



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월18일
(11) 등록번호 10-2731476
(24) 등록일자 2024년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7005664
(22) 출원일자(국제) 2018년07월26일
심사청구일자 2021년07월23일
(85) 번역문제출일자 2020년02월26일
(65) 공개번호 10-2020-0100589
(43) 공개일자 2020년08월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/043968
(87) 국제공개번호 WO 2019/023504
국제공개일자 2019년01월31일
(30) 우선권주장
62/606,159 2017년07월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02016028656 A1*
W02016106302 A1
W02016191643 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아이테오스 벨지움 에스에이
벨기에 고슬리 6041 루 데 프레르 라이트 29
(72) 발명자
쿠퍼, 안토니
미국 버몬트 05001 화이트 리버 정션 루센트 드라
이브 7
쿠에바, 크리스토페
벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 조경주

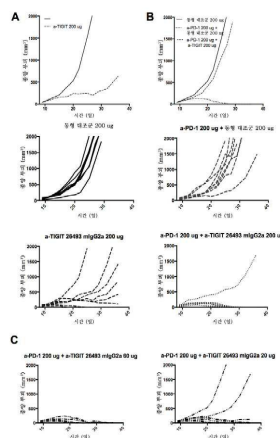
(54) 발명의 명칭 항-TIGIT 항체

(57) 요약

TIGIT-매개 신호전달을 억제하는 항-TIGIT 항체 및 이의 항원 결합 단편이 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조합물 및 이들의 사용 방법과 함께 제공된다.

대표도 - 도16

도 16 - 항-TIGIT 결합력 향상의 양-공포 실험



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/515 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

데니에스, 소피

벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내

후프드, 카테리네

벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내

쿠엔데, 줄리아

벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내

드리에센스, 그레고리

벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내

람블레즈, 플로렌스

벨기에 고슬리 B-6041 루 데 프레르 라이트 29 아
이테오스 테라퓨틱스 사내

(30) 우선권주장

20175535 2017년07월31일 벨기에(BE)
17184102.6 2017년07월31일
유럽특허청(EPO)(EP)
62/660,640 2018년04월20일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 TIGIT에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서 상기 조합은 서열 번호:16을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:17을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:18을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:61을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:62를 포함하는 LCDR2 및 서열 번호:63을 포함하는 LCDR3인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 221로 나타난 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 222로 나타난 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 IgG 항체 또는 인간 IgG1 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합.

청구항 5

항-TIGIT 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합이며, 여기서 서열 번호: 251 및 서열 번호: 252를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합.

청구항 6

숙주 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 제5항에 따른 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합을 포함하는 발현 벡터.

청구항 7

제6항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 제7항의 숙주 세포를 배양하는 단계 및 발현된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 재조합 항체 또는 이의 항원 결합 단편 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 치료제와 병용으로 투여되는 억제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료제가 화학요법제, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체 및 항-ICOS 항체로부터 선택되는 것인 억제학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

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

발명의 설명

배경 기술

[0001] 배경

[0002] 암 면역요법은 종양 세포에 대한 인식 및 반응을 증가시키기 위해 면역 체계의 조절에 의존한다. 그러한 조절은 면역 세포에 존재하는 공동-자극 분자의 활성화를 포함하는 다중 메카니즘에 의해 또는 공동-억제 수용체의 억제제를 통해 달성될 수 있다. 면역 반응의 활성화는 항원-특이적 반응의 개시에 중요한 항원-제시 세포 및 종양 세포 파괴를 담당하는 이펙터(effector) 세포와 같은 수많은 세포 집단을 포함하는 복잡한 메카니즘이다. 세포 독성 T 세포와 같은 이펙터 세포의 활성을 조절하는 메카니즘은 다수이며 암 면역요법과 관련하여 선택 대상을 대표한다.

[0003] WUCAM, VSIG9 또는 Vstm3로도 지칭되는 TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체)는 NK, CD8+ 및 CD4+ T 세포뿐만 아니라 조절 T 세포(Treg 세포, 또는 단순히 "Treg")에서도 우선적으로 발현되는 공동-억제 수용체이다. TIGIT는 세포 내 부분 안에 공지된 ITIM 도메인, 수용체의 세포 외 부분에서 막관통 도메인 및 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 막관통 단백질이다. 여러 리간드가 TIGIT 수용체에 결합하는 것으로 설명되었고, CD155/PVR이 최상의 친화도를 나타내며 CD113/PVRL3 및 CD112/PVRL2가 그 뒤를 잇는다 (Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48.). NK 및 T 세포에서도 발현되는 공지된 공동-자극 수용체인 DNAM/CD226은 CD155 및 CD112 결합에 대해 TIGIT와 경쟁하지만 더 낮은 친화도를 가지며, 이는 CD155 리간드를 발현하는 정상 세포에 대해 제어되지 않은 세포독성을 피하기 위해 이들 이펙터 세포의 활성화를 엄격하게 제어함을 시사한다.

[0004] TIGIT 발현은 종양 침윤 림프구(tumour infiltrating lymphocyte, TIL) 및 HIV 감염과 같은 질병 환경에서 증

가된다. TIGIT 발현은 TIGIT 음성 대응물과 비교하여 더 낮은 이펙터 기능을 갖는 탈진된(exhausted) T 세포를 표지한다 (Kurtulus et al. (2015) J.Clin.Invest. 276:112; Chew et al. (2016) Plos Pathogens. 12). 반대로, TIGIT를 발현하는 Treg 세포는 TIGIT 음성 Treg 집단과 비교하여 향상된 면역억제 활성을 나타낸다 (Joller et al. (2014) Immunity. 40:569).

[0005] 면역요법에 대한 관련 표적으로 입증되고 그에 대해 길항성 항체가 인간 암의 치료에 승인된, T 세포에서 발현되는 다른 공동-억제 수용체(PD1 또는 CTLA4)와 마찬가지로, 길항성 항-TIGIT 항체의 발생은 면역 체계를 가동하고 암 세포와 더 잘 싸우도록 돕는다. 길항성 항-TIGIT 항체는 단일요법으로 또는 a-PD1 항체와의 병용으로 전임상 모델에서 강한 항-종양 효능을 달성할 수 있는 것으로 제안되었다 (Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1; WO2016/028656; US2016/0176963; US2016/0376365, 이들 모두는 본원에 참조로 포함됨).

[0006] 따라서, TIGIT 수용체 활성을 억제할 수 있는 TIGIT에 대해 특이적인 길항성 항체는 종양 미세환경과 관련된 면역억제 효과를 감소시키고 이에 의해 종양 세포에 대한 항종양 면역 반응을 증가시킬 기회를 나타낸다.

발명의 내용

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 TIGIT-매개 신호전달의 면역억제 효과를 감소시킬 수 있는 항-TIGIT 항체를 제공한다. 특히, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 T 세포 (통상적 $\alpha\beta$ T 세포 및 비통상적 $\gamma\delta$ T 세포) 및 NK 세포에 대한 리간드 결합의 방지 및/또는 TIGIT 양성 Treg 세포의 고갈을 통하여 및/또는 TIGIT 수용체의 내재화를 유도함으로써 TIGIT-매개 면역억제를 억제할 수 있다.

[0009] 한 양태에서, 본 발명은 인간 TIGIT에 결합하고, 도 1에 나타나는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열로부터 선택된 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2) 및 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 도 2에 나타나는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열로부터 선택된 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0010] 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 도 1의 각 항체의 HCDR와 함께 도 2의 상응하는 항체의 LCDR에 의해 형성된 조합의 군으로부터 선택된다.

[0011] 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 327, 329 및 331로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있고; 임의로 서열 번호: 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 328, 330 및 332의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0012] 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 도 5에서 각각의 항체의 VH, 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열과 함께, 도 5에서 동일한 항체의 VL, 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열에 의해 형성된 조합의 군으로부터 선택된다.

[0013] 본원에 제공된 가장 바람직한 항체 및 항원 결합 단편은 본원에 제공된 항체 31282의 CDR 또는 완전한 가변 도메인에 기초하는 것이다.

[0014] 본원에 입증된 바와 같이, 항체 31282에 기초한 이러한 바람직한 항-TIGIT 항체 및 항원 결합 단편은 특히 놀랍고 유리한 특성을 갖는다. 이들 특성은 각각의 이전에 설명된 테스트된 항-TIGIT 항체와 비교하여 (건강한 공여자 또는 암 환자의) CD8 T 세포에서 발현된 TIGIT에 대한 더 높은 친화도; 각각의 이전에 설명된 테스트된 항-TIGIT 항체와 비교하여 CD155/PVR와의 경쟁에 있어서 더 우수한 IC₅₀; 각각의 이전에 설명된 테스트된 항-TIGIT 항체와 비교하여 T 세포 활성화 검사에서 더 우수한 EC₅₀; 및 암 환자 말초 혈액의 T 세포에서 그리고 중요하게는 종양 침윤 림프구에서 강력하게 증가하는 활성을 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 항체 및 항원 결합 단편, 특히 항체 31282에 기초한 것이, 우선적으로 Treg 세포를 고갈시킴이 놀랍게도 본원에 나타난다. 즉, 제공된 항-TIGIT 항체에 노출된 TIGIT-발현 Treg 세포가 통상적 CD4 및 CD8 T 세포와 비교하여 더 큰 비율로 용해를 겪는

다. 이는 통상적 CD4 및 CD8 T 세포가 또한 TIGIT를 발현하지만, 항체와 접촉할 때 동일한 정도까지 세포 용해를 겪지 않기 때문에 놀랍다. 또한 놀랍게도 본 발명에 따른 항체 및 항원 결합 단편, 특히 항체 31282에 기초한 것이 통상적 T 세포 전-염증성 활성을 촉진할 뿐만 아니라, 비통상적 $\gamma \delta$ T 세포의 활성을 증가시키는 것으로 나타난다.

- [0015] 따라서, 특정한 바람직한 구체예에서, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편이 본원에 제공되고 여기서:
- [0016] HCDR1은 서열 번호: 16(YTFTSYMH)을 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0017] HCDR2는 서열 번호: 17(VIGPSGASTSYAQKFQG)을 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0018] HCDR3은 서열 번호: 18(ARDHSDYWSGIMEV)을 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0019] LCDR1은 서열 번호: 61(RASQSVRSSYLA)을 포함하거나 이로 이루어지고,
- [0020] LCDR2는 서열 번호: 62(GASSRAT)를 포함하거나 이로 이루어지고, 및
- [0021] LCDR3은 서열 번호: 63(QQYFSPWT)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0022] 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 221에 따른 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 222에 따른 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0023] 특정한 바람직한 구체예에서 항-TIGIT 항체는 본원에 기재된 항체 31282이다.
- [0024] 다른 양태에서 본 발명은 인간 TIGIT에 대한 결합에 있어서 본 발명의 제1양태에 따른 항체, 예를 들어 본원에 예시된 항체와 교차 경쟁하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0025] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1양태에 따른 항체, 예를 들어 본원에 예시된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0026] 다른 양태에서, 본 발명은 TIGIT 잔기 Q56 및 I109를 포함하고, 임의로 잔기 Q56, N58 및 I109를 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 바람직한 구체예에서 TIGIT 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109를 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0027] 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TIGIT 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109로 이루어진 인간 TIGIT의 에피토프에 결합한다.
- [0028] 다른 양태에서, 본 발명은 인간 TIGIT에 결합하고 TIGIT 결합에 있어서 CD155와 경쟁하지 않는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0029] 특정한 구체예에서, 인간 TIGIT에 결합하고 TIGIT 결합에 있어서 CD155와 경쟁하지 않는 항체 또는 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 280을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR2는 서열 번호: 281을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR3은 서열 번호: 282를 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR1은 서열 번호: 292를 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR2는 서열 번호: 293을 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR3은 서열 번호: 294를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0030] 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 333으로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 334로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0031] 특정한 바람직한 구체예에서, 인간 TIGIT에 결합하고 TIGIT 결합에 있어서 CD155와 경쟁하지 않는 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 353을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 354를 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 355를 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 356을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 357을 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 358을 포함한다.
- [0032] 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 367로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어

도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 368로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0033] 다른 양태에서, 본 발명은 TIGIT-발현 Treg 세포를 우선적으로 고갈시키는 단리된 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 임의로 항체 또는 항원 결합 단편은 본 발명의 제1양태에 따른 항체 또는 항원 결합 단편, 예를 들어 본원에 예시된 항체이다.
- [0034] 다른 양태에서 본 발명은 본 발명의 다른 양태에 따른 항체, 예를 들어 본원에 예시된 항체의 친화도 변이체를 제공한다.
- [0035] 다른 양태에서 본 발명은 본 발명의 임의의 다른 양태에 따른 항체 또는 항원 결합 단편, 예를 들어 본원에 예시된 항체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합을 제공한다.
- [0036] 다른 양태에서 본 발명은 항-TIGIT 항체의 VH 및/또는 VL 도메인을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호: 241-270, 335-342 및 369-370으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 서열을 포함한다.
- [0037] 다른 양태에서 본 발명은 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 항원 결합 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 조합을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0038] 다른 양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템을 제공한다.
- [0039] 다른 양태에서 본 발명은 항체 또는 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 본 발명에 따른 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템을 배양하는 단계 및 발현된 항체 또는 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 재조합 항체 또는 이의 항원 결합 단편 제조 방법을 제공한다.
- [0040] 다른 양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편, 예를 들어 본원에 예시된 항체, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0041] 다른 양태에서 본 발명은 치료법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 다른 양태에서, 본 발명은 암 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어 본원에 예시된 항체) 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 다른 양태에서, 본 발명은 바이러스 감염, 임의로 CMV 감염 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어 본원에 예시된 항체) 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0044] 다른 양태에서 본 발명은 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어 본원에 예시된 항체) 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 대상에게 투여하여, 이에 의해 암을 치료하는 것을 포함하는 대상의 암 치료 방법을 제공한다.
- [0045] 다른 양태에서 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 대상에게 투여하여, 이에 의해 바이러스 감염을 치료하는 것을 포함하는 대상의 바이러스 감염 치료 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서 바이러스 감염은 CMV 감염이다.
- [0046] 다른 양태에서 T 세포의 집단을 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는 T 세포 활성을 촉진시키는 방법이 제공된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 $\alpha\beta$ T 세포 활성을 촉진시킨다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 $\gamma\delta$ T 세포 활성을 촉진시킨다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 시험관내 수행된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 생체내, 예를 들어 인간 대상에서 수행된다.
- [0047] 특정한 구체예에서 본 발명에 따른 방법, 또는 본 발명에 따른 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항원-결합 단편 또는 약제학적 조성물이 제공되고, 여기서 상기 방법은 하나 이상의 추가 치료제의 투여를 추가로 포함한다. 특정한 바람직한 구체예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 화학요법제, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체 및 항-ICOS 항체로부터 선택된다.
- [0048] 다른 양태에서 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 화학요법제, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB

항체, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-ICOS 항체 중 하나 이상을 포함하는 조합물이 제공된다. 다른 양태에서 치료법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 조합물이 제공된다. 다른 양태에서 암 치료 방법에서 사용하거나 바이러스 감염 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 조합물이 제공된다. 다른 양태에서 본 발명에 따른 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 조합물이 제공된다. 바람직한 구체예에서 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0049] 모든 관련 양태에서, 임의의 치료될 대상은 인간 대상인 것이 바람직하다. 모든 관련 양태에서 본 발명에 따른 항체와 접촉하는 세포(예를 들어 T 세포)는 인간 세포(예를 들어 인간 T 세포)인 것이 바람직하다.

[0050] 기술적으로 양립 불가능하거나 반대로 지시되지 않는 한, 기재된 임의의 바람직한 구체예는 모든 다른 바람직한 구체예 중 하나 이상과 조합으로 임의로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1 본 발명의 항체의 중쇄 가변 도메인(VH) 상보성 결정 영역(CDR) 서열을 제공하는 표
- 도 2 본 발명의 항체 경쇄 가변 도메인(VL) CDR 서열을 제공하는 표
- 도 3 본 발명의 항체의 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크(FR) 서열을 제공하는 표
- 도 4 본 발명의 항체의 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크(FR) 서열을 제공하는 표
- 도 5 본 발명의 항체의 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL) 아미노산 서열을 제공하는 표
- 도 6 본 발명에 따른 항체의 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열을 제공하는 표
- 도 7 Jurkat-hTIGIT에 대한 결합에 있어서 hCD155 및 항-TIGIT 항체 간의 경쟁 검사 결과를 나타내는 그래프
- 도 8 (A) 7 명의 건강한 인간 공여자의 PBMC의 특이적 T 세포 집단 내 TIGIT 양성 세포의 비율을 나타내는 그래프. (B) 7 명의 건강한 인간 공여자의 PBMC의 상이한 면역 집단 내 TIGIT 양성 세포의 비율을 나타내는 그래프.
- 도 9 Jurkat-hTIGIT에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프
- 도 10 (A 및 B) 인간 건강한 PBMC의 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프. (C) 인간 건강한 PBMC의 일차 메모리 CD8⁺ T 세포 및 Treg에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프
- 도 11 시노몰구스 건강한 PBMC의 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프
- 도 12 CHO-TCR-CD155 및 Jurkat-hTIGIT 생물학적분석에서 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프
- 도 13 CHO-TCR-CD155 세포로 활성화된 건강한 공여자의 인간 일차 CD8 T 세포에 대한 기능 검사에서 IFN γ 분비를 증가시키는 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프
- 도 14 CHO-TCR-CD155 세포로 활성화된 난소 복수의 인간 일차 CD8⁺ TIL에 대한 기능 검사에서 IFN γ 분비를 증가시키는 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 히스토그램 플롯
- 도 15 (A) Jurkat-mTIGIT에 대한 결합에 있어서 마우스 CD155 및 항-TIGIT 항체 간의 경쟁 검사 결과를 나타내는 그래프. (B) 마우스 OT-1 T 세포에 대한 기능 검사에서 IFN γ 분비를 증가시키는 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프. (C) 마우스 OT-1 T 세포에 대한 기능 검사에서 세포독성을 증가시키는 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프.
- 도 16 (A) CT26 종양 모델에서 단일요법에서 항-TIGIT 항체의 항-종양 효능을 나타내는 그래프. (B 및 C) CT26 종양 모델에서 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체의 항-종양 효능을 나타내는 그래프.
- 도 17 (A) CT26 종양 모델에서 단일요법에서 항-TIGIT 항체의 동형 의존성 항-종양 효능을 나타내는 그래프. (B) CT26 종양 모델에서 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체의 동형 의존성 항-종양 효능을 나타내는 그래프.
- 도 18 (A 및 G) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 전체 CD4⁺ T 세포 집단 내 Treg 세포 비율의 조절을 나타내는 그래프. (B 및 H) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항

체로 치료된 CT26 종양에서 전체 $CD45^{+}$ 집단 내 $CD8^{+}$ T 세포 비율의 조절을 나타내는 그래프. (C 및 I) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 $CD8^{+}/Treg$ T 세포 비의 조절을 나타내는 그래프. (D 및 J) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 IFNg 분비 $CD4^{+}$ T 세포의 조절을 나타내는 그래프. (E) 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 IFNg 분비 $CD8^{+}$ T 세포의 조절을 나타내는 그래프. (L 및 F) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 IFNg/IL-10 분비 $CD4^{+}$ T 세포 비를 나타내는 그래프. (K) 항-PD1 항체와의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 IL-10 분비 $CD4^{+}$ T 세포의 조절을 나타내는 그래프.

도 19 (A) CT26 종양에서 유전자 발현을 조절하는 항-TIGIT 항체 치료의 효과를 보여주고 NanoString 분석에 의해 측정된 볼케이노 플롯. (B) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 세포독성 스코어의 조절을 나타내는 박스 플롯. (C) 단일요법 또는 항-PD1과의 병용에서 항-TIGIT 항체로 치료된 CT26 종양에서 $CD8^{+}$ T 세포 스코어의 조절을 나타내는 박스 플롯

도 20 (A) 인간 건강한 지원자의 PBMC에서 TIGIT⁺ $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ T 세포 및 Treg 집단의 비율을 나타내는 히스토그램 플롯. (B) 인간 건강한 지원자의 PBMC에서 통상적 $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ T 세포 및 Treg 집단에 대한 항-TIGIT 항체의 시험관내 세포독성 효과를 나타내는 그래프.

도 21 CT26 종양에서 통상적 $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ T 세포 및 Treg 집단에 대한 항-TIGIT 항체의 생체의 세포독성 효과를 나타내는 그래프.

도 22 (A) Jurkat-hTIGIT 세포에 대한 항-TIGIT 항체 클론의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프. (B) 건강한 인간 PBMC의 일차 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 항-TIGIT 항체 클론의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프. (C) 암 환자 PBMC의 일차 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 항-TIGIT 항체 클론의 결합 검사 결과를 나타내는 그래프.

도 23 Jurkat-hTIGIT에 대한 결합에 있어서 인간 CD155 및 항-TIGIT 항체 클론 결합 간의 경쟁 검사 결과를 나타내는 그래프

도 24 길항제 a-TIGIT 클론의 기능적 특성을 나타내는 그래프. (A) Jurkat-hTIGIT 이펙터 세포를 사용하는 기능 검사(루시퍼레이즈 리포터 검사)에서 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프. (B) 건강한 지원자의 인간 일차 $CD8^{+}$ T 세포에 의한 IFNg 분비를 측정하는 기능 검사에서 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프. (C) PBMC의 암 환자 $CD3^{+}$ T 세포에 의한 IFNg 분비를 측정하는 기능 검사에서 항-TIGIT 항체 클론 31282의 효과를 나타내는 그래프. (D) 암 환자 TIL 또는 PBMC에서 세포내 사이토카인 염색을 측정하는 기능 검사에서 항-TIGIT 항체 클론 31282의 효과를 나타내는 그래프.

도 25 암 환자의 PBMC에서 전체 메모리 $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 및 Treg 집단에 대한 a-TIGIT 클론 31282의 세포독성 활성

도 26 암 환자의 면역 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명을 나타내는 그래프. (A) 암 환자 PBMC 및 TIL의 면역 집단에서 TIGIT 발현의 빈도. (B) 암 환자 PBMC 및 TIL의 면역 집단에서 TIGIT 발현의 절대 정량.

도 27 (A) 리본 다이어그램으로 나타난 Fab:TIGIT 복합체의 구조; (B) 클론 31282 및 TIGIT 간의 완전한 결합 계면; (C) 접촉된 잔기를 나타내는 클론 31282 및 TIGIT 간의 결합 계면.

도 28 항-TIGIT 클론 31282 및 32959 간의 경쟁 검사.

도 29 시노몰구스 원숭이에서 0.1 mg/kg (상단 행), 1 mg/kg (중간 행) 또는 10 mg/kg (하단 행)으로 단일 용량의 정맥 주사 후 항-TIGIT 클론 31282의 혈장 농도 측정. 좌측 열: 31282 IgG1; 우측 열 31282 IgG4.

도 30 세자리 증후군 환자의 악성 및 정상 $CD4^{+}$ T 세포 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명을 나타내는 그래프. (A) 악성 및 정상 $CD4^{+}$ T 세포를 분리하기 위한 게이팅 전략. (B) 2 개의 다른 집단에서 TIGIT 염색에 대한 MFI.

도 31 CLL 환자의 악성 및 정상 B 세포 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명을 나타내는 그래프. (A) 악성 및 정상 B 세포를 분리하기 위한 게이팅 전략. (B) 2 개의 다른 집단에서 TIGIT 염색에 대한 MFI.

도 32 (A-C) EL4-mTIGIT 종양이 접종된 마우스에서의 종양 성장 곡선을 나타내는 그래프. (A) 중위 종양 성장 곡선. (B) hIgG1 동형 대조군 항체로 처리된 마우스에서의 개별 종양 성장 곡선. (C) 마우스 대용 길항제 a-TIGIT 항체(hIgG1)로 처리된 마우스에서의 개별 종양 성장 곡선. (D-F) EL4-GFP 종양이 접종된 마우스에서의 종양 성장 곡선을 나타내는 그래프. (D) 중위 종양 성장 곡선. (E) hIgG1 동형 대조군 항체로 처리된 마우스에서의 개별 종양 성장 곡선. (F) 대용 길항제 a-TIGIT(hIgG1)로 처리된 마우스에서의 개별 종양 성장 곡선.

도 33 (A-D) CT26 종양이 접종된 마우스에서의 종양 성장 곡선을 나타내는 그래프. (A) 항-TIGIT 및 항-4-1BB 항체로 처리된 마우스에 대한 중위 및 개별 종양 성장 곡선. (B) 항-TIGIT 및 항-OX-40 항체로 처리된 마우스에 대한 중위 및 개별 종양 성장 곡선. (C) 항-TIGIT 및 항-GITR 항체로 처리된 마우스에 대한 중위 및 개별 종양 성장 곡선. (D) 항-TIGIT 및 항-ICOS 항체로 처리된 마우스에 대한 중위 및 개별 종양 성장 곡선.

도 34 $\gamma \delta$ T 세포에 대한 항-TIGIT 항체의 효과를 나타내는 그래프. (A) CMV 양성 및 음성 인간 공여자의 PBMC의 $V\delta 2^- \gamma \delta$ T 세포 집단 내의 TIGIT 양성 세포 및 TIGIT MFI 신호의 중위 비율. (B) 단리된 인간 일차 $V\delta 1^+ \gamma \delta$ T 세포에 대한 기능 검사에서 IFN γ 분비를 증가시키는 항-TIGIT Ab의 활성을 나타내는 그래프. (C) 전체 PBMC에 대한 기능 검사에서 IFN γ 분비를 증가시키는 항-TIGIT Ab의 활성을 나타내는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 발명의 상세한 설명

[0053] 본원에서 사용된 용어 "면역글로불린"은 임의의 관련 있는 특이적 면역반응성을 보유하는지 여부에 관계없이 두 중쇄 및 두 경쇄의 조합을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. "항체"는 관심 항원(예를 들어 TIGIT)에 대해 현저한 공지된 특이적 면역반응성 활성을 갖는 그러한 조립체를 지칭한다. 용어 "TIGIT 항체" 또는 "항-TIGIT 항체"는 TIGIT 단백질에 대한 면역학적 특이성을 나타내는 항체를 지칭하도록 본원에서 사용된다. 항체 및 면역글로불린은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 이들 사이에 쇠간 공유 결합이 있거나 없다. 척추동물 시스템에서 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 알려져 있다.

[0054] 일반적인 용어 "면역글로불린"은 생화학적으로 구별될 수 있는 다섯 가지의 별개의 클래스의 항체를 포함한다. 비록 다섯 가지의 클래스의 항체 모두가 본 발명의 범위 내에 있지만, 하기 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 클래스에 관련될 것이다. IgG와 관련하여, 면역글로불린은 분자량 약 23,000 달톤의 두 개의 동일한 폴리펩타이드 경쇄 및 분자량 53,000-70,000의 두 개의 동일한 중쇄를 포함한다. 네 개의 사슬은 "Y" 형상에서 디설파이드 결합에 의해 연결되고, 여기서 경쇄가 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통하여 계속되는 중쇄를 팔호로 묶는다.

[0055] 항체의 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다 (κ , λ). 각각의 중쇄 클래스는 카파 또는 람다 경쇄와 결합할 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유적으로 결합하고, 두 중쇄의 "꼬리" 부분은 면역글로불린이 B 세포 또는 유전적으로 엔지니어링된 숙주 세포에 의해 생성될 때 공유 디설파이드 결합 또는 비공유 결합에 의해 서로 결합한다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 형상의 분기된 끝의 N-말단으로부터 각 사슬의 하단에 있는 C-말단까지 이어진다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되고, 이들 중 일부 서브클래스(예를 들어, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)가 있음을 이해할 것이다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE로 결정하는 것이 이 사슬의 특성이다. 면역글로불린 서브클래스(동형) 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등은 특성이 잘 규명되어 있고 기능적 전문성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 이들 클래스 및 동형 각각의 변형된 버전은 본 개시의 관점에서 당업자가 용이하게 식별할 수 있고, 따라서 본 발명의 범위 내에 있다.

[0056] 위에 나타난 바와 같이, 항체의 가변 영역은 항체가 항원의 에피토프(epitope)를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합하게 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인은 조합되어 삼차원 항원 결합 부위를 한정하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각 팔의 끝에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 더욱 구체적으로, 항원 결합 부위는 각각의 VH 및 VL 사슬에서 세 개의 상보성 결정 영역(complementary determining region, CDR)에 의해 한정된다. 본원에 사용된 용어 "TIGIT 단백질" 또는 "TIGIT 항원" 또는 "TIGIT"는 상호 교환적으로 사용되고, 폴리오마바이러스 수용체(PVR - CD155로도 알려짐)에 결합하는 인간 T-세포 면역수용체(젠뱅크 수탁 번호: NM_173799)를 지칭한다. TIGIT는 VSIG9, VSTM3 또는 WUCAM로도 알려져 있다. TIGIT에 대한 연

급은 인간 숙주에서 및/또는 인간 배양 세포주의 표면에서 자연적으로 발현되는 천연 인간 TIGIT 단백질, 뿐만 아니라 재조합 형태 및 이의 단편 및 자연 발생 돌연변이 형태를 또한 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "결합 부위"는 관심 표적 항원(예를 들어 TIGIT)에 대한 선택적 결합을 담당하는 폴리펩타이드의 영역을 포함한다. 결합 도메인은 적어도 하나의 결합 부위를 포함한다. 예시적인 결합 도메인은 항체가 변 도메인을 포함한다. 본 발명의 항체 분자는 단일 결합 부위 또는 다중 (예를 들어, 둘, 셋 또는 넷) 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0058] 본원에서 사용된 용어 지정된 단백질(예를 들어 TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편)로부터 "유래된"은 폴리펩타이드의 기원을 지칭한다. 한 구체예에서, 특정 출발 폴리펩타이드로부터 유래된 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은 CDR 서열 또는 이와 관련된 서열이다. 한 구체예에서, 특정 출발 폴리펩타이드로부터 유래된 아미노산 서열은 인접하지 않는다. 예를 들어, 한 구체예에서, 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개의 CDR이 출발 항체로부터 유래된다. 한 구체예에서, 특정 출발 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열로부터 유래되거나 아니면 출발 서열에서 그 기원을 갖는 것으로서 당업자가 식별 가능한 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은, 출발 서열과 본질적으로 동일한 아미노산 서열 또는 이의 일부를 가지며 상기 부분은 적어도 3-5 아미노산, 적어도 5-10 아미노산, 적어도 10-20 아미노산, 적어도 20-30 아미노산, 또는 적어도 30-50 아미노산으로 이루어진다. 한 구체예에서, 출발 항체로부터 유래된 하나 이상의 CDR 서열은 변이 CDR 서열, 예를 들어 친화도 변이체를 생성하도록 변경되고, 여기서 변이 CDR 서열은 TIGIT 결합 활성을 유지한다.

[0059] 본원에서 사용된 "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 분야에 정의되어 있고, 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 면역글로불린 폴리펩타이드 중의 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리의 또 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 다른 구체예에서, 아미노산의 스트링이 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 상이한 구조적으로 유사한 스트링으로 대체될 수 있다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "중쇄 부분"은 면역글로불린 중쇄의 불변 도메인으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩타이드는 CH1 도메인, 힌지 (예를 들어, 상부, 중부 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 이의 변이체 또는 단편 중 적어도 하나를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 면역글로불린 중쇄의 Fc 부분(예를 들어, 힌지 부분, CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 불변 도메인의 적어도 일부(예를 들어, CH2 도메인의 전부 또는 일부)가 부족할 수 있다. 특정한 구체예에서, 불변 도메인의 적어도 하나, 바람직하게는 모두가 인간 면역글로불린 중쇄로부터 유래된다. 예를 들어, 바람직한 한 구체예에서, 중쇄 부분은 완전한 인간 힌지 도메인을 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 중쇄 부분은 완전한 인간 Fc 부분(예를 들어, 인간 면역글로불린의 힌지, CH2 및 CH3 도메인 서열)을 포함한다.

[0061] 특정한 구체예에서, 중쇄 부분의 구성적 불변 도메인은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래된다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 중쇄 부분은 IgG1 분자로부터 유래된 CH2 도메인 및 IgG3 또는 IgG4 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 불변 도메인은 상이한 면역글로불린 분자의 일부를 포함하는 키메라 도메인이다. 예를 들어, 힌지는 IgG1 분자의 첫 번째 부분 및 IgG3 또는 IgG4 분자의 두 번째 부분을 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 당업자는 중쇄 부분의 불변 도메인이 자연 발생 (야생형) 면역글로불린 분자와 아미노산 서열이 달라지도록 변형될 수 있음을 이해할 것이다. 즉, 본원에 개시된 본 발명의 폴리펩타이드는 중쇄 불변 도메인(CH1, 힌지, CH2 또는 CH3) 중 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 영역 도메인(CL)에 대한 변경 또는 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 하나 이상의 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "가변 영역" 및 "가변 도메인"은 상호 교환적으로 사용되고 동등한 의미를 갖도록 의도된다. 용어 "가변"은 가변 도메인 VH 및 VL의 특정 부분이 항체에서 서열이 광범위하게 상이하고 이의 표적 항원에 대한 각 특정 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 이는 항원 결합 부위의 일부를 형성하는 VL 도메인 및 VH 도메인 각각에서 "초가변 루프"라고 불리는 세 개의 분절에 집중된다. V_{람다} 경쇄 도메인의 제1, 제2 및 제3 초가변 루

프는 본원에서 $L1(\lambda)$, $L2(\lambda)$ 및 $L3(\lambda)$ 로 지칭되고 VL 도메인에서 잔기 24-33 ($L1(\lambda)$), 9, 10 또는 11 아미노산 잔기로 이루어짐), 49-53 ($L2(\lambda)$), 3 잔기로 이루어짐) 및 90-96 ($L3(\lambda)$), 5 잔기로 이루어짐)을 포함하는 것으로 정의될 수 있다 (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000). $V_{\text{카파}}$ 경쇄 도메인의 제1, 제2 및 제3 추가변 루프는 본원에서 $L1(\kappa)$, $L2(\kappa)$ 및 $L3(\kappa)$ 로 지칭되고 VL 도메인에서 잔기 25-33 ($L1(\kappa)$), 6, 7, 8, 11, 12 또는 13 잔기로 이루어짐), 49-53 ($L2(\kappa)$), 3 잔기로 이루어짐) 및 90-97 ($L3(\kappa)$), 6 잔기로 이루어짐)을 포함하는 것으로 정의될 수 있다 (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000). VH 도메인의 제1, 제2 및 제3 추가변 루프는 본원에서 H1, H2 및 H3으로 지칭되고 VH 도메인에서 잔기 25-33 (H1, 7, 8 또는 9 잔기로 이루어짐), 52-56 (H2, 3 또는 4 잔기로 이루어짐) 및 91-105 (H3, 길이가 매우 가변적임)를 포함하는 것으로 정의될 수 있다 (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000).

[0063] 달리 지시되지 않는 한, 용어 $L1$, $L2$ 및 $L3$ 은 각각 VL 도메인의 제1, 제2 및 제3 추가변 루프를 지칭하고, $V_{\text{카파}}$ 및 $V_{\text{람다}}$ 동형 모두로부터 획득된 추가변 루프를 포함한다. 용어 H1, H2 및 H3은 각각 VH 도메인의 제1, 제2 및 제3 추가변 루프를 지칭하고, γ , ϵ , δ , α 또는 μ 를 포함하는 공지된 중쇄 동형 중 임의의 것으로부터 획득된 추가변 루프를 포함한다.

[0064] 추가변 루프 $L1$, $L2$, $L3$, H1, H2 및 H3은 아래에 정의된 바와 같은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"의 일부를 각각 포함할 수 있다. 용어 "추가변 루프" 및 "상보성 결정 영역"은 엄밀히는 동의어가 아닌데, 추가변 루프(HV)는 구조에 기초하여 정의되는 반면, 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기초하여 정의되기 때문이며 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) HV 및 CDR의 한계가 일부 VH 및 VL 도메인에서 상의할 수 있다.

[0065] VL 및 VH 도메인의 CDR은 전형적으로 다음 아미노산을 포함하는 것으로 정의될 수 있다: 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) 및 89-97 (LCDR3), 및 중쇄 가변 도메인에서 잔기 31-35 또는 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) 및 95-102 (HCDR3); (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). 따라서, HV는 상응하는 CDR 내에 포함될 수 있으며 본원에서 VH 및 VL 도메인의 "추가변 루프"에 대한 언급은 달리 지시되지 않는 한 상응하는 CDR을 또한 포함하는 것으로 해석되어야 하고, 그 역도 마찬가지이다.

[0066] 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 아래 정의된 바와 같이 프레임워크 영역(FR)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 네 개의 FR(각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함하고, 세 개의 추가변 루프에 의해 연결된 β -시트 배열을 대체로 채택한다. 각 쇄의 추가변 루프는 FR에 의해 아주 근접하게 엮이고, 다른 쇄의 추가변 루프와 함께, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. 항체의 구조 분석은 상보성 결정 영역에 의해 형성된 결합 부위의 서열과 형태 사이의 관계를 밝혀냈다 (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227, 799-817, 1992; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175-182, 1990). 높은 서열 가변성에도 불구하고, 여섯 개의 루프 중 다섯 개가 "정규 구조(canonical structure)"로 지칭되는 주쇄 입체형태의 작은 레퍼토리를 채택한다. 이들 입체형태는 우선 루프의 길이에 의해 결정되고 두 번째로 패킹, 수소 결합 또는 특이한 주쇄 입체형태를 취하는 능력을 통해 입체형태를 결정하는, 루프 및 프레임워크 영역의 특정 위치에서 핵심 잔기의 존재에 의해 결정된다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 양자 모두의 가변 영역 내에서 발견되는 비인접 항원 조합 부위를 의미한다. 이들 특정 영역은 Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616, 1977, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, Chothia et al., J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987, 및 MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262, 732-745, 1996에 의해 설명되었으며, 여기서 정의는 서로 비교할 때 아미노산 잔기의 중첩 또는 부분집합을 포함한다. 위에서 인용된 참조문헌 각각에 의해 정의된 CDR을 포함하는 아미노산 잔기가 비교를 위해 제시된다. 바람직하게는, 용어 "CDR"은 서열 비교에 기초하여 Kabat에 의해 정의된 CDR이다.

[0068] 표 1: CDR 정의.

	CDR 정의		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹잔기 번호부여는 상기 Kabat 등의 명명법을 따른다

²잔기 번호부여는 상기 Chothia 등의 명명법을 따른다

³잔기 번호부여는 상기 MacCallum 등의 명명법을 따른다

[0069]

[0070]

본원에 사용된 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR 영역"은 가변 영역의 일부이지만, CDR의 일부는 아닌 (예를 들어, Kabat CDR 정의 사용) 아미노산 잔기를 포함한다. 그러므로, 가변 영역 프레임워크는 길이가 약 100-120 아미노산이지만 CDR 외부의 아미노산만을 포함한다. 중쇄 가변 도메인의 구체적인 예 및 Kabat 등에 의해 정의된 CDR에 있어서, 프레임워크 영역 1은 아미노산 1-30을 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고; 프레임워크 영역 2는 아미노산 36-49를 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고; 프레임워크 영역 3은 아미노산 66-94를 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고, 프레임워크 영역 4는 아미노산 103에서 가변 영역의 끝까지의 가변 영역의 도메인에 상응한다. 경쇄에 대한 프레임워크 영역은 각각의 경쇄 가변 영역 CDR에 의해 유사하게 분리된다. 유사하게, Chothia 등 또는 McCallum 등에 의한 CDR의 정의를 사용하여 프레임워크 영역 경계는 위에 기재된 바와 같이 각각의 CDR 말단에 의해 분리된다. 바람직한 구체예에서 CDR은 Kabat에 의해 정의된 바와 같다.

[0071]

자연 발생 항체에서, 각각의 단량체 항체에 존재하는 여섯 개의 CDR은 항체가 수성 환경에서 삼차원 배열을 취할 때 항원 결합 부위를 형성하도록 특이적으로 위치하는 아미노산의 짧은 비인접 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열에서 더 작은 분자간 변동성을 나타내며 프레임워크 영역으로 지칭된다. 프레임워크 영역은 주로 β-시트 입체형태를 채택하고 CDR은 β-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 이의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이들 프레임워크 영역은 사슬간 비공유성 상호작용에 의해 정확한 배향으로 여섯 개의 CDR을 위치시키는 스캐폴드를 형성하도록 작용한다. 위치 지정된 CDR에 의해 형성된 항원 결합 부위는 면역반응성 항원에서 에피토프에 상보적인 표면을 한정한다. 이러한 상보적인 표면은 면역반응성 항원 에피토프에 대한 항체의 비공유 결합을 촉진한다. CDR의 위치는 당업자에 의해 용이하게 식별될 수 있다.

[0072]

본원에 사용된 용어 "단편"은 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체 사슬보다 더 적은 아미노산 잔기를 포함하는 항체 또는 항체 사슬의 일부 또는 부분을 지칭한다. 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 결합하거나 항원 결합(즉, TIGIT에 대해 특이적인 결합)을 위해 온전한 항체와(즉, 이들이 유래한 온전한 항체와) 경쟁하는 면역 글로불린 또는 항체의 폴리펩타이드 단편을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 항체 분자의 "단편"은 항체의 항원-결합 단편, 예를 들어, 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 단쇄 항체(scFv), F(ab')₂ 단편, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편 및 단일 도메인 항체 단편(DAb)을 포함한다. 단편은, 예를 들어, 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체 사슬의 화학적 또는 효소적 처리를 통해 또는 재조합 수단에 의해 획득될 수 있다.

[0073]

본원에서 사용된 용어 "결합가(valency)"는 폴리펩타이드에서 잠재적인 표적 결합 부위의 수를 지칭한다. 각각의 표적 결합 부위는 하나의 표적 분자 또는 표적 분자의 특정 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩타이드가 하나 초과 표적 결합 부위를 포함하는 경우, 각각의 표적 결합 부위는 동일하거나 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다 (예를 들어, 상이한 리간드 또는 상이한 항원, 또는 동일한 항원상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다). 대상 결합 분자는 TIGIT에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다.

[0074]

본원에 사용된 용어 "특이성"은 주어진 표적, 예를 들어 TIGIT에 결합하는 (예를 들어, 면역 반응하는) 능력을 지칭한다. 폴리펩타이드는 단일특이성이고 한 표적에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 포함할 수 있거나, 폴리펩타이드는 다중특이성이고 동일한 또는 상이한 표적에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 결합 부위를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 항체는 하나 초과 표적에 대해 특이적이다. 예를 들어, 한 구체예에서, 본 발명의 다중특이적 결합 분자는 TIGIT 및 제2 표적 분자에 결합한다. 이와 관련해서, 제2 표적 분자는 TIGIT 이외의 분자이다.

[0075]

본원에서 사용된 폴리펩타이드에 대한 용어 "합성"은 자연 발생하지 않는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드

드를 포함한다. 예를 들어, 자연 발생하지 않는 폴리펩타이드는 자연 발생하는 폴리펩타이드의 변형된 형태이거나 (예를 들어, 첨가, 치환 또는 결실과 같은 돌연변이를 포함) 자연에서는 자연적으로 연결되지 않는 (자연 발생하거나 자연 발생하지 않을 수 있는) 제2 아미노산 서열에 아미노산의 선형 서열에서 연결된 (자연 발생하거나 자연 발생하지 않을 수 있는) 제1 아미노산 서열을 포함한다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "엔지니어링된(engineered)"은 합성 수단에 의한 (예를 들어 재조합 기법, 시험관내 펩타이드 합성에 의한, 펩타이드의 효소적 또는 화학적 커플링 또는 이들 기법의 일부 조합에 의한) 핵산 또는 폴리펩타이드의 분자의 조작을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 하나 이상의 특성, 예컨대 항원 결합, 안정성/반감기 또는 이펙터 기능을 개선하도록 엔지니어링되었다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "변형된 항체"는 자연 발생하지 않도록 변경된 항체의 합성 형태, 예를 들어, 적어도 두 개의 중쇄 부분을 포함하지만 두 개의 완전한 중쇄를 포함하지 않는 항체 (예컨대, 도메인 결실 항체 또는 미니바디); 둘 이상의 상이한 항원 또는 단일 항원상의 상이한 에피토프에 결합하도록 변경된 다중특이성 형태의 항체 (예를 들어, 이중특이성, 삼중특이성 등); scFv 분자에 연결된 중쇄 분자 등을 포함한다. ScFv 분자는 당해 분야에서 공지이고, 예를 들어 미국 특허 제5,892,019호에 설명된다. 또한, 용어 "변형된 항체"는 다중결합가 형태의 항체(예를 들어, 3가, 4가 등, 동일한 항원의 셋 이상의 카피에 결합하는 항체)를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 변형된 항체는 CH2 도메인이 결여된 적어도 하나의 중쇄 부분을 포함하고 수용체 리간드 쌍의 한 멤버의 결합 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0078] 용어 "변형된 항체"는 또한 본 발명의 TIGIT 항체의 아미노산 서열 변이체를 지칭하도록 본원에서 사용될 수 있다. 본 발명의 TIGIT 항체는 그것이 유래된 TIGIT 항체와 비교하여 아미노산 서열이 다른 변이 TIGIT 항체를 생성하도록 변형될 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다. 예를 들어, "비필수" 아미노산 잔기에서 보존성 치환 또는 변화를 유발하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 치환이 (예를 들어, CDR 및/또는 프레임워크 잔기에서) 이루어질 수 있다. 아미노산 치환은 하나 이상의 아미노산을 자연 발생하는 또는 비천연 아미노산으로 대체하는 것을 포함할 수 있다.

[0079] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 항원 결합 또는 이의 가변 도메인을 포함한다. 항원 결합 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 이중특이적 Fab's 및 Fv 단편, 디아바디(diabody), 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 단쇄 가변 단편(scFv) 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다 (Holliger and Hudson, Nature Biotechnol. 23:1126-1136, 2005 참조, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다).

[0080] 본원에 사용된 용어 "친화도 변이체"는 본 발명의 참조 TIGIT 항체와 비교하여 아미노산 서열에서 하나 이상의 변화를 나타내는 변이 항체를 지칭하며, 여기서 친화도 변이체는 참조 항체와 비교하여 TIGIT에 대해 변경된 친화도를 나타낸다. 바람직하게는 친화도 변이체는 참조 TIGIT 항체와 비교하여 TIGIT에 대해 개선된 친화도를 나타낼 것이다. 개선은 TIGIT에 대한 더 낮은 KD 또는 TIGIT에 대한 더 느린 오프-레이트(off-rate)로서 명백할 수 있다. 친화도 변이체는 전형적으로, 참조 TIGIT 항체와 비교하여 CDR에서 하나 이상의 아미노산 서열 변화를 나타낸다. 그러한 치환은 CDR에서 주어진 위치에 존재하는 원래 아미노산을 자연 발생하는 아미노산 잔기 또는 자연 발생하지 않는 아미노산 잔기일 수 있는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 야기할 수 있다. 아미노산 치환은 보존성 또는 비보존성일 수 있다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "친화도" 또는 "결합 친화도"는 항체 결합의 맥락에서 당해 분야의 통상적인 의미에 기초하여 이해되어야 하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 항원과 결합 부위 사이의 결합의 강도 및/또는 안정성을 반영한다.

[0082] 본원에 제공된 항-TIGIT 항체는 인간 TIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 특징으로 한다. TIGIT에 대한 결합 친화도는 당업자에게 공지인 표준 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0083] 결합 친화도는 또한 특정 항체에 대한 해리 상수 또는 K_D로 표현될 수 있다. K_D 값이 더 작을수록, 항체와 이의 표적 항원 사이의 결합 상호작용이 더 강해진다. 한 구체예에서, 정의된 VH/VL 쌍을 포함하는 Fab 클론의 결합 친화도는 당해 분야에 공지인 방법을 사용하여, 예를 들어 ForteBio™ 시스템에 의해, MSD-용액 평형 적정(SET)에 의해, 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해, 예를 들어 첨부된 실시예에 기재된 바와 같이 Biacore™ 시스템을 사용하여 평가될 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 Fab 단편은 전형적으로 1x10⁻¹⁰ 내지 5x 10⁻⁸ M, 임의로 7x10⁻¹⁰ 내지 4 x 10⁻⁸ M 범위의, ForteBio™에 의해 측정된 TIGIT에 대한 K_D를 나타낸다. 이 범위 내의 K_D는 Fab 및 상응하는 2가 mAb가 hTIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 나타낸다는 지시로 간주될 수 있다. 언급된 범

위 내의 hTIGIT에 대한 K_D 를 (개별적으로) 나타내는 두 개의 Fabs를 포함하는 2가 mAbs가 또한 hTIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 1×10^{-11} 내지 5×10^{-9} , 임의로 2×10^{-11} 내지 1×10^{-9} 범위의 MSD K_D 는 hTIGIT에 대한 높은 친화도 결합의 지시로 간주될 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 Fab 단편은 전형적으로 1×10^{-10} M 내지 1×10^{-9} M, 임의로 1×10^{-10} 내지 7×10^{-10} , 임의로 2×10^{-10} 내지 7×10^{-10} M 범위의, Biacore™에 의해 측정된 TIGIT에 대한 K_D 를 나타낸다. 이 범위 내의 K_D 는 Fab 및 상응하는 2가 mAb가 hTIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 나타낸다는 지시로 간주될 수 있다.

[0084] 인간 TIGIT에 대한 결합 친화도는 또한 첨부된 실시예에 기재된 바와 같이 세포-기반 시스템을 사용하여 평가될 수 있으며, 여기서 mAbs는 예를 들어 ELISA 또는 흐름 세포측정법을 사용하여 포유류 세포(TIGIT를 발현하는 세포주 또는 생체외 세포)에 대한 결합에 대해 테스트된다. TIGIT에 대한 높은 친화도는, 예를 들어, 실시예 10에 기재된 것과 같은 흐름 세포측정(예를 들어 FACS) 분석에 의해 0.5 nM 이하의 EC_{50} 으로 표시될 수 있다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 0.5 nM 이하, 임의로 0.2 nM 이하의 세포 결합 EC_{50} 을 나타낸다. EC_{50} 으로 표현된 친화도의 세포-기반 결정은 바람직하게는 hTIGIT를 발현하는 Jurkat 세포 또는 인간 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)의 일차 CD8 T 세포를 사용하여 결정된다.

[0085] 본원에서 사용된 "Treg 세포" 또는 단순히 "Treg"는 조절 CD4+ T 세포 - 즉, 통상적 T 세포(CD8 또는 CD4 T 세포)의 이펙터 기능(들)을 감소시키는 T 세포를 지칭한다. Treg는 당해 분야에 공지인 방법에 따라, 예를 들어 높은 수준의 CD25를 발현하고 낮은 수준의 CD127를 발현하거나 이것이 부재하는 CD4 세포를 식별하는 흐름 세포 측정법을 사용하여 식별될 수 있다.

[0086] 위에 요약된 바와 같이, 본 발명은, 적어도 부분적으로, TIGIT에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명에 따른 TIGIT 항체 및 항체 단편의 특성 및 특징이 이제 보다 상세하게 설명될 것이다.

[0087] 항-TIGIT 항체

[0088] 한 양태에서, 본 발명은 인간 TIGIT에 결합하고, 도 1에 나타나는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열로부터 선택된 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2) 및 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 도 2에 나타나는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열로부터 선택된 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 즉, 본 발명은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고 이는 인간 TIGIT에 결합하고 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2) 및 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서:

[0089] (i) HCDR1은 서열 번호: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 271, 274 및 277로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0090] (ii) HCDR2는 서열 번호: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 272, 275 및 278로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0091] (iii) HCDR3은 서열 번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 273, 276 및 279로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0092] 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함하고, 여기서

[0093] (iv) LCDR1은 서열 번호: 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82, 85, 88, 283, 286 및 289로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0094] (v) LCDR2는 서열 번호: 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 284, 287 및 290으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 및

[0095] (vi) LCDR3은 서열 번호: 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 285, 288 및 291로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0096] 항원(인간 TIGIT)에 대한 결합 부위를 형성하기 위하여 VL 도메인과 쌍을 이루는 VH 도메인을 포함하는 임의의 주어진 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 6 CDR: 가변 중쇄 CDR3(HCDR3), 가변 중쇄 CDR2(HCDR2), 가변 중쇄 CDR1(HCDR1), 가변 경쇄 CDR3(LCDR3), 가변 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 가변 경쇄 CDR1(LCDR1)의 조합을 포

함할 것이다. 비록 위에 나열된 CDR 서열 군으로부터 선택된 6 CDR의 여러 상이한 조합이 허용될 수 있기는 하지만, 본 발명의 범위 내에서, 6 CDR의 특정한 조합이 특히 바람직하다; 이들은 인간 TIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 나타내는 단일 mAb 내의 "천연" 조합이다. 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 도 1의 각 항체의 HCDR와 함께 도 2의 상응하는 항체의 LCDR에 의해 형성된 조합의 군으로부터 선택된다.

