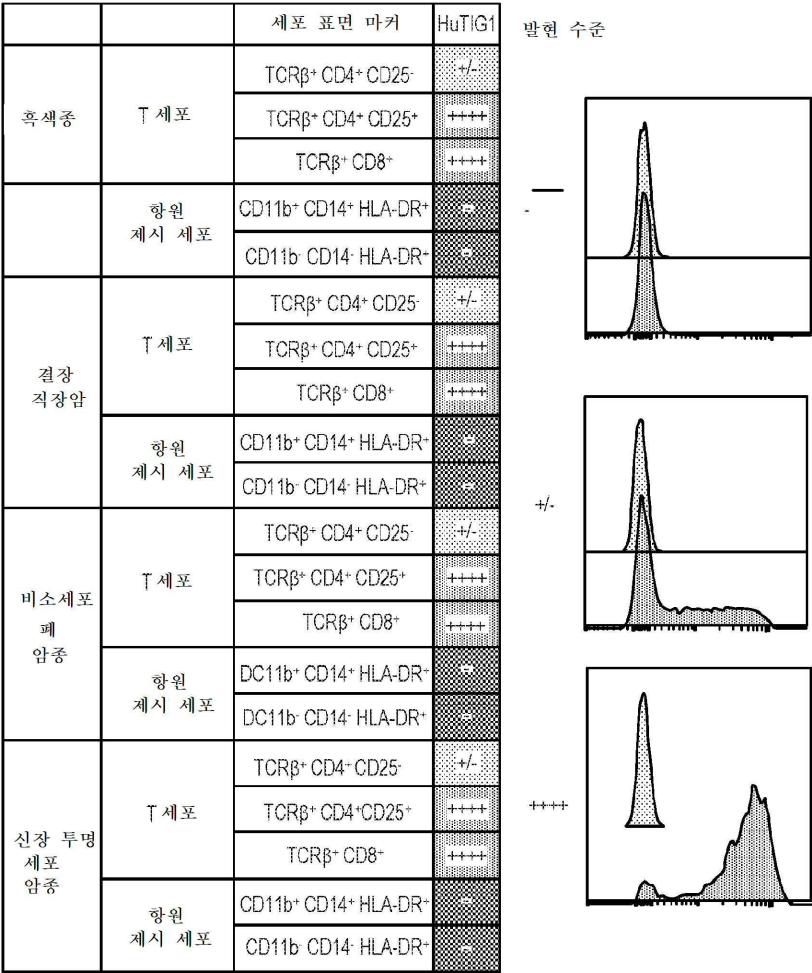


도 30B

도면31



도면32



도 32A

도 32B

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JN Biosciences, LLC
Abmuno Therapeutics LLC
Tso, J. Yun
Tsurushita, Naoya
Duramad , Omar

<120> ANTIBODIES TO TIGIT
<130> 50658-504001WO
<140> Not Yet Assigned

<141> 2017-03-03
 <150> 62/304,045
 <151> 2016-03-04
 <150> 62/413,025
 <151> 2016-10-26
 <160> 65
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

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 Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr			
	115	120	125
Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg			

130	135	140	
Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg			
145	150	155	160

Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu
180 185 190

Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu
195 200 205

Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
210 215 220

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Phe Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Ser
1 5 10 15
Val Leu Ser

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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 Thr Gly
115 120
<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic construct

<400> 4
Thr Gly Gly Gly
1
<210> 5
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
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> 6
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr
 20 25 30
 His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met
 35 40 45
 Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg
 50 55 60

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

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

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

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

 Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile
 260 265 270
 Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr
 275 280 285
 Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu
 290 295 300
 Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala
 305 310 315
 <210>

7

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln

115 120 125

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

130 135 140

Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr

195 200 205

Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr

210 215 220
 Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp
 225 230 235 240
 Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met

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

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

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

 435 440 445
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 450 455 460

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

500 505 510
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 515 520 525
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 530 535 540
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

545 550
 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic construct

<400>
 8
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5
 <210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Arg Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly Leu Leu Gly Thr Leu Val Thr
 20 25 30

Met Gly Leu Leu Thr
 35
 <210> 10
 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 11

Asn Phe Gly Met His

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 13

Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	100	105
<210>	15	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	Synthetic construct	
<400>	15	
	Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala	
1	5	10
<210>	16	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	Synthetic construct	
<400>	16	
	Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser	
1	5	
<210>	17	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	Synthetic construct	
<400>	17	
	Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr	
1	5	
<210>	18	
<211>	119	
<212>	PRT	
<213>	Artificial sequence	
<220><223>	Synthetic construct	
<400>	18	
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1	5	10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 19

Glu Tyr Thr Met His

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 20

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 21

Pro Gly Trp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr His Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 25