- [0097] 즉, 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0098] (i) 서열 번호:1을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:2를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:3을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:46을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:47을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:48을 포함하는 LCDR3;
- [0099] (ii) 서열 번호:4를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:5를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:6을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:49를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:50을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:51을 포함하는 LCDR3;
- [0100] (iii) 서열 번호:7을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:8을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:9를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:52를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:53을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:54를 포함하는 LCDR3;
- [0101] (iv) 서열 번호:10을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:11을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:12를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:55를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:56을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:57을 포함하는 LCDR3;
- [0102] (v) 서열 번호:13을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:14를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:15를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:58을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:59를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:60을 포함하는 LCDR3;
- [0103] (vi) 서열 번호:16을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:17을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:18을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:61을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:62를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:63을 포함하는 LCDR3;
- [0104] (vii) 서열 번호:19를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:20을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:21을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:64를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:65를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:66을 포함하는 LCDR3;
- [0105] (viii) 서열 번호:22를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:23을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:24를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:67을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:68을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:69를 포함하는 LCDR3;
- [0106] (ix) 서열 번호:25를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:26을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:27을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:70을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:71을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:72를 포함하는 LCDR3;
- [0107] (x) 서열 번호:28을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:29를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:30을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:73을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:74를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:75를 포함하는 LCDR3;
- [0108] (xi) 서열 번호:31을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:32를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:33을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:76을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:77을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:78을 포함하는 LCDR3;
- [0109] (xii) 서열 번호:34를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:35를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:36을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:79를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:80을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:81을 포함하는 LCDR3;
- [0110] (xiii) 서열 번호:37을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:38을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:39를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:82를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:83을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:84를 포함하는 LCDR3;
- [0111] (xiv) 서열 번호:40을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:41을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:42를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:85를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:86을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:87을 포함하는 LCDR3;
- [0112] (xv) 서열 번호:43을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:44를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:45를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:88을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:89를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:90을 포함하는 LCDR3;
- [0113] (xvi) 서열 번호:271을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:272를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:273을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:283을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:284를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:285를 포함하는 LCDR3;
- [0114] (xvii) 서열 번호:274를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:275를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:276을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:286을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:287을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:288을 포함하는 LCDR3;
- [0115] (xviii) 서열 번호:277을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:278을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:279를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:289를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:290을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:291을 포함하는 LCDR3.

- [0116] 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 327, 329 및 331로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하고; 서열 번호: 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 328, 330 및 332의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 임의로 포함한다.
- [0117] 비록 위에 나열된 VH 및 VL 도메인 서열 군으로부터 선택된 VH 도메인 및 VL 도메인의 모든 가능한 쌍이 허용될 수 있기는 하지만, 본 발명의 범위 내에서, 특정 조합 VH 및 VL이 특히 바람직하다; 이들은 인간 TIGIT에 대한 높은 친화도 결합을 나타내는 단일 mAb 내의 "천연" 조합이다.
- [0118] 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 도 5에서 각각의 항체의 VH, 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열과 함께, 도 5에서 동일한 항체의 VL, 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열에 의해 형성된 조합의 군으로부터 선택된다. 특정한 구체예에서 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 조합을 포함하고, 여기서 조합은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0119] (i) 서열 번호:211의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:212의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0120] (ii) 서열 번호:213의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:214의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0121] (iii) 서열 번호:215의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:216의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0122] (iv) 서열 번호:217의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:218의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0123] (v) 서열 번호:219의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:220의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0124] (vi) 서열 번호:221의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:222의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0125] (vii) 서열 번호:223의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:224의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0126] (viii) 서열 번호:225의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:226의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0127] (ix) 서열 번호:227의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:228의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0128] (x) 서열 번호:229의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:230의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0129] (xi) 서열 번호:231의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:232의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0130] (xii) 서열 번호:233의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:234의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0131] (xiii) 서열 번호:235의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:236의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0132] (xiv) 서열 번호:237의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:238의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;

- [0133] (xv) 서열 번호:239의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:240의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0134] (xvi) 서열 번호:327의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:328의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- [0135] (xvii) 서열 번호:329의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:330의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 및
- [0136] (xviii) 서열 번호:331의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호:332의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인.
- [0137] 위에 나열된 특정 VH/VL 조합 각각에 대해, 발명의 범위 내에서, 열거된 VH 도메인 서열에 대해 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 열거된 VL 도메인 서열에 대해 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인과 조합하는 것이 또한 허용될 수 있다. VH 도메인의 아미노산 서열이 주어진 참조 VH 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는, 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 참조 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 동일한 중쇄 CDR을 포함할 수 있다. 마찬가지로, VL 도메인의 아미노산 서열이 주어진 참조 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는, 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 참조 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일한 경쇄 CDR을 포함할 수 있다.
- [0138] 이전 단락 및 본원의 다른 곳에서, 항체/항원 결합 단편의 구조는 (주어진 서열 번호를 갖는) 열거된 참조 서열과의 % 서열 동일성 기준으로 정의된다. 이와 관련하여, 두 아미노산 서열 사이의 % 서열 동일성은 최적의 방식으로 정렬된 이들 두 서열을 비교하여 결정될 수 있고, 비교될 아미노산 서열은 이들 두 서열 사이의 최적의 정렬을 위해 참조 서열에 대한 첨가 또는 결실을 포함할 수 있다. 동일성 백분율은 아미노산 잔기가 두 서열 사이에 동일한 동일 위치의 수를 결정하고, 이러한 동일 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 총 수로 나누고, 이들 두 서열 사이의 동일성의 백분율을 얻기 위해 얻은 결과에 100을 곱하여 계산된다. 전형적으로, 비교 윈도우는 비교되는 서열의 전체 길이에 대응한다. 예를 들어, 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>에서 구할 수 있는 BLAST 프로그램, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)를 사용할 수 있고, 사용되는 파라미터는 기본적으로 제공되는 것이며 (특히 파라미터 "오픈 갭 페널티": 5 및 "확장 갭 페널티": 2에 대해; 선택된 매트릭스는, 예를 들어 프로그램에 의해 제안된 매트릭스 "BLOSUM 62"), 비교될 두 서열 사이의 동일성 백분율은 프로그램에 의해 직접 계산된다. 참조 서열에 대한 쿼리 서열의 서열 동일성 결정은 당업자의 능력 내에 있고 BLASTTM와 같은 상업적으로 이용 가능한 분석 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0139] 특정한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 16을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 17을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 18을 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 61을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 62를 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 63을 포함한다.
- [0140] 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 221로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 222로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 본원에 제공된 항체 31282의 VH 및 VL 도메인이다.
- [0141] 본원에 제공된 항체 31282는 항체 29489로부터 유래된다. 항체 31282는 VH FR4 영역 중의 아미노산 116에서의 M-T 치환에 의해 29489로부터 생성되었다. 이러한 치환은 항체의 잠재적 산화 부위를 제거함으로써 기능에 영향을 미치지 않으면서 안정성을 개선하는 것으로 이해된다. 따라서 항체 31282 및 29489는 프레임워크만이 상이한 동일한 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 공유한다.
- [0142] 따라서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 219로 나타

난 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 220으로 나타난 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 본원에 제공된 항체 29489의 VH 및 VL 도메인이다.

[0143] VH 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 221 또는 219로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그림에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:221 및 219의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3(각각 서열 번호:16, 17 및 18)과 동일한 중쇄 CDR을 포함할 수 있다. 마찬가지로, VL 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 222 또는 220으로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그림에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:222 및 220의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3(각각 서열 번호:61, 62 및 63)과 동일한 경쇄 CDR을 포함할 수 있다.

[0144] 본원에 기재되고 도 1-5에 제시된 서열을 갖는 예시적인 TIGIT 항체는 5 개의 모항체 클론으로부터 개발되었다. 표 2는 본원에 기재된 항체의 계통을 요약한다. 나이브 모 인간 항-TIGIT 항체는 효모에서 발현되었고, TIGIT에 대해 높은 기능적 활성을 나타내는 것이 선택되고 (회색 행, 26...으로 명명됨), 친화도 성숙을 겪었다. 선택된 친화도-성숙 항체는 이후 포유류 세포에서 발현되었다 (각각의 모 아래의 백색 행, 29... 또는 3...으로 명명됨). 또한, 항체 31282가 VH FR4 영역의 아미노산 116에서 M-T 치환에 의해 29489로부터 생성되었다. 이러한 치환은 항체의 잠재적 산화 부위를 제거함으로써 기능에 영향을 미치지 않으면서 안정성을 개선하는 것으로 이해된다. 또한, 항체 31288이 VH FR1 영역의 아미노산 2에서 V-L 치환에 의해 그리고 VH FR4 영역의 아미노산 120에서 M-T 치환에 의해 29494로부터 생성되었다. V-L 치환은 VH4-39 생식계열의 서열 및 M-T 치환을 복원하여 항체의 잠재적 산화 부위를 제거함으로써 기능에 영향을 미치지 않으면서 안정성을 개선하는 것으로 이해된다.

[0145] 표 2

항체 클론	VH CDR3 계통	최적화 방법	VH 생식계열
26518	26518	모	VH3-07
29478	26518	H1/H2/H3	VH3-30
26452	26452	모	VH1-46
29487	26452	H1/H2/H3	VH1-46
29489	26452	H1/H2/H3	VH1-46
31282	29489	M116T 아미노산 돌연변이	VH1-46
26486	26486	모	VH4-0B
29499	26486	H1/H2/H3	VH4-39
29494	26486	H1/H2/H3	VH4-39
31288	29494	생식계열 복귀 + M116T 아미노산 돌연변이	VH4-39
32919	31288	L1/L2/L3	VH4-39
32931	31288	L1/L2/L3	VH4-39
26521	26521	모	VH1-69
29513	26521	H1/H2/H3	VH1-69
26493	26493	모	VH3-09
29520	26493	H1/H2/H3	VH3-09
29523	26493	H1/H2/H3	VH3-33
29527	26493	H1/H2/H3	VH3-30
26432	26432	모	VH1-69
32959	26432	H1/H2/H3	VH1-69

[0146]

[0147] 2세대 항체는 각각의 모항체보다 더 높은 친화도를 나타낸다.

[0148] 특정한 구체예에서, 본 발명은 VH 도메인이 VH3-07, VH3-30, VH1-46, VH4-0B, VH4-39, VH1-69, VH3-09, VH3-33, VH3-30로부터 선택된 인간 V 영역 생식계열 서열로부터 유래하는 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 V 영역 생식계열 VH1-46으로부터 유래한 VH 도메인을 포함한다.

[0149] 중쇄 가변 영역의 서열이 다른 어떤 것보다 주어진 생식계열로부터 유래할 가능성이 더 높을 경우, VH 도메인은 특정 V 영역 생식계열 서열에서 "유래된다".

[0150] TIGIT 에피토프

[0151] 본 발명은 또한 잔기 Q56 및 I109를 포함하는 에피토프에서 인간 TIGIT에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 잔기 Q56, N58 및 I109에서 인간 TIGIT에 결합한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 잔기 Q56, N58 및 I109 및 임의로 잔기 E60, I68, L73 및 H76 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에서 인간 TIGIT에 결합한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109를 포함하는 에피토프에서 인간 TIGIT에 결합한다.

[0152] 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TIGIT 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109로 이루어진 에피토프에서 인간 TIGIT에 결합한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 31282로서 동일한 에피토프에 결합한다.

[0153] 항체 또는 항원 결합 단편이 지시된 TIGIT 잔기를 포함하는 인간 TIGIT의 에피토프에 결합하는 경우, 항체는 이들 잔기 각각 및 임의로 TIGIT의 다른 잔기에 결합한다. 항체 또는 항원 결합 단편이 TIGIT 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109로 이루어진 인간 TIGIT의 에피토프에 결합하는 경우, 항체는 이들 잔기 각각에 결합하고 TIGIT의 다른 잔기에 결합하지 않는다.

[0154] 항체 또는 항원 결합 단편은 TIGIT에 결합 시 지시된 TIGIT 아미노산 잔기(들)에 접촉하는 경우 주어진 에피토프에서 인간 TIGIT에 결합한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 항체-TIGIT 결합에 의해 형성된 단백질 복합체에서, 잔기가 다음 기준 각각을 충족시키는 경우, 항체는 TIGIT 잔기와 접촉한다: (i) 0.3 kcal/mol 초과 의 계산된 결합 자유 에너지 기여를 갖는다, (ii) X-선 구조에서 모든 잔기의 평균 B-인자보다 낮은 실험 평균 B-인자를 갖는다, (iii) 4.0 옹스트롬 이하의 거리에서 항체 원자와의 적어도 3 쌍의 중원자 원자간 접점을 만든다, (iv) 용매 노출된 수소 결합 또는 이온성 상호작용만을 하지 않는다, (v) 비방향족 극성 잔기(Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys 또는 Arg)인 경우, 항체와 적어도 하나의 수소 결합 또는 이온성 상호작용을 한다. 결합 자유 에너지의 계산은 당업자의 능력 내에 있을 것이다. 바람직하게는 결합 자유 에너지는 실험적 역장 (empirical force field), 바람직하게는 FoldX를 사용하여 계산된다. FoldX는 당업자에게 익숙할 것이며 <http://foldxsuite.crg.eu/>에서 공개적으로 입수 가능하다. FoldX를 사용한 결합 자유 에너지의 계산은 또한 Guerois et al. J. Mol. Biol. 2002;320(2):369-87에 설명되며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 당업자에게 익숙한 바와 같이, 중원자는 모두 비수소 원자이다 (C, N, O, S 포함).

[0155] 따라서, 본 발명은 또한 적어도 잔기 Q56 및 I109에서 인간 TIGIT에 접촉하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 잔기 Q56, N58 및 I109에서 인간 TIGIT에 접촉한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 잔기 Q56, N58 및 I109 및 임의로 잔기 E60, I68, L73 및 H76 중 하나 이상에서 인간 TIGIT에 접촉한다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 잔기 Q56, N58, E60, I68 L73, H76 및 I109에서 인간 TIGIT에 접촉한다.

[0156] 그러한 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 잔기 Q56, N58, E60, I68, L73, H76 및 I109에서 만 인간 TIGIT에 접촉한다.

[0157] TIGIT의 어떤 잔기가 항체 또는 항원-결합 단편에 의해 접촉되는지를 결정하는 수단은 당업자에게 익숙하며, 실시예 23에 기재된 것과 같은 X-선 결정학을 포함한다.

[0158] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편과 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 또한 제공된다.

[0159] 항체 아형

[0160] TIGIT 항체는 VH 도메인 및 VL 도메인이 모두 존재하는 다양한 상이한 구체예를 취할 수 있다. 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 인간 TIGIT 단백질에 대한 적절한 면역학적 특이성을 나타내는 한 단일클론 항체(전장 단일클론 항체 포함), 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에서 사용된 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 다시 말해서, 집단을 차지하는 개별 항체가 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 또한, 항원상의 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 통상적인 (다중클론) 항체 제제와 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원상의 단일 결정인자 또는 에피토프에 대해 지시된

다.

- [0161] 비제한적 구체예에서, 본원에 제공된 TIGIT 항체는 CH1 도메인 및/또는 CL 도메인을 포함할 수 있고, 이의 아미노산 서열은 완전히 또는 실질적으로 인간이다. TIGIT 항체가 인간 치료 용도에 의도될 경우, 항체의 전체 불변 영역 또는 이의 적어도 일부가, 완전히 또는 실질적으로 인간 아미노산 서열을 갖는 것이 전형적이다. 그러므로, CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CL 도메인(및 존재할 경우 CH4 도메인) 중 하나 이상 또는 임의의 조합은 이의 아미노산 서열에 대해 완전히 또는 실질적으로 인간일 수 있다. 그러한 항체는 임의의 인간 동형일 수 있으며, 인간 IgG4 및 IgG1이 특히 바람직하다.
- [0162] 유리하게는, CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CL 도메인(및 존재할 경우 CH4 도메인) 모두 완전히 또는 실질적으로 인간 아미노산 서열을 가질 수 있다. 인간화 또는 키메라 항체, 또는 항체 단편의 불변 영역과 관련하여, 용어 "실질적으로 인간"은 인간 불변 영역과의 적어도 90%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 지칭한다. 이와 관련하여 용어 "인간 아미노산 서열"은 생식계열, 재배열된 및 체세포 돌연변이된 유전자를 포함하는 인간 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 지칭한다. 그러한 항체는 임의의 인간 동형일 수 있으며, 인간 IgG4 및 IgG1이 특히 바람직하다.
- [0163] 인간 서열에 대한 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 변경된 "인간" 서열의 불변 도메인을 포함하는 TIGIT 항체가 또한 제공된다.
- [0164] 본원에 제공된 TIGIT 항체는 임의의 동형일 수 있다. 인간 치료 용도로 의도된 항체는 전형적으로 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 유형, 흔히 IgG 유형일 것이며, 이 경우에 이들은 네 개의 서브-클래스 IgG1, IgG2a 및 b, IgG3 또는 IgG4 중 어느 것에 속할 수 있다. 이들 서브-클래스 각각에서 Fc 부분 내에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 수행하거나, 예를 들어 Fc-의존적 기능성을 향상시키거나 감소시키기 위한 다른 구조적 변형을 수행하는 것이 허용된다.
- [0165] 특정한 바람직한 구체예에서, 본원에 제공된 TIGIT 항체는 IgG 항체이다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG1 항체이다. 특정한 대안 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG4 항체이다.
- [0166] IgG4 항체는 Fab 암 교환(Fab arm exchange, FAE)을 겪는 것으로 알려져 있으며, 이는 IgG4 항체의 예측 불가능한 약력학적 특성을 야기할 수 있다. FAE는 힌지 영역에서 S228P 돌연변이에 의해 예방되는 것으로 나타났다(Silva *et al.* J Biol Chem. 2015 Feb 27; 290(9): 5462-5469). 그러므로, 본 발명에 따른 항체가 IgG4 항체인 그러한 특정한 구체예에서, 항체는 돌연변이 S228P - 즉, 위치 228(EU 번호부여에 따름)에서 세린에서 프롤린으로의 돌연변이를 포함한다.
- [0167] 비제한적 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실이 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 영역 안, 특히 Fc 영역 안에서 이루어질 수 있는 것으로 고려된다. 아미노산 치환은 상이한 자연 발생 아미노산 또는 비천연 또는 변형 아미노산으로 치환된 아미노산의 대체를 야기할 수 있다. 예를 들어 (예를 들어 N- 또는 O-연결된 글리코실화 부위의 첨가 또는 결실에 의한) 글리코실화 패턴 변화와 같은 다른 구조적 변형이 또한 허용된다. TIGIT 항체의 의도된 용도에 따라, Fc 수용체에 대한 결합 특성과 관련하여, 예를 들어 이펙터 기능을 조절하기 위해 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0168] 특정한 구체예에서, TIGIT 항체는 주어진 항체 동형, 예를 들어 인간 IgG1의 Fc 영역을 포함할 수 있으며, 이는 항체 동형과 자연적으로 연관된 하나 이상의 항체 이펙터 기능을 감소시키거나 실질적으로 제거하기 위해 변형된다.
- [0169] 본원에서 입증된 바와 같이, 세포 용해 이펙터 기능을 갖는 항체는 Treg 세포 집단 감소에서 효과적일 수 있지만, 놀랍게도, 통상적 이펙터 T 세포 집단에 악영향을 미치지 않는다. 이러한 선택성은 항-종양 이펙터 T 세포를 유지하면서 Treg의 조절 효과의 더 강력한 억제를 허용할 수 있다.
- [0170] 그러므로, 특정한 대안의 구체예에서, TIGIT 항체는 항체 동형과 자연적으로 연관된 하나 이상의 항체 이펙터 기능을 유지한다. 예를 들어, 본 발명의 TIGIT 항체는 ADCC 기능성을 유지하는 IgG1 항체일 수 있다. 추가의 구체예에서, TIGIT 항체는 주어진 항체 동형, 예를 들어 인간 IgG1의 Fc 영역을 포함할 수 있으며, 이는 항체 동형과 자연적으로 연관된 하나 이상의 항체 이펙터 기능을 향상시키기 위해 변형된다. 이와 관련하여, "항체 이펙터 기능"은 항체-의존성 세포 독성(ADCC), 보체-의존성 세포 독성(CDC) 및 항체-의존성 세포 포식작용(ADCP) 중 하나 이상 또는 모두를 포함한다.

- [0171] 특정한 구체예에서 항-TIGIT 항체는 변형된 항체이다.
- [0172] 특정한 구체예에서 TIGIT에 특이적인 제1 암 및 제2 표적에 특이적인 제2 암을 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다. 바람직한 구체예에서 제2 표적은 면역 관문 분자이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 OX40이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 ICOS이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 GITR이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 4-1BB이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 PD-1이다. 특정한 구체예에서, 제2 표적은 PD-L1이다. 특정한 구체예에서, TIGIT에 특이적인 제1 암은 본 발명에 따른 항체의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열의 조합을 포함한다. 특정한 구체예에서 제1 암은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 16을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 17을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 18을 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 61을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 62를 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 63을 포함한다.
- [0173] 본원에 개시된 TIGIT 항체와 "교차 경쟁"하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 본 발명의 TIGIT 항체가 결합하는 부위(들)와 동일하거나 이에 중첩되는 부위(들)에서 인간 TIGIT에 결합하는 것이다. 경쟁 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 예를 들어 항체 경쟁 검사에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 정제된 또는 부분적으로 정제된 인간 TIGIT의 샘플은 고체 지지체에 결합될 수 있다. 이후, 본 발명의 항체 화합물 또는 이의 항원 결합 단편 및 그러한 본 발명의 항체 화합물과 경쟁할 수 있는 것으로 의심되는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 첨가된다. 두 분자 중 하나가 표지된다. 표지 화합물 및 비표지 화합물이 TIGIT상의 분리된 별개의 부위에 결합하는 경우, 표지 화합물은 의심되는 경쟁 화합물이 존재하는지에 관계 없이 동일한 수준으로 결합할 것이다. 그러나, 상호작용 부위가 동일하거나 중첩되는 경우, 비표지 화합물이 경쟁할 것이며, 항원에 결합된 표지 화합물의 양이 적어질 것이다. 비표지 화합물이 과잉으로 존재하는 경우, 존재한다면, 매우 적은 표지 화합물이 결합할 것이다.
- [0174] 본 발명의 목적을 위해, 경쟁 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TIGIT에 대한 본 발명의 항체 화합물의 결합을 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 감소시키는 것이다. 그러한 경쟁 검사를 수행하는 절차의 세부 사항은 당해 분야에 공지이며, 예를 들어 Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988, 567-569, 1988, ISBN 0-87969-314-2에서 찾을 수 있다. 그러한 검사는 정제된 항체를 사용하여 정량적으로 이루어질 수 있다. 하나의 항체를 자체에 대해 적정하여 표준 곡선이 확립되는데, 즉, 동일한 항체가 표지 및 경쟁자 모두에 대해 사용된다. 플레이트에 대한 표지 분자의 결합을 억제하는 비표지 경쟁 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 능력이 적정된다. 결과를 플로팅하고, 원하는 정도의 결합 억제를 달성하는 데 필요한 농도를 비교한다.
- [0175] 본 발명의 항체는 TIGIT에 대한 높은 친화도를 나타내고 CD155와 경쟁한다.
- [0176] 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 TIGIT에 대한 높은 친화도를 나타낸다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체의 Fab 단편은 1×10^{-10} 내지 5×10^{-8} M, 임의로 7×10^{-10} 내지 4×10^{-8} M 범위의 ForteBio™에 의해 측정된 TIGIT에 대한 K_D 를 나타낸다. 특정한 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 1×10^{-11} 내지 5×10^{-9} M, 임의로 2×10^{-11} 내지 1×10^{-9} 범위의 MSD K_D 를 나타낸다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체의 Fab 단편은 1×10^{-10} M 내지 1×10^{-9} M, 임의로 1×10^{-10} 내지 7×10^{-10} M, 임의로 2×10^{-10} 내지 7×10^{-10} M 범위의 Biacore™에 의해 측정된 TIGIT에 대한 K_D 를 나타낸다.

[0177] 표 3

클론	ForteBio Fab KD 비오티닐화 인간 TIGIT His (M) 1가	ForteBio Fab KD 마우스 TIGIT-Fc (M) 1가	ForteBio Fab KD Cyno TIGIT-Fc (M) 1가	ForteBio IgG KD 인간 TIGIT-Fc (M) Avid	MSD - 1가 KD (M), 인간 TIGIT-His	Biacore - 1가 KD (M), 인간 TIGIT-His	세포 결합 Jurkat 인간 TIGIT FON (네거 티브와 비 교한 배수)	세포 결합 Jurkat 마우스 TIGIT FON (네거 티브와 비 교한 배수)
26518	1.24E-09	N.B.	4.47E-09	6.30E-10			154	233
29478	7.03E-10	9.18E-08	1.26E-09	5.27E-10			182	500
26452	5.08E-09	N.B.	N.B.	4.74E-10			164	47
29487	2.08E-09	N.B.	1.55E-07	3.96E-10			161	95
29489	8.81E-10	N.B.	3.52E-08	3.53E-10	1.1E-10	2.48E-10	162	187
31282	1.34E-09	N.B.	3.77E-08			2.94E-10		
26486	2.19E-08	N.B.	N.B.	5.89E-10			143	199
29499	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
29494	1.66E-09	5.36E-08	1.86E-08	3.76E-10	7.0E-11	2.70E-10	164	511
31288	2.09E-09		2.51E-08			1.92E-10		
32919	1.42E-09		6.57E-09				680	
32931	1.18E-09		1.97E-09				741	
29499	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
26521	9.87E-09	N.B.	1.49E-07	5.41E-10			146	218
29513	7.74E-10	8.55E-08	9.56E-09	3.92E-10	2.5E-11		156	406
26493	4.06E-08	2.67E-08	N.B.	1.49E-09			80	463
29520	1.31E-09	1.95E-09	2.68E-09	3.84E-10	2.1E-10	7.16E-10	166	535
29523	3.84E-09	1.89E-08	2.79E-08	5.31E-10	1.7E-09		150	502
29527	1.33E-09	2.02E-08	1.76E-08	3.50E-10	6.4E-10		142	414
26432	1.31E-08	N.B.	N.B.	4.62E-09				

[0178]

[0179]

실시예에서 입증된 바와 같이, 항체 31282는 트랜스제닉 세포에서 발현된 TIGIT에 대해 놀랍게도 높은 친화도를 나타낸다. 따라서, 특정한 구체예에서, 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 0.5 nM 미만의 인간 TIGIT에 대한 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 그러한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.05 내지 약 0.4 nM, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.3 nM, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.2 nM, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.15 nM의 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 특정한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.1 nM의 인간 TIGIT에 대한 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 항체는 항체 31282의 CDR을 포함한다. 바람직하게는 EC_{50} 은 실시예 18에 기재된 바와 같이 인간 TIGIT를 발현하는 Jurkat 세포를 사용하여 결정된다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 마우스 TIGIT 및/또는 시노몰구스 TIGIT와 교차 반응한다.

[0180]

"29..." 2세대 항체는 고도로 기능적인 모항체의 친화도 상속 자손이므로, 모항체와 적어도 유사하거나 동등한 기능적 특성을 나타낼 것으로 예상되며, 그 반대도 마찬가지이다.

[0181]

본원에 기재된 바와 같이, 특정한 구체예에서 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 CD8 T 세포에 의해 발현되고 Treg 세포에 의해 발현된 TIGIT에 대해 동등한 친화도를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, CD8 T 세포에 대한 친화도가 Treg 세포에 대한 친화도의 0.5-1.5 배의 범위일 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD8 T 세포 및 Treg 세포에 대해 "동등한 친화도"를 갖는다. 예를 들어, 0.03 nM의 Treg 세포에 대한 친화도를 나타내는 CD8 T 세포 및 Treg 세포에 대한 동등한 친화도를 갖는 항체는 0.015-0.045nM 범위의 CD8 T 세포에 대한 친화도를 나타낼 것이다.

[0182]

표 3은 항-본 발명의 TIGIT 항체의 친화도 특성의 요약을 제공하며, 회색 셀은 모항체 클론을 나타내고, 각 계통의 2세대 및 3세대 항체가 각각의 모항체 바로 아래 나타난다 (또한 표 2 참조).

[0183]

실시예에서 입증된 바와 같이, 항체 31282는 인간 일차 CD8+ T 세포에서 발현된 TIGIT에 대해 놀랍게도 높은 친화도를 나타낸다. 따라서, 특정한 구체예에서, 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 0.5 nM 미만의 인간 TIGIT에 대한 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 그러한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.05 내지 약 0.4 nM, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 0.3 nM의 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 특정한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.2 nM의 인간 TIGIT에 대한 결합 EC_{50} 을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 항체 31282의 CDR을 포함한다. 바람직하게는 EC_{50} 은 실시예 18에 기재된 바와 같이

인간 PBMC, 바람직하게는 건강한 개체의 CD8+ T 세포를 사용하여 결정된다.

- [0184] 침부된 실시예에서 입증된 것과 같이, 특정한 구체예에서 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 TIGIT-발현 CD8 T 세포에 대한 높은 친화도 및 TIGIT-발현 Treg 세포에 대한 높은 친화도를 나타낸다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 0.5nM 미만, 바람직하게는 0.3nM 미만, 바람직하게는 0.2nM 미만의 EC₅₀을 특징으로 하는 TIGIT-발현 CD8 T 세포 및 TIGIT-발현 Treg 세포에 대한 친화도를 나타낸다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 TIGIT-발현 CD8 T 세포 및 TIGIT-발현 Treg 세포에 대해 동등한 친화도를 나타낸다.
- [0185] 본 발명에 따른 항체(예를 들어 항체 31282)는 암 환자의 CD8+ T 세포에 대해 놀랍게도 높은 친화도를 나타낸다. 이는 TIGIT 신호전달의 억제에 의한 암 환자의 T 세포의 이펙터 활성 증가가 더욱 효과적인 종양 제거를 야기할 수 있기 때문에 특히 유리하다. 따라서, 특정한 구체예에서, 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 암 환자의 인간 CD8+ T 세포에서 인간 TIGIT에 대해 0.5 nM 미만의 결합 EC₅₀을 나타낸다. 그러한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.05 내지 약 0.4 nM, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 0.3 nM의 결합 EC₅₀을 나타낸다. 특정한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.1 nM 내지 약 0.2 nM의 인간 TIGIT에 대한 EC₅₀을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 항체 31282의 CDR을 포함한다. 바람직하게는 EC₅₀은 실시예 18에 기재된 바와 같이 암 환자로부터 취한 PBMC의 CD8+ T 세포를 사용하여 결정된다.
- [0186] 침부된 실시예에서 입증된 것과 같이, 특정한 구체예에서 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 TIGIT 결합에 대해 CD155/PVR와 경쟁한다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 0.2nM 이하, 바람직하게는 0.1nM 이하의 IC₅₀을 특징으로 하는 CD155와의 경쟁을 나타낸다. 특정한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.05 nM 이하의 IC₅₀을 특징으로 하는 CD155와의 경쟁을 나타낸다. 특정한 바람직한 구체예에서, 나타난 IC₅₀은 약 0.05 nM이다. 이론에 얽매이지 않고, TIGIT 결합에 대한 CD155와의 항체의 경쟁은 CD155-유도된 TIGIT-매개 신호전달의 수준을 감소시켜, 이펙터 T 세포 활성화의 수준을 증가시킬 것으로 예상된다.
- [0187] 본 발명은 본원에 기재된 항체의 "친화도 변이체"를 추가로 제공한다.
- [0188] 본 발명은 또한 인간 TIGIT에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편과 교차 경쟁하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0189] 본 발명의 항체는 전-염증성 T 세포 활성을 촉진한다
- [0190] 본 발명에 따른 항체(예를 들어 항체 31282)는 CD8+ T 세포의 전-염증성 활성 촉진에서 놀랍게도 효과적이다. 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편(특히 31282)은 비교기 항-TIGIT 항체보다 전-염증성 CD8+ T 세포 활성 (IFN γ 방출에 의해 지시됨) 촉진에 더욱 효과적이다 (도 24 참조). 비교기 항체에 대한 이러한 개선된 효능은 TIGIT-발현 트랜스제닉 Jurkat 리포터 세포 및 일차 CD8 T 세포에서 입증되었다. 따라서, 특정한 구체예에서, 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 실시예 19에 기재된 바와 같이 리포터 세포에 의해 발현된 인간 TIGIT에 대해 5 nM 미만의 활성화 EC₅₀을 나타낸다. 그러한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 1 nM 내지 약 4 nM, 바람직하게는 약 2 nM 내지 약 4 nM의 EC₅₀을 나타낸다.
- [0191] 특정한 구체예에서, 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 실시예 19에 기재된 바와 같이 건강한 개체의 CD8 T 세포에 대해 0.4 nM 미만의 활성화 EC₅₀을 나타낸다. CD8 T 세포 활성(즉 전-염증성 활성)은 염증성 사이토카인(예를 들어 IFN γ) 생성에 의해 측정될 수 있다. 그러한 바람직한 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 바람직하게는 약 0.1 nM 내지 약 0.2 nM의 EC₅₀을 나타낸다. 바람직하게는 EC₅₀은 실시예 19에 기재된 바와 같이 건강한 개체로부터 취한 PBMC의 CD8+ T 세포를 사용하여 결정된다.
- [0192] 제공된 항-TIGIT 항체가 감마-델타(γ δ 또는 g/d) T 세포(즉 통상적 α β TCR 서브유닛과 대조적으로 γ δ TCR 서브유닛을 발현하는 T 세포)의 활성 증가에 효과적임이 침부된 실시예에서 부가적으로 놀랍게도 입증되었다. 그러한 γ δ T 세포는 면역 체계의 독특하고 중요한 성분을 형성하고 이들 세포의 활성을 촉진시키는 본원에 제공된 항체의 능력은 항체의 유용성을 강조한다.

- [0193] 따라서, $\gamma\delta$ T 세포의 집단을 항-TIGIT 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 $\gamma\delta$ T 세포 활성을 촉진시키는 방법이 본원에 또한 제공된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 시험관내 수행된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 인간 대상에서 생체내 수행된다. 그러한 특정한 구체예에서 인간 대상은 암을 가진다. 특정한 구체예에서 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 본 발명에 따른 항체의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열의 조합을 포함한다. 특정한 구체예에서 항-TIGIT 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 16을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 17을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 18을 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 61을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 62를 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 63을 포함한다.
- [0194] T-REG 세포의 선택적 고갈
- [0195] 본원에서 입증된 바와 같이, 항-TIGIT 항체는 TIGIT-발현 Treg 세포를 선택적으로 고갈시킬 수 있다. 즉, 항-TIGIT 항체는 이펙터 또는 메모리 CD4 또는 CD8 T 세포의 비율을 감소시키는 것보다 T 세포의 전체 집단에 대한 TIGIT-발현 Treg 세포의 비율을 더 큰 정도로 감소시킨다.
- [0196] 특정한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TIGIT-발현 Treg 세포를 선택적으로 고갈시킨다.
- [0197] 이러한 TIGIT-발현 Treg 세포의 선택적 고갈은 TIGIT-발현 Treg의 선택적 용해(예를 들어 ADCC 또는 CDC에 의해(도 20, 21 및 25 참조)를 통해 매개될 수 있다. TIGIT-발현 Treg는 TIGIT를 발현하지 않는 Treg보다 더 강력한 조절 세포인 것으로 이해된다. 이론에 얽매이지 않고, TIGIT-발현 Treg 세포의 용해에 의한 선택적 고갈은 Treg 세포의 전체 수를 고갈시키고 또한 더 강력한 조절 기능을 나타내는 Treg 세포를 고갈시켜 T 세포 이펙터 기능(예를 들어 T-세포 매개된 세포독성, 전-염증성 사이토카인 방출)을 증가시키는 것으로 예상된다. 이러한 증가된 T 세포 이펙터 기능은 도 24에서 입증된다.
- [0198] 그러므로, 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 TIGIT-발현 Treg 세포를 선택적으로 용해시킨다.
- [0199] TIGIT를 발현하는 Treg 세포의 선택적 고갈은 또한 TIGIT 수용체가 더 이상 세포막에서 발현되지 않도록 이의 내재화를 유도하여 매개될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, TIGIT+ Treg 세포가 TIGIT- Treg 세포가 되도록 TIGIT 내재화를 유도하여, 이들 세포의 조절 기능은 덜 강력해질 것으로 예상된다(TIGIT+ Treg가 더 강력한 조절 세포이기 때문에). 수용체 내재화 및 후속의 이들 Treg의 조절 효능 감소의 결과로, T 세포 이펙터 기능은 증가할 것으로 예상된다. 그러므로, 특정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은, 바람직하게는 TIGIT-발현 Treg 세포에 의한 TIGIT의 내재화를 유도함으로써, TIGIT-발현 Treg 세포의 억제 활성을 억제한다.
- [0200] 본 발명에 따른 항-TIGIT 항체는 CD8 T 세포 및 Treg 세포에 대해 높은 친화도를 나타내고 또한 Treg 세포의 선택적 고갈을 나타내서, 두 가지 메커니즘을 통해 T 세포 이펙터 기능을 촉진시키는 것이 특히 유리하다. 항체 이펙터 기능(예를 들어 ADCC, CDC)의 유지는 Treg의 효과적인 고갈을 야기하고 선택성은 항체 이펙터 기능이 이펙터 T 세포의 원하지 않는 고갈을 초래하지 않음을 의미한다. 선택성은 특히 놀라운데, 항-TIGIT 항체를 제조하기 위한 이전의 시도는 TIGIT를 발현하는 이펙터 T 세포의 용해를 피하기 위해 항체 이펙터 기능 제거를 추구했기 때문이다. 더욱이, 본 발명의 TIGIT 항체가 이펙터 T 세포(예를 들어 CD8 T 세포)에 대한 친화도를 나타내기 때문에, 이들 세포에서의 TIGIT-매개 신호전달은 CD155 결합에 대한 경쟁 및/또는 이펙터 T 세포에서 TIGIT의 내재화 유도에 의해 억제될 수 있다. 조합하여, 본 발명의 항체의 이러한 효과는 T 세포 이펙터 기능의 현저한 상향조절을 야기할 수 있다.
- [0201] 본 발명에 따른 항체 및 항원 결합 단편에 의해 나타나는 추가의 놀라운 유리한 특성은 종양 침윤 림프구(TIL)의 T 세포 이펙터 기능(예를 들어 전염증성 사이토카인의 방출)을 증가시키는 것을 포함한다. 종양 미세환경에 대한 노출은 아마도 항원 과다-노출 및/또는 면역억제 종양 미세환경으로 인하여, 무력성(anergic) 또는 소위 "탈진된(exhausted)" 표현형을 발현하는 TIL을 야기할 수 있다. TIL의 이펙터 기능 향상은 이들 세포가 종양 자체에 침투하고 따라서 종양 크기 또는 성장을 감소시키기에 가장 적합한 장소에 위치된 것이므로 바람직하다; 그러나 많은 TIL의 무력성 또는 탈진된 표현형으로 인해, 이펙터 기능을 강화시키는 것이 어려울 것으로 예상된다. 그러므로 본 발명의 항체에 노출된 후 TIL의 전염증성 반응 증가는 놀랍고 항체가 특히 효과적인 치료제일 수 있음을 나타낸다.
- [0202] 항체 및 항원 결합 단편에 의해 나타나는 더욱 놀라운 유리한 특성은 감마-델타($\gamma\delta$) T 세포의 전-염증성 활성을 증가시키는 능력을 포함한다. $\gamma\delta$ T 세포와 같은 비통상적 T 세포의 활성을 촉진시키는 능력은 항-TIGIT 항체에 대해 이전에 보고된 바 없으며 $\gamma\delta$ T 세포가 중요한 것으로 알려진 암 이외의 질병을 치료할 가능성을

제공한다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 병원성 감염(세균, 바이러스 (예를 들어 CMV), 진균)에 대한 반응에 관여하고 또한 자가면역 질병으로부터 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되었다. 또한, 비통상적 T 세포의 활성을 촉진시키는 놀라운 능력은 항체의 항-종양 효과에 추가의 효능을 제공한다.

[0203] 다른 양태에서 T 세포의 집단을 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시켜, 항-TIGIT 항체가 Treg 세포의 집단을 선택적으로 고갈시키는 것을 포함하는, T 세포의 집단으로부터 Treg 세포를 선택적으로 고갈시키는 방법이 제공된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 *시험관내* 수행된다. 특정한 구체예에서 상기 방법은 인간 대상에서 *생체내* 수행된다. 그러한 특정한 구체예에서 인간 대상은 암을 가진다. 특정한 구체예에서 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 본 발명에 따른 항체의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열의 조합을 포함한다. 특정한 구체예에서 항-TIGIT 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 16을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 17을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 18을 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 61을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 62를 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 63을 포함한다.

[0204] 첨부된 실시예에서 입증된 것과 같이, 본 발명은 또한 TIGIT 결합에 대해 CD155/PVR과 경쟁하지 않는 항-TIGIT 항체를 제공한다. 그러므로, 다른 양태에서, 본 발명은 인간 TIGIT 결합에 대해 CD155/PVR과 경쟁하지 않는 인간 TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 그러한 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 CD155 비-경쟁적 항-TIGIT 항체의 Fab 단편은 5×10^{-9} 내지 5×10^{-8} M, 임의로 1×10^{-8} 내지 3×10^{-8} M 범위의 ForteBio™에 의해 측정된 TIGIT에 대한 K_D 를 나타낸다.

[0205] 특정한 바람직한 구체예에서, 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 280을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 281을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 282를 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 292를 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 293을 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 294를 포함한다. 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 333으로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 334로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0206] VH 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 333으로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:333의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3(각각 서열 번호:280, 281 및 282)과 동일한 중쇄 CDR을 포함할 수 있다. 마찬가지로, VL 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 334으로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:334의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3(각각 서열 번호:292, 293 및 294)과 동일한 경쇄 CDR을 포함할 수 있다.

[0207] 특정한 바람직한 구체예에서, 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있고 여기서 HCDR1은 서열 번호: 353을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 354를 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 355를 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 356을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 357을 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 358을 포함한다. 그러한 특정한 구체예에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 367로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 368로 나타나는 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0208] VH 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 367로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:367의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3(각각 서열 번호:353, 354 및 355)과 동일한 중쇄 CDR을 포함할 수 있다. 마찬가지로, VL 도메인의 아미노산 서열이 서열 번호: 368로 나타난 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내는 구체예는 그럼에도 불구하고 프레임워크 영역 내의 아미노산 서열 변이를 나타내면서 서열 번호:368의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3(각각 서열 번호:356, 357 및 358)과 동일한 경쇄 CDR을 포함할 수 있다.

[0209] 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 발현 시스템

[0210] 본 발명은 또한 본 발명의 TIGIT 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자, 또한 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 항원 결합 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조절 서열 숙주에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 TIGIT 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터, 및 이러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템을 제공한다.

- [0211] 본 발명의 TIGIT 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자는, 예를 들어 재조합 DNA 분자를 포함한다. 본원에서 상호 교환적으로 사용된 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드 분자"는 단일- 또는 이중-가닥인 임의의 DNA 또는 RNA 분자, 단일-가닥일 경우, 이의 상보성 서열의 분자를 지칭한다. 핵산 분자 논의에 있어서, 특정 핵산 분자의 서열 또는 구조는 서열을 5'에서 3' 방향으로 제공하는 일반적인 관례에 따라 본원에 기재될 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 "단리된다". 이 용어는, 핵산 분자에 적용될 경우, 그것이 유래한 유기체의 자연 발생 유전체에서 바로 인접한 서열로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 예를 들어, "단리된 핵산"은 벡터, 예컨대 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 삽입되거나, 원핵 또는 진핵 세포 또는 비인간 숙주 유기체의 유전체 DNA에 통합된 DNA 분자를 포함할 수 있다. RNA에 적용될 경우, 용어 "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 위에 정의된 바와 같은 단리된 DNA 분자에 의해 인코딩된 RNA 분자를 주로 지칭한다. 대안으로, 상기 용어는 천연 상태(즉, 세포 또는 조직에서)와 관련된 다른 핵산으로부터 정제/분리된 RNA 분자를 지칭할 수 있다. 단리된 폴리뉴클레오타이드(DNA 또는 RNA)는 생물학적 또는 합성 수단에 의해 직접 생성되고 이의 생성 동안 존재하는 다른 성분으로부터 분리된 분자를 추가로 나타낼 수 있다.
- [0212] 본 발명에 따른 TIGIT 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 (표준 분자 생물학 기술을 사용하여) 제조되고, 선택된 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서의 발현을 위한 복제 가능 벡터에 삽입될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 고급 진핵생물 세포, 구체적으로 포유류 세포일 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-74, 1977); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포 /-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980; 또는 CHO-K1, ATCC CCL-61과 같은 CHO 유도 클론, Kao and Puck, Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 60:1275-1281, 1968); 마우스 세르톨리 세포 (TM4; Mather, Biol. Reprod. 23:243-252, 1980); 마우스 골수종 세포 SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) 또는 NS0 (HPA 배양 수집 번호 85110503); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 라인 (Hep G2), 또한 DSM의 PERC-6 세포주이다. 이들 숙주 세포 각각에서 사용하기에 적합한 발현 벡터가 또한 당해 분야에서 일반적으로 공지이다.
- [0213] 용어 "숙주 세포"는 일반적으로 배양된 세포주를 지칭함에 유념해야 한다. 본 발명에 따른 항원 결합 폴리펩타이드를 인코딩하는 발현 벡터가 도입된 전체 인간은 "숙주 세포"의 정의에서 명백하게 배제된다.
- [0214] 중요한 양태에서, 본 발명은 TIGIT 항체의 발현을 허용하는 조건 하에 TIGIT 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어 발현 벡터)를 포함하는 숙주 세포(또는 무세포 발현 시스템)를 배양하는 단계 및 발현된 TIGIT 항체를 회수하는 단계를 포함하는 본 발명의 TIGIT 항체 제조 방법을 또한 제공한다. 이러한 재조합 발현 공정은 인간 치료 용도에 의도된 단일클론 항체를 포함하여 본 발명에 따른 TIGIT 항체의 대규모 생산에 사용될 수 있다. 생체내 치료 용도에 적합한 재조합 항체의 대규모 제조에 적합한 벡터, 세포주 및 생산 공정이 당해 분야에서 일반적으로 이용 가능하고 당업자에게 공지일 것이다.
- [0215] 그러므로, 본 발명에 따라 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합이 제공되고, 여기서 조합은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0216] (i) 서열 번호: 16을 포함하는 HCDR1, 서열 번호: 17을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:18을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:61을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:62를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:63을 포함하는 LCDR3;
- [0217] (ii) 서열 번호:4를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:5를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:6을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:49를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:50을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:51을 포함하는 LCDR3;
- [0218] (iii) 서열 번호:7을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:8을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:9를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:52를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:53을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:54를 포함하는 LCDR3;

- [0219] (iv) 서열 번호:10을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:11을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:12를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:55를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:56을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:57을 포함하는 LCDR3;
- [0220] (v) 서열 번호:13을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:14를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:15를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:58을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:59를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:60을 포함하는 LCDR3;
- [0221] (vi) 서열 번호:1을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:2를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:3을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:46을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:47을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:48을 포함하는 LCDR3;
- [0222] (vii) 서열 번호:19를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:20을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:21을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:64를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:65를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:66을 포함하는 LCDR3;
- [0223] (viii) 서열 번호:22를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:23을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:24를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:67을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:68을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:69를 포함하는 LCDR3;
- [0224] (ix) 서열 번호:25를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:26을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:27을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:70을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:71을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:72를 포함하는 LCDR3;
- [0225] (x) 서열 번호:28을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:29를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:30을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:73을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:74를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:75를 포함하는 LCDR3;
- [0226] (xi) 서열 번호:31을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:32를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:33을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:76을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:77을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:78을 포함하는 LCDR3;
- [0227] (xii) 서열 번호:34를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:35를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:36을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:79를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:80을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:81을 포함하는 LCDR3;
- [0228] (xiii) 서열 번호:37을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:38을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:39를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:82를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:83을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:84를 포함하는 LCDR3;
- [0229] (xiv) 서열 번호:40을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:41을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:42를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:85를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:86을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:87을 포함하는 LCDR3;
- [0230] (xv) 서열 번호:43을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:44를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:45를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:88을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:89를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:90을 포함하는 LCDR3;
- [0231] (xvi) 서열 번호:271을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:272를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:273을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:283을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:284를 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:285를 포함하는 LCDR3;
- [0232] (xvii) 서열 번호:274를 포함하는 HCDR1, 서열 번호:275를 포함하는 HCDR2, 서열 번호:276을 포함하는 HCDR3, 서열 번호:286을 포함하는 LCDR1, 서열 번호:287을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:288을 포함하는 LCDR3;
- [0233] (xviii) 서열 번호:277을 포함하는 HCDR1, 서열 번호:278을 포함하는 HCDR2, 서열 번호:279를 포함하는 HCDR3, 서열 번호:289를 포함하는 LCDR1, 서열 번호:290을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호:291을 포함하는 LCDR3.
- [0234] 특정한 구체예에서 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합이 제공되고 여기서:
- [0235] (i) HCDR1은 서열 번호: 16을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR2는 서열 번호: 17을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR3은 서열 번호:18을 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR1은 서열 번호:61을 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR2는 서열 번호:62를 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR3은 서열 번호:63을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0236] 또한 본 발명에 따라 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 조합이 제공된다. 특정한 구체예에서 본원에 제공된 항체 31282, 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0237] 또한, 본 발명에 따르면 항-TIGIT 항체의 VH 및/또는 VL 도메인을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공되며, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호: 241-270, 335-342 및 369-370으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 특정한 구체예에서, 단리된 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호: 251에 따른 서열 및/또는 서열 번호: 252에 따른 서열을 포함한다. 특정한 구체예에서 폴리뉴클레오타이드가 서열 번호: 251

에 따른 서열 및 서열 번호: 252에 따른 서열을 포함하는 경우, 서열은 인접한다. 특정한 구체예에서 폴리뉴클레오타이드가 서열 번호: 251에 따른 서열 및 서열 번호: 252에 따른 서열을 포함하는 경우, 서열은 인접하지 않는다.

[0238] 또한, 본 발명에 따르면 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 항원 결합 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.

[0239] 또한, 본 발명에 따르면 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템이 제공된다.

[0240] 또한, 본 발명에 따르면 항체 또는 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 본 발명에 따른 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템을 배양하는 단계 및 발현된 항체 또는 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 제조항체 또는 이의 항원 결합 단편 제조 방법이 제공된다.

[0241] 약제학적 조성물

[0242] 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 함께 제제화된 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본원에 제공된다. 그러한 조성물은 TIGIT 항체 중 하나 또는 조합(예를 들어, 둘 이상의 상이한)을 포함할 수 있다. 인간 치료 용도를 위한 항체 배합 기술이 당해 분야에서 공지이고, 예를 들어, Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007에서 검토된다.

[0243] 본원에 제공된 TIGIT 항체 및 약제학적 조성물은 질병, 특히 TIGIT 기능의 억제로부터 이익을 얻는 병태의 요법, 특히 치료적 치료에서 유용성을 갖는다.

[0244] 조합 생성물

[0245] 본원에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 관문 억제제 - 구체적으로 항-ICOS 길항제 항체 또는 항-PD-1 항체(즉, 인간 면역조절 분자 PD-1에 특이적인 길항제 항체)와 병용으로 투여될 때 특히 효과적이다. 항-ICOS 또는 항-PD-1 항체와 병용으로 항-TIGIT 항체의 투여는 두 항체 단독과 비교하여 종양 성장의 상승적 감소를 야기한다. 본 발명에 따른 항-TIGIT 항체 및 항-PD-L1 항체의 조합물을 사용하여 유사한 효과가 관찰될 것으로 예상된다.

[0246] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 면역 관문 공동-자극 분자에 특이적인 작용제 항체 - 구체적으로 항-4-1BB, 항-OX40 또는 항-GITR 작용제 항체와 병용으로 투여될 때 특히 효과적임이 본원에서 추가로 입증되었다. 항-4-1BB, 항-OX40 또는 항-GITR 작용제 항체와 병용된 항-TIGIT 항체의 투여는 두 항체 단독과 비교하여 종양 성장의 상승적 감소를 야기한다.

[0247] 다른 양태에서 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 화학요법제, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-ICOS 항체 중 하나 이상을 포함하는 조합 생성물이 제공된다. 특정한 바람직한 구체예에서, 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 본 발명에 따라 제공된 항체 또는 항원 결합 단편이다. 가장 바람직한 구체예에서, 항-TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서:

[0248] HCDR1은 서열 번호: 16(YTFTSYMH)을 포함하고,

[0249] HCDR2는 서열 번호: 17(VIGPSGASTSYAQKFQG)을 포함하고,

[0250] HCDR3은 서열 번호: 18(ARDHSDYWSGIMEV)을 포함하고,

[0251] LCDR1은 서열 번호: 61(RASQSVRSSYLA)을 포함하고,

[0252] LCDR2는 서열 번호: 62(GASSRAT)를 포함하고, 그리고

[0253] LCDR3은 서열 번호: 63(QQYFSPWT)을 포함한다.

[0254] 암 또는 바이러스 감염 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 제공된 조합물이 제공되며, 여기서 임의로 바이러스 감염은 CMV 감염이다. 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 본원에 제공된 조합물이 추가로 제공된다.

[0255] 본원에서 사용되는 바와 같이, 둘 이상의 활성제가 "병용", "치료적 병용" 또는 "병용 요법" (용어는 상호 교환적으로 사용됨)으로 제공되는 경우, 이는 단일 조성물로 제제화되는 것을 필요로 하지 않거나 배제하지 않는다. 병용 요법은 환자가 각각의 활성제로부터 이익을 얻을 수 있도록 투여될 둘 이상의 활성제의 통상적인 해석이 주어진다. "병용 요법"은 공동-제제, 공동-투여, 동시 투여 또는 고정 용량 제제를 필요로 하지 않는다.

- [0256] 치료 방법
- [0257] 본원에 제공된 TIGIT 항체, 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적 조성물은 생체내 암성 종양 세포의 성장을 억제하는 데 사용될 수 있고 그러므로 종양의 치료에 유용하다.
- [0258] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 인간 환자에서 종양 세포 성장을 억제하는 방법 및 또한 암을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이고, 이는 이를 필요로 하는 환자에게 유효량의 본원에 기재된 TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 약제학적 조성물, 또는 본원에 기재된 조합물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0259] 본 발명의 또 다른 양태는 인간 환자에서 종양 세포의 성장 억제에 사용하기 위한 본원에 기재된 TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 인간 환자에서 암을 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본원에 기재된 TIGIT 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0260] 또 다른 양태에서 본 발명은 암 환자에서 Treg 세포를 선택적으로 고갈시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 특정한 구체예에서, 항-TIGIT 항체는 잔기 Q56, N58, E60, I68 L73, H76 및 I109를 포함하고, 바람직하게는 잔기 Q56, N58, E60, I68 L73, H76 및 I109로 이루어지는 인간 TIGIT 상의 에피토프에 결합한다. 특정한 구체예에서, 항-TIGIT 항체는 본원에 제공된 항-TIGIT 항체이다.
- [0261] 특정한 구체예에서, 항-TIGIT 항체는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합을 포함하고, 여기서: HCDR1은 서열 번호: 16(YTFTSYMH)을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR2는 서열 번호: 17(VIGPSGASTSYAQKFQG)을 포함하거나 이로 이루어지고, HCDR3은 서열 번호: 18(ARDHSDYWSGIMEV)을 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR1은 서열 번호: 61(RASQSVRSYLA)을 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR2는 서열 번호: 62(GASSRAT)를 포함하거나 이로 이루어지고, LCDR3은 서열 번호: 63(QQYFSPWT)을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0262] 특정한 바람직한 구체예에서, 치료될 환자는 다음으로부터 선택된 암을 갖는다: 신장암 (예를 들어, 신장 세포암종), 유방암, 뇌종양, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병을 포함하는 만성 또는 급성 백혈병, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 림프구성 림프종, 원발성 CNS 림프종, B-세포 림프종 (예를 들어 CLL), T-세포 림프종 (예를 들어 세자리 증후군)), 비인두 암종, 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 전립선암, 결장암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목의 암 (예를 들어 두경부 편평세포 암종 (HNSCC)), 피부 암종, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 식도의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 소아의 고형 종양, 방광의 암, 신장 또는 요관의 암, 신우의 암종, 중추신경계(CNS)의 신 생물, 종양 혈관신생, 척추 축 종양, 뇌간 교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양 암, 편평세포 암, 중피종. 특정한 구체예에서, 억제된 암은 폐암, 방광암, 유방암, 신장암(예를 들어 신장 암종), 두경부암(예를 들어 HNSCC), 또는 결장암(예를 들어 결장 선암종)이다. 특정한 구체예에서, 암은 결장암(예를 들어 결장 선암종) 또는 폐암이다. 특정한 구체예에서, 암은 혈액암이다. 그러한 특정한 구체예에서, 암은 림프종이다. 특정한 구체예에서 암은 T 세포 림프종 또는 B 세포 림프종이다.
- [0263] 특정한 구체예에서, 암 치료 방법은 추가적인 치료제, 예를 들어 화학요법제의 투여를 추가로 포함한다.
- [0264] 본원에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 관문 억제제 - 구체적으로 항-ICOS 길항제 항체 또는 항-PD-1 항체(즉, 인간 면역조절 분자 PD-1에 특이적인 길항제 항체)와 병용으로 투여될 때 특히 효과적이다. 항-ICOS 또는 항-PD-1 항체와 병용으로 항-TIGIT 항체의 투여는 두 항체 단독과 비교하여 종양 성장의 상승적 감소를 야기한다. 본 발명에 따른 항-TIGIT 항체 및 항-PD-L1 항체의 조합물을 사용하여 유사한 효과가 관찰될 것으로 예상된다.
- [0265] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 면역 관문 공동-자극 분자에 특이적인 작용제 항체 - 구체적으로 항-4-1BB, 항-OX40 또는 항-GITR 작용제 항체와 병용으로 투여될 때 특히 효과적임이 본원에서 추가로 입증되었다. 항-4-1BB, 항-OX40 또는 항-GITR 작용제 항체와 병용된 항-TIGIT 항체의 투여는 두 항체 단독과 비교하여 종양 성장의 상승적 감소를 야기한다.
- [0266] 그러므로, 대상에게 유효량의 본 발명에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것 및 또한 유효량의 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 및 항 GITR 항체, 또는 항-ICOS 항체를 투여하는 것을 포함하는 대상에서 암을 치료하는 방법이 본원에 또한 제공된다.

- [0267] 또한, 항-TIGIT 항체가 $\gamma\delta$ 세포뿐만 아니라 통상적 T 세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 입증하는 본원에 제공된 데이터는 항-TIGIT 항체가 암 이외의 병태 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다. 특히, $\gamma\delta$ T 세포는 감염, 예를 들어 세균, 진균 또는 바이러스 감염에 대한 반응에서 중요한 것으로 알려져 있다. 실시예 29에 나타나는 바와 같이, 항-TIGIT 항체와 접촉할 때, CMV 혈청반응양성 대상의 $\gamma\delta$ T 세포는 IFN γ 색선 증가를 특징으로 하는 현저하게 증가된 활성화를 나타낸다. 이러한 방식으로 CMV 환자에서 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화를 촉진하는 능력은 항-TIGIT 항체의 투여가 $\gamma\delta$ T 세포의 항바이러스 활성을 촉진할 것임을 나타낸다.
- [0268] 따라서, 유효량의 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단백을 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 바이러스 감염을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 유효량의 본원에 제공된 항-TIGIT 항체 또는 항원-결합 단백질 또는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하여 바이러스 감염을 치료하는 것을 포함하는, 대상에서 바이러스 감염을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 바람직한 구체예에서, 바이러스 감염은 CMV 감염이다.
- [0269] 특정한 구체예에서, 상기 방법은 하나 이상의 추가적인 치료제의 투여를 추가로 포함한다. 특정한 구체예에서, 하나 이상의 치료제는 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항 GITR 항체 및 항-ICOS 항체로부터 선택된다.
- [0270] 실시예에 입증된 바와 같이, 본원에 개시된 항-TIGIT 항체는 T 세포 활성, 특히 전-염증성 T 세포 활성 촉진에 효과적이다. T 세포 활성은 당업자에게 익숙한 방법에 의해, 예를 들어 실시예에 기재된 바와 같은 IFN γ 생성 측정에 의해 측정될 수 있다.
- [0271] 따라서, T 세포의 집단을 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단백질과 접촉시키는 것을 포함하는 T 세포 활성 촉진 방법이 본원에 또한 제공된다.
- [0272] 특정한 구체예에서, T 세포 활성 촉진 방법은 *시험관내* 수행된다. 특정한 구체예에서, T 세포 활성 촉진 방법은 인간 대상에서 *생체내* 수행된다. 그러한 특정한 구체예에서, 인간 대상은 암을 가진다. 특정한 구체예에서, 인간 대상은 바이러스 감염, 예를 들어 CMV 감염을 가진다.
- [0273] 특정한 구체예에서, 상기 방법은 통상적 $\alpha\beta$ T 세포 활성을 촉진시킨다. 특정한 구체예에서, 상기 방법은 CD4 T 세포 활성을 촉진시킨다. 특정한 구체예에서, 상기 방법은 CD8 T 세포 활성을 촉진시킨다. 특정한 구체예에서, 상기 방법은 $\gamma\delta$ (감마-델타) T 세포 활성을 촉진시킨다.
- [0274] 본원에 기재된 항-TIGIT 항체는 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항 GITR 항체, 또는 항-ICOS 항체와 병용으로 사용될 때 T 세포 활성 촉진에 특히 효과적일 것임이 실시예에서 추가로 입증된다. 유의하게, 상기 병용은 상승적 (즉 부가적보다 더 큼) T 세포 활성 증가를 제공한다.
- [0275] 따라서, 특정한 구체예에서, T 세포 활성 촉진 방법은 T 세포의 집단을 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-41BB 항체, 항-OX40 항체, 항 GITR 항체 및 항-ICOS 항체 중 하나 이상과 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0276] 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않는 본원에 기재된 본 발명의 구체예의 변형 및 등가물이 당업자에게 익숙할 것이다. 본 발명은 다음의 비제한적 실시예를 참조하여 추가로 이해될 것이다.
- [0277] **실시예**
- [0278] **실시예 1: TIGIT 항원-결합 단백질의 선별**
- [0279] TIGIT ABP는, 예를 들어, W02009036379; W02010105256; W02012009568; 및 Xu et al., *Protein Eng Des Sel.*, Vol. 26(10), pp. 663-670 (2013))에 일반적으로 설명된 바와 같이, 더욱 구체적으로는 아래에 제공되는 바와 같이 효모 세포의 표면에서 IgG 형식으로 발현되고 제시된 인간 항체의 합성 라이브러리로부터 선별되었다. 재조합 라이브러리로부터 단리된 ABP의 서열 및 특징이 도 1 내지 6에 제공된다.
- [0280] 각각 $\sim 10^9$ 다양성의 여덟 개의 나이브 인간 합성 효모 라이브러리가 이전에 설명된 바와 같이 번식되었다(예를 들어, Xu et al., 2013; W02009036379; W02010105256; 및 W02012009568 참조). 처음 두 라운드의 선별에 대해, Miltenyi MACS 시스템을 이용하는 자기 비드 분류 기술이 설명된 바와 같이 수행되었다(예를 들어, Siegel et al., 2004 참조). 간단히, 효모 세포($\sim 10^{10}$ 세포/라이브러리)를 FACS 세척 버퍼(인산염-완충 식염수(PBS)/0.1% 소 혈청 알부민(BSA))에서 비오틴화 TIGIT-Fc 항원(Creative Biomart)과 함께 인큐베이션했다. 50 ml 빙냉 세척 버퍼로 한 번 세척한 후, 세포 펠렛을 40 mL 세척 버퍼에 재현탁시키고, 스트렙타비딘 마이크 로비드(500 μ l)를 효모에 첨가하고 15 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 다음으로, 효모를 펠렛화하고, 5 mL

세척 버퍼에 재현탁시키고, Miltenyi LS 컬럼에 로딩했다. 5 mL를 로딩한 후, 컬럼을 3 mL FACS 세척 버퍼로 3 회 세척했다. 이후 컬럼을 자기장으로부터 제거하고, 효모를 5 mL의 성장 배지로 용출시킨 다음 밤새 성장시켰다. 효모 세포측정법을 사용하여 다음 라운드의 분류를 수행했다. 대략 1×10^8 효모를 펠렛화하고, 세척 버퍼로 세 번 세척하고, 비오틴화 TIGIT-Fc 용합 항원(10 nM)과 함께 실온에서 평형 조건 하에 인큐베이션했다. 이후 효모를 두 번 세척하고 LC-FITC (1:100 희석) 및 SA-633 (1:500 희석) 또는 EA-PE (1:50 희석) 2차 시약으로 15 min 동안 4° C에서 염색했다. 빙냉 세척 버퍼로 두 번 세척 후, 세포 펠렛을 0.4 mL 세척 버퍼에 재현탁시키고 스트레이너-캡핑된 분류 튜브로 옮겼다. FACS ARIA 분류기(BD Biosciences)를 사용하여 분류를 수행하고 백그라운드 대조군과 비교하여 특이적 결합제를 선택하도록 분류 게이트를 할당한다. CHO 세포의 가용성 막 단백질 이용을 이용하여 비특이적 결합제의 수를 감소시키고 (예를 들어, WO2014179363 및 Xu et al., Protein Eng Des Sel, Vol. 26(10), pp. 663-670 (2013) 참조), TIGIT-Fc 항원을 사용하여 TIGIT에 대한 개선된 친화도를 갖는 결합제를 확인하기 위해 후속의 선별 라운드를 사용했다. 최종 분류 라운드 후, 효모를 플레이팅하고 친화도 성숙을 위한 클론의 특징규명 및 지명을 위해 개별 콜로니를 선택했다. 기능적 활성에 대해 63 클론을 스크리닝했다. 스크리닝으로부터, 클론 26518, 26452, 26486, 26521 및 26493이 최고의 기능적 활성을 가졌고 추가의 최적화를 위해 선별되었다.

[0281] 실시예 2: 항체 최적화

[0282] 세 가지 성숙 전략: 경쇄 다양화; HCDR1 및 HCDR2의 다양화; 및 선택된 HCDR1 및 HCDR2 다양성 풀 내에서 HCDR3의 다양화를 이용하여 나이브 클론의 최적화를 수행했다.

[0283] 경쇄 다양화: 중쇄 가변 영역을 나이브 산출물로부터 추출하고 (위에 기재됨) 1×10^6 의 다양성을 갖는 경쇄 라이브러리 형질전환시켰다. 위에 기재된 바와 같이 한 라운드의 MACS 분류 및 각각의 라운드에 대해 10 nM 또는 1 nM 비오틴화 TIGIT-HIS 항원(Creative Biomart)을 사용하여 세 라운드의 FACS 분류로 선별을 수행했다.

[0284] HCDR1 및 HCDR2 선별: 경쇄 다양화 절차로부터 선택된 클론의 HCDR3을 1×10^8 의 다양성의 HCDR1 및 HCDR2 변이체를 갖는 사전 제조된 라이브러리로 재조합하고, 단량체 HIS-TIGIT 항원을 사용하여 선별을 수행했다. 감소하는 농도의 비오틴화 HIS-TIGIT 항원(100 내지 1 nM)을 평형 조건 하에서 실온에서 사용하여 친화도 압력을 가했다.

[0285] HCDR3/HCDR1/HCDR2 선별: HCDR3뿐만 아니라 HCDR3의 양측의 상동성 측부 영역을 포함하는 올리고를 IDT로부터 주문했다. HCDR3 중의 아미노산 위치가 전체 HCDR3에 걸쳐 올리고마다 두 위치에서 NNK 다양성을 통해 다변화되었다. HCDR3 올리고는 HCDR3의 측부 영역에 어닐링된 프라이머를 사용하는 이중 가닥이었다. 중쇄 가변 영역의 나머지 FWR1 내지 FWR3을 상기 선택된 HCDR1 및 HCDR2 다양성으로부터 단리된 개선된 친화도를 갖는 항체의 풀로부터 증폭시켰다. 이후 이중 가닥의 HCDR3 올리고, FWR1 내지 FWR3 풀링된(pooled) 단편, 및 중쇄 발현 벡터를 원래 나이브 모(parent)의 경쇄를 이미 포함하는 효모로 형질전환시켜 라이브러리를 생성했다. 네 라운드에 대한 FACS 분류를 사용하여 이전 사이클 동안과 같이 선별을 수행했다. 각각의 FACS 라운드에 대하여 라이브러리를 PSR 결합, 종 교차-반응성, 및 친화도 압력에 대해 평가했고, 원하는 특징을 갖는 집단을 획득하도록 분류를 수행했다. 위에 기재된 바와 같이 HCDR1 및 HCDR2 선별에서 이들 선별에 대한 친화도 압력을 수행했다.

[0286] 실시예 3: 항체 생산 및 정제

[0287] A. 효모에서의 생산

[0288] 추가의 특징규명을 위한 충분한 양의 최적화 및 비최적화 선택된 항체를 생산하기 위해, 효모 클론을 포화까지 성장시킨 다음 진탕하며 48 h 동안 30° C에서 유도했다. 유도 후, 효모 세포를 펠렛화하고 정제를 위해 상청액을 수확했다. IgG를 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하고 pH 2.0의 아세트산으로 용리시켰다. Fab 단편을 파파인 소화에 의해 생성하고 단백질 A(GE LifeSciences) 및 KappaSelect(GE Healthcare LifeSciences)에서 두 단계 공정으로 정제했다.

[0289] B. 포유류 세포에서의 생산

[0290] 추가의 특징규명을 위한 충분한 양의 최적화 및 비최적화 선택된 항체를 생산하기 위해, 특정 항체 클론을 코딩하는 DNA 벡터를 생성하고 HEK 세포에 형질도입했다. 항체 가변 도메인에 대한 인간 코돈 최적화 합성 DNA 단편을 Geneart에서 주문했다. 가변 도메인 서열을 마우스 IgKappa 신호 서열 및 각각의 항체 클래스의 불변 영역을 포함하는 pUPE 발현 벡터로 원활하게 결합시켰다. 발현 벡터는 제한 분석 및 DNA 서열결정에 의해 확인되었다.

일시적 형질주입을 위해, 확립된 프로토콜에 따라 내독소 유리 DNA 맥시프랩(Sigma)이 생성되었고 중쇄 및 경쇄 백터를 Freestyle 배지(ThermoFisherScientific)에서 HEK293EBNA1 세포에 동시-형질주입했다. 형질주입 후 24 시간에 프리마톤(0.55% 최종 부피)을 첨가했다. 조정 배지를 형질주입 후 6 일에 수확했다. 항체를 Mabselect sureLX (GE Healthcare) 친화도 크로마토그래피에 의해 회분식으로 정제했다. 결합 항체를 PBS 함유 1M NaCl 및 PBS로써 2 단계로 세척했다. 항체를 20 mM 시트레이트 150 mM NaCl pH3로 용리시키고 1/6 부피의 1M K2HPO4/KH2PO4 pH8로 대략 pH7까지 중성화했다.

다음으로 항체를 PBS에서 평형화된 Superdex200 컬럼을 사용하여 겔-여과에 의해 추가로 정제했다. 분획을 NuPAGE에 의해 분석하고 항체 함유 분획을 모았다. 최종 생성물을 0.22 μ M 주사기 필터에서 멸균시켰다. 생성물을 NuPAGE에 의해 분석하고 내독소 수준을 LAL-검사에 의해 측정했다.

실시예 4: 재조합 인간 TIGIT 단백질에 대한 항-TIGIT 항체의 결합에 대한 친화도 결정

A. ForteBio K_D 측정

선택된 항체의 ForteBio 친화도 측정은 일반적으로 이전에 설명된 바와 같이 수행되었다 (예를 들어, Estep *et al.*, *Mabs*, Vol. 5(2), pp. 270-278 (2013) 참조). 간단히, IgG를 AHQ 센서에 온라인 로딩하여 ForteBio 친화도 측정을 수행했다. 기준선 확립을 위해 센서를 검사 버퍼(assay buffer)에서 30 min 동안 오프라인 평형화한 다음 60 초 동안 온라인 모니터링했다. 오프-레이트 측정을 위해 IgG가 로딩된 센서를 100 nM 항원(인간 TIGIT-Fc, 인간 TIGIT-His 또는 시노 TIGIT-Fc)에 5 분 동안 노출시킨 후, 이들을 5 min 동안 검사 버퍼로 옮겼다. 1:1 결합 모델을 사용하여 반응속도론을 분석했다. 90 개 이상의 항체를 친화도에 대해 ForteBio에 의해 테스트했고, 표 3은 재조합 TIGIT 단백질에 대한 강한 결합을 나타내는 15 개의 선택된 항-TIGIT 항체에 대한 데이터를 제공한다.

B. MSD-SET K_D 측정

선택된 항체의 평형 친화도 측정은 일반적으로 이전에 설명된 바와 같이 수행되었다 (Estep *et al.*, *Mabs*, Vol. 5(2), pp. 270-278 (2013)). 간단히, 용액 평형 적정(SET)을 10-100 pM에서 일정하게 유지된 항원(TIGIT-His 단량체)으로써 PBS + 0.1% IgG-Free BSA (PBSF)에서 수행하고 10pM-10nM에서 시작하여 Fab 또는 mAb를 3-내지 5-배 연속 희석하며 인큐베이션했다. 항체(PBS 중 20 nM)를 밤새 4° C에서 또는 실온에서 30 min 동안 표준 결합 MSD-ECL 플레이트에 코팅했다. 이후 플레이트를 30 min 동안 700 rpm에서 진탕하며 BSA에 의해 차단하고, 이어서 세척 버퍼(PBSF + 0.05% Tween 20)으로 세 번 세척했다. SET 샘플을 플레이트 상에 도포하고 150s 동안 700 rpm에서 진탕하며 인큐베이션하고 이어서 한 번 세척했다. 플레이트에서 포획된 항원을 플레이트에서 3 min 동안 인큐베이션함으로써 PBSF에서 250ng/mL 설포태그-표지 스트렙타비딘으로 검출했다. 플레이트를 세척 버퍼로 세 번 세척한 다음 계면활성제를 포함한 1x Read Buffer T를 사용하여 MSD Sector Imager 2400 기기에서 판독했다. 유리 항원 퍼센트를 적정된 항체의 함수로서 Prism에서 플로팅하고 이차 방정식에 적합시켜 K_D 를 추출했다. 처리량을 향상시키기 위해, SET 샘플 제조를 포함하여 MSD-SET 실험 전반에 걸쳐 액체 조작 로봇을 사용했다. 선택된 항체를 친화도에 대해 MSD에 의해 테스트했고 표 4는 재조합 TIGIT 단백질에 대한 강한 결합을 나타내는 7 개의 항-TIGIT 클론에 대한 데이터를 제공한다.

표 4: 선택된 항-TIGIT 항체에 대한 친화도의 MSD 분석

클론	MSD 친화도 1가 KD (M) 인간 TIGIT-His
29489	1.1E-10
29494	7.0E-11
29499	1.9E-11
29513	2.5E-11
29520	2.1E-10
29523	1.7E-09
29527	6.4E-10

C. Biacore 측정

CM5 센서 칩(GE Healthcare, Marlboro, MA)에 도킹된 Biacore 8K 광학 바이오센서를 사용하여 HBS-EP 버퍼 시스템(10 mM HEPES pH 7.3, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20)에서 25 ° C에서 바이오센서 분석을

수행했다. 샘플 호를 8° C에서 유지시켰다. 염소 항-인간 IgG 포획 항체(Fcγ 단편 특이적, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; 109-005-098)를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 센서 칩의 양쪽 흐름 세포에 고정시켰다 (11700 +/- 200 RU). 제공된 이러한 표면 유형은 각각의 재생 단계 후 새로운 분석 항체를 재현 가능하게 포획하기 위한 형식을 제공했다. 흐름 세포 1이 참조 흐름 세포로서 사용되면서 흐름 세포 2가 포획된 항체(60-90 RU)를 분석하기 위해 사용되었다. 30 내지 0.123 nM 범위의 항원 농축물(3배 희석)을 러닝 버퍼에서 제조했다. 항원 샘플 농축물 각각을 단일 반복으로 수행했다. 두 번의 블랭크 (버퍼) 주입을 또한 수행하고 시스템 인공물을 평가하고 차감하기 위하여 사용했다. 모든 항원 농축물에 대한 결합(300 s) 및 해리(600 s) 단계를 30 uL/min의 유량에서 수행했다. 30 uL/min의 유량으로 pH 1.5, 10 mM 글라이신의 세 번 연속 주입(15 s, 15 s 및 60 s)으로 표면을 재생시켰다. Biacore 8K Evaluation 소프트웨어, 버전을 1.0 사용하여 데이터를 정렬하고, 이중 참조하고, 1:1 결합 모델에 피팅했다. 선택된 항체를 친화도에 대해 Biacore에 의해 테스트했고 표 5는 재조합 TIGIT 단백질에 대한 강한 결합을 나타내는 5 개의 항-TIGIT 클론에 대한 데이터를 제공한다.

표 5: 선택된 항-TIGIT 항체에 대한 친화도의 Biacore 분석

클론	Biacore: 1가 KD (M) (CM5 칩에서 IgG, 용액 중의 인간 TIGIT-HIS (출발 농도 25nM, 3x 희석))
29489	2,48E-10
31282	2,94E-10
29494	2,70E-10
29520	7,16E-10
29527	1,20E-09
31288	1.92E-10

실시예 5: 항-TIGIT 길항성 항체와 TIGIT 천연 리간드 사이의 경쟁 검사

A. Octet Red384 에피토프 비닝/리간드 차단

선택된 항체의 에피토프 비닝(binning)/리간드 차단이 표준 샌드위치 형식 교차-차단 검사를 사용하여 수행되었다. 대조군 항-표적 IgG를 AHQ 센서에 로딩하고 센서 상의 비어 있는 Fc-결합 부위를 관련 없는 인간 IgG1 항체로 차단했다. 이후 센서를 100 nM 표적 항원(hTIGIT, Creative Biomart)에 이어서 두 번째 항-표적 항체 또는 리간드(항-TIGIT 항체 및 CD155 또는 CD112 또는 CD113)에 노출시켰다. ForteBio의 데이터 분석 소프트웨어 7.0을 사용하여 데이터를 가공했다. 항원 결합 후 두 번째 항체 또는 리간드에 의한 추가적인 결합은 비어 있는 에피토프(비경쟁자)를 나타내는 반면, 결합 없음은 에피토프 차단(경쟁자 또는 리간드 차단)을 나타낸다. 모항체(최적화 전)를 천연 리간드와의 경쟁에 대해 테스트했고 표 6은 CD155, CD112 및 CD113에 대한 경쟁에 대해 획득한 데이터를 요약한다. 모클론 26432는 TIGIT 결합에 있어서 CD155와 경쟁하지 않는 것으로 밝혀졌다. 선택된 다른 모든 항-TIGIT 항체는 재조합 인간 TIGIT 단백질에 대한 결합에 대해 천연 리간드와 경쟁한다.

표 6: 비최적화 항-TIGIT 항체에 대한 TIGIT 천연 리간드에 대한 비닝 분석

클론	CD155 경쟁	CD112 경쟁	CD113 경쟁
26518	네	네	네
26452	네	네	네
26486	네	네	네
26521	네	네	네
26493	네	네	네
26432	아니오		

A. Jurkat-hTIGIT에서 CD155와 항-TIGIT 길항성 항체의 경쟁

인간 TIGIT를 과발현하는 Jurkat 세포(Jurkat-hTIGIT)를 수집하고 10^5 세포/웰로 분배하고 다음 농도: 166,6 ; 53,24 ; 17,01 ; 5,43 ; 1,73 ; 0,55 ; 0,17 ; 0,05 ; 0,01 ; $5,78 \times 10^{-3}$; $1,85 \times 10^{-3}$; $5,9 \times 10^{-3}$ nM의 항-인간 TIGIT 항체와 함께 완전 배지에서 45 min 동안 37° C에서 인큐베이션했다. 과량의 항체를 세척한 다음, 세포를 5 μg/ml의 CD155-His(Creative Biomart, PVR-3141H)와 함께 45 min 동안 37° C에서 인큐베이션했다. 이후, 결합된 CD155-His를 항-His tag-PE(Biolegend, 362603, 테스트당 2 μl)를 사용하여 검출하고 30 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세포를 BD LSRT Fortessa를 사용하여 FACS에 의해 분석했고 CD155 결합을 막는 절반 농도

(IC₅₀)를 기하평균 형광에 기초하여 계산했다.

[0310] 결과는 다음과 같았다: 도7에 도시된 결과에 있어서, 클론 29489에 대해 0,101 nM; 클론 29494에 대해 0,07nM; 클론 29520에 대해 0,102 nM 및 클론 29527에 대해 0,078 nM. 다른 테스트된 항체의 값은 아래 표 7에 요약된다. 전반적으로, 결과는 막 발현된 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155와 테스트된 길항성 항-TIGIT 항체의 강한 경쟁을 입증한다.

[0311] 표 7: 인간 TIGIT에 대한 CD155 경쟁에 있어서 IC₅₀ 데이터

클론	TIGIT 결합에 대한 CD155 경쟁의 IC50 (nM로 표현)
29489	0,101
29494	0,070
29499	0,103
29513	0,094
29520	0,102
29523	0,079
29527	0,078

[0312]

[0313] 실시예 6: 소수성 상호작용 크로마토그래피의 특징규명 (*MAbs*, 2015 May-Jun; 7(3):553-561.)

[0314] 항-TIGIT IgG1 항체 샘플을 Zeba 40 kDa 0.5 mL 스핀 컬럼(Thermo Pierce, cat # 87766)을 사용하여 pH 6.5에서 1 M 암모늄 설페이트 및 0.1 M 소듐 포스페이트로 버퍼 교환했다. 염 구배는 pH 6.5에서 1.8 M 암모늄 설페이트, 0.1 M 소듐 포스페이트로부터 암모늄 설페이트 없이 동일한 조건으로 Dionex ProPac HIC-10 컬럼에서 확립되었다. 구배는 17 min 동안 0.75 ml/min의 유량으로 진행되었다. 실험 마지막에 아세토니트릴 세척 단계를 추가하여 임의의 잔여 단백질을 제거하고, 다음 주입 사이클 전에 컬럼을 7 컬럼 부피에 걸쳐 재평형화시켰다. 피크 체류 시간은 A280 흡광도에서 모니터링되었고 용리 시 암모늄 설페이트의 농도는 구배 및 유량에 기초하여 계산되었다. 표 8은 15 개의 선택된 항-TIGIT 항체에 대해 획득한 결과를 요약한다.

[0315] 표 8: 선택된 항-TIGIT 항체에 대한 소수성 상호작용 크로마토그래피의 분석

클론	소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 체류 시간 (min)
26518	10,4
29478	12,7
26452	9,3
29487	9,9
29489	10,6
26486	11,0
29494	9,7
29499	9,1
26521	12,4
29513	12,5
26493	8,8
29520	9,6
29523	8,7
29527	8,6
26432	11,1
32919	9,0
32931	9,3
32959	12,0

[0316]

[0317] 실시예 7: PSR 제조 다중특이성 시약의 특징규명

[0318] A. 다중특이성 시약의 제조 :

[0319] 다중특이성 시약(PSR)을 Xu *et.al*, *mAbs* 2013에 따라 제조했다. 간단히, 2.5 리터 CHO-S 세포를 출발 물질로 사용했다. 400 mL까지 채운 500 mL 원심 분리 병에서 세포를 2,400 x g에서 5 min 동안 펠렛화했다. 세포 펠렛을 조합한 다음 25 ml 버퍼 B에 재현탁시키고 2,400 x g에서 3 min 동안 펠렛화했다. 버퍼를 따라 내고 세척을

1회 반복했다. 얼음 상에서 유지된 세포와 함께 폴리트론 균질화기를 사용하여 1 x 프로테아제 억제제(Roche, cOmplete, EDTA-없음)를 함유하는 3x 펠렛 부피의 버퍼 B에 세포 펠렛을 재현탁시켰다. 이후 균질물을 2,400 x g에서 5 min 동안 원심분리했고 상청액을 유지시키고 1회 추가 시간(2,400 x g/5min)으로 펠렛화하여 비파괴 세포, 세포 잔해 및 핵의 제거가 보장되었고; 생성된 상청액은 전체 단백질 제제이다. 이후 상청액을 두 개의 Nalgene Oak Ridge 45 mL 원심분리 튜브로 옮기고 40,000 x g에서 40 min 동안 4° C에서 펠렛화했다. 이후 분리된 시토솔 단백질(Separated Cytosolic Protein, SCP)을 함유하는 상청액을 깨끗한 Oak Ridge 튜브로 옮기고, 40,000 x g에서 한 번 더 원심분리했다. 병행하여, 막 분획(EMF)을 함유하는 펠렛을 유지시키고 40,000에서 20 min 동안 원심분리하여 잔류 상청액을 제거했다. 이후 EMF 펠렛을 버퍼 B로 행구었다. 이후 8 mL 버퍼 B를 막 펠렛에 첨가하여 펠렛을 제거하고 다운스 균질화기로 옮겼다. 펠렛을 균질화한 후, 50 mL 코니칼 튜브로 옮겼고 최종 EMF 제제를 나타냈다.

[0320] $\sim 10^6 - 10^7$ 세포/mL의 10억 포유류 세포(예를 들어 CHO, HEK293, Sf9)를 조직 배양 환경으로부터 4x 250 mL 코니칼 튜브로 옮기고 550 x g에서 3 min 동안 펠렛화했다. 모든 후속 단계는 4° C에서 또는 빙냉 버퍼와 함께 얼음 상에서 수행되었다. 세포를 100 mL의 PBSF(1x PBS + 1 mg/mL BSA)로 세척하고 하나의 코니칼 튜브로 조합했다. 상청액을 제거한 후, 세포 펠렛을 30 mL 버퍼 B(50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerol, pH 7.2)에 재현탁시키고 550 x g에서 3 min 동안 펠렛화했다. 버퍼 B 상청액을 따라 내고 세포를 3x 펠렛 부피의 버퍼 B 및 2.5x 프로테아제 억제제(Roche, cOmplete, EDTA-없음)에 재현탁시켰다. 버퍼 B의 프로테아제 억제제는 여기서부터 앞으로 포함되었다. 세포를 30 sec 펄스 동안 네 번 균질화하고 (Polyton 균질화기, PT1200E) 막 분획을 40,000 x g에서 1 시간 동안 4 C에서 펠렛화했다. 펠렛은 1 mL 버퍼 B로 행구어지고; 상청액은 유지되고 s를 나타낸다. 펠렛을 3 mL의 버퍼 B와 함께 다운스 균질화기로 옮기고 막자를 30-35 스트로크 동안 서서히 위아래로 움직여 재현탁시켰다. 농축 막 분획(enriched membrane fraction, EMF)을 새로운 수집 튜브로 옮기고, 막자를 행구어 잠재적인 모든 단백질을 수집한다. Dc-단백질 검사 키트(BioRad)를 사용하여 정제된 EMF의 단백질 농도를 결정한다. EMF를 가용화하기 위해, 1 mg/mL의 최종 농도까지 가용화 버퍼(50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 % n-도데실-b-D-말토 피라노사이드(DDM), 1x 프로테아제 억제제, pH 7.2)로 옮긴다. 혼합물을 밤새 4° C에서 회전시킨 후 50 mL Oak Ridge 튜브(Fisher Scientific, 050529-ID)에서 40,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리한다. 가용성 막 단백질(soluble membrane protein, SMP)을 나타내는 상청액을 수집하고, 단백질 수율을 위에 기재한 바와 같이 정량했다.

[0321] 비오틴화를 위해, 제조업체의 프로토콜(Pierce, Thermo Fisher)에 따라 NHS-LC-비오틴 저장 용액을 준비한다. 간단히, 1 mg의 EMF 샘플마다 20 uL의 비오틴 시약을 첨가하고 4° C에서 3 시간 동안 부드럽게 교반하며 인큐베이션한다. 버퍼 B를 사용하여 부피를 25 mL로 조정하고 Oak Ridge 원심분리 튜브로 옮긴다. 40,000 x g에서 1 시간 동안 비오틴화 EMF(b-EMF)를 펠렛화하고, 펠렛을 건드리지 않고 3 mL의 버퍼 C(글리세롤을 제외한 버퍼 B)로 두 번 행구었다. 잔류 용액을 제거한다. 앞서 기재된 바와 같이 펠렛을 3 mL의 버퍼 C에서 다운스 균질화기로 재현탁시켰다. 이제 재현탁된 펠렛은 비오틴화 EMF(b-EMF)를 나타내고 위에 기재된 바와 같이 가용화되어 b-SMP가 제조된다.

[0322] B. PSR 결합 분석

[0323] PSR 분석은 W02014/179363에 일반적으로 설명된 바와 같이 수행되었다. 간단히, 효모 상에 제시된 단일클론 항체의 PSR 프로파일을 특징구명하기 위해, 2백만 개의 IgG-제시 효모를 96-웰 검사 플레이트로 옮기고 3000 x g에서 3 min 동안 펠렛화하여 상청액을 제거했다. 펠렛을 50 uL의 새로 제조된 저장 b-PSR의 1:10 희석액에 재현탁시키고 얼음 상에서 20 분 동안 인큐베이션한다. 200 uL의 차가운 PBSF로 세포를 두 번 세척하고 펠렛을 50 uL의 이차 표지 혼합물(엑스트라비딘-R-PE, 항-인간 LC-FITC 및 프로피듐 아이오다이드)에 재현탁시킨다. 혼합물을 얼음 상에서 20 분 동안 인큐베이션하고 이어서 200 uL 빙냉 PBSF로 두 번 세척한다. 세포를 100 uL의 빙냉 PBSF에 재현탁시키고 HTS 샘플 주입기를 사용하여 플레이트를 FACS Canto(BD Biosciences)에서 러닝한다. 비특이적 결합을 평가하기 위해 흐름 세포측정법 데이터를 R-PE 채널에서 평균 형광 강도에 대해 분석하고 적절한 대조군에 대해 정규화시켰다. 표 9는 15 개의 선택된 항-TIGIT 항체에 대해 획득한 다중-특이성 시약 결합의 결과를 요약하고, 이는 클론 대부분에 대해 낮은 점수를 확인시킨다.

표 9: 다중특이성 시약의 분석

클론	다중특이성 시약 (PSR) 점수 (0-1)
26518	0,00
29478	0,01
26452	0,00
29487	0,01
29489	0,01
26486	0,00
29494	0,00
29499	0,10
26521	0,00
29513	0,01
26493	0,00
29520	0,32
29523	0,12
29527	0,12
26432	0,00
31288	0,00
32919	0,00
32931	0,00
32959	0,1

실시예 8: 건강한 인간 PBMC의 면역 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명

A. T 세포 서브세트에서의 TIGIT 발현 프로파일

건강한 개체로부터 새로 분리된 PBMC에서 면역 세포 서브세트 상의 TIGIT의 발현을 평가하기 위해 흐름 세포측정법 분석이 수행되었다. 집합 항체를 Ebioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend 또는 BD Biosciences로부터 구입했다. 제조업체의 지시에 따라 여과된 FACS 버퍼(PBS + 2mM EDTA + 0,1%BSA) 및 Brilliant Stain 버퍼(BD #563794)를 사용하여 세포를 염색했다. 염색 전에 세포를 적절한 인간 FcBlock(BD #564220)으로 차단하고 획득 전에 IC 고정 버퍼(eBioscience #00-8222-49)를 사용하여 고정시켰다. 획득은 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 수행되었고 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)로 분석되었다. 생존 세포를 전방 및 측방 산란에서 게이팅했다. 다양한 면역 세포 서브세트가 다음과 같이 게이팅되었다: $CD19^{+}$ (B 세포), $CD3^{-} CD19^{-} CD14^{+}$ (Monocytes), $CD3^{+} TCRab^{-}$ (TCRgd T 세포), $CD3^{+} TCRab^{+}$ (TCRab T 세포), $CD3^{-} CD19^{-} CD14^{-} HLA-DR^{-} CD56^{hi/co}$ (NK 세포), $CD3^{-} CD19^{-} CD14^{-} HLA-DR^{+}$ (수지상 세포), $CD3^{+} TCRab^{+} CD4^{+} CD127^{hi} CD25^{+}$ (조절 T 세포), $CD3^{+} TCRab^{+} CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+} CD45RO^{-} CCR7^{+}$ (CD4 또는 CD8 나이브 T 세포), $CD3^{+} TCRab^{+} CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+} CD45RO^{+}$ (메모리 T 세포) 및 $CD45RO^{-} CD62L^{-}$ (이펙터 T 세포),

도 8A 및 8B에 나타나는 바와 같이, TIGIT는 NK 세포, 조절 T 세포 및 CD8 메모리 T 세포에서 우선적으로 발현된다. 이는 TIGIT 발현을 나타내는 낮은 비율의 나이브 T 세포를 갖는 다른 T 세포 서브세트에서 더 적은 정도로 존재한다. 또한, TIGIT는 단핵구, 수지상 세포 및 B 세포에서 발현되지 않는다 (도8B). 이 데이터 세트는 공개된 데이터와 일치한다 (Yu et al. NI 2008 및 Wang et al. EJI 2015).

실시예 9: 항-TIGIT 길항성 항체의 세포 결합

A. Jurkat-hTIGIT 및 Jurkat-mTIGIT에 대한 항-TIGIT 항체의 결합

인간 항-TIGIT 항체의 친화도가 인간-TIGIT(Jurkat hTIGIT) 또는 마우스 TIGIT(Jurkat-mTIGIT)로써 형질도입된 Jurkat E6.1 세포를 사용하여 측정되었다. hTIGIT 또는 mTIGIT에 대한 선택된 항체의 친화도를 분석하기 위해, 10^5 세포를 웰마다 분배하고 단일 용량으로 100nM의 항-TIGIT 항체와 함께 (표 3) 또는 감소하는 농도(166,6 ; 53,24 ; 17,01 ; 5,43 ; 1,73 ; 0,55 ; 0,17 ; 0,05 ; 0,01 ; $5,78 \times 10^{-3}$; $1,85 \times 10^{-3}$; $5,9 \times 10^{-3}$ nM)의 선택된 항체와 함께 (도 9) 인큐베이션했다. 항체를 FACS 버퍼에서 세포와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 항-인간 Ig(Fc 감마 특이적)- PE (ebioscience, 12-4998-82, 2,5 µg/ml)와 함께 20min 동안 얼음 상에서 인큐베이션하고 두 번 세척했다. LSR BD Fortessa를 사용하여 기하평균 형광 강도를 분석했다. 세포 결합을 각각의 항체에 대해 형질주입되지 않은 라인과 비교하여 형질주입된 라인에서의 PE의 중위 형광 강도

로서 기록했다 (표 3). EC_{50} 결합의 계산을 위해, hTIGIT-Jurkat에 대한 결합의 절반-최대 농도(EC_{50})를 Prism에서 4-변수 곡선-적합 방정식을 사용하여 계산했고, 획득한 값은 다음과 같았다: 도9에 도시된 데이터에 있어서 클론 29489에 대해 0,082 nM; 클론 29494에 대해 0,07 nM; 클론 29520에 대해 0,119 nM 및 클론 29527에 대해 0,05 nM. 결과는 테스트된 항-TIGIT 항체에 있어서 막 발현된 인간 TIGIT에 대한 강한 결합을 입증한다.

[0333] B. 인간 일차 T 세포에 대한 항-TIGIT 길항성 항체의 결합

[0334] 건강한 지원자로부터 분리된 인간 PBMC를 길항성 항-TIGIT 항체에 의한 결합에 대해 분석했다. 세포를 웰당 5×10^5 세포로 분배했다. 세포를 항-CD16(클론 3G8, BioLegend 302002), CD32(클론 FL18.26, BD Bioscience 557333) 및 CD64(BD Bioscience 555525)와 함께 실온에서 10 min 동안 인큐베이션했고, 지시된 항-인간 TIGIT 항체를 FACS 버퍼에서 12,65 ; 4 ; 1,26 ; 0,40 ; 0,126 ; 0,040 ; 0,12 및 4×10^{-3} nM의 최종 농도로 직접 첨가하고 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 항-인간 Ig (Fc 감마 특이적)-PE (eBioscience, 12-4998-82, 2,5 µg/ml)와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 이후, 세포를 세척하고 도 10A 및 10B의 결과에 대해 다음 항체 및 LVD 혼합물과 함께 인큐베이션했다: 항-CD4- PercP-Cy5.5 (클론 A161A1, BioLegend 357414); 항-CD8- BV510 (클론 SK1, BD Bioscience 563919) 및 LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). 도 10C에 대해, 세포를 세척하고 다음의 항체 및 LVD 혼합물과 함께 인큐베이션했다: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), 항-TCRab-PercP-Cy5.5 (클론 IP26, BioLegend 306723), 항-CD4-BV510 (클론 SK3, BD Horizon 562970), 항-CD8-APC-Cy7 (클론 SK1, Biolegend 344714), 항-CD25-BV605 (클론 2A3, Biolegend 562660), 항-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), 항-CCR7-BV421 (클론 G043H7, Biolegend 353207) 및 항-CD45RO-PE-Cy7 (클론 UCHL1, Biolegend 304229).

[0335] $CD8^+$ 인간 일차 T 세포에 대한 결합에 있어서 EC_{50} 값을 게이팅된 LVD^-CD8^+ T 세포에서 양성 TIGIT 염색된 세포의 %를 사용하여 계산했다 (도 10A 및 10B). 인간 메모리 $CD8^+$ 또는 Treg 일차 T 세포에 대한 결합에 있어서 EC_{50} 값은 게이팅된 $LVD^-TCRab^+CD45RO^+CD8^+$ T 세포에서 (메모리 $CD8^+$ T 세포에 대해) 또는 게이팅된 $LVD^-TCRab^+CD127^+CD25^+$ $CD4^+$ T 세포에서 (Treg에 대해) 양성 TIGIT 염색된 세포의 %를 사용하여 계산되었고 도 10C에 도시된다.

[0336] 도 10A에 나타난 바와 같이, 전체 인간 $CD8^+$ T 세포에 대한 결합에 있어서 EC_{50} 값은 클론 29489에 대해 0,123nM; 클론 29520에 대해 0,181nM 및 클론 29527에 대해 0,253nM이다. 29489 및 31282 (잔기 116에서 M에서 T로의 돌연변이를 갖는 29489 돌연변이체) 사이의 직접 비교를 수행했고, EC_{50} 값은 각각 0,057 nM 및 0,086 nM이었으며, 이는 2 클론에 대해 인간 일차 $CD8^+$ T 세포에 대한 강하고 유사한 결합 효능을 입증한다 (도 10B). 메모리 $CD8^+$ T 세포 및 Treg에 대한 결합에 대해 획득한 EC_{50} 값은 각각 0,039 nM 및 0,03 nM이었으며, 이는 두 집단 모두에 대한 강하고 유사한 친화도를 입증한다 (도 10C).

[0337] C. 시노물구스 일차 T 세포에 대한 항-TIGIT 길항성 항체의 결합

[0338] 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)로부터 분리된 PBMC를 BioPRIM으로부터 얻었다. 제조업체의 설명서에 따라 비인간 영장류에 대한 T 세포 활성화/팽창 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 1:2(비드:세포 비율)로 세포를 해동하고 자극시켰다. 다음 날, 세포를 수집하고, 계수하고 웰당 5×10^4 세포로 분배했다. 세포를 항-CD16(클론 3G8, BioLegend 302002), CD32(클론 FL18.26, BD Bioscience 557333) 및 CD64(BD Bioscience 555525)와 함께 실온에서 10 min 동안 인큐베이션했고, 선택된 항-인간 TIGIT 항체를 FACS 버퍼에서 12,65 ; 4 ; 1,26 ; 0,40 ; 0,126 ; 0,040 ; 0,12 및 4×10^{-3} nM의 최종 농도로 직접 첨가하고 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 항-인간 Ig (Fc 감마 특이적)-PE (eBioscience, 12-4998-82, 2,5 µg/ml)와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 이후, 세포를 세척하고 도 11A 및 11B에 도시된 데이터에 대해 다음 항체 및 LVD 혼합물과 함께 인큐베이션했다: 항-CD4- PercP-Cy5.5 (클론 A161A1, BioLegend 357414); 항-CD8- BV510 (클론 SK1, BD Bioscience 563919), CD69-APC-Cy7 (클론 FN50, BioLegend, 310914) 및 LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). BD LSR Fortessa를 사용하여 FACS에 의해 염색된 세포를 분석했다. $LVD^-CD69^+CD8^+$ T 세포에서 게이팅된 양성 TIGIT 염색된 세포의 %를 사용하여 결합의 EC_{50} 값을 계산했다. 도 11에 나타난 바와 같이, 시노물구스 $CD8^+$ T 세포에 대한 결합에 있어서 EC_{50} 값은 클론 29489에 대해 0,487 nM, 클론 29520에 대해

1,73 nM 및 클론 29527에 대해 0,378 nM이었다. 클론 29489 및 31282(잔기 116에서 M에서 T로의 돌연변이를 갖는 29489 돌연변이체)를 또한 비교했고, EC₅₀ 값은 도 11B에 나타난 예에 대해 각각 0,25 nM 및 0,26 nM이었으며, 이는 2 클론에 대해 시노몰구스 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 유사하고 강한 친화도를 입증한다.

[0339] 실시예 10: 길항성 항-TIGIT 활성의 시험관내 기능적 특징규명

[0340] A. CHO-TCR-CD155 및 Jurkat-hTIGIT 공동-배양에 대한 TIGIT 생물학적분석

[0341] 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 발명자들은 hTIGIT를 발현하는 Jurkat 세포 및 TCR 결합(engagement) 시 활성화되는 루시퍼레이스 리포터(Promega의 Thaw-and-Use TIGIT 이펙터 세포)를, 인간 CD155 및 TCR 활성제를 발현하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주(Promega의 Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1)와 공동-배양했다. TIGIT-과발현 Jurkat 세포의 활성화는 Jurkat 세포에 대한 TCR 결합 시 CD155-발현 CHO-K1 세포와의 접촉에 의해 유발될 수 있고 길항성 항-TIGIT 항체의 존재에서 증가될 수 있다. Jurkat 세포 활성화를 증가시키는 여러 상이한 항체의 효능을 비교하기 위해, 증가하는 항체 농도의 존재에서 실험을 수행했고 EC₅₀ 값을 계산했다.

[0342] Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 시딩하고 37° C, 5% CO2 인큐베이터 O/N에서 인큐베이션했다. 그 다음 날, Thaw-and-Use TIGIT 이펙터 세포 (Promega, CS198811)를 제조업체의 권장사항에 따라 133nM의 항-TIGIT 항체(도 12A) 또는 증가하는 농도(0,22; 0,54; 1,36; 3,41; 8,53; 21,3; 53,3; 133,33; 및 333 nM)의 항-TIGIT 항체(도 12B)를 갖는 신선한 완전 배지를 함유하는 CD155 aAPC/CHO-K1 세포 플레이트에 첨가하고 37° C, 5% CO2에서 6 시간 동안 인큐베이션했다.

[0343] 6 시간의 인큐베이션 후, Bio-Glo™ 루시퍼레이스 검사 시스템(Promega, G7941)을 사용한 루시퍼레이스 활성 측정에 의해 TIGIT 이펙터 세포의 활성화를 검사했다.

[0344] 도 12A는 동형 대조군과 비교하여 루시퍼레이스 신호에 대한 선택된 클론 첨가의 효과를 나타낸다. 데이터는 Jurkat-hTIGIT 세포의 더 강한 활성화를 야기하는 이들 항체의 길항 활성을 입증한다. 표 10은 여러 상이한 항-TIGIT 항체에 대해 획득한 루시퍼레이스 발현의 동형 대조군 클론(03847)과 비교한 배수 변화 유도를 요약한다.