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 27

Asp Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 28

Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 29

Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 30

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 31

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 32

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 33

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 34

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Ser Asn Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

130 135
 <210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic construct

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 127
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Arg Phe Gln Val Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser

35 40 45

Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn

100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 38

<211> 448

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 38

actagtacca ccatggactc caggctcaat ctggttttcc ttgtccttat tctgaaaggc 60
 gtccagtgtg aagtgcagct ggtggagtct gggggaggcc tgggtcagcc tggagggtcc 120
 ctgagactct ccgtgcagc ctctggattc actttcagta actttggaat gcactgggtt 180
 cgacaggctc caggaaggg gctggagtgg gtcgcattca ttagtagtgg cagtagttcc 240

atctactatg cagacacagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
 agcctgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gctgaggaca ctgccgtgta ttactgtgca 360
 agaatgagac tggattacta tgctatggac tactggggtc aaggaaccat ggtcacccgc 420
 tcctcaggta agtatggcct ctaagctt 448

<210> 39

<211> 416

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 39

gctagacca ccatgaggtt ccaggttcag gttctggggc tccttctgct ctggatctca 60
 ggagcccagt gtgatatcca gatgaccag tctccatctt ctcttctgc atctgttga 120
 gatagagtca ctattacttg cagggaagt aagagcatta gcaaatatct gccttggtat 180
 caacagaaac ctgggaaagc tctaagctg cttatctact ctgggtccac ttgcaatct 240
 ggagttccat caagattcag tggcagtga tctgttacag atttactct caccatcagt 300
 agcctgcagc ctgaagattt tgcaacctat tactgtcaac agcataatga ataccctgg 360

accttcggcg gaggcaccaa agtcgaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

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

	435		440		445										
Lys															
<210>	41														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	Artificial sequence														
<220><223>	Synthetic construct														
<400>	41														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Glu	Tyr	Pro	Trp
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130					135					140			
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
					165				170						175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 42

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Asn Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe

35 40 45

Ser Asp Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

50

55

60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65

70

75

80

Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85

90

95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115

120

125

Lys Val Glu Ile Lys

130

<210> 45

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20

25

30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35

40

45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

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

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 46

<211> 448

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 46

```
actagtacca ccatgaactt tgggctcaga ttgattttcc ttgtccttac tctgaaaggc      60
gtgaactgtg aagtccagct cgtggagtct gggggaggcc ttgtgcagcc tggagggtcc      120
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc gctttcagtg actatgacat gtcttgggtt      180
cgccaggctc ctggcaaggg gctggagtgg gtcgcataca ttagtgatgg cggttataac      240
acctactatc cagacactgt gaagggccga ttaccatctt ccagagacaa tgccaagaac      300
tcctgtacc  tgcaaatgaa cagtctgagg gctgaggaca cagccgtcta ttactgtgca      360

agacaaattc tgctcggta ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc      420
tcctcaggtg agtccttaaa acaagctt                                     448
```

<210> 47

<211> 434

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 47

```
gctagcacca ccatggattc acaggcccag gttcttatgc tgctgctgct ctgggtttct      60
ggaacctgtg gggacattca gatgacacag tctccatcct cctgtctgc ctcagttgga      120
gacagggtta ctatcacctg caagtccagt cagagtcttc tgtatagtag caatcaaaag      180
aactacttgg cctggtacca gcagaaacca gggaaggctc ctaaactgct gatttactgg      240

gcatccacta gggaatctgg ggtccctagt cgcttctcag gcagtggatc tgggacagat      300
ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct gaagacttcg cagtttatta ctgtcagcaa      360
tatcatagct atccctggac cttcggcgga ggcaccaagg tggaaatcaa acgtaagtag      420
aatccaaaga attc                                     434
```

<210> 48

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

<210> 49

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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 Ala 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 Thr Gly

115 120

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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 Ala 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 Thr Gly
 115 120

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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 Ala 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 Thr Gly
 115 120

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Ala 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 Thr Gly

115 120

<210> 54

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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 Ala 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 Thr Gly
 115 120
 <210> 55
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 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 Ala 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 Thr Gly
 115 120
 <210> 56

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210> 57			
<211> 214			

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Phe Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 58

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr

35 40 45

Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys

50 55 60

His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln

65 70 75 80

Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile

85 90 95

Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu

100 105 110

Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile

115 120 125

Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu

130 135 140

Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro

145 150 155 160

Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val

165 170 175

Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His

180 185 190

Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp

195 200 205

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

210 215 220
Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu
225 230 235 240
Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys

245 250 255
Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly

260

<210> 59

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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 Thr Gly Thr Gly Gly Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 60

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

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

435 440 445

Lys

<210> 61

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

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

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 62

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

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

 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 63

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

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

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

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

 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 64
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

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

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

195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 65

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
210						215					220