[0345] 표 10: 동형 대조군과 비교한 배수 변화 유도

클론명	동형 대조군과 비교한 유도 (배수 변화)
26518	2,89
29478	3,57
26452	2,9
29487	3,22
29489	4,08
26486	1,9
29494	3,42
29499	3,68
26521	2,66
29513	3,26
26493	0,96
29520	2,52
29523	2,4
29527	2,96
03847	1

[0346] 도 12B에 나타나는 바와 같이, 0,22nM 내지 333nM의 항-TIGIT 항체로써 Jurkat-hTIGIT 세포 활성화를 평가했고 클론 29489에 대해 3,0nM; 클론 29494에 대해 4,4nM; 클론 29520에 대해 2,3nM 및 클론 29527에 대해 32nM; 클론 32919에 대해 2,7nM 및 클론 32931에 대해 3,2nM의 EC₅₀ 값을 제공하며 TIGIT 억제 신호전달 차단에 연속적인 강한 기능적 활성을 입증한다. 클론 29489 및 31282(잔기 116에서 M에서 T로의 돌연변이를 갖는 29489 돌연변이체)를 또한 비교했고, EC₅₀ 값은 도 12C에 나타난 예에 대해 각각 4.3 nM 및 8.1 nM이었으며, 이는 2 클론에 대해 유사한 기능적 활성을 입증한다.

[0348] B. 인간 일차 CD8⁺ T 세포-기반 기능 검사

[0349] 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 건강한 인간 공여자의 PBMC의 인간 일차 CD8⁺ T 세포를 인간 CD155를 발현하고 인간 T 세포를 활성화하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주와 함께 공동-배양했다. 발명자들은 엔지니어링된 CD155-발현 CHO-K1 세포의 존재에서 CD8⁺ T 세포에 의한 IFN γ 의 방출이 차단 항-TIGIT 길항성 항체로써 hTIGIT를 차단하여 증가될 수 있음을 발견했다. IFN γ 방출을 증가시키는 이들 항체의 효능을 비교하기 위해, 증가하는 항체 농도의 존재에서 실험을 수행했고 EC₅₀ 값을 계산했다.

[0350] Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 U-바텀 96-웰 플레이트에서 시딩하고 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터 O/N에서 인큐베이션했다. 다음 날, 제조업체의 권장사항에 따라 네거티브 선별 키트(Stemcell Technologies, 17953)를 사용하여 건강한 공여자의 전혈로부터 단리된 냉동 인간 말초 혈액 단핵 세포(Immunehealth)로부터 CD8⁺ T 세포를 정제했다. 이후 정제된 CD8⁺ T 세포를 증가하는 농도 (0,11 nM, 0,33nM, 1,06nM, 3,3nM, 10,6nM, 33,3nM, 105,5nM 및 333 nM)의 항체(100,000 CD8⁺ T 세포/100 μ l의 항체 함유 완전 배지)와 함께 1 시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 항체-CD8 혼합물을 50 μ l의 신선한 완전 배지를 함유하는 CD155 aAPC/CHO-K1 세포 플레이트에 첨가하고 37° C, 5% CO₂에서 5 일 동안 인큐베이션했다. 최종적으로, 제조업체의 권장사항에 따라 실행된 ELISA 검사(Affymetrix eBioscience, 88-7316-86)를 사용하여 세포 상청액에서 IFN γ 농도를 평가했다.

[0351] 도 13A에 나타나는 바와 같이, 모든 항-TIGIT 항체가 동형 대조군에 비해 IFN γ 분비를 증가시켰다. 가장 높은 증가가 클론 29489 (6,4 배)로써 관찰되었고 이어서 29494 (5,8 배), 29520 (5,4 배), 29499 (5,2 배), 29527 (4,5 배) 및 29513 (3,2 배)이었다.

[0352] 인간 일차 CD8⁺ T 세포에 의한 IFN γ 분비 증가에 대한 EC₅₀ 값을 평가하기 위해 용량 범위 연구(0,22nM 내지 333nM의 항-TIGIT 항체)를 또한 수행했다. 도 13B에 나타나는 바와 같이, 항-TIGIT 항체 29489가 3,5nM의 EC₅₀으로 최상의 활성을 나타냈고 클론 29527 EC₅₀ = 5,1nM), 클론 29494 (EC₅₀ = 6,1nM) 및 클론 29520 (EC₅₀ = 11,1nM)이 그 뒤를 이었다. 최종적으로, 클론 29489 및 이의 돌연변이체 31282를 동시에 테스트했고 0,49nM 및 0,50nM의 각각의 EC₅₀ 값으로 유사한 활성을 입증했다 (도 13C). 이들 데이터는 모두 CD8⁺ 인간 T 세포에서 TIGIT 억제 신호를 차단하고 이펙터 기능을 증가시키는 길항성 항-TIGIT 항체의 강한 기능적 활성을 입증하며, 이는 IFN γ 생성의 강한 증가를 특징으로 한다.

[0353] C. 인간 TIL 기능 검사

[0354] 암 환자의 종양 침윤 림프구(TILs)에서 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 발명자들은 난소 복수 환자의 TIL의 인간 일차 CD8⁺ T 세포를 인간 CD155를 발현하고 인간 T 세포를 활성화하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주와 함께 공동-배양했다. 발명자들은 엔지니어링된 CD155-발현 CHO-K1 세포의 존재에서 CD8⁺ T 세포에 의한 IFN γ 의 방출이 차단 항-TIGIT 길항성 항체로써 hTIGIT를 차단하여 증가될 수 있음을 발견했다.

[0355] Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 U-바텀 96-웰 플레이트에서 시딩하고 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터 O/N에서 인큐베이션했다. 다음 날, 제조업체의 권장사항에 따라 네거티브 선별 키트(Stemcell Technologies, 17953)를 사용하여 난소 복수로부터 단리된 냉동 인간 TIL(Immunehealth)로부터 CD8⁺ T 세포를 정제했다. 이후 정제된 CD8⁺ T 세포를 항-TIGIT 항체 클론 26452, 클론 29489 및 31282의 비최적화 모(100,000 CD8⁺ T 세포/100 μ l의 항체 함유 완전 배지)와 함께 1 시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 항체-CD8 혼합물을 50 μ l의 신선한 완전 배지를 함유하는 CD155 aAPC/CHO-K1 세포 플레이트에 첨가하고 37° C, 5% CO₂에서 5 일 동안 인큐베이션했다.

[0356] 최종적으로, 제조업체의 권장사항에 따라 실행된 ELISA 검사(Affymetrix eBioscience, 88-7316-86)를 사용하여 세포 상청액에서 IFN γ 농도를 평가했다. 도 14에 나타나는 바와 같이, IFN γ 분비는 항-TIGIT 항체가 공동-배양에 첨가될 때 거의 2 배 증가했다. 이들 데이터는 CD8⁺ 인간 TIL에서 TIGIT 억제 신호를 차단하고 종양 환경에서 T 세포의 이펙터 기능을 증가시키는 길항성 항-TIGIT 항체의 강한 기능적 활성을 입증한다.

[0357] 실시예 11: 마우스에서 기능적 활성을 갖는 항-TIGIT 길항성 항체의 특징규명

[0358] A. 대용 항-TIGIT 길항성 항체에 대한 마우스 CD155 경쟁 검사

[0359] 이 검사를 위하여, 마우스 TIGIT를 과발현하도록 엔지니어링된 Jurkat 세포(클론 E6-1, ATCC TIB-152) (Jurkat-mTIGIT)를 사용했다. 항-TIGIT 항체 26493이 인간 TIGIT에 대한 결합뿐만 아니라 마우스 TIGIT에 대해서도 교차-반응성을 나타내었기 때문에 이를 대용물로서 사용했다. 25 μ l의 완전 배지(RPMI + 10% FBS)에서 상이한 농도의 항-TIGIT 항체 클론 26493(0.03 내지 10 μ g/ml)와 함께 세포를 45min 동안 37° C에서 사전 인큐베이션했다. 세포를 한 번 세척하고 50 μ l의 완전 배지에서 4 μ g/ml 마우스 CD155-His-Fc tag 단백질(Thermo Fisher, 50259M03H50)과 함께 45min 동안 인큐베이터에서 인큐베이션했다. 세포를 한 번 세척하고, 30min 동안 4° C에서 PE-항-His 항체(Biolegend, 362603)로 염색했다. FACS에 의해 측정된 중위 형광 강도(median fluorescence intensity, MFI)를 Jurkat-mTIGIT에 대한 CD155의 결합의 척도로서 사용했다. 도 15A는 IC₅₀으로서 2,3nM을 확인하는 CD155 경쟁에 있어서 항-TIGIT 클론 26493의 용량-반응 곡선을 나타낸다 (상부 점선은 동형의 신호를 나타내고, 하부 점선은 CD155가 없는 세포의 신호를 나타낸다). 이들 결과는 마우스 TIGIT에 대해 CD155 리간드와 경쟁하는 항-TIGIT 항체의 기능적 효능을 입증한다.

[0360] B. 마우스 기능 시험관내 검사: 항원-특이적 세포독성 (OT-I)

[0361] 이 검사에서 OVA-펩스화 표적 세포에 대한 OT-I CD8⁺ T 세포의 항원-특이적 세포독성 활성 및 항-TIGIT 항체의 효과를 평가하기 위하여, EasySep™ 마우스 T 세포 분리 키트(Stemcell, Catalog # 19851)를 사용하여 기계적 분리에 이어서 마우스 T 세포에 대한 네거티브 선별에 의해 C57BL/6-Tg^(TeraTcrb)1100Mjb/Cr1 마우스(Charles River)의 비장으로부터 OT1 세포를 분리했다. 항원-제시 세포로서, CD155를 자연적으로 발현하는 Pan02 암 세포를 미토사이신 C(25 μ g/ml)로 처리하고 그 후 OVA-펩타이드로 펄싱했다 (S7951-1MG, Sigma Aldrich, 1 μ g/ml, 37° C에서 1h). CD8⁺ T 세포 및 Pan02를 133nM의 항-TIGIT 클론 26493 또는 동형 대조군의 존재에서 3일 동안 공동-배양했다. 3일째에, ELISA에 의한 IFN γ (도 15B) 및 세포독성 검사를 위한 T 세포(도 15C)의 검출을 위해 상청액을 수집했다. 표적 세포로서, OVA-펩스화 Pan02를 사용했다. 각각 1x10⁶의 표적 세포 및 비펄스화 Pan02 세포(비표적 내부 대조군)를 제조업체의 지시에 따라 각각 CFSE (C1157, ThermoFisher) 및 CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit(C34564, ThermoFisher)로 표지했다. 이들 세포를 혼합하고 (1:1 비율) 웰당 2x10⁴ 세포로 플레이팅했다. 자극된 OT-1 CD8⁺ T 세포를 1x10⁵ 세포/웰(이펙터 세포)로 첨가하여 133nM의 항-TIGIT 클론 26493 또는 동형 대조군의 존재에서 10:1 이펙터 대 표적 비율이 되었다. 24 시간 후 세포를 PBS로 세척하고 트립신처리에 의해 부양시켰다. 이후 세포를 Live/dead fixable violet dead cell staining kit(Molecular Probes, L34955)로 염색했다. 이후 흐름 세포측정법에 의해 살아있는 표적 세포 대 비표적 세포의 비율 변화를 모니터링하여 표적 세포의 세포독성 사멸을 측정했다.

[0362] 도 15B는 항-TIGIT 항체가 IFN γ 생성을 거의 2 배 증가시킴을 나타내는 한편 도 15C는 약 60%의 마우스 OT-I CD8⁺ T 세포의 증가된 세포독성 활성을 나타낸다. 모두, 이들 결과는 마우스 CD8⁺ T 세포 이펙터 기능을 증가시키는 항-TIGIT 항체의 기능적 활성을 확인시킨다.

[0363] 실시예 12: 마우스 모델에서 단일요법 및 항-PD1 항체와의 병용에서 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 활성

[0364] A. 단일요법에서 항-TIGIT 길항성 항체의 생체내 항-종양 활성

[0365] 이 실험을 위해, 항-TIGIT 클론 26493이 마우스 IgG2a 동형에 대해 포유류 세포에서 생성되었다. 8 주의 암컷 Balb/c 마우스에게 500,000 CT26 결장암 세포(ATCC® CRL-2638™)를 피하 접종했다. 접종 후 9 일째에, 종양 부피가 평균 약 45mm³였을 때, 마우스는 동일한 종양 부피를 갖는 처리군에서 무작위화되었다 (군 당 n=8). 마우스를 200 μ g의 항-TIGIT 또는 동형 대조군(mIgG2a, BioXcell) 또는 200 μ g의 항-PD-1(RMP1-14, BioXcell) 및 200 μ g의 동형 대조군(mIgG2a, BioXcell) 또는 200 μ g의 항-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) 및 상이한 농도의 항-TIGIT(200 μ g, 60 μ g, 20 μ g)로 9일, 12일 및 15일에 복강내 주사에 의해 처리했다. 종양 성장을 모니터링하고 종양 부피를 전자 캘리퍼스 9일부터 36일까지 일주일에 세 번 측정했다. 종양 부피가 2000mm³를 초과했을 때 마우스를 희생시켰다. 종양 성장 곡선을 선형 혼합 모델에 의해 통계적으로 분석했다. 시간*처리군의 상호작용을 테스트하여 처리군 간의 차이를 평가했다. 항-TIGIT 및 항-PD-1 간의 상승 효과를 테스트하기 위해, 처리군을 두 변수의 조합; 항-TIGIT (네/아니오) 및 항-PD-1 (네/아니오)에 의해 재부호화했다. 각 처리의 부가 효과

(항-TIGIT*시간 및 항-PD-1*시간) 이외에 상승 효과를 상호작용 항 항-TIGIT*항-PD-1*시간을 테스트하여 평가했다.

[0366] 도 16A는 단일요법에서 항-TIGIT 항체로 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 대조군에서는 마우스가 종양의 퇴행을 나타내지 않았고, 항-TIGIT로 처리된 2/8 마우스는 완전한 반응을 나타냈다. 나머지 마우스에서, 뚜렷한 종양 성장 지연이 존재했다. 대조군에서는 30 일 이상 생존한 마우스가 없었고, 반면에 처리군에서는 7/8 마우스가 30 일 이상 생존했다.

[0367] 도 16B는 단일요법 또는 항-TIGIT와의 병용에서 항-PD1에 의해 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 항-PD-1 단일요법과 비교하여 ($p < 0.0001$) 항-TIGIT+항-PD-1로 처리된 마우스에서 유의한 종양 성장 억제가 있었다. 항-TIGIT + 항-PD-1의 병용은 두 가지 단일요법 치료의 부가 효과보다 높은 상승적 항-종양 효능을 달성했다 ($p = 0.02$). 항-TIGIT (200ug) 및 항-PD1 항체의 병용은 7/8 마우스에서 완전한 반응을 나타냈다. 항-PD1 및 더 적은 용량의 항-TIGIT의 병용으로 항-종양 효능이 유지되었고, 이는 항-TIGIT 항체가 60 μ g까지 감소했을 때 8/8 마우스에 대해, 항-TIGIT 항체가 20 μ g까지 추가로 감소했을 때 5/8 마우스에 대해 완전한 반응을 달성했다 (도 16C). 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 단일요법에서 ($p < 0.0001$) 또는 항-PD1 항체와의 병용에서 ($p < 0.0001$) 항-TIGIT 요법의 유의한 항-종양 효능을 입증한다.

[0368] **실시예 13: 마우스 모델에서 단일요법 및 항-PD1 항체와의 병용에서 항-TIGIT 길항성 항체의 동형-의존성 항-종양 활성.**

[0369] 이 실험을 위해, 항-TIGIT 클론 26493이 마우스 IgG2a 및 마우스 IgG1 동형에 대해 포유류 세포에서 생성되었다. 8 주 of 암컷 Balb/c 마우스에게 500,000 CT26 결장암 세포(ATCC® CRL-2638™)를 피하 접종했다. 접종 후 10 일째에, 종양 부피가 평균 약 100mm³였을 때, 마우스는 동일한 종양 부피를 갖는 처리군에서 무작위화되었다 (군 당 n=10). 단일요법의 평가를 위해, 마우스를 200 μ g의 항-TIGIT 또는 동형 대조군(mIgG2a, BioXcell)으로 10일, 13일 및 16일에 복강내 주사에 의해 처리했다. 항-PD-1와의 병용의 평가를 위해, 마우스를 200 μ g의 항-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) 및 200 μ g의 동형 대조군(mIgG2a, BioXcell)으로 또는 200 μ g의 항-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) 및 200 μ g의 항-TIGIT의 병용에 의해 10일, 13일 및 16일에 복강내 주사에 의해 처리했다. 종양 성장을 모니터링하고 종양 부피를 전자 캘리퍼스 10일부터 33일까지 일주일에 세 번 측정했다. 종양 부피가 2000mm³를 초과했을 때 마우스를 희생시켰다.

[0370] 도 17A는 항-TIGIT 항체를 사용한 단일요법에 대한 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타내고 도 17B는 항-TIGIT 및 항-PD1 항체를 사용한 병용 요법에 대해 나타낸다. 단일요법 및 항-PD-1과의 병용에서, 항-TIGIT 항체를 사용한 처리는 마우스 IgG2a 동형으로서 투여 시 유의한 항-종양 효능을 야기했다 (각각 $p = 0.0001$ 및 $p = 0.009$). 그러나, 항-종양 효능이 마우스 IgG1 동형으로서 항-TIGIT와 함께 관찰될 수 없었으며, Fc 수용체와 mIgG2a의 상호작용이 류단 CT26 모델에서 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 활성에 중요함을 시사한다. 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 단일요법 또는 병용에서 항-TIGIT 요법의 동형-의존성 항-종양 효능을 입증한다.

[0371] **실시예 14: 항-TIGIT 길항성 항체의 생체내 항-종양 활성의 작용 메커니즘의 특징규명**

[0372] A. 비장 및 종양의 흐름 세포측정법 분석

[0373] 길항성 항-TIGIT 항체의 생체내 작용 모드를 조사하기 위해, 단일요법 및 항-PD-1와의 병용에서 항-TIGIT 항체 26493(IgG2a)를 사용한 처리 후 면역 세포 침윤물에 대해 흐름 세포측정법에 의해 종양을 분석했다. 실시예 12에 기재된 바와 같이 마우스를 접종하고 처리했다. 두 번째 처리 2일 후, 마우스(군마다의 8 마리의 마우스)를 희생시키고 종양을 수확했다. 종양 분리 키트(Miltenyi Biotec)로 종양을 분리했다. 직접 생체의 염색을 위해, 세포를 생존성 염료(Molecular Probes, L34955) 및 Fc-block으로 염색한 후 항-CD45, 항-CD4, 항-CD8 및 항-FoxP3(모두 eBioscience로부터 입수)로 염색했다. 생체의 자극을 위해, 세포를 세포 자극 각테일(eBioscience) 및 단백질 수송 억제제(eBioscience)와 함께 3 시간 동안 인큐베이션했다. 이후 항-CD4 및 항-CD8 항체 및 Fc-block으로 염색했다. 상용 버퍼(IC 고정 버퍼 및 투과화 버퍼)를 사용하여 고정 및 투과화한 후, 세포를 항-IL-10 및 항-IFN γ (모두 eBioscience로부터 입수)로 염색했다. 모든 도면에서, 관련 대조군(단일요법에 대한 동형 대조군, 병용에 대한 항-PD-1)과 비교한 백분율 변화가 나타나고, 대조군에 비해 음의 값은 감소를 나타내고 양의 값은 증가를 나타낸다.

[0374] 도 18A는 항-TIGIT mIgG2a 항체를 사용한 종양의 생체내 처리가 대조군과 비교하여 28%의 CD4⁺ TIL 집단 내 조

절 T 세포의 비율 감소를 야기함을 나타내고, 이는 항-TIGIT mIgG1를 사용한 처리 후에는 관찰되지 않는다. 이는 TIGIT⁺ Treg 세포의 고갈이 있음을 나타내며, 아마도 실시예 14에서 논의된 바와 같이 두 가지 동형의 차등적 효능을 설명할 수 있다. 도 18B는 CD8⁺ TIL의 고갈이 없지만, 대신 두 가지 동형에 대해 작은 증가가 관찰됨을 나타낸다 (대조군과 비교하여 mIgG1에 대해 17% 증가 및 mIgG2a에 대해 16%). 이들 결과는 함께 항-TIGIT mIgG2a로 처리된 종양에서 CD8/Treg 비율의 50% 초과 증가를 야기한다 (도 18C). 종양내 T 세포의 기능이 또한 항-TIGIT mIgG2a 항체로 처리된 군에 대해 개선되며, CD4⁺ (도 18D) 및 CD8⁺ TIL (도 18E) 모두에 대해 IFNg 생성이 강하게 증가한다. 이는 CD4⁺ TILs/CD8⁺ 집단에서 생체외 자극 후 IFN-g 생성 세포/IL-10 생성세포 비율의 강한 증가를 야기했다 (도 18F).

[0375] 도 18G는 항-TIGIT mIgG2a와 항-PD-1의 병용이 항-PD-1 단일요법과 비교하여 33% 감소된 조절 T 세포를 야기함을 나타낸다. 다시, CD8⁺ T 세포에 대해, 항-PD-1 단일요법과 비교하여 각각 mIgG1 및 mIgG2a 동형에 대해 CD8⁺ T 세포 침윤의 22% 및 28% 증가로써, 반대가 사실이다 (도 18H). 이는 함께 항-TIGIT mIgG2a와의 병용에 대해 종양에서 CD8⁺ TIL 대 Treg 비율의 2-배 이상의 증가를 야기한다 (도 18I). 또한, 항-PD-1와 조합된 항-TIGIT 항체 mIgG2a를 사용한 처리는, IFNg 생성 CD4 세포의 현저한 증가 (도 18J) 및 IL-10 생성 CD4 세포의 감소로써 (도 18K), 종양내 CD4⁺ T 세포에 대한 Th1 대 Th2 표현형 이동을 입증한다. 이는 단일요법에서 항-PD-1로 처리된 마우스와 비교하여 CD4⁺ TIL 집단에서 생체외 자극 후 IFNg/IL-10 생성 세포의 강한 증가를 야기했다 (도 18L).

[0376] 표 11: 항-TIGIT mIgG2a 및 비히클 처리된 마우스 사이의 차등적으로 발현된 유전자

유전자 기호	Log2 배수 변화	보정된 p-값
Ccr2	-1,29	0,0000668
Prf1	1,79	0,0000668
Ctsg	2,13	0,0000668
Ctla4	1,72	0,00309
Gzmb	1,51	0,00309
Ccl2	0,56	0,0174
Il2ra	1,61	0,0174
Cd55	1,64	0,0213
Il2rb	0,872	0,0379
Cd274	0,982	0,0385
Klrg1	1,3	0,0402
Icos	1,26	0,0402
Il1rn	0,87	0,0402
Cx3cr1	-0,82	0,0428
Clra	0,896	0,0428
Cd33	-0,906	0,0479
Ccl4	0,886	0,0518

[0377]

[0378] 표 12: 항-TIGIT mIgG2a + 항-PD-1 및 항-PD1 처리된 마우스 사이의 차등적으로 발현된 유전자

유전자 기호	Log2 배수 변화	보정된 p-값
Ctsg	2.34	0.0000375
Prfl	1.69	0.000255
Gzmb	1.71	0.000766
Cd55	2.08	0.00131
Entpd1	0.839	0.00131
Klrg1	1.76	0.00132
Itgal	0.874	0.0017
Ctla4	1.72	0.00173
Il2ra	1.82	0.00237
Itgb3	0.863	0.00237
Slc11a1	0.849	0.00329
Cd36	1.44	0.0049
Cd180	0.899	0.00602
Icam1	0.893	0.00802
Cd274	1.06	0.00993
Cd40	0.926	0.0113
Eomes	1.28	0.0113
Abcg1	0.869	0.0113
Ccr2	-0.781	0.0122
Thy1	0.868	0.0165
Ccl2	0.501	0.0203
Gbp5	1.12	0.0216
Icos	1.24	0.0263
Tgfb2	0.458	0.0278
H2 K1	0.292	0.0307
Sh2d1a	0.999	0.0307
Il2rb	0.808	0.0307
Selplg	0.64	0.031
Bst1	0.702	0.0317
Cd247	1	0.032
Irf8	0.699	0.0365
Il21r	0.899	0.0392
Gbp2b	1.11	0.0392
Stat1	0.865	0.0427
C4b	0.922	0.0428
Abca1	0.537	0.044
Trem2	0.482	0.0454

[0379]

[0380]

B. NanoString에 의한 종양의 전사체 분석

[0381]

항-TIGIT 항체의 생체내 작용 모드를 조사하기 위해, 항-TIGIT로 처리된 종양의 면역 세포 침윤물을, 단일요법 및 항-PD-1과의 병용에서, 전사체 분석(Nanostring)에 의해 분석했다. 실시예 12에 기재된 바와 같이 마우스를 접종하고 처리했다. 항-TIGIT 및/또는 항-PD1 항체를 사용한 세 번째 처리 2일 후, 마우스를 희생시키고 종양을 수확했다. RNA를 추출하고 암 면역학에 관여하는 염색된 770 개의 유전자의 발현을 nCounter 기술(PanCancer Immune Profiling panel, Nanostring; VIB Nucleomics Core에 의해 수행됨)로써 직접 정량화했다. 데이터를 nSolver 소프트웨어(Nanostring)로 분석했다.

[0382]

도 19A는 비허클 처리된 마우스 및 항-TIGIT mIgG2a 처리된 마우스 사이에서 차등적으로 조절되는 유전자의 볼케이노 플롯을 보여준다. 통계적으로 매우 유의한 유전자가 플롯의 상부에 오고, 매우 차등적으로 발현된 유전자가 양측으로 온다 (좌: 항-TIGIT 처리된 마우스에서 하향조절됨, 우: 항-TIGIT 처리된 마우스에서 상향조절됨). 고도로 상향조절된 유전자의 예는 퍼포린, 그랜자임 B 및 CTLA-4를 포함한다. 실선은 0.01의 비보

정 p-값을 나타내고, 점선은 0.05의 보정 p-값을 나타낸다 (Benjamini-Hochberg 보정). 표 11 및 표 12는 각각 비히클 및 aPD-1+항-TIGIT mIgG2a 대 항-PD1와 비교하여 항-TIGIT mIgG2a에 대해 유의하게 차등적으로 발현된 유전자를 나타낸다. 다중 유전자가 면역 세포의 기능적 서브세트에 대해 점수로 요약될 때, 가장 두드러진 발견은 세포독성 세포 및 CD8⁺ T 세포의 점수 증가였다(도 19B). 항-PD-1 단독과 비교하여 항-PD-1 + 항-TIGIT mIgG2a로 처리된 마우스에서 동일한 변화가 존재했다. 단일요법 또는 항-PD-1와의 병용에서 항-TIGIT mIgG1로 처리된 마우스에서 변화가 관찰되지 않았다.

[0383] 이들 데이터는 모두 항-TIGIT 항체를 사용한 생체내 처리 후 관찰된 항-종양 효능이 종양에서 감소된 Treg 침윤물에 의해 매개되는 한편 CD8⁺ 이펙터 T 세포 집단이 증가함을 입증한다. 또한, CD4⁺ 및 CD8⁺ TIL의 이펙터 기능은 더 높은 IFN γ 생성 세포의 비율, Th1 반응으로의 이동 및 T 세포 세포독성 기능에 중요한 유전자의 증가된 발현에 의해 나타난 바와 같이 증가된다.

[0384] **실시예 15: 항-TIGIT 길항성 항체에 의해 유도된 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성**

[0385] A. 건강한 공여자의 인간 PBMC에서 시험관내 ADCC

[0386] 건강한 인간 공여자로부터 분리된 PBMC를 완전 RPMI 배지(10% 열 불활성화 FBS + 50U 페니실린 + 50U 스트렙토마이신으로 보충되고, 200 IU IL-2/ml로 보충됨)에 재현탁시켰다. 96U 웰 플레이트에서 웰당 2.5×10^5 인간 PBMC를 분배했다. 포유류 세포 또는 IgG1 동형 대조군(Biolegend, 403102)에서 생성된 항-인간 TIGIT 항체 클론 26452를 각각의 상응하는 웰에 66,6 ; 0,66 및 0,006nM의 최종 농도로 첨가했다. 세포를 20h 동안 37° C에서 5% CO2로 인큐베이션했다. 이후 세포를 수집하고 다음의 항체 패널로 염색했다: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), 항-TCR α -PercP-Cy5.5 (클론 IP26, Biolegend 306723), 항-CD4-BV510 (클론 SK3, BD Horizon 562970), 항-CD8-APC-Cy7 (클론 SK1, Biolegend 344714), 항-CD25-BV605 (클론 2A3, Biolegend 562660), 항-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), 항-CCR7-BV421 (클론 G043H7, Biolegend 353207) 및 항-CD45RO-PE-Cy7 (클론 UCHL1, Biolegend 304229). 게이팅된 생세포에 대해 결과가 제시된다 CD45⁺CD4⁺ 또는 CD45⁺CD8⁺는 전체 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포를 나타낸다. CD45⁺RO⁺CD4⁺ 또는 CD45⁺RO⁺CD8⁺ 세포는 메모리 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포를 나타내는 한편 CD25⁺CD127⁺CD4⁺는 Treg 세포를 나타낸다. 도 20A에 나타나는 바와 같이 게이팅된 Treg에 대한 TIGIT⁺ 세포의 비율은 게이팅된 메모리 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포에 대한 것보다 높았다.

[0387] 제조업체의 설명서에 따라 AccuCheck Counting beads(Life technologies)를 사용하여 절대 정량을 수행한다. μ l당 절대 세포 수의 계산 후, 다음의 식 = (1- (26452 TIGIT 항체 처리된 샘플에서 μ l당 세포의 절대 수/ 항체 처리 없음의 삼중복의 평균)) x100을 사용하여 특이적 용해의 %가 계산된다. 도 20B에 나타나는 바와 같이 항-TIGIT 26452 hIgG1 항체는 전체 CD8⁺ T 세포(12,2%) 또는 전체 CD4⁺ T 세포(16,36%)에서보다 Treg(62,22%)에서 더 높은 특이적 용해를 촉발시킨다.

[0388] B. 마우스 종양에 대한 생체의 ADCC

[0389] 항-TIGIT 마우스 IgG2a 항체가 TIGIT⁺ 조절 T 세포를 고갈시킬 수 있음을 확인하기 위해, 생체의 ADCC 검사를 설정했다. 8 주의 암컷 Balb/c 마우스에게 500.000 CT26 결장암 세포(ATCC® CRL-2638™)를 피하 접종했다. 접종 3 주 후, 종양을 수확하고 종양 분리 키트(Miltenyi Biotec)로 분리했다. 단일 세포 현탁액을 133nM 항-TIGIT 항체 26493(mIgG1 또는 mIgG2a 동형)와 함께 20h 동안 인큐베이션했다 (RPMI + 10%FBS에서 100만 세포/200 μ l). 20h 후, 세포를 생존성 염료(Molecular Probes, L34955) 및 Fc-block으로 염색한 후 항-CD4, 항-TIGIT, 항-CD8 및 항-FoxP3 항체(모두 eBioscience로부터 입수)로 염색했다.

[0390] 도 21은 상이한 TIGIT⁺ 면역 서브세트에 대하여 동형 대조군을 사용한 처리와 비교하여 절대 TIGIT⁺ 세포 계수의 % 감소를 나타낸다. 항-TIGIT mIgG2a 항체 처리 후의 가장 강한 감소는 조절 T 세포에서 명백하며 (약 40% 감소), 이들 세포가 통상적 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포보다 ADCC에 더 취약함을 시사한다.

[0391] 전반적으로, 이들 결과는 Treg 집단에서 입증된 더 강한 활성을 갖는 TIGIT⁺ 면역 세포를 고갈시키는 항-TIGIT hIgG1 또는 mIgG2a의 효능을 입증한다.

[0392] **실시예 16: 인 실리코 분석을 사용한 면역원성 예측**

- [0393] 클론 29494 및 29489뿐만 아니라 이의 변이체 31282의 면역원성 가능성을 EpiMatrix 단백질 점수를 사용하는 인실리코 예측에 의해 평가했다 (De Groot et al. (2009) Clinical Immunol. 131:189). 분석을 완료하기 위해, 입력 서열을 중첩 9-mer 프레임으로 파싱하고 각각의 프레임을 8개의 공통 Class II HLA 대립유전자의 패널에 대해 평가했다. 이들 대립유전자는 "수퍼-타입"이다. 각각은 많은 추가적 "패밀리 멤버" 대립유전자와 기능적으로 동등하거나 거의 동등하다. 총괄하여, 이들 8개의 수퍼-타입 대립유전자는, 이들의 각각의 패밀리 멤버와 함께, 인구의 95% 이상을 잘 "포함한다" (Southwood et al. (1998) J. Immunol 160:3363). 각각의 프레임-바이-대립유전자 "평가"는 예측된 HLA 결합 친화도에 대한 진술이다. EpiMatrix 평가 점수는 대략 -3으로부터 +3까지의 범위이며 정규적으로 분포된다. 1.64 이상의 EpiMatrix 평가 점수는 "적중"으로 정의된다; 즉 잠재적으로 면역원성이며 추가로 고려할 가치가 있다.
- [0394] 다른 모든 인자가 동일하면, 주어진 단백질에 포함된 HLA 리간드(즉 EpiMatrix 적중)가 많을수록, 단백질이 면역 반응을 유발할 가능성이 높다. EpiMatrix 단백질 점수는 주어진 크기의 단백질에서 발견될 것으로 예상되는 예측된 T 세포 에피토프의 수와 EpiMatrix System에 의해 예측된 추정 에피토프의 수의 차이이다. EpiMatrix 단백질 점수는 관찰된 면역원성과 상관관계가 있다. EpiMatrix 단백질 점수는 "정규화"되고 표준화된 척도로 플로팅될 수 있다. "평균" 단백질의 EpiMatrix 단백질 점수는 0이다. 0 초과와 EpiMatrix 단백질 점수는 과잉 MHC 리간드의 존재를 나타내며 더 높은 면역원성 가능성을 의미하는 한편 0 미만의 점수는 예상된 것보다 더 적은 잠재적 MHC 리간드의 존재 및 더 낮은 면역원성 가능성을 나타낸다. +20 초과와 단백질 특점은 상당한 면역원성 가능성을 갖는 것으로 간주된다.
- [0395] 조절 T 세포 에피토프의 존재에 대한 조정.
- [0396] 항체는 가변 도메인, 특히 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열이 놀랄 만한 정도까지 변할 수 있다는 점에서 독특한 단백질이다. 항체가 광범한 항원을 인식할 수 있게 하는 것이 이러한 가변성이다. 그러나, 항체 성숙을 제어하는 재조합 및 돌연변이 이벤트가 또한 새로운 또는 네오- T 세포 에피토프를 생성할 수 있다. 이들 네오-에피토프는 순환하는 T 세포에 "외래"인 것으로 나타날 수 있다. 항체 서열에서 네오-에피토프의 존재는 HAHA 반응 또는 ADA(항-Drug-항체)로도 알려진 인간-항-인간 항체 반응의 형성을 야기할 수 있다.
- [0397] 조절 T 세포는 돌연변이된 및/또는 고도로 가변적인 서열, 예컨대 항체 CDR을 포함하는 것을 포함하여, 말초에서 완전한 인간 단백질에 대한 면역 반응 억제에 중요한 역할을 한다. 조절 T 세포는 조절 T 세포 에피토프에 의해 결합되고 활성화된다. 항체 서열에서 네오-에피토프의 존재와 관련된 내재적 위험은 자연적으로 발생하는 조절 T 세포 에피토프의 존재에 의해 균형을 이루는 것으로 보인다.
- [0398] 많은 인간 항체 단리물 서열의 스크리닝에 의해, EpiVax는 조절 가능성이 있는 것으로 여겨지는 몇몇의 고도로 보존된 HLA 리간드를 확인했다. 실험적 증거는 이들 펩타이드 중 다수가 사실상 대부분의 대상에서 활성적으로 면역허용성을 시사한다. 이러한 고도로 보존되고 조절성이며 난잡한 T 세포 에피토프는 현재 트레지토프(Tregitope)로 알려져 있다 (De Groot et al. (2008) Blood 112:3303)
- [0399] 많은 경우에, 인간화 항체에 포함된 네오-에피토프의 면역원성 가능성은 상당한 수의 트레지토프의 존재에서 효과적으로 제어될 수 있다. 항체 면역원성 분석의 목적을 위해, EpiVax는 트레지토프-조정 EpiMatrix 점수 및 상응하는 항-치료적 항체 반응의 예측을 개발했다. 트레지토프-조정 EpiMatrix 점수를 계산하기 위해, 트레지토프의 점수가 EpiMatrix 단백질 점수로부터 차감된다. 트레지토프-조정 점수는 23개의 상용 항체의 세트에 대해 관찰된 임상적 면역 반응과 상관관계를 갖는 것으로 나타난다 (De Groot et al. (2009) Clinical Immunol. 131:189).
- [0400] 클론 29489, 29494 및 31282 항체 서열은 EpiMatrix 척도 하단에서 점수를 얻으며, 제한된 면역원성 가능성을 나타낸다. 허가된 단일클론 항체의 회귀 분석은 항체 클론 29489 및 31282에 노출된 환자의 ~0% ADA 반응을 예측한다. 클론 29494에 있어서, 분석은 기준선 VH 서열에 노출된 환자의 2.78%, 변이 VH 서열에 대해 2.88% ADA 반응을 예측한다. 데이터는 아래 표 13에 요약된다.

[0401] 표 13: EpiMatrix 및 트레지토프 조정 EpiMatrix 점수

입력 서열	길이	평가	EpiMatrix 히트	EpiMatrix 점수	트레지토프 조정된 EpiMatrix 점수
29489_VH	121	904	40	-19.41	-47.26
29489_VL	108	800	39	-17.58	-51.75
31282_VH	121	904	40	-19.41	-47.26
31282_VL	108	800	39	-17.58	-51.75
29494_VH	125	936	54	2.68	-7.18
29494_VL	107	792	40	-12.2	-38.83

[0402]

[0403] 실시예 17: 재조합 인간 TIGIT 단백질에 대한 항-TIGIT 클론의 결합에 대한 친화도 결정

[0404] 항체 31282는 다른 특허 출원에 기재된 항-TIGIT 항체 클론과 비교되었다. 구체적으로, 31282는 4.1D3.Q1E (4.1D3로도 지칭됨, W02017/053748로부터); 22G2 (W02016106302로부터); 31C6 (W02016/028656로부터); 313M2 (W02016/191643로부터); 및 TIG1 (W02017/152088로부터)와 비교된다. 비교된 항체 클론의 참조 및 서열이 아래 표 14에 나타난다:

[0405] 표 14: 경쟁적 항-TIGIT 항체의 VH 및 VL 도메인의 서열

a-TIGIT 클론	참조	서열
4.1D3.Q1E	VH: W02017/053748의 서열 번호: 34 VL: W02017/053748의 서열 번호: 36	VH 서열: EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGLEWLKITYYRFKQWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQPSLQLNSVTPEDTA VFYCTRESTTYDLLAGPFDYWGQGLTVTVSS (본원에서 서열 번호: 343) VL 서열: DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQ QKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ QYYSITPFTFGPGTKVEIK (본원에서 서열 번호: 344)
22G2	VH: W02016/106302의 서열 번호: 7 VL: W02016/106302의 서열 번호: 9	VH 서열: QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGIYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPKSRVTISVDTSKNQPSLQLSSVTAADTAVY YCARYYYVSGNYNVDYFFGVDVWGQGTITVTVSS (본원에서 서열 번호: 345) VL 서열: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQA PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWP PLFTFGPGTKVDIK (본원에서 서열 번호: 346)
31C6 (MEB125, 31C6.A1.205 V H4/VL1)	VH: W02016/028656의 서열 번호: 127 VL: W02016/028656의 서열 번호: 130	VH 서열: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQ GLEWIGYIDPYNDGAKYAQKFGQGRVTLTSDKSTSTVYMELSSLRSEDATVY CARGGPGYWFYDVGQGTITVTVSS (본원에서 서열 번호: 347) VL 서열: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEHHYSYLSWYQKPGKA PKLLIYNKATLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHPGSP LFTFGQGTLEIK (본원에서 서열 번호: 348)
313M32	VH: W02016/191643의 서열 번호: 67 VL: W02016/191643의 서열 번호: 68	VH 서열: QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWRQPPG KGLEWIGYISYSGSTSYNPSLRVITISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVY CARRQVGLGFAYWGQGLTVTVSS (본원에서 서열 번호: 349) VL 서열: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHSTP WTFG (본원에서 서열 번호: 350)
TIG1	VH: W02017/152088의 서열 번호: 10 VL: W02017/152088의 서열 번호: 14	VH 서열: DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHVVRQAPK GLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNPKNITFLQMTSLRSEDATAM YCARMLDYAMDYWGQGTSTVTVSS (본원에서 서열 번호: 351) VL 서열: DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSI SKYLAWYQKPGKT NKLIIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAMYYCQHNEY PWFPGGKLEIK (본원에서 서열 번호: 352)

[0406]

[0407]

A. 포유류 세포에서의 생산

[0408]

추가 특징규명을 위한 충분한 양의 선택된 a-TIGIT 클론을 생산하기 위해, 특정 항체 클론(클론 31282_up, 4.1D3, 22G2, 31C6, 313M32 및 TIG1)을 코딩하는 DNA 벡터를 생성하고 인간 IgG1 동형의 생산을 위한 HEK 세포에 형질도입했다. 항체 가변 도메인에 대한 인간 코돈 최적화 합성 DNA 단편을 Geneart에서 주문했다. 가변 도메인 서열을 마우스 IgKappa 신호 서열 및 각각의 항체 클래스의 불변 영역을 포함하는 pUPE 발현 벡터로 원활하게 결합시켰다. 발현 벡터는 제한 분석 및 DNA 서열결정에 의해 확인되었다. 일시적 형질주입을 위해, 확립된 프로토콜에 따라 내독소 유리 DNA 맥시프랩(Sigma)이 생성되었고 중쇄 및 경쇄 벡터를 Freestyle 배지 (ThermoFisherScientific)에서 HEK293EBNA1 세포에 동시-형질주입했다. 형질주입 후 24 시간에 프리마톤(0.55% 최종 부피)을 첨가했다. 조정 배지를 형질주입 후 6 일에 수확했다. 항체를 Mabselect sureLX (GE Healthcare) 친화도 크래마토그래피에 의해 회분식으로 정제했다. 결합 항체를 PBS 함유 1M NaCl 및 PBS로써 2 단계로 세척했다. 항체를 20 mM 시트레이트 150 mM NaCl pH3로 용리시키고 1/6 부피의 1M K2HPO4/KH2PO4 pH8로 대략 pH7까지 중성화했다.

[0409]

다음으로 항체를 PBS에서 평형화된 Superdex200 컬럼을 사용하여 겔-여과에 의해 추가로 정제했다. 분획을 NuPAGE에 의해 분석하고 항체 함유 분획을 모았다. 최종 생성물을 0.22 μM 주사기 필터에서 멸균시켰다. 생성물을 NuPAGE에 의해 분석하고 내독소 수준을 LAL-검사에 의해 측정했다.

[0410]

부가적으로, 클론 31282는 또한 IgG1 또는 IgG4 동형에서 다음과 같이 CHO-K1 세포에서 생성되었다 (클론 31282_wu). 항체를 코딩하는 DNA 벡터를 구축하고 CHO-K1 세포로 형질주입했다. 항체 가변 도메인에 대해 CHO 코돈 최적화된 DNA 단편을 합성하고, 각각의 항체 클래스의 신호 서열 및 불변 영역을 포함하는 발현 벡터에 결합시켰다. 발현 벡터는 제한 분석 및 DNA 서열결정에 의해 확인되었다. 확립된 프로토콜에 따라 중쇄 및 경쇄

백터를 전기천공(Bio-rad)에 의해 CHO-K1 세포로 공동-형질주입했다. 형질주입된 배양물을 스케일업하고 유가식(fed-batch) 배양에 집중했다. 14 일의 유가식 배양 후 컨디셔닝된 배지를 수확했다.

[0411] 직렬로 연결된 DOHC 및 AHC(Millipore)를 사용하는 두 단계의 심층 여과에 의해 수확된 세포 배양물을 먼저 정화시켰다. 이후, MabSelect SuRe(GE Healthcare)를 사용하는 친화도 크래마토그래피에 의해 정화된 수확물을 먼저 정제했다. 결합된 항체를 1 M NaCl 함유 50 mM NaAc-HAc(pH 5.5) 및 50 mM NaAc-HAc(pH 5.5)로써 2 단계로 세척했다. 이후 항체를 50mM NaAc-HAc(pH 3.5)를 용리시키고 1 M Tris-HCl(pH 9.0)로 대략 pH 5.5까지 중화시켰다.

[0412] 다음으로 중화된 중간체를 관류(flow-through) 모드에서 POROS HQ50(Life Tech)를 사용하는 음이온 교환 크래마토그래피(AEX)에 의해 추가로 정제했다. 로딩 전에 50mM NaAc-HAc (pH 5.5)에 의해 컬럼을 평형화시켰다. 로딩 및 회수 단계 동안 수집된 AEX 흐름을 POROS XS(Life Tech.)를 사용하여 결합-용리 모드에서 양이온 교환 크래마토그래피(CEX)에 의해 추가로 폴리싱했다. CEX 컬럼을 50 mM NaAc-HAc(pH 5.5)에서 평형화시키고, 항체를 10 CV에서 0.5 M NaCl를 함유하는 50 mM NaAc-HAc(pH 5.5)에 도달하도록 선형 구배 용리(LGE)에 의해 용리시켰다. Pellicon 3, ultracel 30 kD, 타입 A(Millipore)를 사용하는 최종 한외여과 및 정용여과(UF/DF)를 수행하여 CEX 용출액을 농축하고 버퍼를 20 mM His-HCl(pH 5.5)로 교환했다. 그 후, 폴리소르베이트 80(PS80) 및 수크로스를 정용여과된 샘플에 첨가하여, 농도가 20 mM His-HCl, 0.01 % (w/w) PS 80, 및 9% (w/v) 수크로스 (pH 5.5)의 버퍼에서 대략 20 g/L인 최종 생성물을 획득했다. 생성물은 모두 PQA 테스트를 거쳤다. SEC 순도, 내독소 수준 및 기타 기준 모두가 요건을 충족했다.

[0413] B. Biacore 측정

[0414] Biacore T200 기술, CM5 센서 칩(Novalix, France에서 수행)을 사용하여 HBS-EP 버퍼 시스템(10 mM HEPES pH 7.3, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween20)에서 25 ° C에서 바이오센서 분석을 수행했다. 샘플 호텔을 8° C에서 유지시켰다. 염소 항-인간 IgG 포획 항체(Fcγ 단편 특이적, Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 센서 칩의 양쪽 흐름 세포에 고정시켰다 (10000 RU). 제공된 이러한 표면 유형은 각각의 재생 단계 후 새로운 분석 항체를 재현 가능하게 포획하기 위한 형식을 제공했다. 흐름 세포 1이 참조 흐름 세포로서 사용되면서 흐름 세포 2가 포획된 항체를 분석하기 위해 사용되었다. 30 내지 0.123 nM 범위의 6가지 항원 농축물을 러닝 버퍼에서 제조했다. 3.33nM 런 중복을 제외하고, 항원 샘플 농축물 각각을 단일 반복으로 수행했다. 두 번의 블랭크 (버퍼) 주입을 또한 수행하고 시스템 인공물을 평가하고 차감하기 위하여 사용했다. 모든 항원 농축물에 대한 결합(300 s) 및 해리(600 s) 단계를 30 uL/min의 유량에서 수행했다. pH 1.5, 10 mM 글라이신-HCl의 세 번 연속 주입(15 s, 15 s 및 60 s)으로 표면을 재생시켰다. 획득된 센서그램을 전반적으로 1:1 모델로 적합시켰다 (모든 적용된 농축물에 대해 동일한 반응속도론 값 가정). 1:1 반응속도론 모델 적합을 신뢰할 수 없기 때문에, 클론 313M32에 대한 정상 상태로부터 친화도를 또한 결정했고, 결합 시간의 마지막에 인간 TIGIT와의 평형을 나타냈다. 여러 상이한 a-TIGIT 클론에 대해 획득한 결과가 표 15에 보고된다.

[0415] 표 15: 반응속도론 및 친화도 평가

클론	반응속도론 모델 1:1 결합				정상 상태 모델	
	K _a (1/s)	K _d (1/s)	K _d (nM)	R _{max} (RU)	K _d (nM)	R _{max} (RU)
31282_wu	3.86 ⁺⁰⁸	4.62 ⁻⁰⁴	0.120	16.7		
31282_up	3.70 ⁺⁰⁶	4.75 ⁻⁰⁴	0.128	15.3		
4.1D3	1.07 ⁺⁰⁶	4.72 ⁻⁰⁵	0.044	14.4		
22G2	2.51 ⁺⁰⁶	1.78 ⁻⁰⁴	0.071	11.1		
31C6	3.10 ⁺⁰⁸	2.09 ⁻⁰⁴	0.067	16.7		
313M32	na	na	na	na	10.1	17.2
TIG1	5.24 ⁺⁰⁶	1.31 ⁻⁰²	2.49	11.1		

[0416]

[0417] 실시예 18: 항-TIGIT 길항성 항체의 세포 결합

[0418] A. Jurkat-hTIGIT에 대한 항-TIGIT 클론의 결합

[0419] 인간 항-TIGIT 항체의 친화도가 인간-TIGIT(Jurkat hTIGIT)로 형질도입된 Jurkat E6.1 세포를 사용하여 측정되었다. hTIGIT에 대한 선택된 항체의 친화도를 분석하기 위해, 10⁵ 세포를 웰마다 분배하고 감소하는 농도(8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.062; 0.031; 0.016; 8x10⁻³ 및 4x10⁻³ nM)의 다양한 항-TIGIT 길항제 항체 클론과 함께 (도 2) 인큐베이션했다. 항체를 FACS 버퍼에서 세포와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척

후, 세포를 항-인간 Ig(Fc 감마 특이적)- PE (eBioscience, 12-4998-82, 2.5 µg/ml)와 함께 20min 동안 얼음 상에서 인큐베이션하고 두 번 세척했다. 형광 강도를 LSR BD Fortessa를 사용하여 분석했고 세포 결합을 표면에서 TIGIT를 발현하는 세포에서 PE의 중위 형광 강도로서 기록했다.

[0420] Jurkat-hTIGIT에 대한 결합의 절반-최대 농도(EC₅₀)를 Prism에서 4-변수 곡선-적합 방정식을 사용하여 계산했다. 결과는 도 22A에 도시되고 값은 아래 표 16에 요약된다. Jurkat-hTIGIT 결합에 대한 EC₅₀ 값은 클론 31282에 대한 것과 매우 근접하며 HEK 세포에서 (31282_{up}, 0.13nM) 또는 CHO-K1 세포에서 (31282-wu, 0.10nM) 생성된 항체 사이에 현저한 차이가 없다. 클론 31C6 및 TIG1은 또한 0.2nM 미만의 EC₅₀ 값을 나타내는 한편 다른 클론(4.1D3, 22G2 및 313M32)에 대한 친화도는 더 낮고 결과는 0.267 내지 0.445 nM 범위의 EC₅₀ 값을 나타낸다. 결과는 항-TIGIT 클론 31282, 31C6 및 TIG1에 대해 엔지니어링된 시스템에서 막 발현된 인간 TIGIT에 대한 강한 결합을 입증하는 한편 다른 클론은 더 낮은 친화도를 갖는다.

[0421] 표 16: Jurkat-hTIGIT에 대한 결합에 있어서 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 EC₅₀ 데이터 및 비교

클론	Jurkat-hTIGIT에 대한 EC ₅₀ 결합 (nM로 표현)	최상의 클론(31282-wu)의 EC ₅₀ 과 비교한 EC ₅₀ 의 배수 변화
31282-wu	0.10	1
31282-up	0.13	1.3
313M32	0.44	4.2
4.1D3	0.27	2.5
22G2	0.32	3.0
31C6	0.13	1.2
TIG1	0.17	1.6

[0422]

[0423] B. 건강한 인간 PBMC의 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 항-TIGIT 클론의 결합

[0424] 건강한 지원자로부터 단리된 인간 PBMC를 길항제 항-TIGIT 항체에 의한 결합에 대해 분석했다. 세포를 웰당 1x10⁵ 세포로 분배했다. 세포를 항-CD16(클론 3G8, BioLegend 302002), CD32(클론 FLI8.26, BD Bioscience 557333) 및 CD64(BD Bioscience 555525)와 함께 실온에서 10 min 동안 인큐베이션했고, 지시된 항-인간 TIGIT 항체 클론을 FACS 버퍼에서 8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.062; 0.031; 0.016; 8x10⁻³ 및 4x10⁻³ nM의 최종 농도로 직접 첨가하고 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 항-인간 Ig (Fc 감마 특이적)-PE (eBioscience, 12-4998-82, 2.5 µg/ml)와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 이후, 세포를 세척하고 다음 항체 및 LVD 혼합물과 함께 인큐베이션했다: 항-CD4- PercP-Cy5.5 (클론 A161A1, BioLegend 357414); 항-CD8- BV510 (클론 SK1, BD Bioscience 563919) 및 LVD efluor 660 (eBioscience 65-0864-18).

[0425] CD8⁺ 인간 일차 T 세포에 대한 결합에 있어서 EC₅₀ 값을 살아있는 TIGIT⁺ CD8⁺ T 세포에서의 MFI 신호를 사용하여 계산했다. 결과는 도 22B에 도시되고 EC₅₀ 농도는 아래 표 17에 요약된다. 인간 일차 CD8⁺ T 세포 결합에 대한 EC₅₀ 값은 클론 31282에 대한 것과 매우 근접하며 HEK 세포에서 (31282_{up}, 0.21nM) 또는 CHO-K1 세포에서 (31282-wu, 0.19nM) 생성된 항체 사이에 현저한 차이가 없다. 길항제 a-TIGIT 항체의 여러 상이한 클론 간의 비교는 클론 31282-wu(0.19 nM) 및 클론 31282-up(0.21 nM)에 대해 인간 일차 CD8⁺ T 세포에서 결합에 대한 최상의 EC₅₀ 값을 나타낸다. 클론 31C6 및 TIG1은 2 배의 EC₅₀ 차이를 나타내는 한편 클론 22G2, 313M32 및 4.1D3은 6.1 내지 9.7 배로 상이하다. 전반적으로, 31282-wu 및 31282-up은 인간 일차 CD8⁺ T 세포에서 막 발현된 TIGIT에 대한 최상의 결합을 나타낸다.

[0426] 표 17: 인간 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 결합에 있어서 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 EC₅₀ 데이터 및 비교

클론	CD8 ⁺ T 세포에 대한 결합에 대한 EC ₅₀ 농도 (nM로 표현)	최상의 클론(31282_wu)의 EC ₅₀ 에 대한 EC ₅₀ 의 배수 변화
31282_wu	0.19	1
31282_up	0.21	1.1
313M32	1.45	7.5
4.1D3	1.88	9.7
22G2	1.17	6.1
31C6	0.39	2.0
TIG1	0.38	2.0

[0427] C. 암 환자 PBMC의 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 항-TIGIT 클론의 결합

[0429] 암 환자로부터 단리된 인간 PBMC를 여러 상이한 길항제 항-TIGIT 항체 클론에 의한 결합에 대해 분석했다. 세포를 웰당 1×10^5 세포로 분배했다. 세포를 항-CD16(클론 3G8, BioLegend 302002), CD32(클론 FL18.26, BD Bioscience 557333) 및 CD64(BD Bioscience 555525)와 함께 실온에서 10 min 동안 인큐베이션했고, 지시된 항-인간 TIGIT 항체를 FACS 버퍼에서 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 및 0.031 nM의 최종 농도로 직접 첨가하고 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 항-인간 Ig (Fc 감마 특이적)-PE (eBioscience, 12-4998-82, 2.5 μg/ml)와 함께 20 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 이후, 세포를 세척하고 다음 항체 및 생존성 염료(life viability dye, LVD) 혼합물: 항-CD4-PercP-Cy5.5(클론 A161A1, BioLegend 357414); 항-CD8-BV510(클론 SK1, BD Bioscience 563919) 및 LVD efluor 520(eBioscience 65-0867-14)와 함께 인큐베이션했다. 세포를 세척 및 고정하고 BD LSR Fortessa를 사용하여 표면 염색을 정량했다. FlowJo V10.1을 사용하여 흐름 세포측정법 데이터를 분석했다. EC₅₀ 값을 계산하기 위해 게이팅된 LVD⁻TIGIT⁺CD8⁺ 세포에서의 TIGIT MFI를 사용했다. 비선형 회귀 곡선이 도 22C에 나타나고 값은 아래 표 18에 요약된다.

[0430] 클론 31282_wu 및 31282_up은 암 환자의 CD8⁺ T 세포에 대한 결합에 있어서 매우 근접한 EC₅₀ 값을 나타내며 각각 0.14 및 0.12 nM의 농도이다. 나머지 클론은 더 낮은 친화도를 나타내며 클론 31C6, TIG1 및 22G2는 각각 1.5, 2.7 및 3.1 배 더 낮은 친화도를 나타낸다. 클론 313M32에 대해 측정된 EC₅₀ 값은 클론 31282_up과 비교하여 8.3 배 더 낮다. 클론 4.1D3는 가장 낮은 친화도를 나타내며, 테스트된 최상의 클론에 대해 9.5 배의 차이로 결합한다.

[0431] 표 18: 암 환자의 인간 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 결합에 있어서 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 EC₅₀ 데이터 및 비교

클론	CD8 ⁺ T 세포 결합에 대한 EC ₅₀ 값 (nM로 표현)	최상의 클론(31282)의 EC ₅₀ 과 비교한 EC ₅₀ 의 배수 변화
31282_wu	0.14	1.2
31282_up	0.12	1.0
313M32	1.0	8.3
4.1D3	1.15	9.5
22G2	0.37	3.1
31C6	0.18	1.5
TIG1	0.33	2.7

[0432] 실시예 19: 항-TIGIT 길항제 항체 클론과 TIGIT 천연 리간드(CD155) 사이의 경쟁 검사

[0434] 인간 TIGIT를 과발현하는 Jurkat 세포(Jurkat-hTIGIT)를 수집하고 5×10^4 세포/웰로 분배하고 다음 농도: 133,33; 42,20; 13,33; 4,22; 1,33; 0,422; 0,133; 0,042; 0,0133; $4,2 \times 10^{-3}$; $1,3 \times 10^{-3}$; $4,2 \times 10^{-4}$; $1,3 \times 10^{-4}$; $4,2 \times 10^{-5}$ nM의 항-인간 TIGIT 항체와 함께 완전 배지에서 45 min 동안 37° C에서 인큐베이션했다. 과량의 항체

를 세척한 다음, 세포를 15 µg/ml의 CD155-His(Creative Biomart, PVR-3141H)와 함께 45 min 동안 37° C에서 인큐베이션했다. 이후, 결합된 CD155-His를 항-His tag-PE(Biolegend, 362603, 테스트당 2 µl)를 사용하여 검출하고 30 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. 세포를 BD LSRFortessa를 사용하여 FACS에 의해 분석했고 CD155 결합을 막는 절반 농도(IC₅₀)를 전체 세포에서 PE의 중위 형광 강도에 기초하여 계산했다.

[0435] 결과는 도 23에 도시되고 값은 아래 표 19에 요약된다. 항-TIGIT 클론 31282_wu 및 31282_up은 hTIGIT를 발현 하도록 엔지니어링된 Jurkat 세포에서 CD155 경쟁에 대해 최상의 IC₅₀ 값을 나타내며 각각 0.05 및 0.04nM의 농도이다. 다른 클론(4.1D3, 22G2, 31C6, TIG1)은 0.07 내지 0.09nM의 IC₅₀ 값을 가지는 한편 클론 313M32 클론은 훨씬 더 낮은 효율(0.65nM)로 TIGIT에 대한 결합에 있어서 CD155와 경쟁한다.

[0436] 표 19: 인간 TIGIT에 대한 CD155 경쟁에 있어서 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 IC₅₀ 데이터 및 비교

클론	TIGIT 결합에 대한 CD155 경쟁의 IC ₅₀ (nM로 표현)	최상의 클론(31282_up)의 IC ₅₀ 과 비교한 IC ₅₀ 의 배수 변화
31282_wu	0.05	1.3
31282_up	0.04	1
313M32	0.65	16.7
4.1D3	0.07	1.9
22G2	0.09	2.2
31C6	0.07	1.7
TIG1	0.06	1.6

[0437]

[0438] 실시예 20: 길항성 항-TIGIT 클론의 기능적 특징규명

[0439] A. Jurkat-hTIGIT 세포를 사용한 TIGIT 기능 검사

[0440] 인간 TIGIT 수용체 차단 기능의 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 발명자들은 hTIGIT를 발현하는 Jurkat 세포 및 TCR 결합(engagement) 시 활성화되는 루시퍼레이스 리포터(Promega의 Thaw-and-Use TIGIT 이펙터 세포)를, 인간 PVR/CD155 및 TCR 활성제를 발현하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주(Promega의 Thaw-and-Use CD155 aAPC/CHO-K1)와 공동-배양했다. TIGIT-과발현 Jurkat 세포의 활성화는 Jurkat 세포에 대한 TCR 결합 시 CD155-발현 CHO-K1 세포와의 접촉에 의해 유발될 수 있고 길항제 항-TIGIT 항체의 존재에서 증가될 수 있다. Jurkat 세포 활성화를 증가시키는 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 효능을 비교하기 위해, 증가하는 항체 농도의 존재에서 실험을 수행했고 EC₅₀ 값을 계산했다.

[0441] CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 시딩하고 37° C, 5% CO2 인큐베이터 O/N에서 인큐베이션했다. 그 다음 날, TIGIT 이펙터 세포(Promega, CS198811)를 제조업체의 권장사항에 따라 증가하는 농도(0.03; 0.11; 0.33; 1.06; 3.34; 10.56; 33.38; 105.49; 및 333 nM)의 항-TIGIT 항체를 갖는 신선한 완전 배지를 함유하는 CD155 aAPC/CHO-K1 세포 플레이트에 첨가하고 37° C, 5% CO2에서 6 시간 동안 인큐베이션했다. 6 시간의 인큐베이션 후, Bio-Glo™ 루시퍼레이스 검사 시스템(Promega, G7941)을 사용한 루시퍼레이스 활성 측정에 의해 TIGIT 이펙터 세포의 활성화를 검사했다.

[0442] 도 24A에 나타나고 표 20에 요약되는 바와 같이, 검사에서 EC₅₀ 값 및 루시퍼레이스 신호의 최대 유도 측면에서 항-TIGIT 항체 31282가 최상의 효능을 갖는다. HEK (31282_up) 또는 CHO-K1 (31282_wu) 세포에서 생성된 클론에 대해 관찰된 활성은 대조군 동형(Bioexcell, BE0297)보다 8 배 더 높은 최대 루시퍼레이스 신호와 비교되고 EC₅₀ 농도는 각각 3.3nM 및 3.5nM에서 측정된다. 비교로서, 클론 4.1D3, 22G2 및 31C6은 동형 대조군과 비교하여 5 내지 10nM의 EC₅₀와 관련된 5.3 내지 6.7 배의 최대 활성을 갖는다. 클론 313M32 및 TIG1에 대한 EC₅₀ 값은 낮은 활성 및 테스트된 농도에서 미흡한 커브 적합으로 인해 결정될 수 없었다 (도 24A).

[0443] 표 20: Jurkat-hTIGIT 세포에서 기능적 활성화에 대한 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 EC₅₀ 데이터 및 비교

클론명	동형 대조군과 비교한 유도 (배수 변화)	EC ₅₀ (nM)	최상의 클론(31282_wu)의 EC ₅₀ 과 비교한 EC ₅₀ 의 배수 변화
31282_wu	8.4	3.5	1.1
31282_up	8.0	3.3	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	5.8	10.3	3.1
22G2	5.3	5.2	1.6
31C6	6.7	5.3	1.6
TIG1	/	P.F.	/

[0444] P.F.: 미흡한 적합

[0445] B. 건강한 지원자의 인간 일차 CD8⁺ T 세포에서의 TIGIT 기능 검사

[0446] 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 건강한 인간 공여자의 PBMC의 인간 일차 CD8⁺ T 세포를 인간 PVR/CD155를 발현하고 인간 T 세포를 활성화하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주와 함께 공동-배양했다. 발명자들은 엔지니어링된 CD155-발현 CHO-K1 세포의 존재에서 CD8⁺ T 세포에 의한 IFN γ 의 방출이 차단 항-TIGIT 길항성 항체로써 hTIGIT를 차단하여 증가될 수 있음을 발견했다. IFN γ 방출을 증가시키는 이들 항체의 효능을 비교하기 위해, 증가하는 항체 농도의 존재에서 실험을 수행했고 EC₅₀ 값을 계산했다.

[0447] CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 U-바텀 96-웰 플레이트에서 시딩하고 37° C, 5% CO2 인큐베이터 0/N에서 인큐베이션했다. 다음 날, 제조업체의 권장사항에 따라 네거티브 선별 키트(Stemcell Technologies, 17953)를 사용하여 건강한 공여자의 전혈로부터 분리된 냉동 인간 말초 혈액 단핵 세포(Immunehealth)로부터 CD8⁺ T 세포를 정제했다. 이후 정제된 CD8⁺ T 세포 및 증가하는 농도(0,011 nM, 0,033nM, 0,11 nM, 0,33nM, 1,06nM, 3,3nM, 10,6nM, 33,3nM 및 105,5nM)의 항체를 CD155 aAPC/CHO-K1(100,000 CD8⁺ T 세포/100 μ l의 항체 함유 완전 배지)에 첨가하고 37° C, 5% CO2에서 5 일 동안 인큐베이션했다. 최종적으로, 제조업체의 권장사항에 따라 실행된 ELISA 검사(Affymetrix eBioscience, 88-7316-86)를 사용하여 세포 상청액에서 IFN γ 농도를 평가했다.

[0448] 도 24B에 나타나고 표 21에 요약된 바와 같이, a-TIGIT 클론 31282 및 4.1D3은 최상의 IFN γ 분비 유도를 나타내고 각각 동형 대조군 항체에 비해 2.7 및 2.9 배 증가이다. 클론 31282는 0.13nM에서 측정된 EC₅₀ 농도 측면에서 IFN γ 생성의 유도에 대해 최상의 효능을 갖는다. 클론 31C6은 2.3 배 상이한 EC₅₀ 값을 나타내는 한편 클론 22G2 및 4.1D3은 클론 31282보다 3.1 및 10.8 배 더 적은 효능이다. 낮은 활성 및 테스트된 농도에서 미흡한 커브 적합으로 인해 클론 313M32에 대해 값이 결정될 수 없었다 (도 24B).

[0449] 표 21: 인간 일차 CD8⁺ T 세포에서 기능적 활성화에 대한 여러 상이한 a-TIGIT 클론의 EC₅₀ 데이터 및 비교

클론	동형 대조군과 비교한 유도 (배수 변화)	EC ₅₀ (nM)	최상의 클론(31282_wu)의 EC ₅₀ 과 비교한 EC ₅₀ 의 배수 변화
31282_wu	2.7	0.13	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	2.9	1.43	10.8
22G2	1.5	0.41	3.1
31C6	1.6	0.30	2.3

[0450] C. 암 환자의 인간 일차 CD3⁺ T 세포에서의 TIGIT 기능 검사

[0452] 암 환자의 T 세포에서 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 암 환자의 PBMC의 인간 일

차 $CD3^+$ T 세포를 인간 PVR/CD155를 발현하고 인간 T 세포를 활성화하도록 엔지니어링된 CHO-K1 세포주(CHO-TCR-CD155)와 함께 공동-배양했다. 발명자들은 엔지니어링된 CD155-발현 CHO-K1 세포의 존재에서 $CD3^+$ T 세포에 의한 IFN γ 의 방출이 항-TIGIT 길항제 항체 31282로써 hTIGIT를 차단하여 증가될 수 있음을 발견했다.

[0453] CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 세포를 제조업체의 권장사항에 따라 U-바텀 96-웰 플레이트에서 시딩하고 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터 O/N에서 인큐베이션했다. 다음 날, 제조업체의 권장사항에 따라 네거티브 선별 키트(Stemcell Technologies, 17951)를 사용하여 24h 전에 수집된 암 환자(HNSCC)의 전혈로부터 분리된 신선한 인간 말초 혈액 단핵 세포(Biopartners)로부터 $CD3^+$ T 세포를 정제했다. 이후 정제된 $CD3^+$ T 세포 및 66,7nM의 항체를 CD155 aAPC/CHO-K1(100,000 $CD3^+$ T 세포/100ul의 항체 함유 완전 배지)에 첨가하고 37° C, 5% CO₂에서 5일 동안 인큐베이션했다. 최종적으로, 제조업체의 권장사항에 따라 실행된 ELISA 검사(Affymetrix eBioscience, 88-7316-86)를 사용하여 세포 상청액에서 IFN γ 농도를 평가했다.

[0454] 도 24C에 나타나는 바와 같이, 항체 31282는 IFN γ 분비를 증가시키는 강한 기능적 활성을 유도했고, 암 환자의 PBMC T 세포를 재활성화시키는 이러한 a-TIGIT 항체의 가능성을 입증한다.

[0455] D. a-TIGIT 클론 31282는 암 환자 PBMC 및 분리된 종양 세포(DTC)의 T 세포에서 세포내 사이토카인 생성을 증가시킨다

[0456] 이 실시예에서, 새롭게 분리된 일차 PBMC 및 신장 암종 암 환자로부터 분리된 종양 세포(dissociated tumour cell, DTC) 내의 종양 침윤된 림프구로부터 T 세포 사이토카인 생성을 평가하기 위해 세포내 흐름 세포측정법 염색을 수행했다. DTC의 경우, 종양을 기계적으로 다진 다음 특정 종양 유형에 대한 제조업체의 지시에 따라 gentleMACS 분리기에서 종양 분리 키트(Miltenyi Biotech #130-095-929)와 함께 회전시키면서 인큐베이션했다. 세포내 염색을 수행하기 전에 세포를 16h 동안 T 세포 자극 비드 각테일(Dynabeads, Thermo Fisher)로 자극시켰다. 자극의 최종 3 시간 동안, 단백질 수송 억제제 각테일(eBioscience) 및 세포 자극 각테일(eBioscience)을 세포에 첨가했다. 접합 항체를 eBioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend 또는 BD Biosciences로부터 구입했다. 제조업체의 지시에 따라 여과된 FACS 버퍼(PBS + 2mM EDTA + 0,1%BSA) 및 Brilliant Stain 버퍼(BD #563794)를 사용하여 표면 염색을 수행했다. 표면 염색 전에 세포를 적절한 인간 FcBlock(BD #564220)으로 차단했다. 세포내 염색을 위해, BD Cytotfix/cytoperm 용액(BD Biosciences)을 사용하여 세포를 고정하고 투과화시켰다. 세포를 다음의 항체 패널로 염색했다: 항-CD45-BB515 (클론 HI30, BD Horizon 564585), 항-CD73-BV421 (클론 AD2, BD Horizon 562430), 항-CD8a-BV510 (클론 SK1, BD Horizon 563919), 항-CD3-BV650 (클론 SK7, BD Horizon 563999), 항-IFN γ -BV711 (클론 4S.B3, BD Horizon 564793), 항-IL-2-APC (MQ1-17H12, eBioscience 17-7029-82), 항-CD4-APC-R700 (클론 RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), 항-TIGIT-PE (클론 MBSA43, eBioscience E13456-108), 항-CD39-PE-Dazzle594 (클론 A1, Biolegend 328224) 및 TNF α -PE-cy7 (클론 Mab11, eBioscience 25-7349-82). 획득은 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 수행되었고 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)로 분석되었다. 생존 세포를 전방 및 측방 산란에서 게이팅했다. T 세포 서브세트는 다음과 같이 게이팅되었다: PBMC에 대해 $CD45^+ CD3^+$ 및 DTC에 대해 $CD45^+ CD3^+ CD4^+$ 및 $CD45^+ CD3^+ CD8^+$. 비염색 및 비자극 대조군을 사용하여 사이토카인-분비 T 세포를 게이팅했다.

[0457] 도 24D는 IL2, IFN γ 및 TNF α 의 세포내 함량이 a-TIGIT 클론 31282의 존재에서 활성화 시 모두 증가했음을 나타낸다. 이러한 증가는 도 24C에 도시된 데이터에 따라 PBMC의 $CD3^+$ T 세포에서 관찰되었지만 분리된 종양 세포의 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ TIL에서도 마찬가지였다. 이는 암 환자 T 세포의 PBMC 및 TIL 집단의 활성화를 증가시키는 a-TIGIT 클론 31282의 잠재력을 입증한다.

[0458] 실시예 21: a-TIGIT 클론 31282는 암 환자의 PBMC에서 Treg의 우선적인 세포독성을 유도한다

[0459] 이 실시예에서, 폐 암 환자로부터 분리된 PBMC를 완전 RPMI 배지(10% 열 불활성화 FBS + 50U 페니실린 + 50 U 스트렙토마이신으로 보충됨)에 재현탁시켰다. 96U 웰 플레이트에서 웰당 2.5×10^5 인간 PBMC를 분배했다. 항-인간 TIGIT 항체 클론 31282, 인간 IgG1 동형 대조군(BioXcell BE0297) 또는 리톡시맵(InvivoGen hcd20-mab1)을 각각의 상응하는 웰에 6.6nM의 최종 농도로 첨가했다. 세포를 20h 동안 37° C에서 5% CO₂로 인큐베이션했다. 이후 세포를 수집하고 다음의 항체 패널로 염색했다: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), 항-TCR α -PerCP-Cy5.5 (클론 IP26, Biolegend 306723), 항-CD4-BV510 (클론 SK3, BD Horizon 562970), 항-CD8-APC-Cy7 (클론 SK1, Biolegend 344714), 항-CD25-BV605 (클론 2A3, Biolegend 562660), 항-CD127-APC (A019D5,

Biolegend 351316), 항-CCR7-BV421 (클론 G043H7, Biolegend 353207) 및 항-CD45RO-PE-Cy7 (클론 UCHL1, Biolegend 304229). 게이팅된 생세포에 대해 결과가 제시된다 제조업체의 설명서에 따라 AccuCheck Counting beads(Life technologies)를 사용하여 절대 정량을 수행한다. μ l당 절대 세포 수의 계산 후, 다음의 식 = $(1 - (31282 \text{ TIGIT 항체 처리된 샘플에서 } \mu\text{l당 세포의 절대 수} / \text{대조군 동형 처리된 샘플의 삼중복의 평균})) \times 100$ 을 사용하여 특이적 용해의 %가 계산된다. 결과는 삼중복 \pm SD에 대한 특이적 용해의 평균 %로서 제시된다. ADCC/ADCP 이펙터 세포의 세포독성 활성은 리톡시맵과 함께 인큐베이션 시 게이팅된 CD19⁺ 세포에서의 특이적 세포 용해 %를 측정하여 평가되었다.

[0460] 도 25에 나타나는 바와 같이, 항-TIGIT 클론 31282는 CD45RO⁺CCR7^{+/+}CD8⁺ T 세포 (전체 메모리 CD8⁺ T 세포) (-1.48 \pm 6 %) 또는 CD45RO⁺CCR7^{+/+}CD4⁺ T (전체 메모리 CD4⁺ T 세포) (0.64 \pm 3 %)보다 Treg 세포 (30.1 \pm 3 %)에서 더 높은 특이적 용해를 촉발한다. 리톡시맵 양성 대조군은 게이팅된 CD19⁺ 세포에 대한 특이적 용해의 77.9% (\pm 6.8%)를 촉발한다. 전반적으로 데이터는 전체 메모리 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 집단과 비교하여 암 환자 PBMC의 Treg 세포의 우선적 고갈을 입증한다. 유사한 Treg 세포의 우선적 고갈이 결장 선암증 환자의 세포를 사용하여 관찰되었다.

[0461] **실시예 22: 암 환자 PBMC 및 분리된 종양 세포의 면역 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명**

[0462] 흐름 세포측정법 분석을 수행하여 새롭게 단리된 일차 PBMC의 면역 세포 서브세트 및 암 환자로부터 분리된 종양 세포(DTC) 내의 종양 침윤된 림프구에서의 TIGIT 발현을 평가했다. 상이한 적응증으로부터 샘플을 획득했다: 난소암, 신장암, HNSCC, 피부 암종, 흑색종 및 폐암. DTC의 경우, 종양을 기계적으로 다진 다음 특정 종양 유형에 대한 제조업체의 지시에 따라 gentleMACS 분리기에서 종양 분리 키트(Miltenyi Biotech #130-095-929)와 함께 회전시키면서 인큐베이션했다. 밀도 구배 배지(Lymphoprep Axis-Shield #1115758)에서 전혈로부터 PBMC를 단리했다. 표현형 데이터를 건강한 개체로부터 단리된 냉동 PBMC와 비교했다 (n=10).

[0463] 제조업체의 지시에 따라 여과된 FACS 버퍼(PBS + 2mM EDTA + 0.1%BSA) 및 Brilliant Stain 버퍼(BD #563794)를 사용하여 세포를 염색했다. 염색 전에 세포를 적절한 인간 FcBlock(BD #564220)으로 차단하고 획득 전에 IC 고정 버퍼(eBioscience #00-8222-49)를 사용하여 고정시켰다. DTC를 다음의 항체 패널로 염색했다: 항-CD45-BB515 (클론 HI30, BD Horizon 564585), 항-CD73-BV421 (클론 AD2, BD Horizon 562430), 항-CD8a-BV510 (클론 SK1, BD Horizon 563919), 항-CD3-BV650 (클론 SK7, BD Horizon 563999), 항-CD56-BV711 (클론 5.1H11, Biolegend 362542), 항-CD279-BV785 (클론 EH12.2H7, Biolegend 329930), 항-CD127-APC (클론 A019D5, Biolegend 351316), 항-CD4-APC-R700 (클론 RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), 항-TIGIT-PE (클론 MBSA43, eBioscience E13456-108), 항-CD39-PE-Dazzle594 (클론 A1, Biolegend 328224) 및 CD25-PE-cy7 (클론 BC96, Biolegend 302612). PBMC를 다음의 항체 패널로 염색했다: 항-CD45RO-BB515 (클론 UCHL1, BD Horizon 564529), 항-CD73-BV421 (클론 AD2, BD Horizon 562430), 항-CD8a-BV510 (클론 SK1, BD Horizon 563919), 항-CD3-BV650 (클론 SK7, BD Horizon 563999), 항-CD56-BV711 (클론 5.1H11, Biolegend 362542), 항-CD197-BV786 (클론 3D12, BD Horizon 563710), 항-CD127-APC (클론 A019D5, Biolegend 351316), 항-CD4-APC-R700 (클론 RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), 항-TIGIT-PE (클론 MBSA43, eBioscience E13456-108), 항-CD39-PE-Dazzle594 (클론 A1, Biolegend 328224) 및 CD25-PE-cy7 (C1 bone BC96, Biolegend 302612). 획득은 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 수행되었고 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)로 분석되었다. 생존 세포를 전방 및 측방 산란에서 게이팅했다. 다양한 면역 세포 서브세트가 다음과 같이 게이팅되었다: CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁻ (CD3⁺CD4⁺ 비-Treg 세포), CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺ (조절 T 세포), CD3⁺CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺ T 세포), CD3⁻CD56⁺ (NK 세포), CD3⁺CD56⁺ (NKT 세포), CD3⁻CD56⁻ (비-T/NK 세포). Quantibrite PE 비드(BD #340495)를 동일한 기기 설정에서 작용시키고 형광 데이터를 세포당 결합된 항체의 수로 전환시키는 데 사용했다.

[0464] 백분위수를 계산하기 위해 Tukey 방법을 사용하는 상자 수염 표현을 사용하여, 여러 상이한 면역 집단에서의 TIGIT 발현 빈도가 도 26A에 나타나고 각각의 서브세트에 대한 TIGIT 밀도가 도 26B에 나타난다.

[0465] 데이터는 T 세포 서브세트에서의 TIGIT 빈도가 건강한 공여자의 PBMC와 비교하여 암 환자의 PBMC에서 더 높음을 나타낸다. 이 빈도는 DTC TILS에서 더욱 증가한다 (도 26A). CD3⁺CD4⁺ 비-Treg 세포 및 CD4⁺ Treg 세포의 표면에서의 TIGIT 밀도에 대해 동일한 관찰이 이루어지지만, CD3⁺CD8⁺ T 세포에 대해 세포당 TIGIT 분자의 수가

DTC TILS에서 감소한다 (도 26B).

[0466] **실시예 23: TIGIT 및 클론 31282의 구조적 및 기능적 에피토프 지도화**

[0467] 항-TIGIT mAb 클론 31282 및 TIGIT 재조합 단백질 사이의 상호작용을 추가로 특징규명하고 이해하기 위해, X-선 회절에 의해 TIGIT와의 복합체에서 31282의 결정 구조를 결정했다.

[0468] A. *TIGIT 및 Fab 발현, 정제 및 결정화*

[0469] 인간 TIGIT 잔기 23-128은 Proteros Biostructures GmbH에 의해 생산되었다. N-말단 HIS-태그(트롬빈 절단 가능)를 갖는 TIGIT(23-128)를 pET15b에 클로닝하고 봉입체에서 37 ° C에서 B121(DE3) 중의 LB 배지에서 발현시켰다. 봉입체(inclusion body, IB)를 Tris/HCl pH 7.4 및 Tris/HCl pH 7.4, 0.05 % Brij-35 함유 버퍼로 세척했다. IB를 6 M Gdm/HCl, 50 mM Tris pH 8.5 및 10 mM DTT로 변성시켰다. 리폴딩이 50 mM Tris/HCl pH8, 1 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 150 mM NaCl에서 수행되었다. 리폴딩된 단백질을 HIS-트랩에서 정제했다. 트롬빈 절단을 통해 N-말단 HIS-태그를 제거하고 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 200 mM NaCl에서 평형화된 Superdex-75에서 추가로 정제했다.

[0470] Fab 단편 발현을 위해, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 0.1% 플루로닉과 함께 Freestyle F17에서 HEK293F 세포를 성장시켰다. 형질주입을 위해 확대된 배양물을 3 L 삼각 플라스크(Corning, 2 L 세포 배양 작업 부피, 37° C, 8% v/v CO₂, 80 - 120 rpm, 50 mm 진폭)에서 배양했다.

[0471] 배양물을 형질주입 하루 전에 희석하고 세포 수를 1×10^6 세포/ml로 조정했다. 발현 배양물의 부피는 6L였다. Fab의 경쇄 및 중쇄를 위한 플라스미드를 사용하여 일시적 형질주입을 수행했다. DNA/FectoPro의 MasterMix(FectoPro, PolyPlus)를 순수한 F17 배지에서 제조하고 10 분 동안 인큐베이션했다 (PolyPlus 프로토콜에 따라). 이러한 형질주입 혼합물을 세포 현탁액에 적첨하고 부스터(Booster)를 즉시 첨가했다. 형질주입 18 시간 후에 배양물에 3 g/L 글루코스를 공급했다.

[0472] Fab 단편의 정제를 위해, 형질주입 6 일 후 원심분리에 의해 HEK293 세포 배양물의 6L 상청액을 수확하고 30 ml KappaSelect 컬럼에 적용했다. KappaSelect를 PBS pH 7.4로 세척하고, pH 3 소듐 시트레이트로 용리시키고 Fab 함유 분획을 Tris 버퍼로 중화시켰다. Fab를 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl에서 평형화된 Superdex S-200 컬럼에서 추가로 정제하고 추가로 사용할 때까지 -80° C에서 보관했다.

[0473] Fab-TIGIT 복합체 형성을 위해, 1.5:1의 비율로 정제된 TIGIT를 정제된 Fab와 혼합하고 복합체를 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl에서 평형화된 Superdex-200에서 정제했다. 결정화를 위해 Fab-TIGIT 복합체를 35 mg/ml까지 농축했다. Fab-TIGIT 복합체를 0.1 μ l 단백질 용액(20mM TRIS pH 8.0; 100 mM NaCl에서 35.3 mg/ml)을 1:1 비율로 저장 용액(0.10 M 소듐 카코딜레이트 pH 6.00; 15% (w/v) PEG4000)과 혼합하여 증기 확산 방법을 사용하여 277K에서 결정화했다. 결정을 25 % 글리세롤이 첨가된 저장 용액에 결정을 침지시켜 동결-보존했다.

[0474] B. *데이터 수집 및 가공*

[0475] 동결-프로토콜은 Proteros Biostructures GmbH 표준 프로토콜을 사용하여 확립되었다. 결정을 급속 동결하고 100 K의 온도에서 측정했다. 극저온 조건을 사용하여 SWISS LIGHT SOURCE(SLS, Villigen, Switzerland)에서 Fab-TIGIT 복합체 결정으로부터 X-선 회절 데이터를 수집했다.결정은 공간군 P1에 속한다. 데이터를 프로그램 XDS 및 XSCALE를 사용하여 가공했다. 데이터 수집 및 가공 통계는 표 22에서 찾을 수 있다.

표 22: 데이터 수집 및 가공 통계

X-선원	PXII/X10SA (SLS ¹)
파장 [Å]	1.0000
검출기	PILATUS 6M
온도 [K]	100
공간군	P1
셀: a; b; c; [Å] $\alpha; \beta; \gamma; [^\circ]$	41.73; 71.46; 110.26 96.7; 95.8; 106.5
분해능 [Å]	2.31 (2.56-2.31)
고유 반사	50537 (13271)
다중도	2.0 (1.9)
완전성 [%]	96.1 (95.3)
R _{syn} [%]	8.1 (43.5)
R _{meas} [%]	11.0 (59.1)
평균(I)/sd ³	8.11 (1.94)

¹ SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)² 괄호 안의 값은 가장 높은 해상도 빈(bin)을 지칭한다³ 독립적인 반사로부터 계산됨

C. 구조 모델링 및 개선

구조를 결정하고 분석하기 위해 필요한 상 정보는 분자 대체에 의해 획득되었다. 이전에 풀린 Fab 구조를 검색 모델로서 사용했다. 후속 모델 구축 및 개선은 소프트웨어 패키지 CCP4 및 COOT를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행되었다. 최종 모델의 정확성을 교차-검증하기 위한 측정치인 자유 R-인자의 계산을 위해, 측정된 반사의 약 2.5 %가 개선 절차에서 제외되었다 (표 23 참조).

TLS 개선(REFMAC5, CCP4 사용)이 수행되었고, 이는 더 낮은 R-인자 및 더 높은 품질의 전자 밀도 지도를 야기했다. 자동으로 생성된 로컬 NCS 제약이 적용되었다 (최신 REFMAC5 버전의 키워드 "ncsr local"). 상응하는 라이브리리 파일의 리간드 파라미터화 및 생성이 각각 CHEMSKETCH 및 LIBCHECK(CCP4)를 사용하여 수행되었다.

물 모델은 3.0에서 윤곽이 지정된 Fo-Fc 지도의 피크에 물 분자를 넣은 다음 REFMAC5를 사용하여 개선하고 COOT의 검증 도구로 모든 물을 점검하여 COOT의 "Find waters" 알고리즘으로써 구축되었다. 의심되는 물 목록에 대한 기준은 다음과 같았다: 80 Å² 초과 B-인자, 1.2 σ 미만의 2Fo-Fc 지도, 2.3 Å 미만 또는 3.5 Å 초과 가장 가까운 접촉부까지의 거리. 의심되는 물 분자 및 리간드 결합 부위(10 Å 미만의 리간드까지의 거리)에 있는 물 분자를 수동으로 점검했다. 최종 복합체 구조를 PHENIX를 사용하여 개선했다. 발명자들은 XYZ 좌표, 실제 공간, 개별 B-인자 및 그룹 B-인자를 포함하는 개선 파라미터를 선택했다. X-선/입체화학 중량 최적화 및 NCS 제약이 또한 개선을 위해 선택되었다. 최종 모델의 라마찬드란 플롯은 바람직한 영역에서 모든 잔기의 95.39 %, 허용된 영역에서 3.95 %를 나타낸다. 최종 구조 및 개선 과정의 통계치는 표 23에 나열된다.

표 23: 개선 통계치¹

분해능 [Å]	108.40-2.31
반사의 수 (실시/테스트)	49289 / 1247
R _{워크}	0.2025
R _{프리} [%]	0.2466
총 원자 수:	
단백질	8282
물	676
이상적 기하구조로부터의 편차 : ³	
결합 길이 [Å]	0.003
결합 각도 [deg]	0.771
라마찬드란 플롯: ²	
바람직한 영역 [%]	95.39
허용된 영역 [%]	3.95
허용되지 않은 영역 [%]	0.66

¹ PHENIX에서 정의된 값² COOT로 계산됨

D. 전체 구조

인간 Fab 항체 단편의 중쇄 및 경쇄는 인간 항체의 전형적인 폴딩을 보여준다 (도 27A). 비대칭 단위에는 기본

적으로 동일한 전체 입체형태인 두 개의 이중-삼합체가 있다. 모델은 TIGIT의 잔기 23 내지 128, 클론 31282의 중쇄의 잔기 1 내지 224 및 클론 31282의 경쇄의 잔기 1 내지 214를 포함한다. 중쇄의 하나의 짧은 루프 영역은 전자 밀도에 의해 완전히 정의되지 않으며 따라서 모델에 포함되지 않는다.

[0486] 잔기의 에너지 기여를 추정하고 상호작용 핫스팟을 정의하기 위해 FoldX 프로그램을 사용하여 회절 이미지를 분석했다. 결합 계면을 형성하는 아미노산 잔기는 전자 밀도 지도에 잘 정의된다. 해석된 X-선 회절 데이터는 Fab 및 TIGIT 간의 상호작용을 명확하게 보여준다 (도 27B 및 27C). 클론 31282 경쇄 CDR은 TIGIT의 2 영역과 상호작용하며 CDR L1 Arg30 및 Tyr33이 TIGIT 잔기 Asn58 및 Glu60과 접촉하고; CDR L1 Arg30 및 CDR L3 Phe93이 TIGIT 잔기 Ile109와 접촉한다. CDR L2는 TIGIT와 접촉하지 않는다 (표 24). 클론 31282 중쇄는 TIGIT의 여러 상이한 영역과 상호작용하며 CDR H1 Tyr33이 잔기 Leu73에서 TIGIT와 접촉하고; CDR H2 Val50, Ser54 및 Ser57이 잔기 Leu73에서 TIGIT와 접촉하고; CDR H3 Asp102, Tyr103 및 Trp104가 잔기 Gln56, Ile68, Leu73 및 His76에서 TIGIT와 접촉한다.

[0487] α-TIGIT 클론 31282/TIGIT 복합체의 이러한 결정 구조에 기초하여, 클론 31282에 의해 접촉된 TIGIT의 잔기(클론 31282에 의해 결합된 TIGIT에 대한 에피토프 잔기) 및 TIGIT에 의해 접촉된 클론 31282의 잔기(TIGIT에 의해 결합된 클론 31282에 대한 파라토프 잔기)를 결정했다. 표 24 및 25 및 도 27C는 클론 31282의 잔기의 경쇄(표 24) 또는 중쇄(표 25)와 접촉하는 TIGIT의 잔기를 나타낸다. 접촉 잔기는 다음 기준 각각을 충족시키는 각각의 아미노산으로서 정의되었다: (i) 0.3 kcal/mol 초과인 계산된 결합 자유 에너지 기여를 갖는다, (ii) X-선 구조에서 모든 잔기의 평균 B-인자보다 낮은 실험 평균 B-인자를 갖는다, (iii) 4.0 앙스트롬 이하의 거리에서 항체 원자와의 적어도 3 쌍의 중원자 원자간 접촉을 만든다, (iv) 용매 노출된 수소 결합 또는 이온성 상호작용만을 하지 않는다, (v) 비방향족 극성 잔기(Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys 또는 Arg)인 경우, 항체와 적어도 하나의 수소 결합 또는 이온성 상호작용을 한다.

[0488] 표 24: TIGIT의 에피토프 잔기 및 클론 31282의 경쇄 상의 상응하는 파라토프 잔기의 요약

TIGIT 아미노산	클론 31282 아미노산 경쇄
Asn 58	Tyr 33
Glu 60	Arg 30 Tyr 33
Ile 109	Arg30 Phe 93

[0489]

[0490] 표 25: TIGIT의 에피토프 잔기 및 클론 31282의 중쇄 상의 상응하는 파라토프 잔기의 요약

TIGIT 아미노산	클론 31282 아미노산 중쇄
Gln 56	Trp 104
Ile 68	Tyr 103 Trp104
Leu 73	Tyr33 Val50 Ser 54 Val 50
His 76	Asp 102 Tyr 103 Trp104

[0491]

[0492] 실시예 24: α-TIGIT 클론 31282 및 32959 간의 경쟁 검사.

[0493] 인간 IgG1 동형의 항-TIGIT 항체 클론 32959가 HEK 세포에서 생성되고 위의 실시예 17에 기재된 바와 같이 정제되었다.

[0494] 인간 TIGIT(Jurkat-hTIGIT)를 과발현하는 Jurkat 세포를 수집하고 5×10^4 세포/웰로 분배하고 다음 농도: 0nM (No Ab), 0.08nM, 0.16nM, 0.8nM 및 8nM의 길항제 α-TIGIT 클론 31282와 함께 인큐베이션했고, 상기 농도는 이 클론의 Kd의 0 내지 100 배의 농도 범위를 나타낸다. 과량의 항체를 세척하고, 세포를 감소하는 농도(8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.062; 0.031; 0.016; 0.008 및 0.004 nM)의 직접 결합된 (AF647) 항-TIGIT 클론 32959

와 함께 30 min 동안 4° C에서 인큐베이션했다. LSR BD Fortessa를 사용하여 기하평균 형광 강도를 분석했다. 세포 결합은 AF647의 중위 형광 강도로서 기록되었다. 클론 32959의 EC₅₀ 결합의 계산을 위해, 결합 hTIGIT-Jurkat에 대한 결합의 절반-최대 농도(EC₅₀)를 Prism에서 4-변수 곡선-적합 방정식을 사용하여 계산했고, 획득된 값이 표 26에 나타나고 도28에 도시된다. 결과는 클론 31282의 농도와 독립적으로 a-TIGIT 클론 32959의 강한 결합을 나타내며, 길항제 a-TIGIT 항체와의 경쟁이 없음을 입증한다.

표 26: 증가하는 농도의 길항제 a-TIGIT 클론 31282의 존재에서 Jurkat-hTIGIT에 대한 a-TIGIT 클론 32959의 결합에 있어서 EC₅₀ 농도

	0nM의 a-TIGIT 31282	0.08nM의 a-TIGIT 31282	0.16nM의 a-TIGIT 31282	0.8nM의 a-TIGIT 31282	8nM의 a-TIGIT 31282
a-TIGIT 클론 32959에 대한 EC ₅₀ (nM) 결합	0.22	0.33	0.37	0.49	0.39
a-TIGIT 클론 32959에 대한 세포 결합 Jurkat 인간 TIGIT FOM (네거티브와 비교한 배수)	588				

실시예 25: 시노몰구스 원숭이에서 단일 정맥 주사 후 클론 31282의 독성동태학 프로파일의 결정

시노몰구스 원숭이는 정맥 일시 주사를 통해 a-TIGIT 클론 31282 IgG1 또는 IgG4를 받았다. 항체는 3 가지의 상이한 농도(0.1mg/kg; 1mg/kg; 10mg/kg)로 2 동물(1 수컷 및 1 암컷)에게 투여되었다. 1일 투여 후 504 시간에 걸쳐 혈액을 수집했다. 혈액 샘플을 혈장에 대해 처리하고 ELISA 방법을 사용하여 a-TIGIT 클론 31282 IgG1 또는 IgG4의 농도에 대해 분석했다. 개별 동물의 혈장 농도-시간 데이터를 Phoenix WinNonlin (버전 6.3, Pharsight, a Certara Company, Princeton, NJ)의 혈관내 모델을 사용하여 IV 투여 후 a-TIGIT 클론 31282 IgG1 및 IgG4에 대한 독성동태학 파라미터 값을 계산하기 위해 사용했다.

0.1, 1, 및 10 mg/kg의 a-TIGIT 클론 31282 IgG1 및 IgG4의 IV 일시 투여 후, IgG1 농도는 각각 투여 후 240 h, 336 h, 및 504 h에 걸쳐 수컷 및 암컷 원숭이의 혈장에서 정량 가능했고, IgG4는 각각 168 h, 240 h, 및 504 h에 걸쳐 정량 가능했다 (도 29 및 표 27). a-TIGIT 클론 31282 IgG1 또는 IgG4의 정맥내 일시 투여 후 IgG1 및 IgG4에 대한 전신 노출에서 명백한 성별-관련 차이가 없었고 (C_{max} 및 AUC_{last}), 비율(수컷/암컷)은 0.855 내지 1.16 범위였다.

a-TIGIT 클론 31282 IgG1을 수컷 및 암컷 원숭이에게 정맥내 일시 투여한 후, 혈장 IgG1 농도는 모든 용량 수준에서 이상적으로(biphasically) 감소했고, 평균 말단 반감기(t_{1/2})는 84.7-174 h 범위였다 (도 29). 전신 청소율(CL)은 0.280 내지 0.392 mL/h/kg 범위의 연구된 용량에 걸쳐 일정했다. 명백한 정상 상태에서의 분포 용적(V_{ss})은 테스트된 용량 수준에서 일정했고, 값은 53.7-66.5 mL/kg 범위였다. 0.1 내지 1 mg/kg 및 1 내지 10 mg/kg 범위에서 a-TIGIT 클론 31282 IgG1 용량의 10-배 증가는 노출에서 대략 비례적인 증가를 야기했다 (9.57- 내지 14.5-배 증가).

수컷 및 암컷 원숭이에게 a-TIGIT 클론 31282 IgG4를 정맥내 투여한 후, 혈장 IgG4 농도는 테스트된 모든 용량 수준에서 이상적으로 감소했고, t_{1/2}는 148-334 h였다 (도 29 및 표 28). CL은 0.160 내지 0.219 mL/h/kg 범위의 테스트된 용량 수준에서 일정했다. 평균 V_{ss}는 41.2-70.7 mL/kg 범위였다. 0.1 내지 1 mg/kg 및 1 내지 10 mg/kg 범위에서 a-TIGIT 클론 31282 IgG4 용량의 10-배 증가는 IgG4에 대한 노출에서 대략 비례적인 증가를 야기했다 (9.32- 내지 12.5-배 증가).

표 27: 시노몰구스 원숭이에서 정맥 일시 투여 후 a-TIGIT 클론 31282 인간 IgG1에 대한 평균 독성동태학 파라미터의 요약

a-TIGIT 클론 31282 인간 IgG1			
용량 (mg/kg)	0.1	1	10
C _{최대} (ug/ml)	2.34	22.4	268
t _{최대} (h)	1	1	1
AUC _{최종} (h*ug/ml)	224	2330	33700
t _{1/2} (h)	174	84.7	111
Cl (mL/h/kg)	0.292	0.392	0.280
V _{ss} (mL/kg)	66.5	57.2	53.7

표 28: 시노물구스 원숭이에서 정맥 일시 투여 후 a-TIGIT 클론 31282 인간 IgG4에 대한 평균 독성동태학 파라미터의 요약

a-TIGIT 클론 31282 인간 IgG4			
용량 (mg/kg)	0.1	1	10
C _{최대} (ug/ml)	2.81	26.2	283
t _{최대} (h)	1	1	1
AUC _{최종} (h*ug/ml)	238	2690	39100
t _{1/2} (h)	251	334	182
Cl (mL/h/kg)	0.190	0.160	0.216
V _{ss} (mL/kg)	65.7	70.7	57.5

실시예 26: 인간 종양 세포 집단에서 TIGIT 발현의 특징규명

흐름 세포측정법 분석을 수행하여 상이한 적응증의 혈액암을 갖는 암 환자의 혈액 샘플에서 정상 및 종양 T 또는 B 세포에서의 TIGIT의 발현을 평가했다.

악성 및 정상 CD4⁺ T 세포 집단에서의 TIGIT 발현을 비교하기 위해 세자리 증후군 환자 샘플을 테스트했다. 이들 집단을 분리하기 위해, Beckman Coulter TCR-Vb 레퍼토리 키트(#IM3497)를 사용하여 악성 클론 TCR-Vb 재배열의 사전 결정을 수행했다. 악성 클론이 확인되면, TIGIT 발현이 다음 시판 시약을 사용하여 세자리 증후군 환자의 면역 세포에서 프로파일링되었다: 항-CD3 Krome Orange (#B00068), 항-CD4-PE(#A07751), 항, CD8-PC7(#737661), 항-CD56-PC5 (#A07789), 항-CD45-Pacific Blue (#A74763), 항-CD19-AF750 (#A94681) 및 항-Vb8-FITC (#IM1233) (모두 Beckman-Coulter로부터 입수) 및 항-TIGIT-APC (클론 MBSA43, ebiosciences # 17-9500-42). 세자리 증후군 환자 샘플의 흐름-세포측정법 분석을 CytoFlex 장치(Beckman-Coulter)에서 수행했다. 데이터를 FloJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)로 분석했다.

대표적인 예가 도 30A에 나타난다. 악성 TCR-Vb8 클론을 갖는 이 공여자에 대한 게이팅 전략이 도 30A에 나타나며 악성 세포는 CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁺이고 정상 CD4⁺ T 세포는 CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁻이다. 정상 CD4⁺ T 세포와 비교하여 TIGIT의 강한 발현이 악성 CD4⁺ T 세포에서 관찰된다 (각각 4987 및 999의 MFI) (도 30B).

유사하게, 흐름 세포측정법 분석을 수행하여 CLL을 갖는 환자의 골수 샘플에서 정상 및 악성 B 세포에서의 TIGIT의 발현을 평가했다. 샘플을 다음의 항체 패널로 염색했다: LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), 항-CD45-BB515 (클론 HI30, BD Horizon 564585), 항-CD5-BV510 (클론 UCHT2, Biolegend 363381), 항-CD19-BV711 (클론 SJ25C1, BD Horizon 563036) 및 항-TIGIT-PE (클론 MBSA43, eBioscience E13456-108). 획득은 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 수행되었고 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)로 분석되었다. 생존 세포를 전방 및 측방 산란에서 게이팅했다. 다양한 세포-서브세트가 다음과 같이 게이팅되었다: CD45⁺CD19⁺CD5⁻ (정상 B 세포) 및 CD45⁺CD19⁺CD5⁺ (악성 B-CLL).

대표적인 예가 도 31에 나타나고 게이팅 전략이 도 31A에 도시된다. 정상 B 세포와 대조적으로 (1%) 높은 비율의 악성 B-CLL 세포가 TIGIT에 대해 양성이다 (75%) (각각 1440 및 810의 MFI) (도 31B).

종합적으로, 획득된 데이터는 종양 세포가 특정한 혈액암 적응증에서 TIGIT를 발현함을 입증한다.

실시예 27: 마우스 T 세포 림프종 모델에서 단일요법에서 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 활성.

이 실험을 위해, 마우스 TIGIT(EL4-mTIGIT)를 안정적으로 발현하도록 EL4 T 세포 림프종 세포(ATCC® TIB-39™)를 엔지니어링했다. GFP를 코딩하는 유사한 벡터로써 형질도입된 EL4 세포를 대조군(EL4-GFP)으로서 사용했다. 세포의 풀을 서브클로닝하여 EL4-mTIGIT 및 EL4-GFP의 클론을 획득했다. 사용된 항-TIGIT 항체는 항

체 29527의 변형된 버전이었고 (VH FR3의 잔기 27이 L로부터 V까지 돌연변이되고 VH FR4의 잔기 6이 M으로부터 T까지 돌연변이되도록 변형됨) 인간 IgG1 동형에서 생성되었다. 8 주의 암컷 Balb/c 마우스에게 1.000.000 EL4-mTIGIT 세포 또는 200.000 EL4-GFP 세포를 피하 접종했다. 접종 후 7 일째에, 종양 부피가 평균 약 110 mm^3 였을 때, 마우스는 동일한 종양 부피를 갖는 처리군에서 무작위화되었다 (EL4-mTIGIT에 대해 군마다의 $n=15$ 및 EL4-GFP에 대해 군마다의 $n=10$). 마우스를 200 μg 의 항-TIGIT 또는 동형 대조군 항체(hIgG1, BioXcell)로 종양 접종 후 7 일, 10 일, 13 일 및 16 일에 복강내 주사에 의해 처리했다. 종양 성장을 모니터링하고 종양 부피를 전자 캘리퍼스로 7일부터 26일까지 일주일에 세 번 측정했다. 종양 부피가 2000 mm^3 를 초과했을 때 마우스를 희생시켰다. 종양 성장 곡선을 선형 혼합 모델에 의해 통계적으로 분석했다. 시간*처리군의 상호작용을 테스트하여 처리군 간의 차이를 평가했다.

[0515] 도 32는 EL4-mTIGIT (A-C) 또는 EL4-GFP (D-F) 접종된 마우스에서의 종양 성장 곡선을 도시한다. 중위 종양 성장 곡선(A 및 D) 및 hIgG1 동형 대조군(B 및 E) 또는 길항제 a-TIGIT Ab(C 및 F)로 처리된 마우스에 대한 개별 종양 성장 곡선이 나타난다. EL4-mTIGIT 세포를 접종한 마우스에서, 동형 대조 처리군($p<0.001$)과 비교하여 항-TIGIT Ab로 처리 시 유의한 종양 성장 억제가 있었다. 동형 대조군 항체로 처리된 군에서, 15 마리 중 3 마리의 마우스가 모델의 말미에서 700 mm^3 미만의 부피로 종양 성장의 제어를 나타냈고, 이 숫자는 길항제 항-TIGIT 항체로 처리한 군에서 15 마리 중 8 마리의 마우스로 증가했다. 길항제 a-TIGIT 처리를 동형 대조군 항체와 비교 시 EL4-GFP 종양 보유 마우스에서 항-종양 효능 또는 완전한 반응을 관찰할 수 없었다. 이들 데이터는 함께 길항제 a-TIGIT 항체(hIgG1)가 TIGIT를 발현하는 종양 세포를 갖는 모델에서 유의한 항종양 효능을 가짐을 입증한다.

[0516] **실시예 28: CT26 결장 암종 마우스 모델에서 면역 관문 항체와 병용된 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 활성**

[0517] 항-TIGIT Ab와 항-PD1 항체의 병용 이외에도 (실시예 12, 13 및 14), 항-TIGIT 항체의 항종양 효능이 또한 공동-자극 분자 4-1BB, OX40 및 GITR에 특이적인 작용제 항체뿐만 아니라 관문 억제 분자 ICOS에 특이적인 길항제 항체와의 병용에서 평가되었다.

[0518] CT26 종양 세포주를 ATCC® (CRL-2638™)로부터 구입했다. 8 주의 암컷 balb/c 마우스에게 오른쪽 옆구리에서 500.000 세포를 피하 접종했다. 접종 후 9 일째에, 종양 부피가 평균 약 75mm^3 였을 때, 마우스는 동일한 종양 부피를 갖는 처리군에서 무작위화되었다 (군 당 $n=10$ 마우스). 모든 항체는 무작위화 당일에 시작하여 3 일 마다 총 3 회 주사로 복강내로 주어졌다. 사용된 항-TIGIT 항체는 항체 29527의 변형된 버전이었고 (VH FR3의 잔기 27이 L로부터 V까지 돌연변이되고 VH FR4의 잔기 6이 M으로부터 T까지 돌연변이되도록 변형됨) IgG2a 동형에서 생성되었으며, 20 μg /마우스로 주어졌다. 항-4-1BB(클론 3H3, BioXCell, BE0239)는 5 μg /마우스로 주어졌고, a-OX-40(클론 OX-86, BioXCell, BE0031)은 20 μg /마우스로 주어졌고, a-GITR(클론 DTA-1, BioXCell, BE0063)은 10 μg /마우스로 주어졌고; a-ICOS(클론 7E.17G9, BioXCell, BE0059)은 200 μg /마우스로 주어졌다. 종양 성장을 모니터링하고 종양 부피를 전자 캘리퍼스로 7일부터 35일까지 일주일에 세 번 측정했다. 종양 부피가 2000 mm^3 를 초과했을 때 마우스를 희생시켰다. 종양 성장 곡선을 로그 변환된 종양 부피에서 선형 혼합 모델에 의해 통계적으로 분석했다. 시간*처리군의 상호작용을 테스트하여 처리군 간의 차이를 평가했다. 이는 매우 작은 종양 부피(10mm^3 미만)를 제외하고는 대부분의 데이터에 우수한 모델 적합을 야기했다. 그러므로, 이들 작은 종양 부피는 결측값으로서 처리되었다. 항-TIGIT 항체와 상응하는 면역 관문 항체(IC - 즉 항-41BB, 항-OX40, 항-GITR 및 항-ICOS)의 병용으로부터 발생하는 상승 효과를 테스트하기 위해, 처리군을 두 변수의 조합: 항-TIGIT (네/아니오) 및 IC (네/아니오)에 의해 재부호화했다. 각 처리의 부가 효과(항-TIGIT*시간 및 IC*시간) 이외에 상승 효과를 상호작용 항 항-TIGIT*IC*시간을 테스트하여 평가했다.

[0519] 도 33A는 단일요법 또는 항-4-1BB와의 병용에서 항-TIGIT에 의해 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 항-TIGIT 또는 항-4-1BB 단일요법과 비교하여 항-TIGIT + 항-4-1BB로 처리된 마우스에서 유의한 종양 성장 억제가 있었다 (각각 $p=0.0005$ 및 $p<0.0001$). 항-TIGIT 및 항-4-1BB 항체의 병용은 단일 제제로서 a-TIGIT 또는 a-4-1BB 각각으로 처리된 군에서 1/10 또는 0/10 완전한 반응과 비교하여 완전한 반응(종양이 $<30\text{mm}^3$ 이고 측정 불가능한 것으로 간주됨)을 나타내는 6/10 마우스를 야기했다. 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 항-4-1BB와 병용하는 항-TIGIT 요법의 유의한 항-종양 효능을 입증한다.

[0520] 도 33B는 단일요법 또는 항-OX-40과의 병용에서 항-TIGIT에 의해 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성

장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 항-TIGIT 또는 항-OX-40 단일요법과 비교하여 항-TIGIT + 항-OX-40로 처리된 마우스에서 유의한 종양 성장 억제 효과가 있었다 (각각 $p=0.0002$ 및 $p<0.0001$). 항-TIGIT + 항-OX-40의 병용은 두 가지 단일요법 치료의 부가 효과보다 높은 상승적 항-종양 효능을 달성했다 ($p=0.02$). 항-TIGIT 및 항-OX-40 항체의 병용은 단일 제제로서 a-TIGIT 또는 a-OX-40 각각으로 처리된 군에서 1/10 또는 0/10 완전한 반응과 비교하여 완전한 반응을 나타내는 7/10 마우스를 야기했다. 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 항-OX-40과 병용하는 항-TIGIT 요법의 유의하고 상승적인 항-종양 효능을 입증한다.

[0521] 도 33C는 단일요법 또는 항-GITR과의 병용에서 항-TIGIT에 의해 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 항-TIGIT 또는 항-GITR 단일요법과 비교하여 항-TIGIT + 항-GITR로 처리된 마우스에서 유의한 종양 성장 억제 효과가 있었다 ($p<0.0001$). 항-TIGIT + 항-GITR의 병용은 두 가지 단일요법 치료의 부가 효과보다 높은 상승적 항-종양 효능을 달성했다 ($p=0.01$). 항-TIGIT 및 항-GITR 항체의 병용은 단일 제제로서 항-TIGIT 또는 항-GITR로 각각 처리된 군에서 1/10 또는 0/10과 비교하여 완전한 반응을 나타내는 6/10 마우스를 야기했다. 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 항-GITR과 병용하는 항-TIGIT 요법의 유의하고 상승적인 항-종양 효능을 입증한다.

[0522] 도 33D는 단일요법 또는 항-ICOS와의 병용에서 항-TIGIT에 의해 처리된 마우스에 대해 군마다의 중위 종양 성장 곡선 및 개별 성장 곡선을 나타낸다. 항-TIGIT 또는 항-ICOS 단일요법과 비교하여 항-TIGIT + 항-ICOS로 처리된 마우스에서 유의한 종양 성장 억제 효과가 있었다 (각각 $p=0.003$ 및 $p=0.0001$). 항-TIGIT 및 항-ICOS 항체의 병용은 단일 제제로서 항-TIGIT 또는 항-ICOS 항체 각각으로 처리된 군에서 1/10 또는 0/10과 비교하여 완전한 반응(종양이 $<30\text{mm}^3$ 이고 측정 불가능한 것으로 간주됨)을 나타내는 1/10 마우스를 야기했다. 이들 데이터는 사전 확립된 종양 치료에 대해 항-ICOS와 병용하는 항-TIGIT 요법의 유의하고 상승적인 항-종양 효능을 입증한다.

[0523] **실시예 29: $\gamma\delta$ T 세포에 대한 항-TIGIT 길항성 항체의 활성**

[0524] $\gamma\delta$ (감마-델타, 또는 g/d)T 세포는 설명된 항종양 활성(Zhao et al. 2018. J Transl Med. 16:122) 및 항바이러스 활성(예를 들어 CMV 감염)을 갖는 비통상적 T 세포의 집단이며 자가면역 질환에도 연루되어 있다 (Malik S et al. 2016. Front Immunol. 7:14).

[0525] $\gamma\delta$ 거대세포바이러스(CMV)에 대해 (CMV 상태는 EFS Nouvelle Aquitaine, Bordeaux, France에 의해 평가되었음) 혈청반응음성 또는 혈청반응양성을 갖는 건강한 개체로부터 새로 단리된 PBMC에서 T 세포 상의 TIGIT 발현을 평가하기 위하여 흐름 세포측정법 분석이 수행되었다. 제조업체의 지시에 따라 여과된 FACS 버퍼(PBS + 2mM EDTA + 0.1%BSA)를 사용하여 세포를 염색했다. 획득은 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 수행되었고 BD FACS DIVA 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석되었다. 세포를 전방 및 측방 산란 및 생존력에서 게이팅했다. $\gamma\delta$ T 세포는 다음과 같이 게이팅되었다: 다음 항체를 사용하는 $\text{CD3}^+ \text{TCR} \gamma\delta^+ \text{V}\delta 2^-$ ($\text{V}\delta 2^- \gamma\delta$ T 세포): Miltenyi의 항-TCR $\gamma\delta$ APC, 클론 REA591 #130-109-280; Miltenyi의 항-TCR $\text{V}\delta 2$ -PE-Vio 770, 클론 REA771, #130-111-012; BD Biosciences의 BV421 마우스 항-인간 CD3, 클론 UCHT1, #560365; Biolegend의 Zombie Aqua Fixable viable kit, #423101.

[0526] 통상적 $\alpha\beta$ T 세포와 유사하게, 비통상적 $\text{V}\delta 2^- \gamma\delta$ T 세포는 CMV 음성 및 양성 인간 집단 모두에서 TIGIT를 발현한다 (eBioscience의 항-TIGIT, 클론 MBSA43, #12-98500-42) (도 34A). 이러한 세포 집단에서 인간 TIGIT 수용체 차단 기능적 결과를 특징규명하기 위해, 자기적으로 단리된 $\text{V}\delta 1^+ \gamma\delta$ T 세포 (Miltenyi의 항-TCR Vd1-FITC, 클론 REA173 #130-100-532 및 항-FITC Microbeads #130-048-701) 또는 CMV 양성 공여자의 전체 PBMC를 항- $\text{V}\delta 1$ (10ug/ml) (Beckman Coulter의 클론 R9.1, #IM1761)로 활성화시키고 IL-15 (20ng/ml), Peprotech의 #200-15-50UG), IL-2 (100U/ml, #200-02-1MG Peprotech)를 TIGIT-리간드 CD155(R&D Systems의 #9174-CD-050)의 존재 또는 부재에서 단리된 $\text{V}\delta 1^+ \gamma\delta$ T 세포에 추가로 첨가했다. 도 34B는 TIGIT-리간드 CD155(0, 0.1, 1 및 10ug/ml)의 첨가에 의해 매개된 용량-의존성 $\text{IFN}\gamma$ 분비 감소(Mabtech로부터 입수한 ELISA 키트, #3420-1h-20)를 나타내고 최대 억제가 1ug/ml의 CD155에서 도달했다. 항-TIGIT Ab 클론 31282(10ug/ml)의 첨가는 CD155 리간드가 없는 조건과 동일하거나 더 높은 수준으로 $\text{IFN}\gamma$ 생성을 완전히 회복시키는 반면 인간 IgG1 동형 대조군은 매우 제한적인 효과를 갖는다. 도 34C는 a-TIGIT 클론 31282가 혼합물에 첨가될 때 전체 PBMC의 항- $\text{V}\delta 1$ 활성화 및 $\text{IFN}\gamma$ 분비의 전체 복원 후 CD155(10ug/ml)에 의해 매개된 유사한 억제 효과를 보여준다. 이들 데이터는 $\alpha\beta$ T 세포와 유사하게, $\gamma\delta$ T 세포의 활성이 TIGIT에 대한 CD155의 결찰에 의해 손상될 수 있고, 항-TIGIT 항체가 이러한 억제를 완전히 방지함을 입증한다.

도면

도면1

도 1 - VH CDR 서열

항제	VH CDR1	서열 번호:	VH CDR2	서열 번호:	VH CDR3	서열 번호:
26518	FTFSSYGMS	1	NIKQDGSEKYYVDSVKG	2	ARVSYYYDSSKLRWAEYFQH	3
26478	FTFESYGMV	4	SILYDGSNRYADSVKG	5	ARVSYYYDSVELRWAEYFQH	6
26452	YTFTSYMH	7	VINPSSGGSTSYAQKFQ	8	ARDHSDYWSGILDV	9
26487	YTFEKYYMH	10	VIGPSGASTSYAQKFQ	11	ARDHSDYWSGILHS	12
26489	YTFTSYMH	13	VIGPSGASTSYAQKFQ	14	ARDHSDYWSGIMEV	15
31282	YTFTSYMH	16	VIGPSGASTSYAQKFQ	17	ARDHSDYWSGIMEV	18
26486	YSISSGYWA	19	SIYHSGSTYYNPSLKS	20	AIEGANYYDFGYVAFDI	21
26494	GSISSGSYYLA	22	SIFRSGSTYYNPSLES	23	AIEGANFKDFGYVAFDI	24
26499	GSISSRYWA	25	SIGTSGSTYYNPSLKS	26	AIEGANFRDFGYVAFDI	27
26521	GTFSSYALS	28	GIPIFGTANYAQKFQ	29	ARHLGSSAYYGMVDV	30
26513	GTFQNYALS	31	VIVPIFGTANYAQKFQ	32	ARHLGQKAYYGMVDV	33
26493	FTFGDYAMH	34	GITWNSGSGIYADSVKG	35	AKPVPKSRGLDV	36
29520	FTFRDYAMH	37	GITWNSGLIGYADSVKG	38	AKPVPRLRGLDV	39
29523	FTFGSYMH	40	VWPDGSKNLYADSVKG	41	AKPVPKSRALDV	42
29527	FTFSSYMH	43	VIGADGSKNYYADSVKG	44	AKPVPRRRGLDV	45
31288	GSISSGSYYLA	271	SIFRSGSTYYNPSLES	272	AIEGANFKDFGYVAFDI	273
32919	GSISSGSYYLA	274	SIFRSGSTYYNPSLES	275	AIEGANFKDFGYVAFDI	276
32931	GSISSGSYYLA	277	SIFRSGSTYYNPSLES	278	AIEGANFKDFGYVAFDI	279
26432	GTFSSYALS	280	GIPIFGTANYAQKFQ	281	AREAQSRYRVPFDI	282
32959	GTFSSYLIS	353	GIYPIFATANYAQKFQ	354	AREAQSRYRVPFDI	355

도면2

도 2 - VL CDR 서열

항제	VL CDR1	서열 번호:	VL CDR2	서열 번호:	VL CDR3	서열 번호:
26518	RASQSVSSYLA	46	DASKRAT	47	QQVHNFLPT	48
28478	RASQSVSSYLA	49	DASKRAT	50	QQVHNFLPT	51
26452	RASQSVRSSYLA	52	GASSRAT	53	QQYFSPWPT	54
29487	RASQSVRSSYLA	55	GASSRAT	56	QQYFSPWPT	57
29489	RASQSVRSSYLA	58	GASSRAT	59	QQYFSPWPT	60
31282	RASQSVRSSYLA	61	GASSRAT	62	QQYFSPWPT	63
26486	RASQSVSSNLA	64	GASTRAT	65	QQSPWPRT	66
29494	RASQSVSSNLA	67	GASTRAT	68	QQSPWPRT	69
29499	RASQSVSSNLA	70	GASTRAT	71	QQSPWPRT	72
26521	RASQSISSYLN	73	AASSLOS	74	QQRYVFPPT	75
29513	RASQSISSYLN	76	AASSLOS	77	QQRYVFPPT	78
26493	RASQGISSWLA	79	GASSLOS	80	QQAFLPWT	81
29520	RASQGISSWLA	82	GASSLOS	83	QQAFLPWT	84
29523	RASQGISSWLA	85	GASSLOS	86	QQAFLPWT	87
29527	RASQGISSWLA	88	GASSLOS	89	QQAFLPWT	90
31288	RASQSVSSNLA	283	GASTRAT	284	QQSPWPRT	285
32919	RASQSVSSYLA	286	DASNRAT	287	QQENPRPRT	288
32931	RASKSVSSNLA	289	FATRAT	290	QQTSPWPRT	291
26432	RASQSVSSNLA	292	GASTRAT	293	QQYAWPPPT	294
32959	RASQSVSSNLA	356	GASTRAT	357	QQYAWPPPT	358

도면3a

도 3 - VH FR 서열

항 제	VH FR1	서열 번호:	VH FR2	서열 번호:	VH FR3	서열 번호:	VH FR4	서열 번호:
26518	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASG	91	WVRQAPGKGLEWVA	92	RFTISRDNKNSLYIQMNSL RAEDTAVYYC	93	WGQGT VT/SS	94
29478	EVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	95	WVRQAPGKGLEWVA	96	RFTVSRDNKNSLYIQMNSL RAEDTAVYYC	97	WGQGT VT/SS	98
26452	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKASG	99	WVRQAPGKGLEWVG	100	RVTMTTRDTSTVYMESSL RSEDATVYYC	101	WGQGT VT/SS	102
29487	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKASG	103	WVRQAPGKGLEWVG	104	RVTMTTRDTSTVYMESSL RSEDATVYYC	105	WGQGT VT/SS	106
29489	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKASG	107	WVRQAPGKGLEWVG	108	RVTLTRDTSTVYMESSL RSEDATVYYC	109	WGQGT VT/SS	110
31282	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSKASG	111	WVRQAPGKGLEWVG	112	RVTLTRDTSTVYMESSL RSEDATVYYC	113	WGQGT VT/SS	114
26486	QVQLVESGPGVLVKKPS ETLSLTCAVSG	115	WVRQPPGKGLEWIG	116	RVTISVDTSKNQFSLKLSVT AEDTAVYYC	117	WGQGT VT/SS	118
29494	QVQLVESGPGVLVKKPS ETLSLTCTVSG	119	WVRQPPGKGLEWIG	120	RVTISVDTSKNQFSLKLSVT AEDTAVYYC	121	WGQGT VT/SS	122
29499	QLQLQESGPGVLVKKPSE TLSLTCTVSG	123	WVRQPPGKGLEWIG	124	RVTISVDTSKNQFSLKLSVT ATDTAVYYC	125	WGQGT VT/SS	126
26521	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSKASG	127	WVRQAPGKGLEWVG	128	RVTITADESTSTAYMESSL SEDATVYYC	129	WGQGT VT/SS	130
29513	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSKASG	131	WVRQAPGKGLEWVG	132	RVTITADESTSTAYMESSL RSEDATVYYC	133	WGQGT VT/SS	134
26493	EVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	135	WVRQAPGKGLEWVS	136	RFTISRDNKNSLYIQMNSL RAEDTALYYC	137	WGQGT VT/SS	138
29520	QVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	139	WVRQAPGKGLEWVS	140	RFTISRDNKNSLYIQMNSL RAEDTALYYC	141	WGQGT VT/SS	142
29523	EVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	143	WVRQAPGKGLEWVA	144	RFTISRDNKNSLYIQMNSL AEDTALYYC	145	WGQGT VT/SS	146
29527	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	147	WVRQAPGKGLEWVA	148	RFTISRDNKNSLYIQMNSL AEDTALYYC	149	WGQGT VT/SS	150
31288	QLQLQESGPGVLVKKPSE TLSLTCTVSG	295	WVRQPPGKGLEWIG	296	RVTISVDTSKNQFSLKLSVT AEDTAVYYC	297	WGQGT VT/SS	298
32919	QLQLQESGPGVLVKKPSE TLSLTCTVSG	299	WVRQPPGKGLEWIG	300	RVTISVDTSKNQFSLKLSVT AEDTAVYYC	301	WGQGT VT/SS	302

도면3b

도 3 [계속]

32931	QLQLQESGPGLYKPS E TSLTCTVSG	303	WIRQPPGKGLEWIG	304	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVT AADIATVYYC	305	WGQGT T VTSS	306
26432	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	307	WVROAPGQGLEWIMG	308	RVTITADESTAYMELSSL R SEDTAVYYC	309	WGQGT M VTSS	310
32959	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	359	WVROAPGQGLEWIMG	360	RVTITADESTAYMELSSL R SEDTAVYYC	361	WGQGT M VTSS	362

도면 4a

도 4 - VL FR 서열

항제	VL FR1	서열 번호:	VL FR2	서열 번호:	VL FR3	서열 번호:	VL FR4	서열 번호:
26518	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	151	WYQCKPGQAPRLIY	152	GIPARFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	153	FGGTK VEIK	154
29478	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	155	WYQCKPGQAPRLIY	156	GIPARFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	157	FGGTK VEIK	158
26452	EIVLTQSPGTLSPGE RATLSC	159	WYQCKPGQAPRLIY	160	GIPDRFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	161	FGGTK VEIK	162
29487	EIVLTQSPGTLSPGE RATLSC	163	WYQCKPGQAPRLIY	164	GIPDRFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	165	FGGTK VEIK	166
29489	EIVLTQSPGTLSPGE RATLSC	167	WYQCKPGQAPRLIY	168	GIPDRFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	169	FGGTK VEIK	170
31282	EIVLTQSPGTLSPGE RATLSC	171	WYQCKPGQAPRLIY	172	GIPDRFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	173	FGGTK VEIK	174
26486	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	175	WYQCKPGQAPRLIY	176	GIPARFSGSGGTDFLTIS LQSEDFAVYYC	177	FGGTK VEIK	178
29494	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	179	WYQCKPGQAPRLIY	180	GIPARFSGSGGTDFLTIS LQSEDFAVYYC	181	FGGTK VEIK	182
29499	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	183	WYQCKPGQAPRLIY	184	GIPARFSGSGGTDFLTIS LQSEDFAVYYC	185	FGGTK VEIK	186
26521	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC	187	WYQCKPGKAPKLIY	188	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	189	FGGTK VEIK	190
29513	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC	191	WYQCKPGKAPKLIY	192	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	193	FGGTK VEIK	194
26493	DIQLTQSPSSVSASVG DRVITTC	195	WYQCKPGKAPKLIY	196	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	197	FGGTK VEIK	198
29520	DIQLTQSPSSVSASVG DRVITTC	199	WYQCKPGKAPKLIY	200	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	201	FGGTK VEIK	202
29523	DIQLTQSPSSVSASVG DRVITTC	203	WYQCKPGKAPKLIY	204	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	205	FGGTK VEIK	206
29527	DIQLTQSPSSVSASVG DRVITTC	207	WYQCKPGKAPKLIY	208	GWPSRFSGSGGTDFLTIS LQPEDFATYYC	209	FGGTK VEIK	210
31288	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	311	WYQCKPGQAPRLIY	312	GIPARFSGSGGTDFLTIS LQSEDFAVYYC	313	FGGTK VEIK	314
32919	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	315	WYQCKPGQAPRLIY	316	GIPARFSGSGGTDFLTIS LEPEDFAVYYC	317	FGGTK VEIK	318

도면4b

도 4 (계속)

32931	EIMMITQSPATLSVSPG ERATLSC	319	WYQOKPGQAPRLLIY	320	GIPARFSGSGSGTEFTLTSS LOSEDFAVYYC	321	FGGGTK VEIK	322
26432	EIMMITQSPATLSVSPG ERATLSC	323	WYQOKPGQAPRLLIY	324	GIPARFSGSGSGTEFTLTSS LOSEDFAVYYC	325	FGGGTK VEIK	326
32959	EIMMITQSPATLSVSPG ERATLSC	363	WYQOKPGQAPRLLIY	364	GIPARFSGSGSGTEFTLTSS LOSEDFAVYYC	365	FGGGTK VEIK	366

도면5a

도 5 - 가변 도메인 단백질 서열

항제	VH 단백질	서열 번호:	VL 단백질	서열 번호:
26518	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSGMSWVR QAPGKGLEWVAIIKQDSEKYYVDSWKGRFTISRDNAKN SLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVSYYYDSSKLRLWAEYFQ HWGGTLVTSS	211	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLIYDASKRATGIPARFSGSGGTDFLTISL EPEDFAVYYCQQVHNFLPTFGGGTKVEIK	212
29478	EVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAASGFTFESYGMVWWR QAPGKGLEWVAIIKQDSEKYYVDSWKGRFTISRDNAKN NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVSYYYDSSKLRLWAEYFQ HWGGTLVTSS	213	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLIYDASKRATGIPARFSGSGGTDFLTISL EPEDFAVYYCQQVHNFLPTFGGGTKVEIK	214
26482	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYYMHWVR QAPGQGLEWMGVNPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGLDWWGQG TNMTVSS	215	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	216
29487	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYYMHWVR QAPGQGLEWMGVNPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGLDWWGQG TNMTVSS	217	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	218
29489	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYYMHWVR QAPGQGLEWMGVNPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGQG TTVTSS	219	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	220
31282	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYYMHWVR QAPGQGLEWMGVNPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGQG TTVTSS	221	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	222
26486	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISGYYWAWIR QPPGKGLEWGISYHSGSTYINPSLKSRTVSDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCAIEGANYDFGYWAFDWWGQGT MVTVSS	223	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLIYGASTRATGIPARFSGSGGTDFLTISL QSEDFAVYYCQQSPWPWPRTFGGGTKVEIK	224
29494	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISGYYWAWIR QPPGKGLEWGISYHSGSTYINPSLKSRTVSDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCAIEGANYDFGYWAFDWWGQGT MVTVSS	225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLIYGASTRATGIPARFSGSGGTDFLTISL QSEDFAVYYCQQSPWPWPRTFGGGTKVEIK	226

도면5b

도 5 (계속)

29499	QLQIESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSRYWAWI RQPPGKGLEWIGSIGSGSTYYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKSSVTATDTAVYYCAIEGANFRDFGYAFDWGQGT MVTYSS	227	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTDFLTISL QSEDFATYYCQQSPFPWPRTFGGKTVEIK	228
29521	QWQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKKASGGTFSSYANISWVR QAPGGGLEWVGWPIFGTANYAOKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGSSAYYGMDDWGGGT TVTVSS	229	DIQMTQSPSSLSASWGDRVTITCRASQSISSYLMWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQQRVYFPPTFGGKTVEIK	230
29513	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKKASGGTFQNTAISWVR QAPGGGLEWVGWPIFGTANYAOKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGQKAYYGMDDWGGQ TTVTVSS	231	DIQMTQSPSSLSASWGDRVTITCRASQSISSYLMWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQQRVYFPPTFGGKTVEIK	232
26493	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFGDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGITWNSGSIYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKPSRGLDWWGQGTMY TVSS	233	DIQLTQSPSSVSAWSGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL LQPEDFATYYCQQAFLPWPFTFGGKTVEIK	234
29520	QWQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFRDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGITWNSGLIYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPRLRGLDWWGQGTMY TVSS	235	DIQLTQSPSSVSAWSGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL LQPEDFATYYCQQAFLPWPFTFGGKTVEIK	236
29523	EVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFGSYIMHWVR QAPGKGLEWVAWIWPDGSNKLAYADSVKGRFTISRDNANK TLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKPSRALDWWGQGTMY TVSS	237	DIQLTQSPSSVSAWSGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL LQPEDFATYYCQQAFLPWPFTFGGKTVEIK	238
29527	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSSYIMHWVR QAPGKGLEWVAWIGADGNKYYADSVKGRFTISRDNANK TLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKPSRGLDWWGQGTMY TVSS	239	DIQLTQSPSSVSAWSGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGWPSRFSGSGTDFLTISL LQPEDFATYYCQQAFLPWPFTFGGKTVEIK	240
31288	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSGYLAWIRQPPGK LEWIGSIFRSGSTYYNPSLESIRVTISWDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAIEGANFKDFGWAFDWWGQGTTVTVSS	327	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGTDFLTISLQSEDFAWYQQ QSPWPRTFGGKTVEIK	328
32919	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSGYLAWIRQPPGK LEWIGSIFRSGSTYYNPSLESIRVTISWDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAIEGANFKDFGWAFDWWGQGTTVTVSS	329	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFLTISLLEPEDFAWYQQ ENPRRTFGGKTVEIK	330
32931	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSGYLAWIRQPPGK LEWIGSIFRSGSTYYNPSLESIRVTISWDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAIEGANFKDFGWAFDWWGQGTTVTVSS	331	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYFASTRATGIPARFSGSGTDFLTISLQSEDFAWYQQ QTSPWPRTFGGKTVEIK	332

도면5c

도 5 (계속)

26432	QVQLVDSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSYAIISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFGTANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREAQSYRVPFDIMWGQGTIMVTSS	333	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQOKPGQA PRLLYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTFGGGTKVEIK	334
32959	QVQLVDSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSYLIISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFATANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREAQSYRVPFDIMWGQGTIMVTSS	367	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQOKPGQA PRLLYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTFGGGTKVEIK	368

도면6a

도 6 - 가변 도메인 DNA 서열

장제	VH DNA	서열 번호:	VL DNA	서열 번호:
28518	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTCGGGGAGGCTTGGTCCAGC CTGGGGGCTCCCTGAGACTCTCTGTGTCAGCTCTGGATTCTC ACCTTTAGTAGCTATGGGATGAGCTGGTGGTCCGCGAGGCTCCG GGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCTGGCAACATTAAGAGAGATGG AAGTGAAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAC CATCTCAGAGACAAACGCAAACTCACTGTATCTGCAAT GAACAGCTCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGACTACTGCG CTAGATATCTTACTACTACACAGCAGCAAACTACAGTGGG CAGAATACTTCCAAACAGTGGGGAGAGGGTTACATTTGGTCAACG TCTCTCA	241	GAAATTGTGTTGACACAGCTCCAGGCACCCCTGCTCTTGTGTC TCCAGGGGAAGAGCCACCCTCTCTCTGCGAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCTTACTTGGCTTGGTATGATGCAATCCAAAGGG CCAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGATGCAATCCAAAGGG CCAGTGGCATCCAGCCAGGTTTCACTGAGTGGTGGTGGTGG GACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGCCCTAGAGCCCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTTACTGTCAGCAGGTCCACAAATTTCCCTC TCACTTTTTGGCGAGGAGCCAAAGGTTGAGATCAAA	242
28478	GAAGTCCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGGCTGGTCCAGGC TGGGAGGTCCTGAGACTCTCTGTGTCAGCTCTGGATTCTC CTTCGAGAGCTATGGCATGGTTTGGGTCCGCGAGGCCCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGTGGATCGATATGTTATGATGGA AGTAATAGATACTATGAGACTCTGTGAGGGCCGATTCAC GTCTCCAGAGACAAATTCGAAGAACAGCTGTATCTGCAATG AACAGCTCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGACTACTGCGC TAGAGTATCTTACTACTACGACAGGGTTGAGCTAGCATGGGC AGAAATCTTCCAAACAGTGGGGAGAGGGTTACATTTGGTCAACGT CTCTCA	243	GAAATTGTGTTGACACAGCTCCAGGCACCCCTGCTCTTGTGTC TCCAGGGGAAGAGCCACCCTCTCTCTGCGAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCTTACTTGGCTTGGTATGATGCAATCCAAAGGG CCAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGATGCAATCCAAAGGG CCAGTGGCATCCAGCCAGGTTTCACTGAGTGGTGGTGGTGG GACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGCCCTAGAGCCCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTTACTGTCAGCAGGTCCACAAATTTCCCTC TCACTTTTTGGCGAGGAGCCAAAGGTTGAGATCAAA	244
28452	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTTGAGAAAGGC TGGGGCTCAGTGAAGGTTTCTTCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCACAGCTACTATGACACTGGGTGGGACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGAGTGGAGTCACTCAACCTTAGTGGTG GTAGCACAGCTTACGACAGAGTTCGAGGGGCGAGAGTCAAC ATGACCAAGGACACCTCCAGGACACAGCTTACATGAGGCT GAGCAGCTGAGATCTGAGGACAGGGGGTGTACTACTTGGC CCAGAGACCACTCCGACTACTGGAGGCGAATAC TAGAGTAT GGGGTCAAGGTACATGGTCAACCGCTCTCTCA	245	GAAATTGTGTTGACACAGCTCCAGGCACCCCTGCTCTTGTGTC TCCAGGGGAAGAGCCACCCTCTCTCTGCGAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCTTACTTGGCTTGGTATGATGCAATCCAAAGGG TGGCCAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGATGCAATCCAGC AGGGCCAGCTGGCATCCAGCAGGTTTCACTGAGTGGTGGTGG CTGGGACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGCCCTAGAGCCCT CCTTGAGTTTGGAGTGTATTTACTGTCAGCAGTCTTCAAGTCTCT CCTTGAGCTTTTGGCGAGGAGCCAAAGGTTGAGATCAAA	246
28487	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTTGAGAAAGGC TGGGGCTCAGTGAAGGTTTCTTCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCGAGAGCTACTATGACACTGGGTGGGACAGGGCCCTGG GACAGGGCTTGAAGTGGAGTGGAGTCACTCAACCTTAGTGGTG GCTAGCACAGCTACGACAGAGTTCACAGGGCGAGAGTCAAC CATGACCAAGGACAGGCTCCAGGACACAGTCTTACATGGAGC TGAGCAGCTTGAGATCTGAGGACACAGGCGGTGACTACTGCG GCCAGAGACCACTCCGACTACTGGAGGCGAATACATACATTCG TGGGGTCAAGGTACAAATGGTCAACCGCTCTCTCA	247	GAAATTGTGTTGACACAGCTCCAGGCACCCCTGCTCTTGTGTC TCCAGGGGAAGAGCCACCCTCTCTCTGCGAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCTTACTTGGCTTGGTATGATGCAATCCAAAGGG TGGCCAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGATGCAATCCAGC AGGGCCAGCTGGCATCCAGCAGGTTTCACTGAGTGGTGGTGG CTGGGACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGCCCTAGAGCCCT GAAGATTTTGGAGTGTATTTACTGTCAGCAGTCTTCAAGTCTCT CCTTGAGCTTTTGGCGAGGAGCCAAAGGTTGAGATCAAA	248

도면 6b

도 6 (계속) 항제	VH DNA	서열 번호:	VL DNA	서열 번호:
28489	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGAGCC TGGGGCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGTGATCGGGTCTTATGGGTG CTAGCAAGGCTTACGACAGAGGTTCCAGGCTCAGAGTCACT TGACAGGGACAGTCCACAGGCAAGTCTTACATGGAGCTG AGCAGCTTGAATCTTGAAGACAGGGGGTGTACTACTGCGC CAGAGACCACTCCGACTTACTGAGCGCAATATGGAGGTAT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACTGCTCTCTCA	249	GAATTTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACTCTGTTTGTG TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAAG AGTGTTAGGAGCAGCTTACCTTGGCTGGTACAGGCAAAACC TGGCCAGGCTCCCAAGGCTCTCTATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCAGAGAGGTTTCACTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCCAGATCAGCACTGAGGCT GAAGATTTGGCAGTGTATTACTGTGACGAGTACTTCACTGCT CCTTGGACTTTTGGGGGAGGAGCCAGGTTTGAGATCAAA	250
31282	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGGCC TGGGGCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGTGATCGGGTCTTATGGGTG CTAGCAAGGCTTACGACAGAGGTTCCAGGCTCAGAGTCACT TGACAGGGACAGTCCACAGGCAAGTCTTACATGGAGCTG AGCAGCTTGAATCTTGAAGACAGGGGGTGTACTACTGCGC CAGAGACCACTCCGACTTACTGAGCGCAATATGGAGGTAT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACTGCTCTCTCA	251	GAATTTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACTCTGTTTGTG TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAAG AGTGTTAGGAGCAGCTTACCTTGGCTGGTACAGGCAAAACC TGGCCAGGCTCCCAAGGCTCTCTATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCAGAGAGGTTTCACTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCCAGATCAGCACTGAGGCT GAAGATTTGGCAGTGTATTACTGTGACGAGTACTTCACTGCT CCTTGGACTTTTGGGGGAGGAGCCAGGTTTGAGATCAAA	252
28486	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGGCC TGGGGCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGTGATCGGGTCTTATGGGTG CTAGCAAGGCTTACGACAGAGGTTCCAGGCTCAGAGTCACT TGACAGGGACAGTCCACAGGCAAGTCTTACATGGAGCTG AGCAGCTTGAATCTTGAAGACAGGGGGTGTACTACTGCGC CAGAGACCACTCCGACTTACTGAGCGCAATATGGAGGTAT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACTGCTCTCTCA	253	GAATTTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACTCTGTTTGTG TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAAG AGTGTTAGGAGCAGCTTACCTTGGCTGGTACAGGCAAAACC TGGCCAGGCTCCCAAGGCTCTCTATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCTCACTGGTATCCAGGCAAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTG GGACAGGTTTCACTCTCACTCAGCAGCTGCGAGTCTGAA GATTTGCACTTTTATTTACTGTGACGAGTCTCCGCTGGGC TAGGACTTTTGGGGGAGGAGCCAGGTTTGAGATCAAA	254
28484	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGGCC TGGGGCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCACTCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGTGATCGGGTCTTATGGGTG CTAGCAAGGCTTACGACAGAGGTTCCAGGCTCAGAGTCACT TGACAGGGACAGTCCACAGGCAAGTCTTACATGGAGCTG AGCAGCTTGAATCTTGAAGACAGGGGGTGTACTACTGCGC CAGAGACCACTCCGACTTACTGAGCGCAATATGGAGGTAT GGGGTCAGGGTACAATGGTCACTGCTCTCTCA	255	GAATTTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACTCTGTTTGTG TCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAAG AGTGTTAGGAGCAGCTTACCTTGGCTGGTACAGGCAAAACC TGGCCAGGCTCCCAAGGCTCTCTATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCTCACTGGTATCCAGGCAAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTG GGACAGGTTTCACTCTCACTCAGCAGCTGCGAGTCTGAA GATTTGCACTTTTATTTACTGTGACGAGTCTCCGCTGGGC TAGGACTTTTGGGGGAGGAGCCAGGTTTGAGATCAAA	255

도면6c

도 6 (계속)

일련	VH DNA	서열 번호:	VL DNA	서열 번호:
28499	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCACGAGCTGGTGAAGCC TTCCGAGACCCCTGTCCTCAGCTGCTCTGCTGGTGGCTC CATCAGCAGTAGTAGCTACTAGTGGGCGTGGATCCGGCAGC CCCGAGGAGGGGCTGGAGTGGATGGAGTATCCGGGAC GAGTGGGAGCAGCTACTACAGCCCTGCTCCCTCAGAGTCCAG TGACCATATCCGTAGACACGTCACAGACCCAGTTCCTCCGA AGCTGAGTTCTGTCAGCCGCCACAGACACGGGGTGTACTACT CGGCCATAGAGGAGGCTAATTTTCGGGACTTCGCGATATGTAG CAATTCGACATATGGGGTCAGGGTACAAATGGTCCACCCGCTCTCT CA	287	GAAATAGTATGACGAGTCTCCAGCCACCCCTGCTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGGCGACAGCTCTCTGTCAGGGGCGCAGTCAG AGTGTAGCAGCAAACTTAGCTTGGTATCCAGCAAAACCTGG CCAGGCTCCCGAGCTCTCATCTATGTGTCATCCACACAGG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTCAGTGGCAGTGGGCTGTC GGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGCCCTGCAGCTGAA GATTTGCAAGTTTATCTACTGTCAGAGTCCGCCCTCTGGCC TAGGACTTTTGGGGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	258
28521	TGGGTCCGCTGGGTGAGGCTCTCTGCAAGGCTCTCTGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGGAGGATCCCTATCTT GGACAGGGCTTGGAGTGGGAGGATCCCTATCTCTT GCTACAGCAAACTACGACAGAGTTCCAGGGCAGAGTGCAC GATTACCGGGAGCAATCCAGAGCACAGCCCTACATGAGAC TGACAGCCCTGAGATCTGAGGACACGGGGTGTACTACTGC GCTAGGTTGCACCTGGGATCCAGCGCTTACTACGGCATGGGA TGTATGGGGCCAGGGCAAACTGTCAACCGTCTCCCTCA	259	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCTCTCTCTGCAATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCAGCTTCCCGGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACACAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTCTGATCTATGCTGATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCGATCAGGTTTCAAGTGGGAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAAG ATTTTGCACCTTACTACTGTCAGCAAGATACGCTCTCTCTCTC CTACTTTTGGGGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	260
28513	CAGGTGCAGCTGGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTTGAAAGAGCC TGGGTCTCTGGGTGAGGCTCTCTGCAAGGCTCTCTGAGGCA CCTTCAGCACTATGCTATCAGCTGGGTGGGAGGATCCCTATCTT GACAGGGCTTGGAGTGGGAGTATCTGTGGCTATCTTTG GTACAGCAAACTACGACAGAGTTCCAGGGCAGAGTCAAG GTTACCGGGAGCAATCCAGAGCACAGCCCTACATGAGGCT GAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACACGGGGTGTACTACTGCG CTAGGTGCACCTGGGACAGAGGCTTACTACGGCATGGAT GTATGGGGCCAGGGGAACTGTCAACCGTCTCCCTCA	261	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCTCTCTCTGCAATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCAGCTTCCCGGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACACAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTCTGATCTATGCTGATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCGATCAGGTTTCAAGTGGGAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAAG ATTTTGCACCTTACTACTGTCAGCAAGATACGCTCTCTCTCTC CTACTTTTGGGGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	262
28493	GAASTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGCAGGTCCCTGAGAGCTCTCTGTCAGGCTCTGTGATTAC CTTTGGTGAATTATCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGG GAAGGCCCTGGAGTGGGCTCAGGATATCTTGGAAATAGTG GTAGCATAGGCTATGGGAGCTCTGTGAAGGGCCGATTAACCA TCTCCAGAGACAACGCCAAGAACCTCCCTGTATCTGCAAAATGA ACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTTGTACTACTTGGGCC AAGCCAGTGGCAAAATCTAGAGGCTAGAGCTATGGGGTCA GGGTACAAATGGTCAACGGCTCTCTCTCA	263	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCTCTCTCTGCAATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCAGCTTCCCGGGGCAAGTCAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGGCTTGGTATCAGCAGAAACACAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTCTGATCTATGCTGATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCGATCAGGTTTCAAGTGGGAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGGCTGCAACCTGAAAG ATTTTGCACCTTACTACTGTCAGCAAGATACGCTCTCTCTCTC GGACTTTTGGGGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	264

도면 6d

도 6 (계속)

항목	VH DNA	서열 번호:	VL DNA	서열 번호:
28520	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTCTGTCAGGCCCTGGATTAC CTTTCGGGATTATGCACTGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAG GGAGGGCTGGAGTGGGCTCGAGTTACTTGGAAATAGT GGTTTATGATGGCTATGGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACG ATCTCCAGAGACACGCCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATG AACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCACGCTTGGAGGGCTTAGAGTATGGGGTC AGGTACATGGTCAACCGTCTCTCA	285	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCATCTCTCCGTGCTGTCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTGCGGGGAGTCAAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCTTGGTATTCAGCAGAAACCGAG GAAGGCCCTTAAGCTCTGTATCTATGGTGCACTCCAGTTTGC AAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCTCAACCATCAGCAGCCCTGACCCCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTGTCAGCAGGCAITCTACCTCCCTT GGACTTTTGGCGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	286
28523	GAASTCCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGGCGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTCAGGCTCTGGATTAC CTTCGGGAGCTATTATATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGCGCTGATGGA AGTAAATAAATGTTATGAGACTCCGTGAGAGGGCCGATTACCC ATCTCCAGAGACAAATTCGAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATG AACAGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCACAAATCTAGAGCGCTTGAGCTATGGGGTCA GGGTACAAATGGTCAACCGTCTCTCA	287	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCATCTCTCCGTGCTGTCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTGCGGGGAGTCAAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCTTGGTATTCAGCAGAAACCGAG GAAGGCCCTTAAGCTCTGTATCTATGGTGCACTCCAGTTTGC AAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCTCAACCATCAGCAGCCCTGACCCCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTGTCAGCAGGCAITCTACCTCCCTT GGACTTTTGGCGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	288
28527	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGGTGGTCCAGC CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTCAGGCTCTGGATTCA CCTTCAGTAGCTCTTATATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATAGGTGGGATGGA AGTAAATAAATGTTATGAGACTCCGTGAGAGGGCCGATTACCC ATCTCCAGAGACAAATTCGAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATG AACAGCTGAGAGCTGAGGACACGGCTTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCACCGCTAGAGCGCTTAGAGCTATGGGGTCA AGGTACAAATGGTCAACCGTCTCTCA	289	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCATCTCTCCGTGCTGTCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTGCGGGGAGTCAAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCTTGGTATTCAGCAGAAACCGAG GAAGGCCCTTAAGCTCTGTATCTATGGTGCACTCCAGTTTGC AAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCTCAACCATCAGCAGCCCTGACCCCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTGTCAGCAGGCAITCTACCTCCCTT GGACTTTTGGCGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	270
31288	CAGCTGCACTGTCAGGAGTCCGGGCCACGACTGGTGAAGCC TTGGAGAGCCCTGTCCTCTCACTGCACTGCTCTGTGGGCTC CATCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGCGTGGGATCCGCCAGC CCCCAGGAGGAGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTTTCCG AGTGGAGCACCTACTACAAACCGCTCCCTCGAGAGTGGAGT CAGCAATCGGTAGACACGTCCAGAAACCGAGTTCTCCCTGAA GCTGAGTTCTGTGACCGGCCGAGAGACCGGGGTGTACTACT GCGCAATAGAGGAGCTAACTTAAAGGACTTCGGATATGTAG CATTCGACATATGGGGTCAAGGGTACAACTGTCTACCGTCTCT CA	335	GAAATAGTGAAGCAGGAGTCTCCAGCCCAACCTGTGTGTCTC TCCAGGGGAAAGAGCCCAACCTCTCTCTGAGGGGCGAGTCAAG AGTGTAGCAGCAACTTAGCTTGGTACCGCAGAAACCTGG CCAGGCTCCCGAGGCTCCCTCATCTATGTGTGCACTCCAGCAGG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGAGTGGGCTG GGACAGGTTTCACTCTCAACCATCAGCAGCCCTGACGCTGAA GATTTGCACTTATTACTGTGTCAGCAGTCCCGCCCTGGGC TAGGACTTTTGGCGGAGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	336

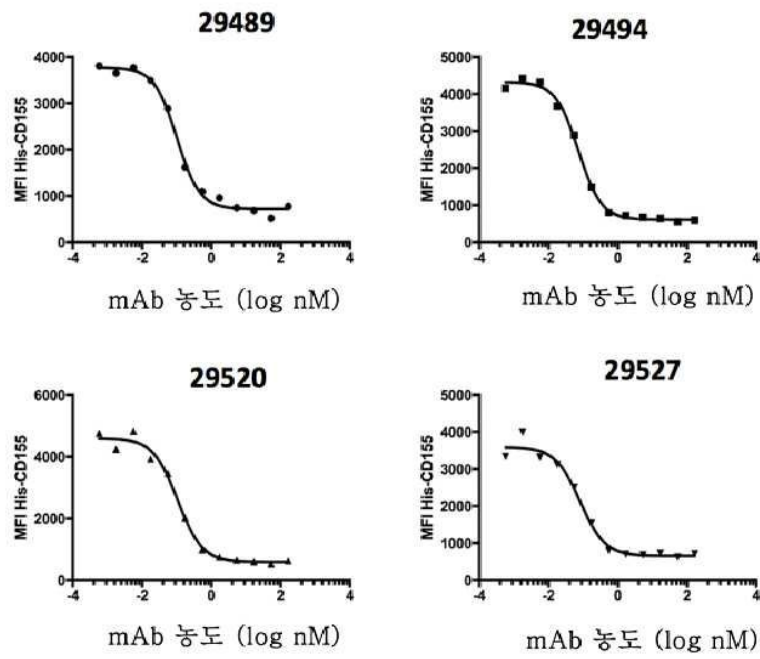
도면6e

도 6 (계속)

항제	VH DNA	서열 번호:	VL DNA	서열 번호:
32919	CAGGTGCAGCTGCGAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCTCCACCTGCACTGCTCTGGTGCTCCATCAAGCAGTGGGAGTTACTTTGGCGTGGATCCGCCAGCCGCCAGGAAAGCGGCTGGAGTGGGAGTATCTTCGGAGTGGAGCACTACTACAAACCGTCCCTGAGAGTGGAGTGGAGTATCAGGTAGACAGCTCCAAAGAACAGTTCTCCTGAAAGCTCAGTTCTGTGACCGCCGACAGACAGCGGCTGACTACTGCGCCATA,GAAGGAGCTAAGTTAAAGGACTTGGGATATGTAGCATTCGACATATGGGGTCAGGGTACAACTGTACCGCTCTCTCTCA	337	GAATATGTTGATGACACAGTCTCCAGGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCCTCTCTCCAGGGGCGCAGTCCAGAGTGTAGCAGCTTACCTTGGTACCAACAGAACTTGGCCAGGGCTCCCTCATCTATGATGATCCAAACAGGGGCACTGGCATCCGACCCAGTTCACTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCAGCATCAGCAGCCCTAGAGCTGAAGAATTTGGCAGTTTATTACTGTCAGCGAGAAACCCAGGCTTAGGACTTTTGGCGAGGGGCAAGGTTGAGATCAAA	338
32931	CAGGTGCAGCTGCGAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCTCCACCTGCACTGCTCTGGTGCTCCATCAAGCAGTGGGAGTTACTTTGGCGTGGATCCGCCAGCCGCCAGGAAAGCGGCTGGAGTGGGAGTATCTTCGGAGTGGAGCACTACTACAAACCGTCCCTGAGAGTGGAGTGGAGTATCAGGTAGACAGCTCCAAAGAACAGTTCTCCTGAAAGCTCAGTTCTGTGACCGCCGACAGACAGCGGCTGACTACTGCGCCATA,GAAGGAGCTAAGTTAAAGGACTTGGGATATGTAGCATTCGACATATGGGGTCAGGGTACAACTGTACCGCTCTCTCTCA	339	GAATATGTTGATGACAGCTCTCCAGGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCCTCTCTCCAGGGGCGCAGTCCAGAGTGTAGCAGCTTACCTTGGTACCAACAGAACTTGGCCAGGGCTCCCTCATCTATGATGATCCAAACAGGGGCACTGGCATCCGACCCAGTTCACTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCACTCAGCATCAGCAGCCCTAGAGCTGAAGAATTTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGACTTGGCCCTTGGCCTTAGGACTTTGGCGAGGGGCAAGGTTGAGATCAAA	340
26432	CAGGTGCAGCTGCGAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCTCCACCTGCACTGCTCTGGTGCTCCATCAAGCAGTGGGAGTTACTTTGGCGTGGATCCGCCAGCCGCCAGGAAAGCGGCTGGAGTGGGAGTATCTTCGGAGTGGAGCACTACTACAAACCGTCCCTGAGAGTGGAGTGGAGTATCAGGTAGACAGCTCCAAAGAACAGTTCTCCTGAAAGCTCAGTTCTGTGACCGCCGACAGACAGCGGCTGACTACTGCGCCATA,GAAGGAGCTAAGTTAAAGGACTTGGGATATGTAGCATTCGACATATGGGGTCAGGGTACAACTGTACCGCTCTCTCTCA	341	GAATATGTTGATGACAGCTCTCCAGGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCCTCTCTCCAGGGGCGCAGTCCAGAGTGTAGCAGCTTACCTTGGTACCAACAGAACTTGGCCAGGGCTCCCTCATCTATGATGATCCAAACAGGGGCACTGGCATCCGACCCAGTTCACTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCACTCAGCATCAGCAGCCCTAGAGCTGAAGAATTTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGACTTGGCCCTTGGCCTTCTTCACTTTTGGCGGAGGAGCCAGGTTGAGATCAAA	342
32959	CAGGTGCAGCTGCGAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCTCCACCTGCACTGCTCTGGTGCTCCATCAAGCAGTGGGAGTTACTTTGGCGTGGATCCGCCAGCCGCCAGGAAAGCGGCTGGAGTGGGAGTATCTTCGGAGTGGAGCACTACTACAAACCGTCCCTGAGAGTGGAGTGGAGTATCAGGTAGACAGCTCCAAAGAACAGTTCTCCTGAAAGCTCAGTTCTGTGACCGCCGACAGACAGCGGCTGACTACTGCGCCATA,GAAGGAGCTAAGTTAAAGGACTTGGGATATGTAGCATTCGACATATGGGGTCAGGGTACAACTGTACCGCTCTCTCTCA	369	GAATATGTTGATGACAGCTCTCCAGGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCCTCTCTCCAGGGGCGCAGTCCAGAGTGTAGCAGCTTACCTTGGTACCAACAGAACTTGGCCAGGGCTCCCTCATCTATGATGATCCAAACAGGGGCACTGGCATCCGACCCAGTTCACTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCACTCAGCATCAGCAGCCCTAGAGCTGAAGAATTTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGACTTGGCCCTTGGCCTTCTTCACTTTTGGCGGAGGAGCCAGGTTGAGATCAAA	370

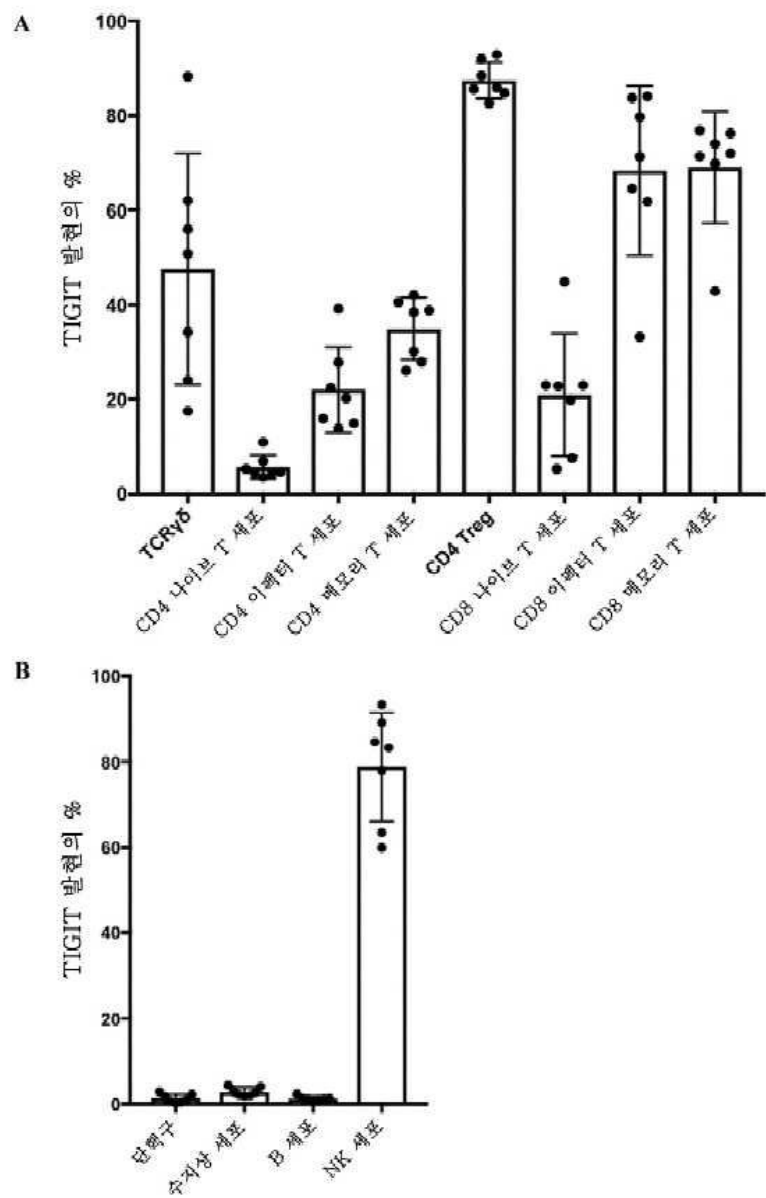
도면7

도 7 - 인간 CD155 리간드와의 경쟁



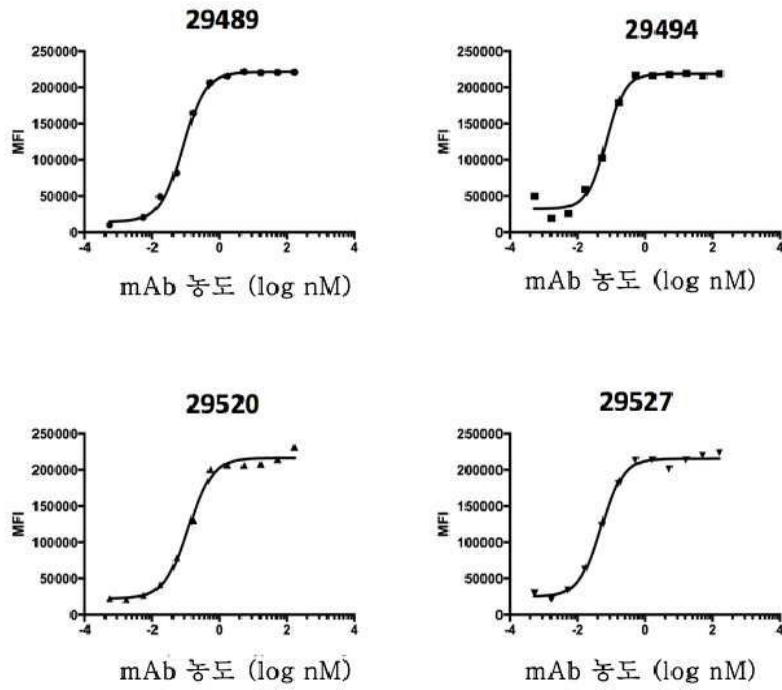
도면8

도 8 - 건강한 공여자 PBMC 의 여러 상이한 면역 집단에서 TIGIT 발현



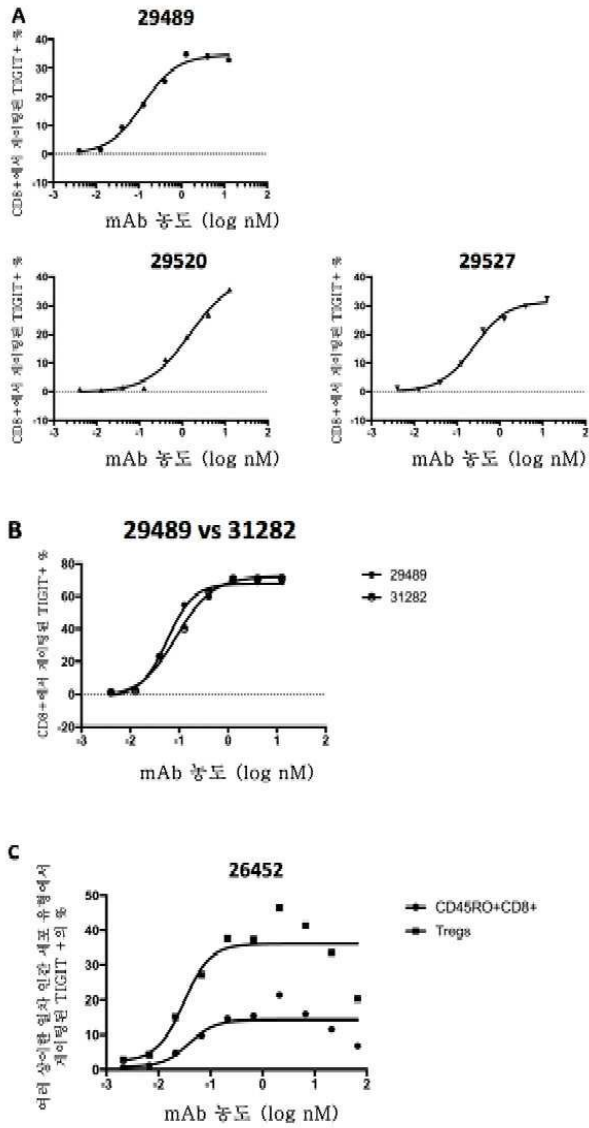
도면9

도 9 - Jurkat-hTIGIT 에 대한 결합



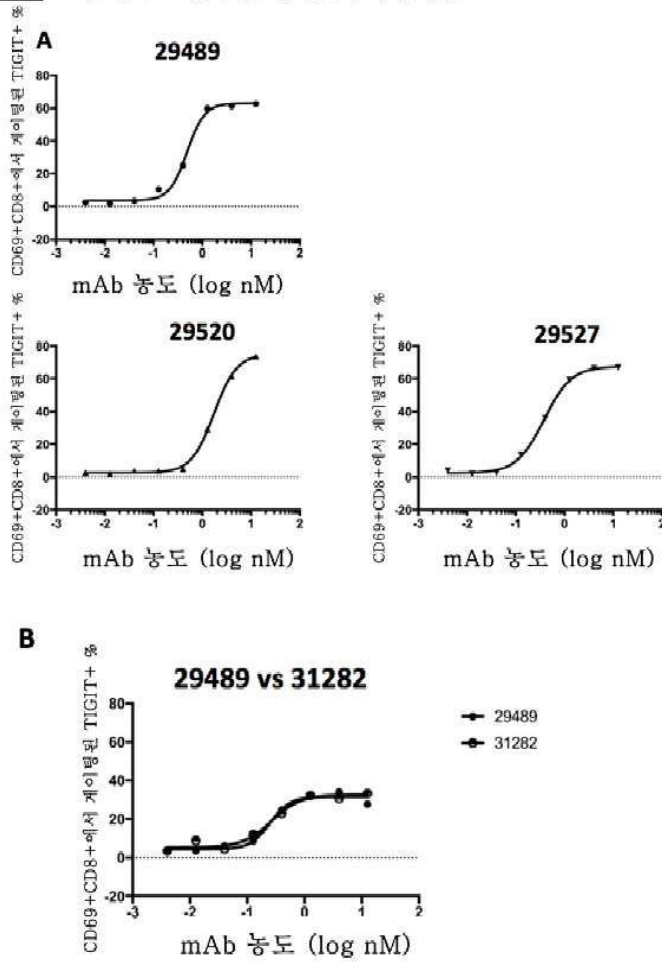
도면10

도 10 - 인간 일차 CD8⁺ T 세포에 대한 결합



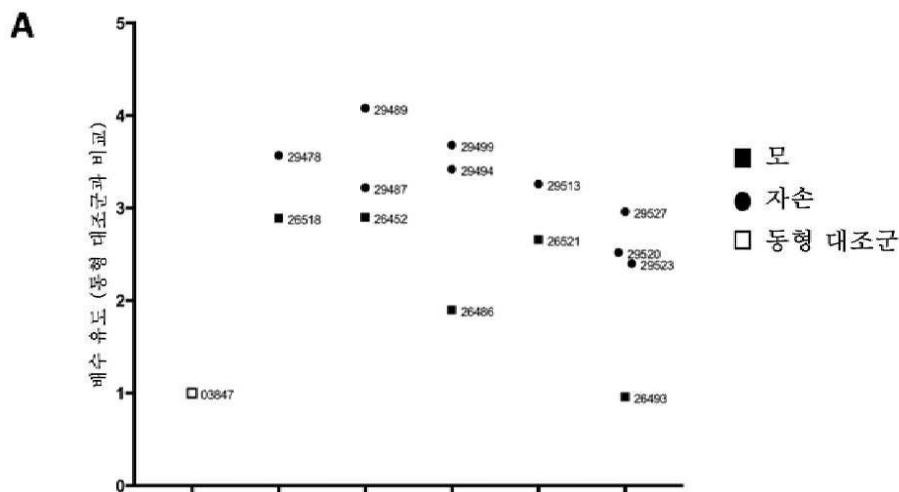
도면11

도 11 - 시노물구스 일차 CD8⁺T 세포에 대한 결합

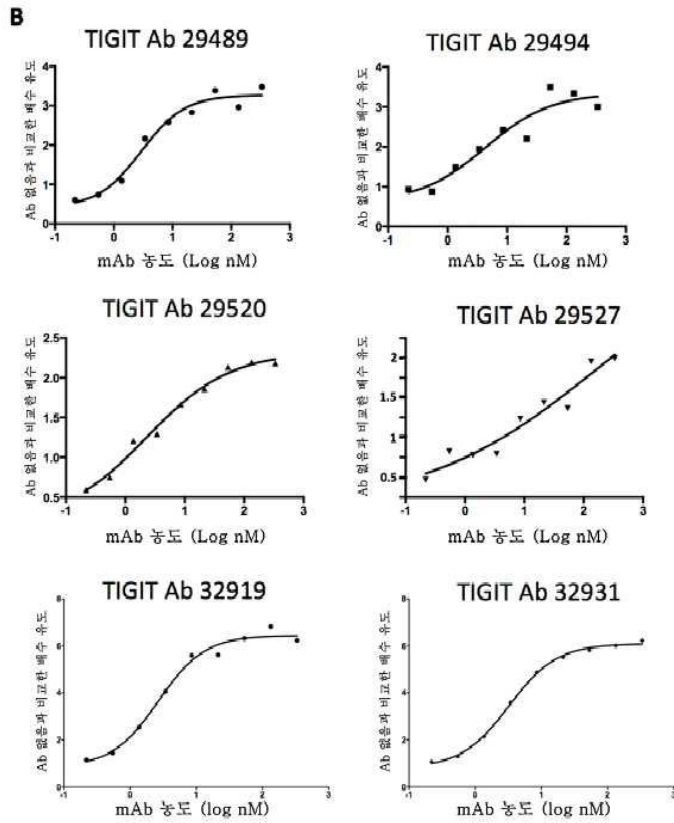


도면12a

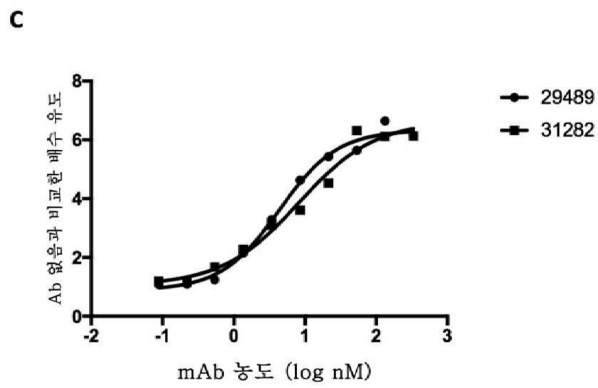
도 12 - CHO-TCR-CD155 및 Jurkat-hTIGIT 생물학적분석에서 항-TIGIT 항체의 효과



도면12b



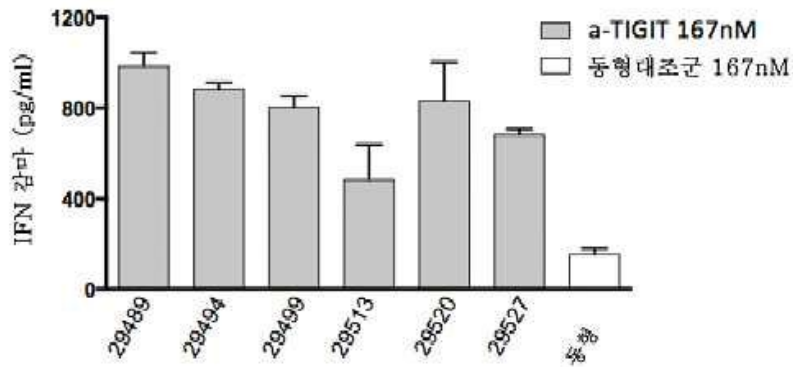
도면12c



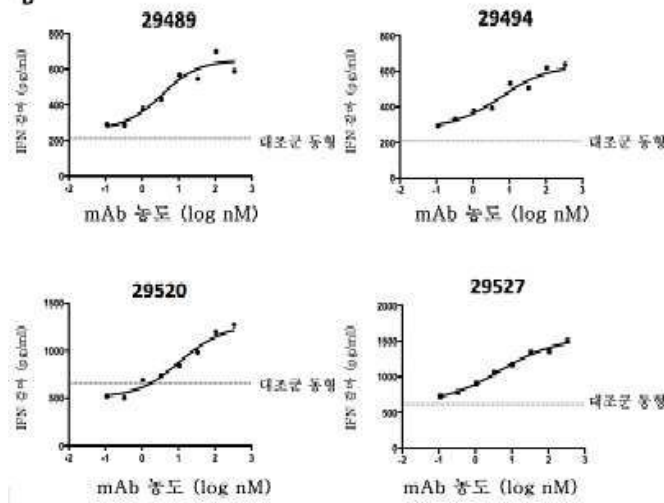
도면13

도 13 - 인간 CD8⁺ T 세포 기반 기능 검사에서 항-TIGIT 항체의 효과

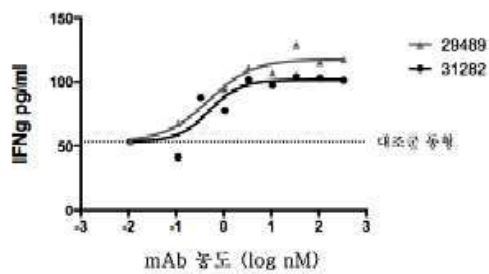
A



B

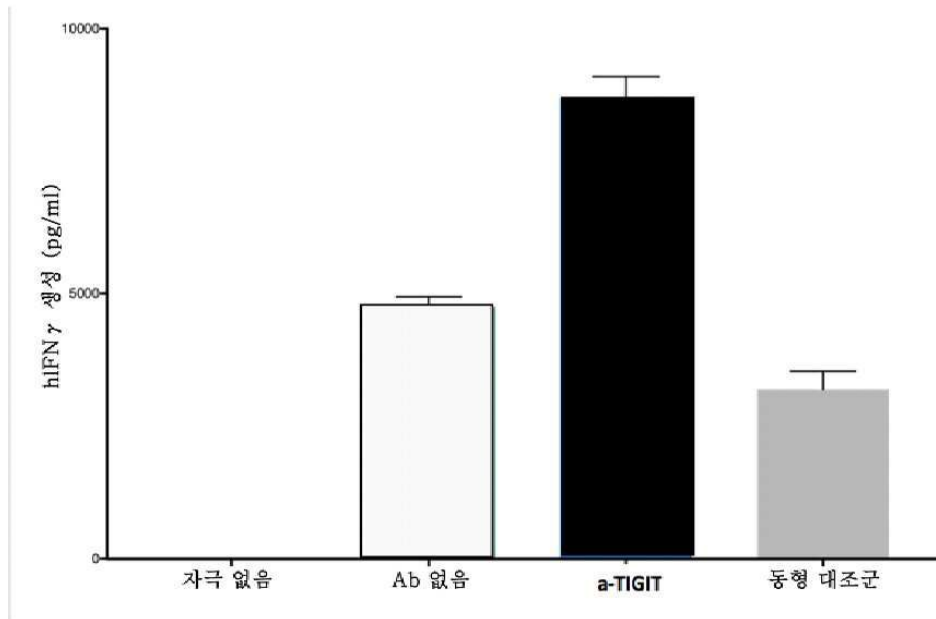


C



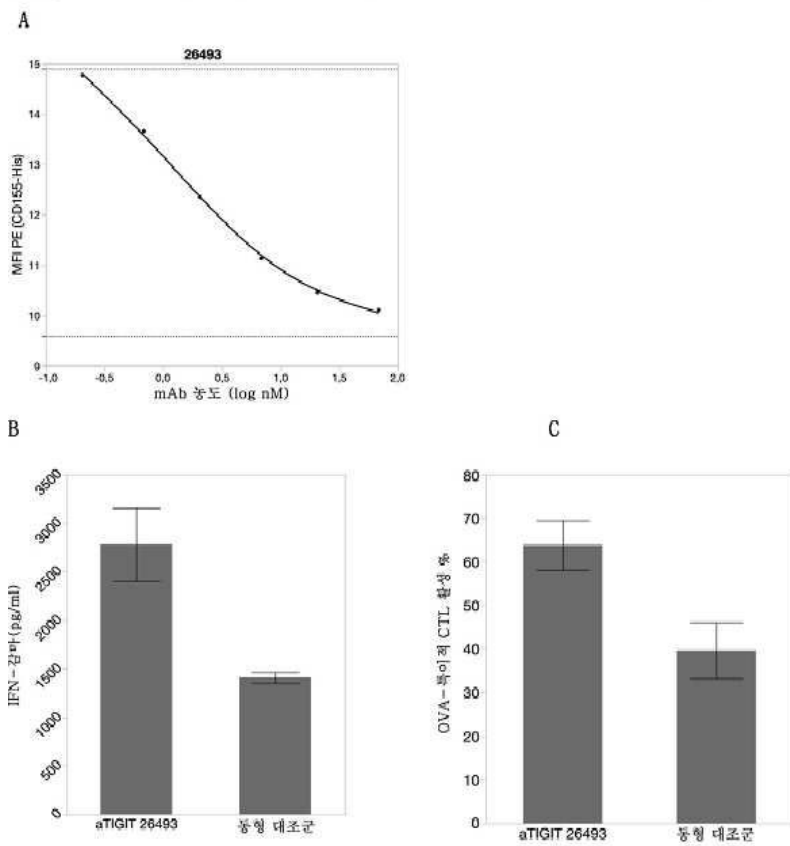
도면14

도 14 - 인간 TIL 기반 기능 검사에서 항-TIGIT 항체의 효과



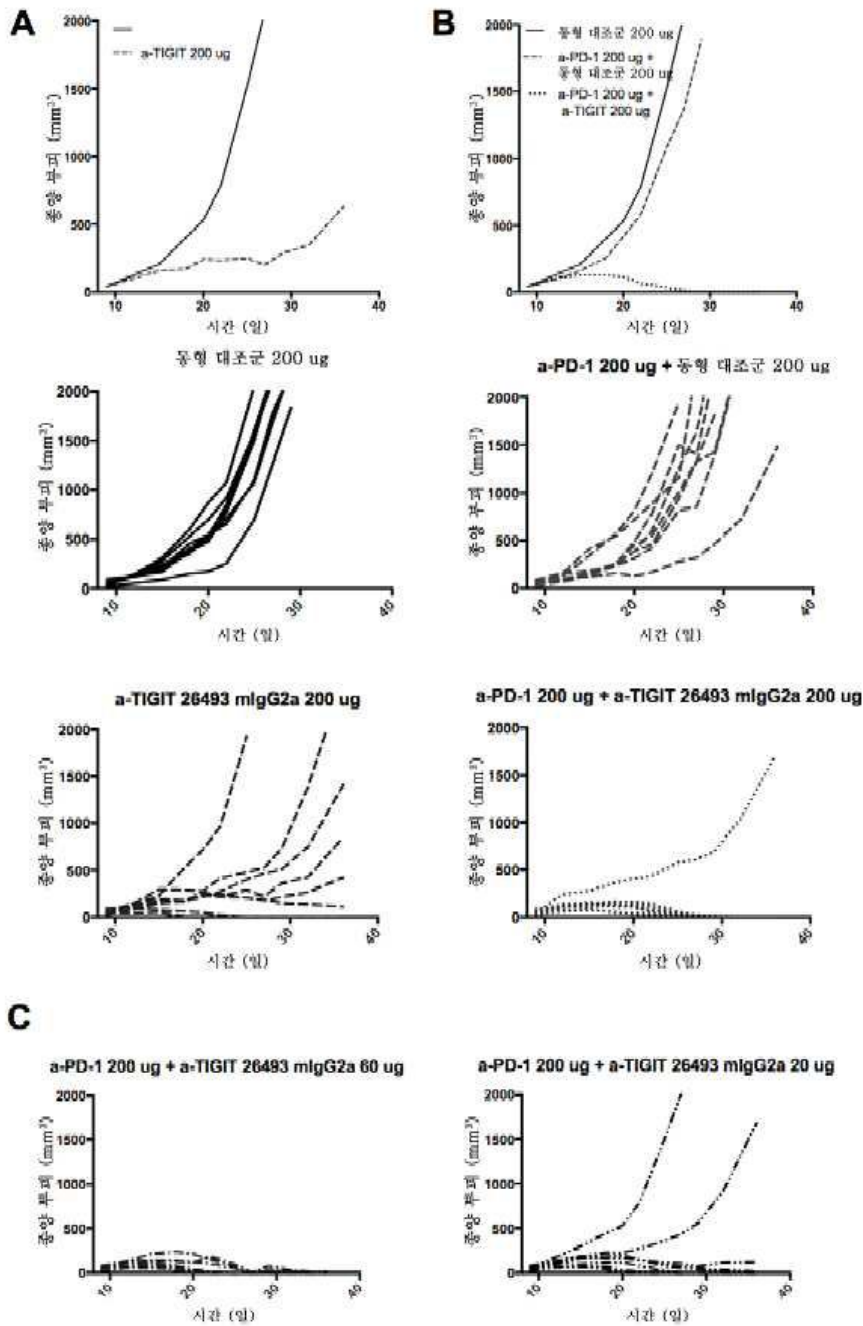
도면15

도 15 - 마우스에서의 기능적 활성을 입증하는 마우스 대용 항-TIGIT 항체의 특징규명



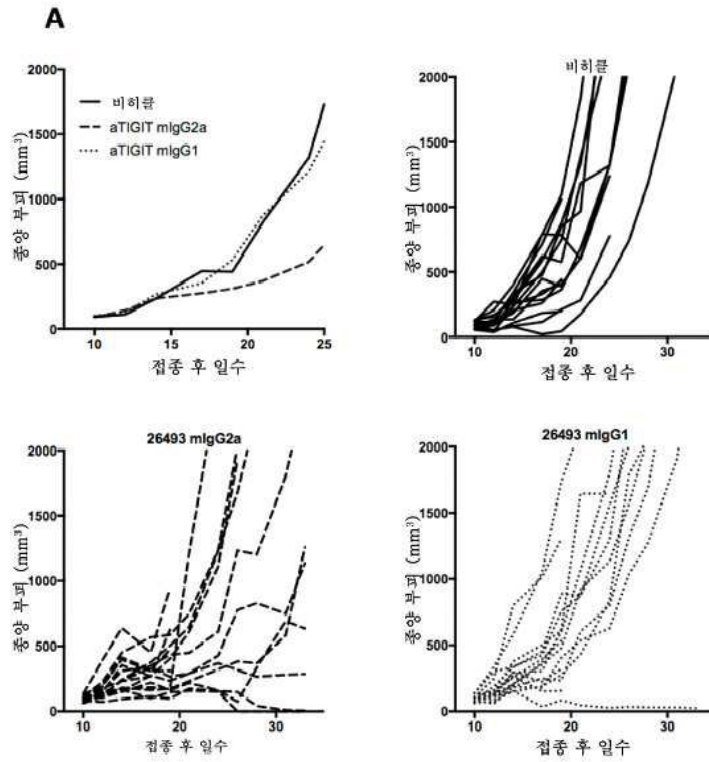
도면16

도 16 - 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 효능



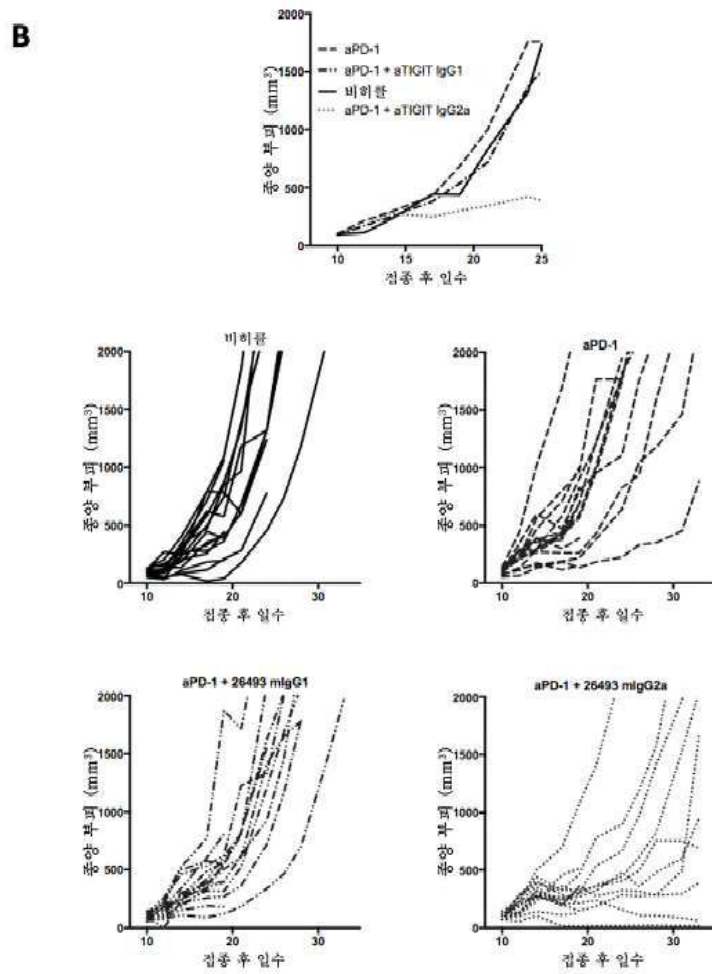
도면17a

도 17 - 항-TIGIT 길항성 항체의 동형-의존성 항-종양 효능



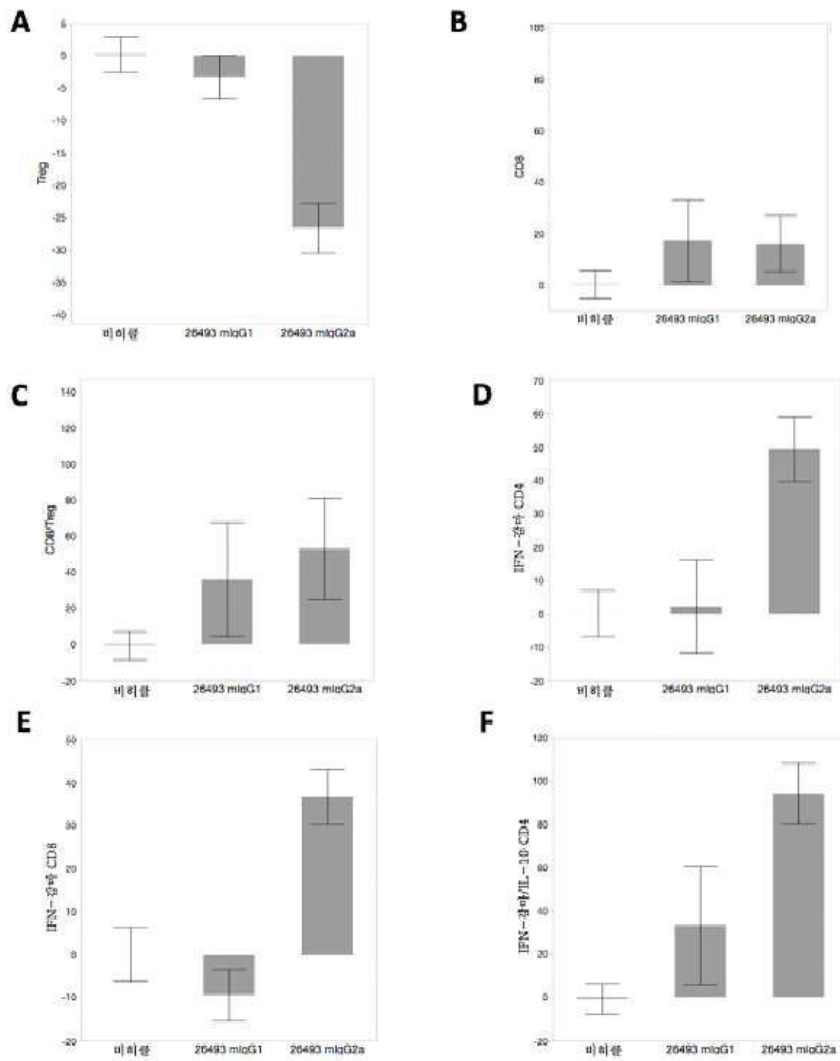
도면17b

도 17 - 항-TIGIT 길항성 항체의 동형-의존성 항-종양 효능



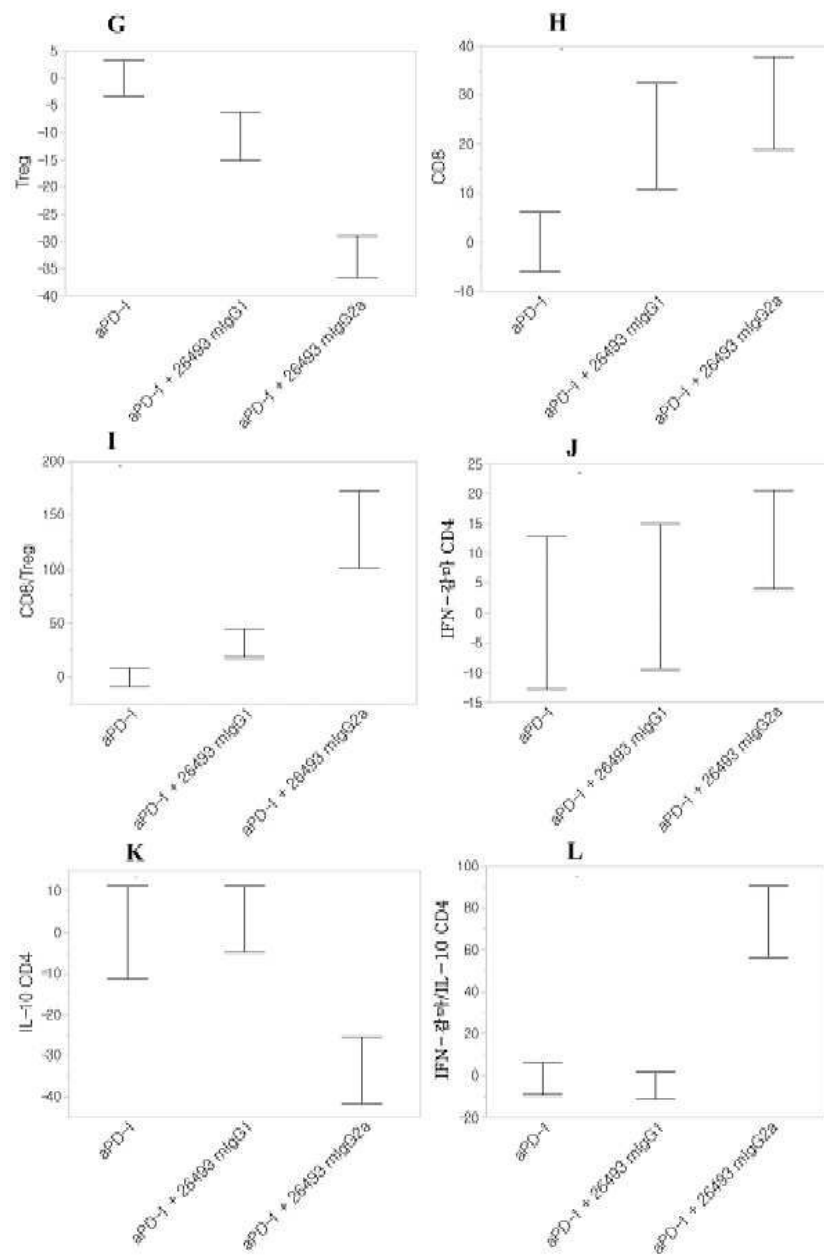
도면18a

도 18 - 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 효능의 메카니즘



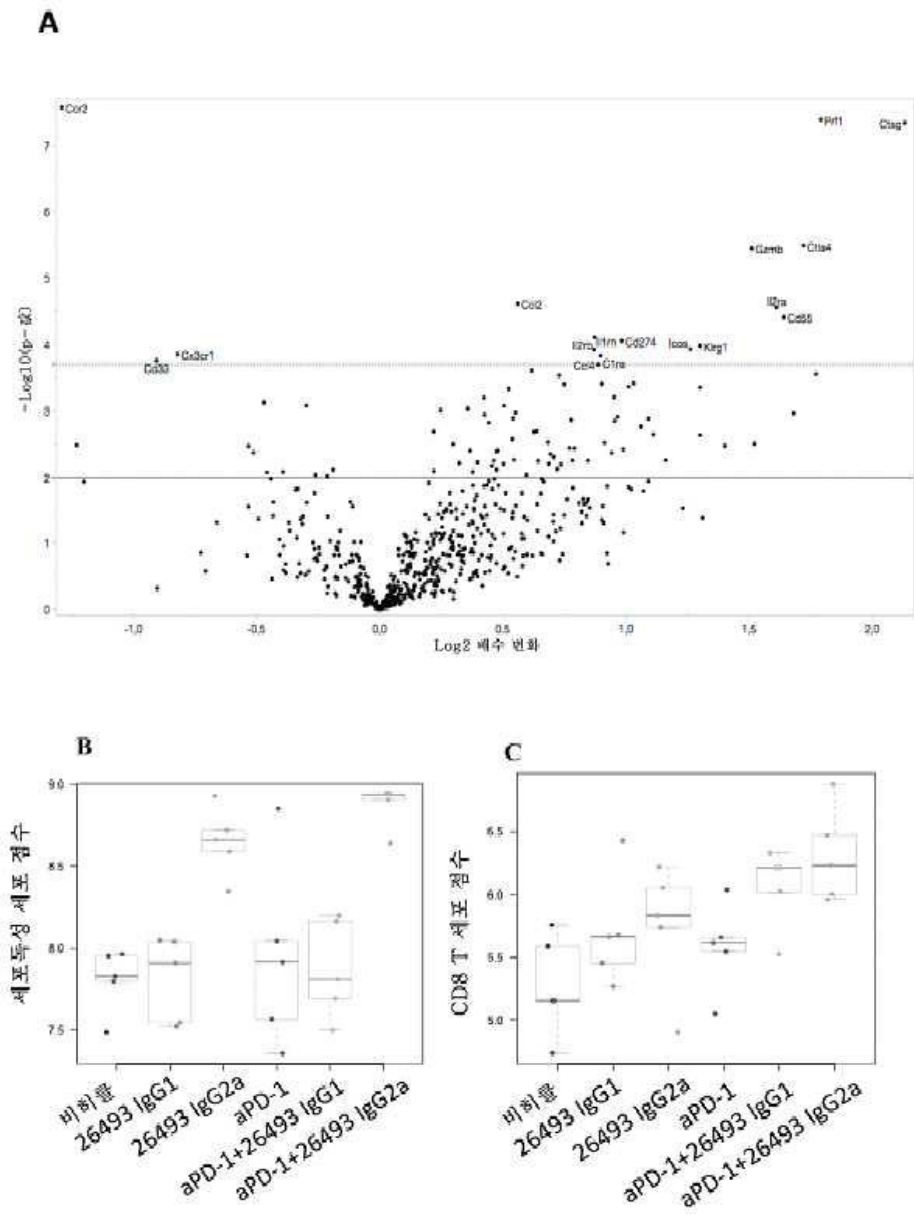
도면18b

도 18 - 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 효능의 메카니즘



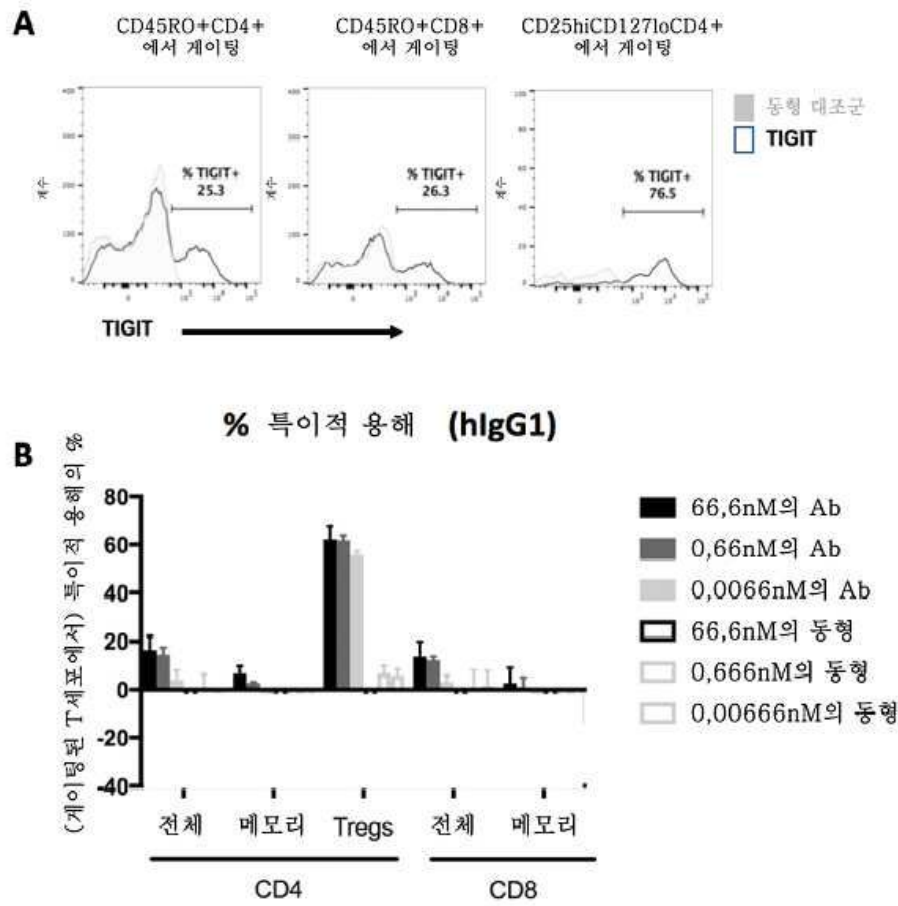
도면19

도 19 - 항-TIGIT 길항성 항체의 항-종양 효능의 메카니즘 (전사 분석)



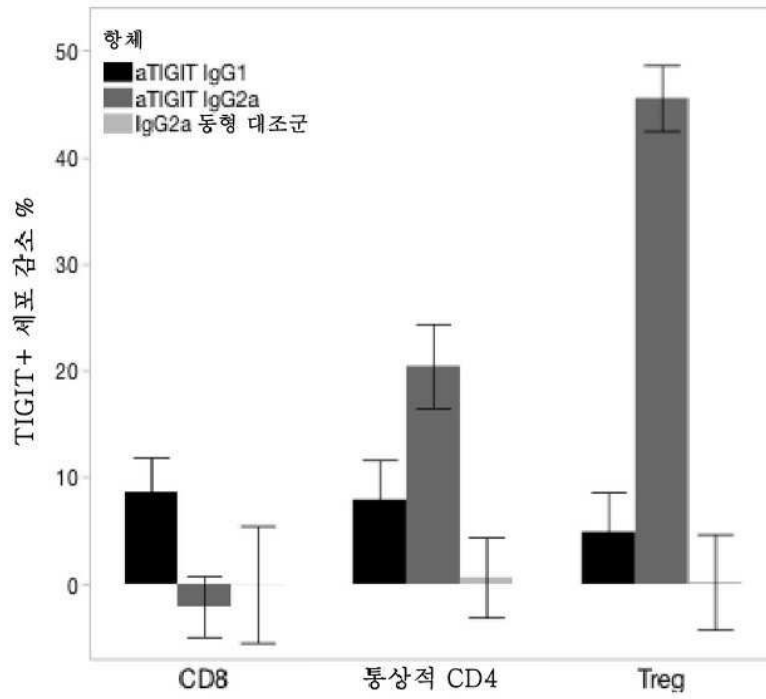
도면20

도 20 - 건강한 인간 PBMC 에서 ADCC 활성



도면21

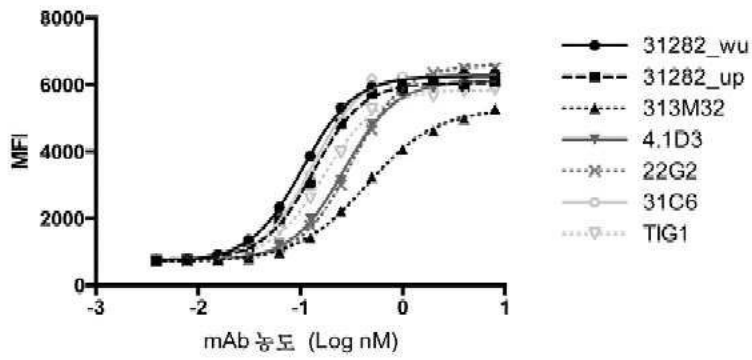
도 21 - 마우스 종양 현탁액에서 Treg 세포의 우선적 고갈



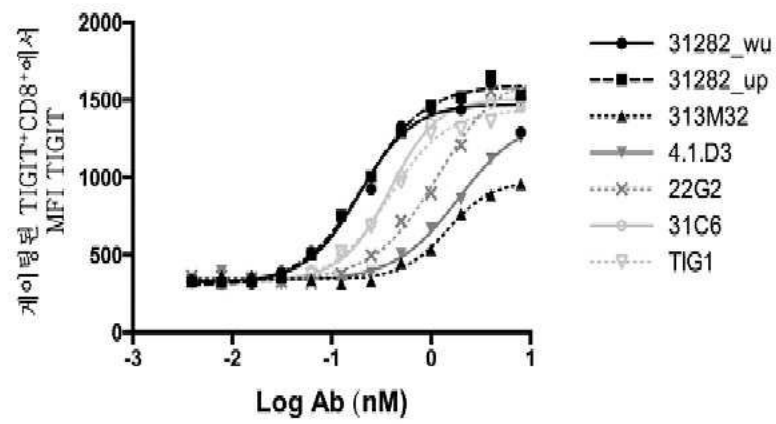
도면22

도 22

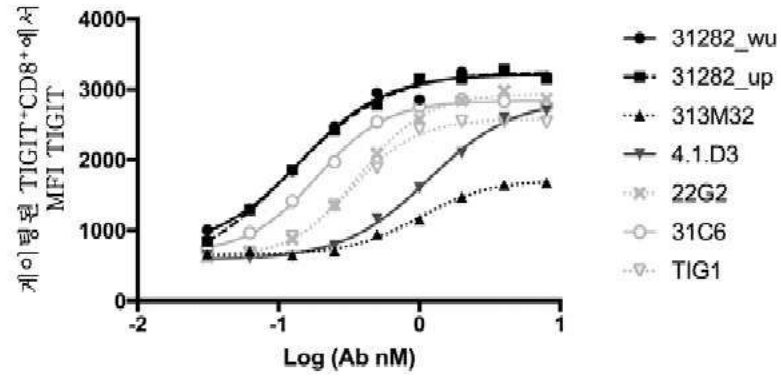
A



B

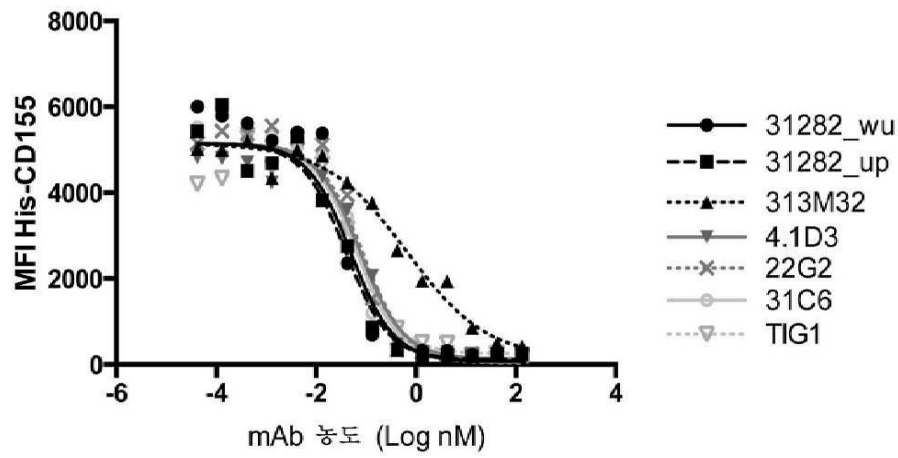


C



도면23

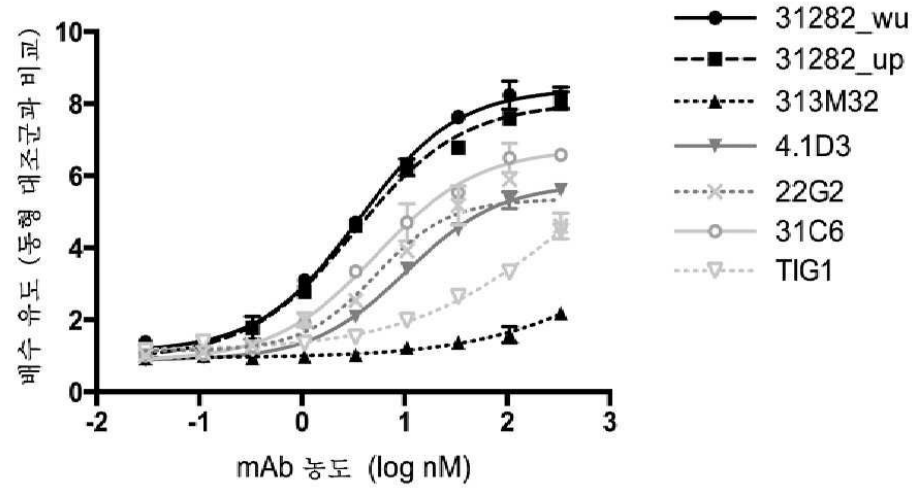
도 23



도면24a

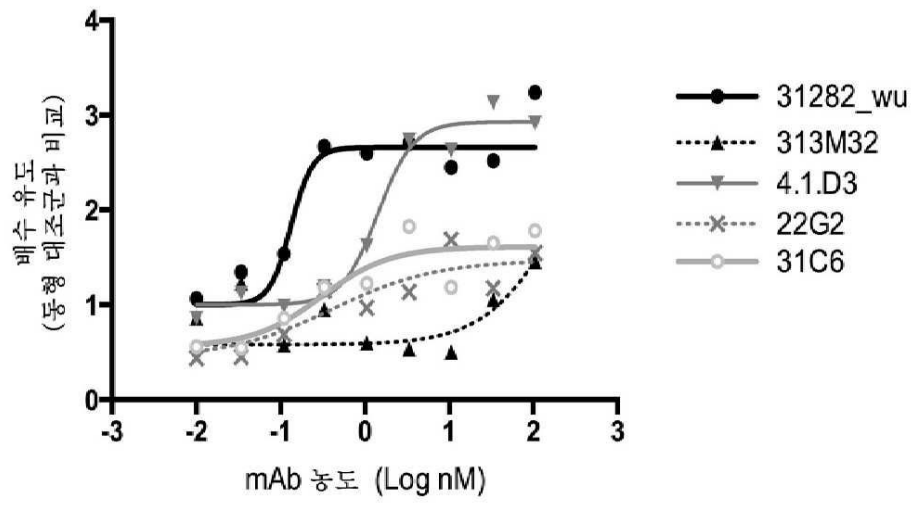
도 24

A



도면24b

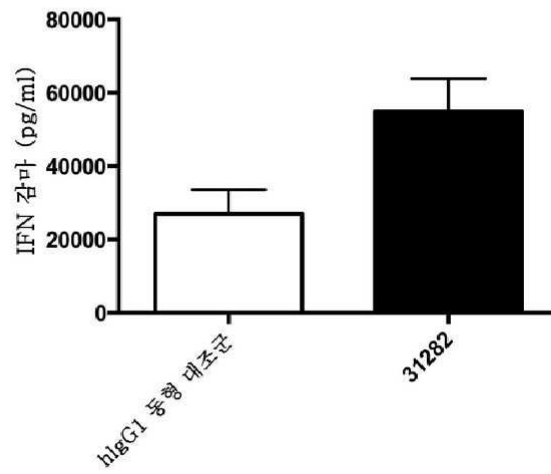
B



도면24c

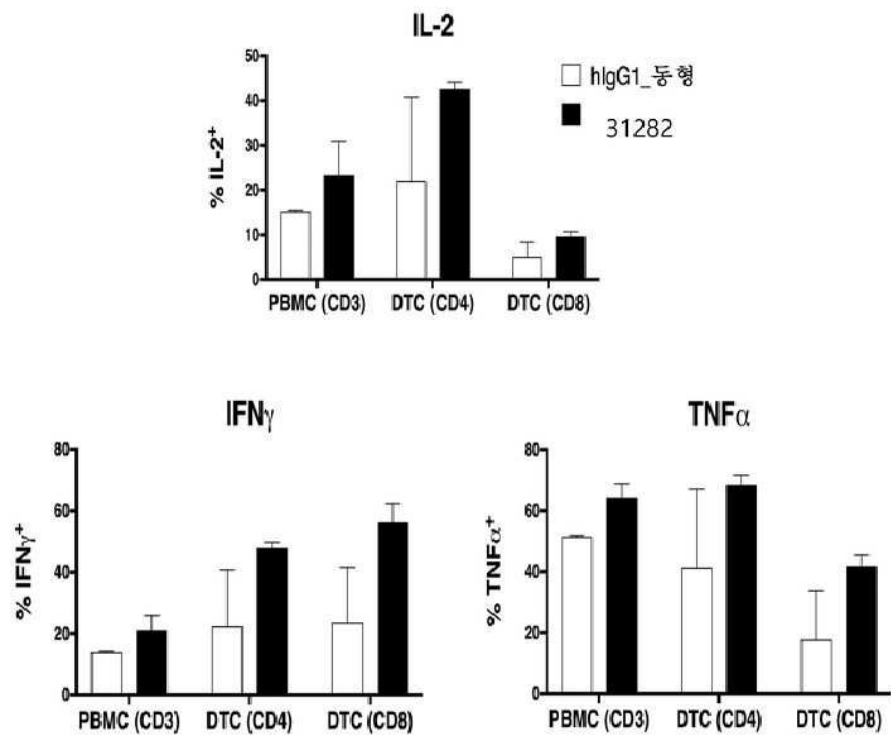
도 24 (계속)

C



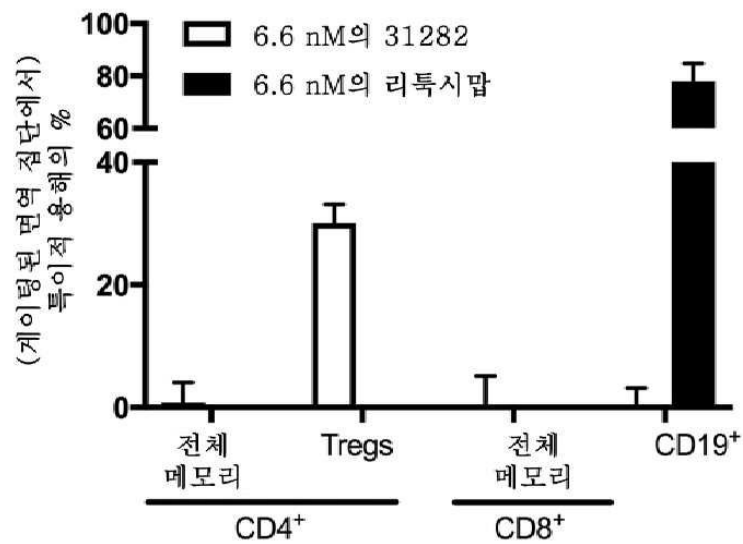
도면24d

D



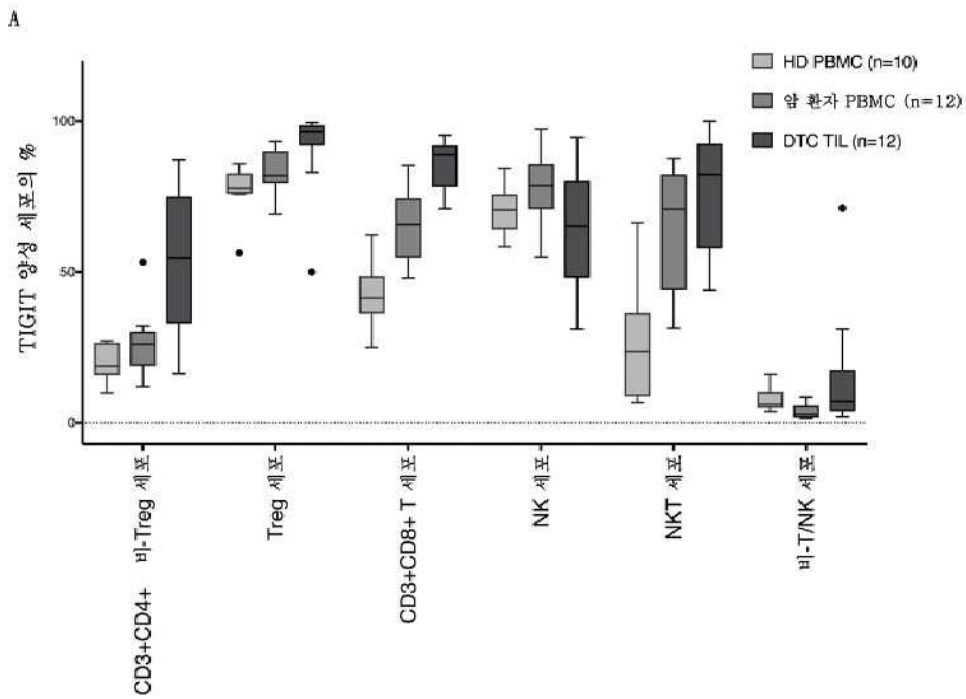
도면25

도 25

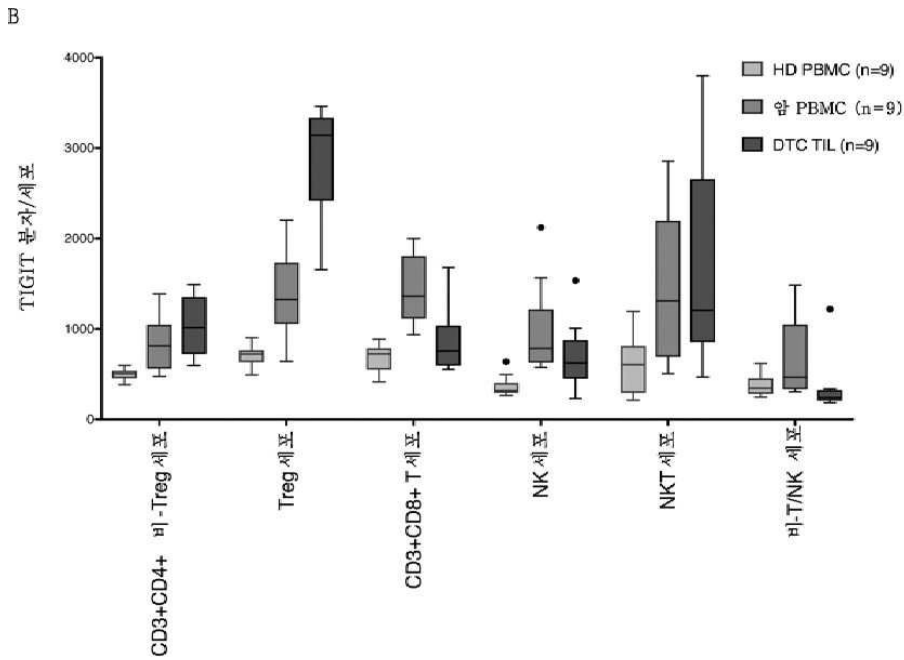


도면26a

도 26



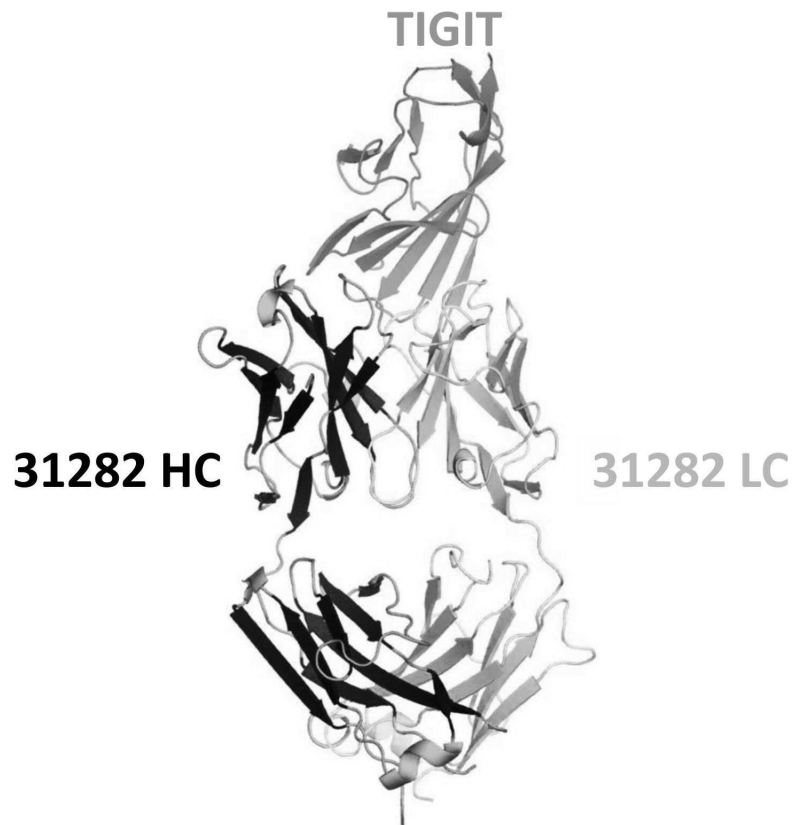
도면26b



도면27a

도 27

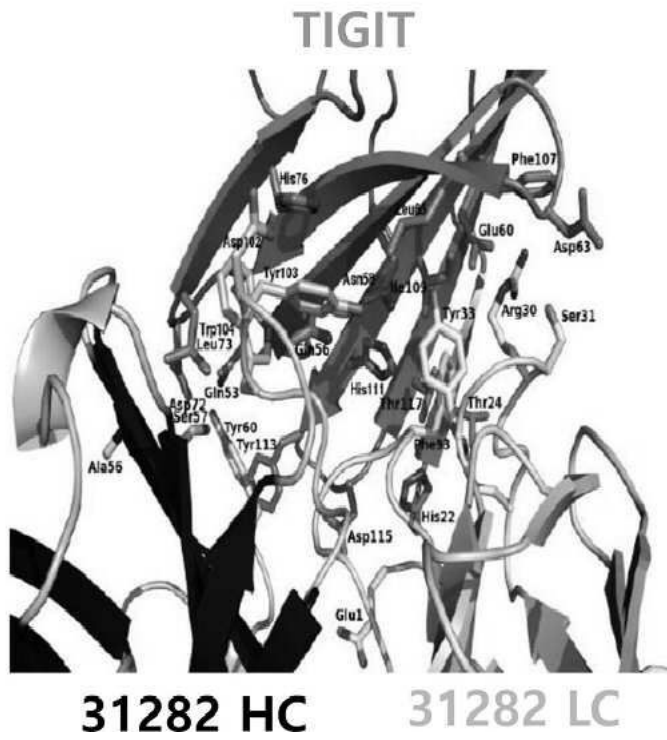
A



도면27b

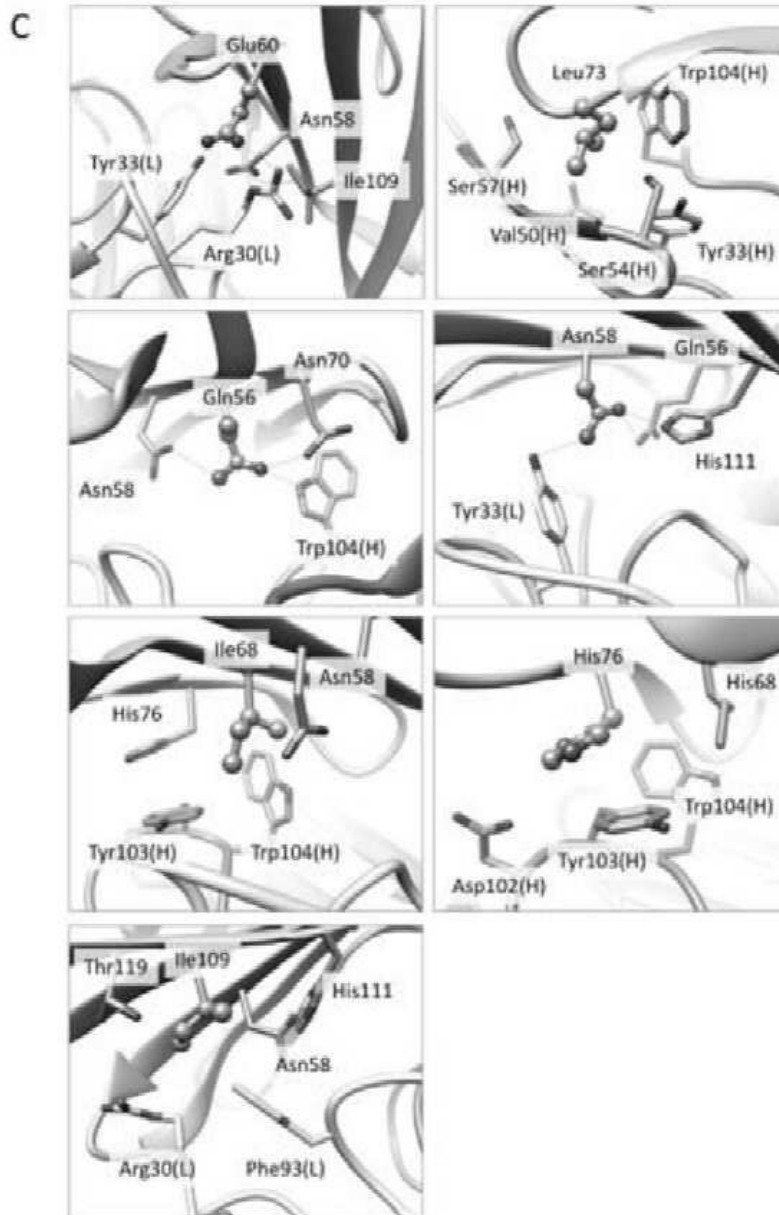
도 27

B



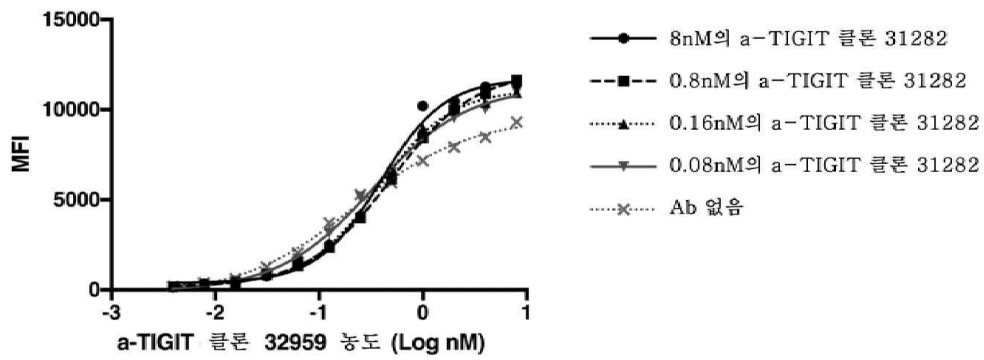
도면27c

도 27C



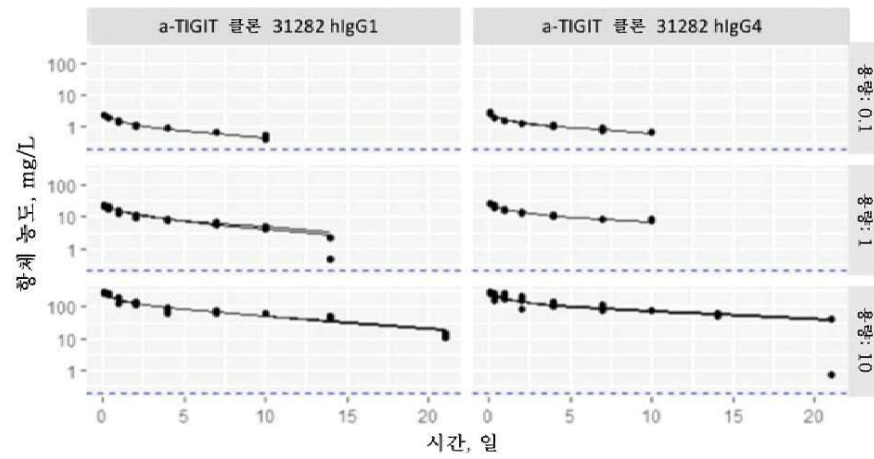
도면28

도 28



도면29

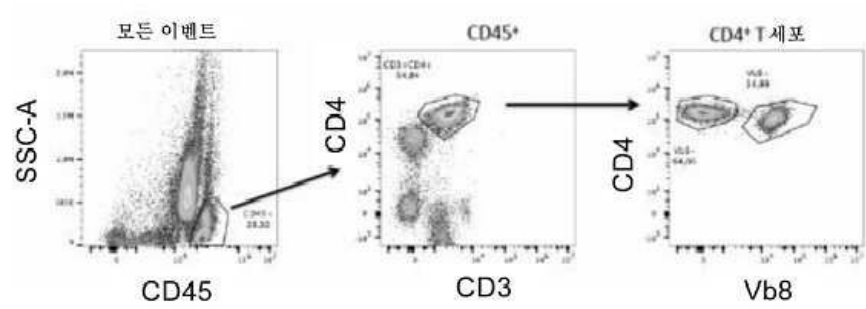
도 29



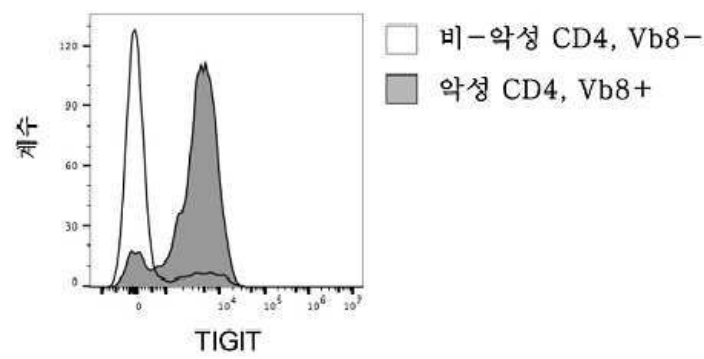
도면30

도 30

A



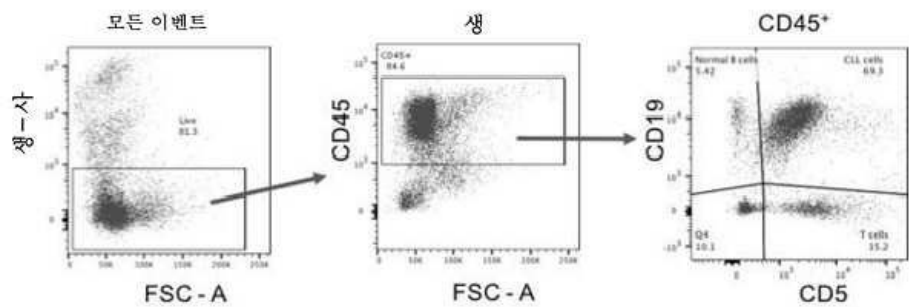
B



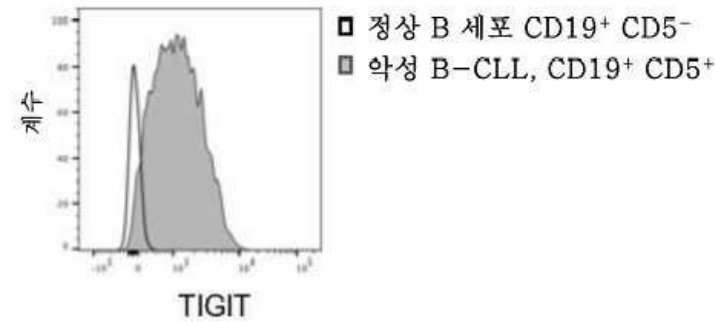
도면31

도 31

A

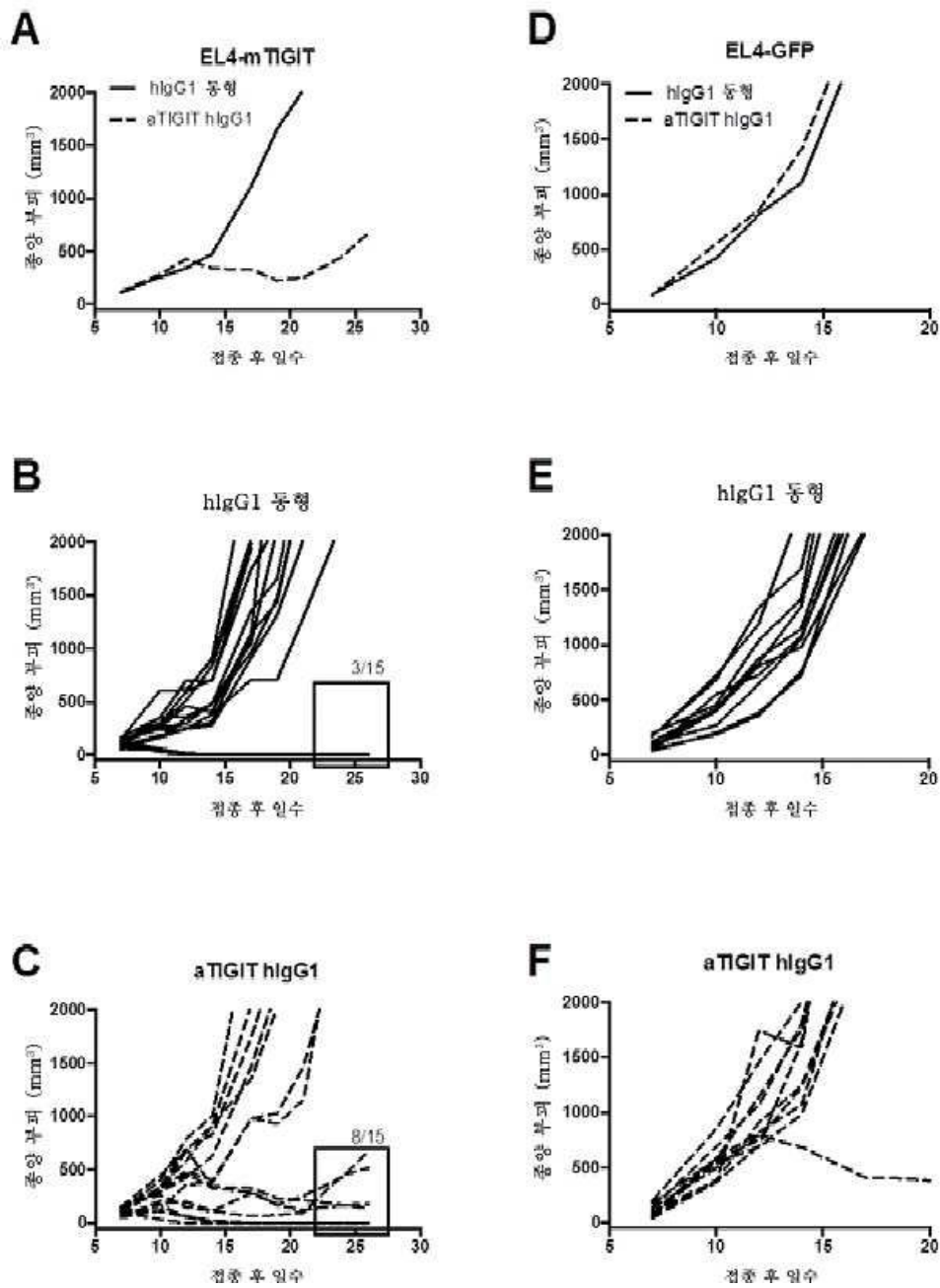


B



도면32

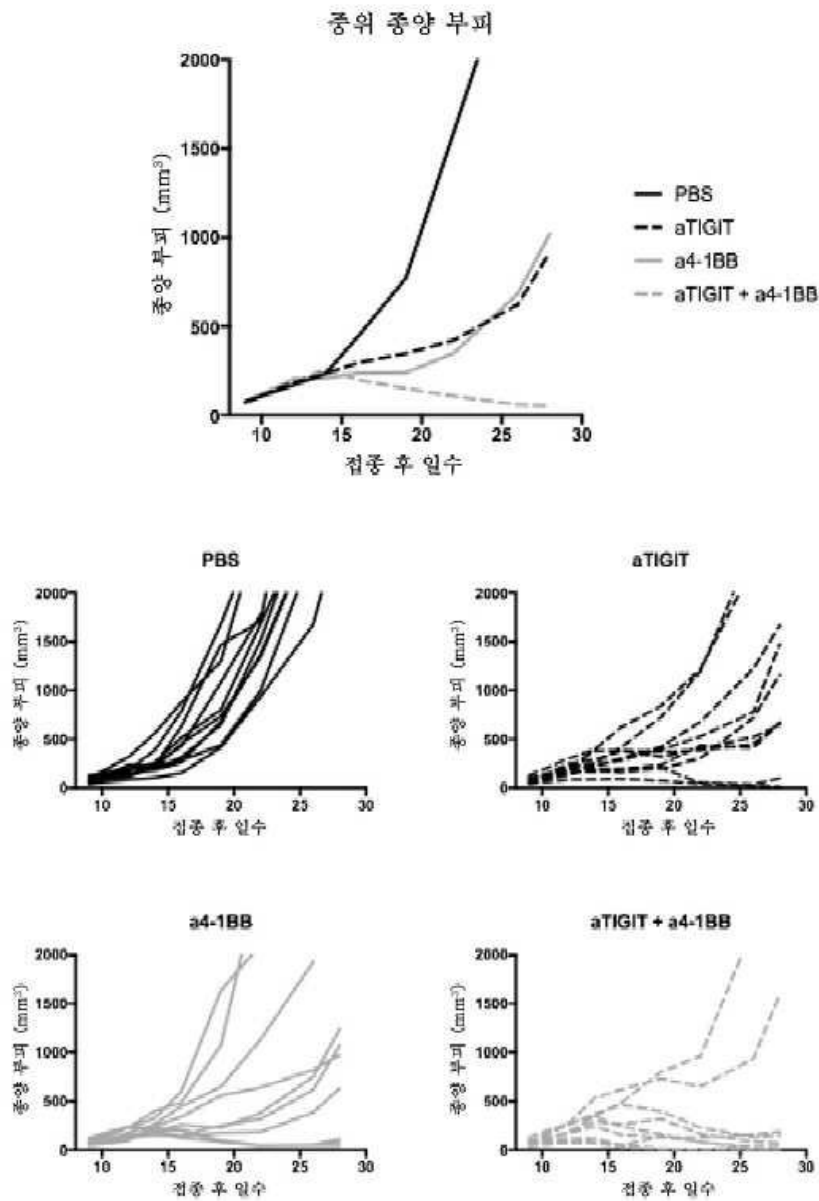
도 32



도면33a

도 33

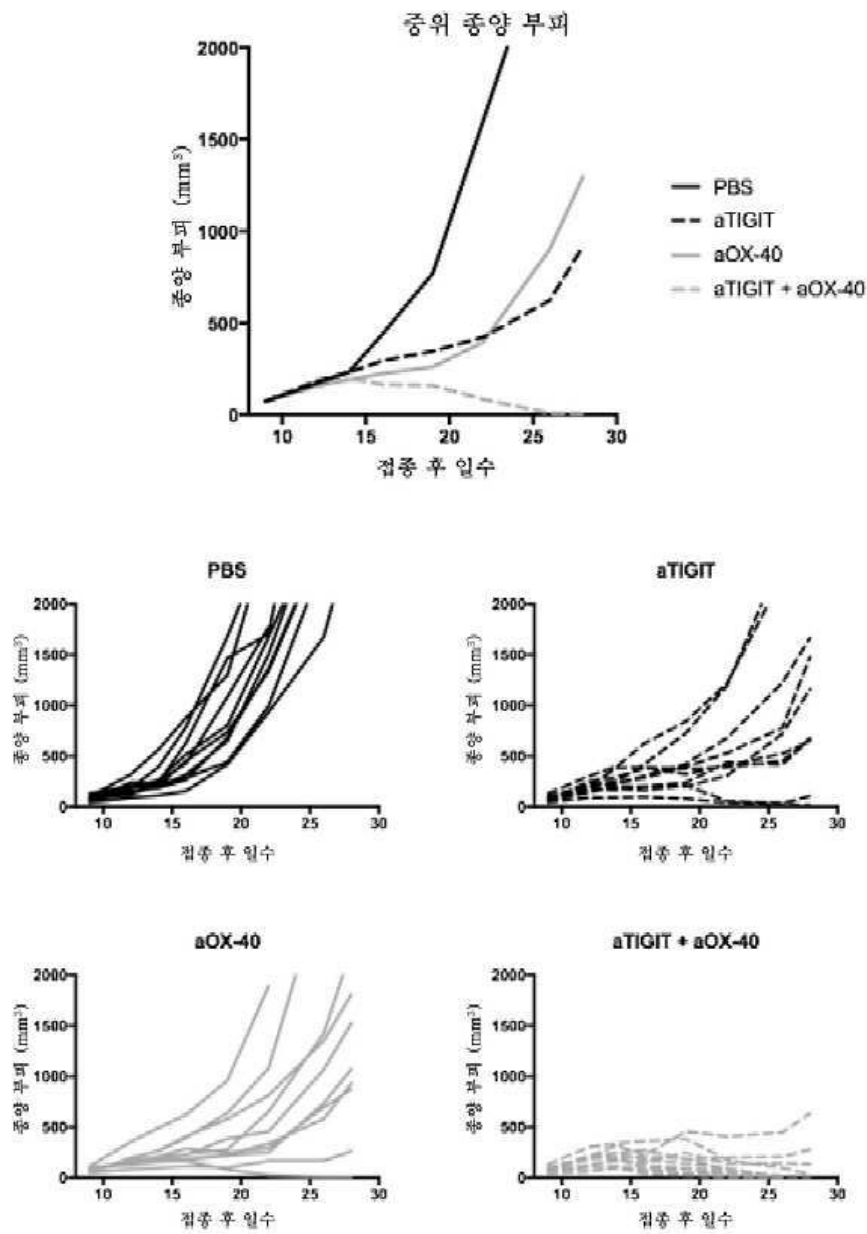
A



도면33b

도 33

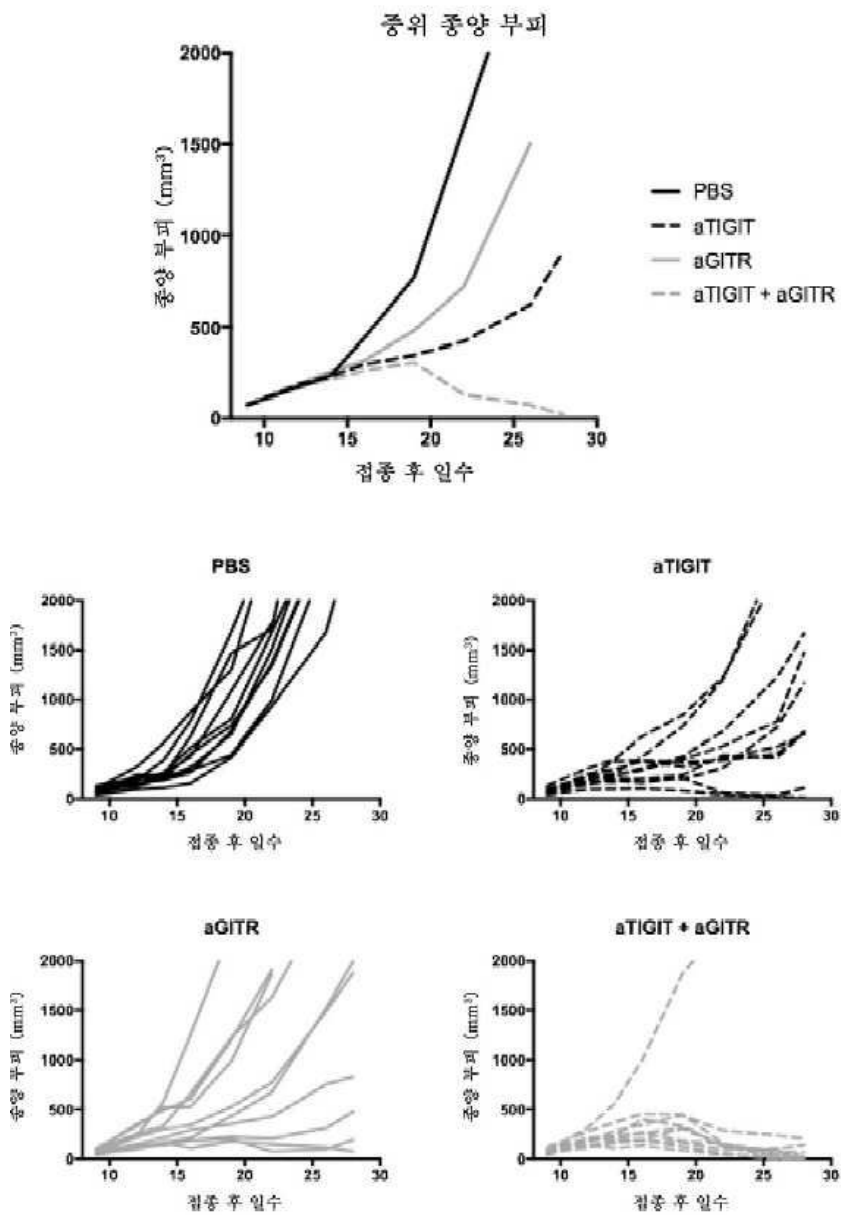
B



도면33c

도 33

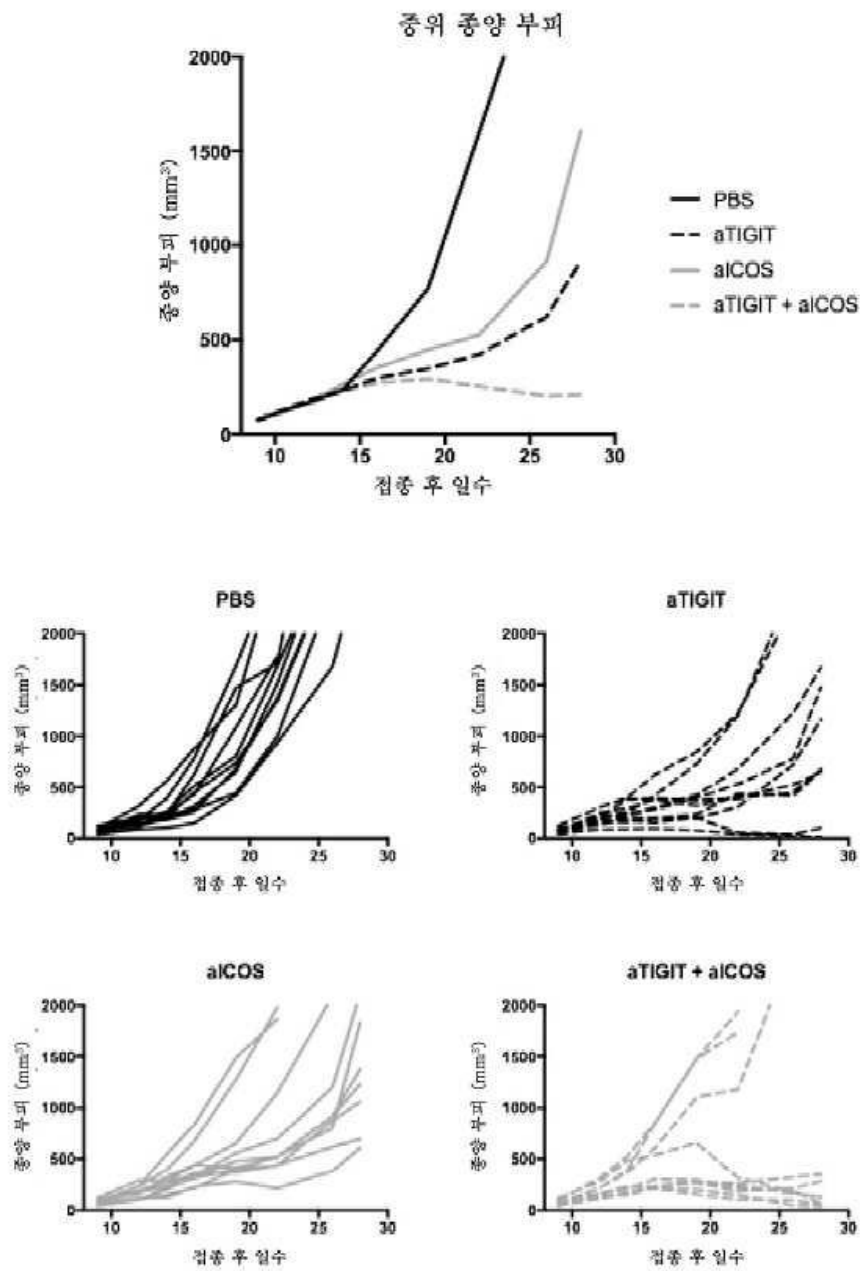
C



도면33d

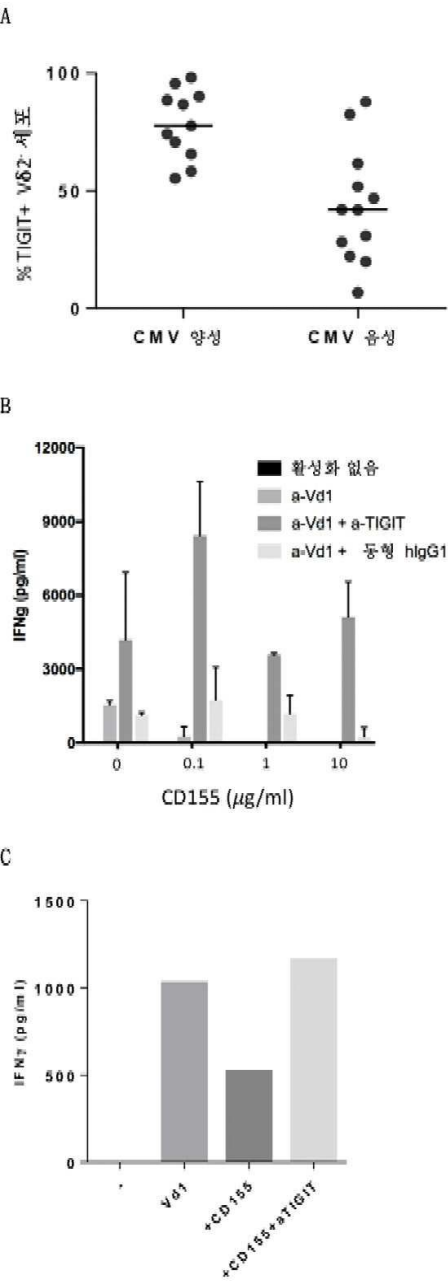
도 33

D



도면34

도 34



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ADIMAB LLC

<120> ANTI-TIGIT ANTIBODIES

<130> NLW/P153274W000

<140> PCT/US2018043968

<141> 2018-07-26

<150> US62/606159

<151> 2017-07-27

<150> EP17184102.6

<151> 2017-07-31

<150> BE20175535

<151> 2017-07-31

<150> US62/660640

<151> 2018-04-20

<160> 370

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 2

<211>

> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln His

20

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Thr Phe Glu Ser Tyr Gly Met Val

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln His

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu Asp Val

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu His Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Ala
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Arg Tyr Tyr Trp Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

Gly

<210

> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Thr Phe Gln Asn Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Thr Phe Gly Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Phe Thr Phe Ser Ser Ser Tyr Met His

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr

1 5

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr

1 5

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr

1 5

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr

1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 69

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>
 > Homo sapiens
 <400> 87
 Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 91

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

20 25

<210> 92

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

1 5 10

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 95

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

20 25

<210> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

1 5 10

<210> 97

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 99

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

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

1 5 10

<210> 101

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 103

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1 5 10

<210> 105

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 107

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 108

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

1 5 10

<210> 109

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 111

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

1 5 10

<210> 113

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 115

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly

20 25

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 117

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 119

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 119

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20 25

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 121

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 123

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20

25

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1

5

10

<210> 125

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 127

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

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

1 5 10

<210> 129

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 131

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 132
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 133
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133

Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 134
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 135
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 135

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 136

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

1 5 10

<210> 137

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 139

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

20 25

<210> 140

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

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

1 5 10

<210> 141

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 143

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 143

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

20 25

<210> 144

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

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

1 5 10

<210> 145

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 147

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

20 25

<210> 148

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

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

1 5 10

<210> 149

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 150

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 151

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

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

1 5 10 15

<210> 153

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<

210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 155

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

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

1 5 10 15

<210> 157

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 159

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 160

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

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

1 5 10 15

<210>

161
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 162
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 162
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 163
 <211> 23

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 163

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 164
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 164

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 165
 <211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 167

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 168

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

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

1 5 10 15

<210> 169

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 172

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

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

1 5 10 15

<210> 173

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 175

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 176

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

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

1 5 10 15

<210> 177

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 178

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 179

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

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

1 5 10 15

<210>

181

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

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

1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 182

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 183

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 184

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

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

1 5 10 15

<210> 185

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 186

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 187

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

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

20

<210> 188

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

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

1 5 10 15

<210> 189

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 190

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 191

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

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

20

<210> 192

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

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

1 5 10 15

<210> 193

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 194

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 195

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 196

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

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

1 5 10 15

<210> 197

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 199

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 200

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

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

1 5 10 15

<210>

201

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 202

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 203

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 204

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

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

1 5 10 15

<210> 205

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 206

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 207

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 208

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

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

1 5 10 15

<210> 209

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 210

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 211

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

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 Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu

100 105 110

Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 212

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 213

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu
 100 105 110
 Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 214

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 215

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu Asp Val Trp Gly

 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 216

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 217

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

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

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

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

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 218

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

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

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

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

100

105

<210> 219

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 220

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 221

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 222

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

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

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

65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 223

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

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

65 70 75 80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

 $\langle 210 \rangle$ 224

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 224

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 225

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

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

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

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

 100 105 110
 Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

 115 120 125

<210> 226

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 227

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 227

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe

100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 228

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg

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

100 105

<210> 229

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 229

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 230

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 230

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 Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Arg Tyr Val Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 231

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 231

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gln Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 232

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 232

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 Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Arg Tyr Val Phe Pro Pro

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

100 105

<210> 233

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser 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 Ala Phe Tyr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 235

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 236

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser 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 Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 237

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Pro Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 238

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser 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 Ala Phe Tyr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 239

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 239

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Lys Pro Val Pro Arg Arg Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 240

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser 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 Ala Phe Tyr Leu Pro Trp

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

100 105

<210> 241

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 241

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctatggga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcggtgt actactgcgc tagagtatct 300

tactactacg acagcagcaa actacgatgg gcagaatact tccaacactg gggacagggt 360

acattggtca ccgtctcctc a 381

<210> 242

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 242

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gtccacaatt tccctctcac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 243

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 243

gaagtccagc tgggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgctcggatt caccitcgag agctatggca tggtttgggt ccgccaggcc 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatcg atattgtatg atggaagtaa tagatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcggtgt actactgcgc tagagtatct 300

tactactacg acagcgttga gctacgatgg gcagaatact tccaacactg gggacagggt 360

acattggtca ccgtctcctc a 381

<210> 244

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 244

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaa gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gtccacaatt tccctctcac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 245

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 245

caggtgcagc tggcgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcaactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtc atcaacccta gtggtggttag cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac	300
tccgactact ggagcggaat actagacgta tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 246

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 246

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagg agcagctact tagcctggtta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggggcac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc	300

ggagggacca aggttgagat caaa	324
<210> 247	
<211> 363	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 247	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata caccttcgag aagtactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggtccta gtggtgctag cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaccac	300
tccgactact ggagcggaat actacattcg tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc	360
tca	363
<210> 248	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 248	
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtcag gagtgtagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc	300
ggagggacca aggttgagat caaa	324
<210> 249	
<211> 363	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 249	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata caccttcact agtactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggtccta gtggtgctag cacaagctac	180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac 300

tccgactact ggagcggaat aatggaggta tggggtcagg gtacaatgt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 250
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 250

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagg agcagctact tagcctgta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtacttca gtctccttg gacttttggc 300
ggagggacca aggttagat caaa 324

<210> 251
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 251

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttact agctactata tgactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagt atcggtccta gtggtgctag cacaagctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac 300
tccgactact ggagcggaat aatggaggta tggggtcagg gtacaactgt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 252
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 252

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtga ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc 300
 ggagggacca aggttgagat caaa 324
 <210> 253
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 253

 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctctggta ctccatcagc agtgggttact actgggcttg gatccggcag 120
 ccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctatc atagtgggag cacctactac 180

 aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagtctcc 240
 ctgaagctga gttctgtgac cgccgcagac acggcggtgt actactgcgc catagaagga 300
 gctaactact acgacttcgg atatgtagca ttgcacatat ggggtcaggg tacaatggtc 360
 accgtctcct ca 372
 <210> 254
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 254

 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggccctaggac ttttggcgga 300
 gggaccaagg ttgagatcaa a 321
 <210> 255
 <211> 375
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 255

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc 120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac 180

tacaaccctg cctcgagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300

ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatggggtca ggttacaatg 360

gtcacctctt cctca 375

<210> 256

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 256

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggcctaggac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 257

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 257

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaggt actactgggc gtggatccgc 120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatcg ggacgagtgg gagcacctac 180

tacaaccctg cctcaagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagttctgt gaccgccaca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300

ggagctaact ttcgggactt cggatatgta gcattcgaca tatggggtca ggttacaatg 360

gtcacctctt cctca 375

<210> 258

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 258

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggtc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc	180
aggttcagt ggcagtggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggcctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 259

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 259

caggtgcagc tggcgcagtc tgggctgag gtaagaagc ctgggtcctc ggtgaagtc	60
tcctgaagg ctctggagg caccitcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagt gatgggagg atcatcccta tctttgttac agcaactac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc taggttcac	300
ctgggatcca ggcctacta cggcatgat gtatggggcc aggaacaac tgtcacctc	360
tcctca	366

<210> 260

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 260

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agtatattaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagt ggcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa agatacgtct tccctcctac ttttggcgga 300
gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 261

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 261

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttgaggg caccttccag aactatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtt atcgtgccta tctttggtac agcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacggtt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtgt actactgcgc taggttgcac 300
ctgggacaga aggcctacta cggcatggat gtatggggcc agggaacaac tgtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 262

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 262

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa agatacgtct tccctcctac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 263

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 263

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttggt gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttggga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcgttgt actactgcgc caagccagtg 300

ccaaaatcta gaggcctaga cgtatggggt cagggtacaa tggtcaccgt ctctca 357
<210> 264
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 264

gacatccagt tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttggac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321
<210> 265
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 265

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttcgg gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttggga atagtggttt gataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcgttgt actactgcgc caagccagtg 300

ccacgtttga gaggcctaga cgtatggggt cagggtacaa tggtcaccgt ctctca 357
<210> 266
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 266

gacatccagt tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttggac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 267

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 267

gaagtccagc tgggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgctggatt caccttcggg agctattata tgacttgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcctg atggaagtaa taaactgtat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgttgt actactgcgc caagccagtg 300

ccaaaatcta gagcgcttga cgtatggggt cagggtacaa tggtcaccgt ctctca 357

<210> 268

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 268

gacatccagt tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttggac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 269

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 269

caggtgcagc tggctggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctcttata tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt ataggtgcgg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tggagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcgttgt actactgcgc caagccagtg 300

ccacggcgta gaggcctaga cgtatggggt cagggtacaa tggtcaccgt ctctca 357

<210> 270

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 270

gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttgac ttttggcgga 300

gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 271

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 271

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 272

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

1 5 10 15

<210> 273

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 273

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 274

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 275

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

1 5 10 15

<210> 276

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 277

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 278

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

1 5 10 15

<210> 279

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 281

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

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

1 5 10 15
Gly

<210> 282

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 283

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 283

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 284

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 285

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 286

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 287

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 287

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Gln Gln Glu Asn Pro Arg Pro Arg Thr

1 5

<210> 289

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 290

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

Phe Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 291

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

Gln Gln Thr Ser Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 292

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 292

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 293

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 293

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 294

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 294

Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr

1 5 10

<210> 295

<211

> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 295

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20

25

<210> 296

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 296

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1

5

10

<210> 297

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 297

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 298

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 298

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 299

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 299

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20 25

<210> 300

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 300

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 301

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 301

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 302

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 302

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 303

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 303

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20 25

<210> 304

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 304

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 305

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 305

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 306

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 306

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 307

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 307

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 308

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 308

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

1 5 10

<210> 309

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 309

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 310

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 310

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 311

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 311

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 312

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 312

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

1 5 10 15

<210> 313

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 313

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 314

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 314

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 315

<211>

> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 315

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 316

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 316

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

1 5 10 15

<210> 317

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

317

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 318

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 318

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 319

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 319

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 320

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 320

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

1 5 10 15

<210> 321

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 321

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 322

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 322

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 323

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 323

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 324

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 324

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

1 5 10 15

<210> 325

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 325

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 326

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 326

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 327

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 327

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95
Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe

100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 328

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 328

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 329

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 329

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30
Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 330

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 330

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Asn Pro Arg Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 331

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 331

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe

100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 332

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 332

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Pro Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 333

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 333

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 334

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 334

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 335

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 335

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttgge gtggatccgc 120

cagcccccag ggaaggggct ggagtggtatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac 180

tacaaccgt cctcgagag tcgagtcacc atatcggtag acagtccea gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300

ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggggtca ggttacaact 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 336

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 336

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggccctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 337

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 337

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc	120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac	180
tacaaccct cctcgagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa	300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggttca ggttacaact	360
gtcacctgtc cctca	375

<210> 338

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 338

gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agtacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gaaaaccca ggccctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 339
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 339
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc 120
 cagcccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gaggacctac 180
 tacaaccctg cctcagagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300
 ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatggggtca ggttacaact 360

 gtcaccgtct cctca 375
 <210> 340
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 340
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtaa aagtgtttcc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggtcct catctatttc gcatccacca gggccaccgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag acttcgcctt ggcctaggac ttttggcgga 300

 gggaccaagg ttgagatcaa a 321
 <210> 341
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 341
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggtgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtgt actactgcgc cagagaggct 300

caatcctaca gggttccatt cgacatatgg ggtcagggtg caatggtcac cgtctcctca 360

<210> 342

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 342

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180

aggttcagt gtcagtgggc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tacgcatct ggcctcctt cacttttggc 300

ggagggacca aggttgagat caaa 324

<210> 343

<211> 126

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 343

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Thr Thr Tyr Asp Leu Leu Ala Gly Pro

	100	105	110
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	
<210> 344			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> Rattus norvegicus			
<400> 344			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Ser			
20	25	30	
Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	
Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100	105	110	
Lys			
<210> 345			
<211> 130			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 345			
Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly			

20 25 30
Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser

130

<210> 346

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 346

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

100 105

<210> 347

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 347

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 348

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 348

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 Glu His Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Phe Gly Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 349
 <211> 118

 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 349
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

 50 55 60
 Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gln Val Gly Leu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 350

<211> 99

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 350

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

1 5 10 15

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 351

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 351

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>	352																	
<211>	107																	
<212>	PRT																	
<213>	Mus musculus																	
<400>	352																	
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>	353																	
<211>	9																	
<212>	PRT																	
<213>	Homo sapiens																	
<400>	353																	
Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ile	Ser										

1 5

<210> 354

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 354

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

1 5 10 15

Gly

<210> 355

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 355

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 356

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 356

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 357

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 357

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 358

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 358

Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr

1 5 10

<210> 359

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 359

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

20 25

<210> 360

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 360

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

1 5 10

<210> 361

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 361

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 362

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 362

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 363

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 363

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 364

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 364

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

1 5 10 15

<210> 365

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 365

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 366

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 366

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 367

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 367

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 368

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 368

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 369

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 369

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctacctca tcagctgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atctacccta tcttcgcaac agcaaactac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtgt actactgcgc cagagaggct	300
caatctaca gggttcatt cgacatatgg ggtcagggtta caatggtcac cgtctcctca	360

<210> 370

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 370

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tacgcatctt ggcctccttt cacttttggc	300
ggagggacca aggttgagat caaa	324