



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0065029
(43) 공개일자 2017년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7012014
(22) 출원일자(국제) 2015년10월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년05월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/054775
(87) 국제공개번호 WO 2016/057846
국제공개일자 2016년04월14일
(30) 우선권주장
62/061,644 2014년10월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
브로그돈, 제니퍼
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애
비뉴 250 노바티스 인스티튜트 포 바이오메디칼
리서치 인크.
시폴레타, 다니엘라
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애
비뉴 250 노바티스 인스티튜트 포 바이오메디칼
리서치 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 **증강된 면역 반응 및 암 요법을 위한 조성물 및 사용 방법**

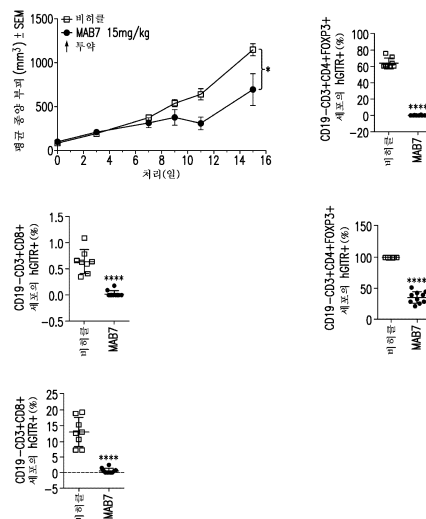
(57) 요약

본 발명은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 (즉, 18)에 결합하는, 예컨대, 항체, 조각된 항체 및 항체 단편을 비롯한, 항체 조성물을 제공한다. CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 증진시키는 데, 및 증강된 면역 반응으로 상쇄될 수 있는 질환, 예컨대, 암을 치료, 호전, 및 예방하는 데 유용한 조성물을 제공한다. 본 발명에서는 또 한 상기 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 벡터, 및 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 보유하는 숙주 세포; 뿐만 아니라, 상기 분자를 포함하는 제약 조성물 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[대표도]

도 7a-e

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/507 (2013.01)
 C07K 2317/24 (2013.01)
 C07K 2317/33 (2013.01)
 C07K 2317/567 (2013.01)
 C07K 2317/732 (2013.01)
 C07K 2317/74 (2013.01)
 C07K 2317/75 (2013.01)
 C07K 2317/76 (2013.01)
 C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

드라노프, 글렌

미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애
 비뉴 250 노바티스 인스티튜트 포 바이오메디칼 리
 서치 인크.

니, 드보라 에이.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스
 드라이브 10675 디비에이 지노믹스 인스티튜트 오
 브 더 노바티스 리서치 파운데이션 노바티스 인스
 티튜트 포 펑셔널 지노믹스, 인크.

왕, 페이

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스
 드라이브 10675 디비에이 지노믹스 인스티튜트 오
 브 더 노바티스 리서치 파운데이션 노바티스 인스
 티튜트 포 펑셔널 지노믹스, 인크.

(30) 우선권주장

62/198,673 2015년07월29일 미국(US)
 62/220,764 2015년09월18일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호(SEQ ID NO): 22를 포함하고,
 - ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 및 서열식별번호: 27 중 어느 하나로부터 선택되는 서열을 포함하고,
 - ii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29 또는 서열식별번호: 109를 포함하는 것인 중쇄 가변 영역; 및
 - (b) i) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30 또는 서열식별번호: 31을 포함하고,
 - ii) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
 - iii) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 서열식별번호: 1에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 17과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 것인, 항체, 그의 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 중쇄 FR4가 인간 배선 FR4인 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 중쇄 FR4가 서열식별번호: 42인 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 경쇄 FR4가 인간 배선 FR4인 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 경쇄 FR4가 서열식별번호: 50인 항체 또는 항체 단편.

청구항 7

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 23을 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고;
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고;
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 8

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;

- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 24를 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 31을 포함하고;
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 9

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 25를 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고;
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 10

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 26을 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고;
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 11

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 27을 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고;
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 12

제1항에 있어서,

- i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고;
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 25를 포함하고;
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 109를 포함하고;
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고;

v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,

vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 13

제2항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 서열식별번호: 16을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 17을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 서열식별번호: 16을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 17을 포함하는 경쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 경쟁하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 15

제1항에 있어서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 10, 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 99 및 서열식별번호: 105 중 어느 것으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인, 단리된 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가

- i) 서열식별번호: 6을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- ii) 서열식별번호: 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- iii) 서열식별번호: 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- iv) 서열식별번호: 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- v) 서열식별번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인;
- vi) 서열식별번호: 99를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 및
- vii) 서열식별번호: 105를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인 중 어느 하나를 포함하는 것인, 단리된 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, 인간화된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 18

제1항에 있어서, Fab' 단편을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 19

제1항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 IgG Fc를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 20

제1항에 있어서, 단일 쇄 항체 (scFv)를 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 21

제1항에 있어서, 인간 불변 영역을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 77, 서열식별번호: 100 및 서열식별번호: 106 중 어느 것으로부터

터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열식별번호: 66 또는 서열식별번호: 70을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인, 단리된 항체.

청구항 23

제1항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 제2 항체, 또는 항체 단편에 가교 결합되고, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 3의 효능제인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 24

- A. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
 ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 23을 포함하고,
 iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고,
 iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고,
 v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
 vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자;
- B. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
 ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 24를 포함하고,
 iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고,
 iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 31을 포함하고,
 v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
 vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자;
- C. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
 ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 25를 포함하고,
 iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고,
 iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고,
 v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
 vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자;
- D. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
 ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 26을 포함하고,
 iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고,
 iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고,
 v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
 vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자;
- E. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
 ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 27을 포함하고,
 iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 29를 포함하고,
 iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고,
 v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,

- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; 및
- F. i) 중쇄 CDR1이 서열식별번호: 22를 포함하고,
- ii) 중쇄 CDR2가 서열식별번호: 25를 포함하고,
- iii) 중쇄 CDR3이 서열식별번호: 109를 포함하고,
- iv) 경쇄 CDR1이 서열식별번호: 30을 포함하고,
- v) 경쇄 CDR2가 서열식별번호: 33을 포함하고,
- vi) 경쇄 CDR3이 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 중 어느 하나로부터 선택되는, 서열식별번호: 1에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 25

제24항에 있어서, 인간화된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 26

제24항에 있어서, Fab' 단편을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 27

제24항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 IgG Fc를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 28

제24항에 있어서, 단일 쇄 항체 (scFv)를 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 29

제24항에 있어서, 인간 불변 영역을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 30

제29항에 있어서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 77, 서열식별번호: 100 및 서열식별번호: 106 중 어느 것으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열식별번호: 66 또는 서열식별번호: 70을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인, 단리된 항체.

청구항 31

제24항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 제2 항체 또는 항체 단편에 가고 결합되고, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 3의 효능제인 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 32

제1항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 글리코실화된 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 33

제1항에 있어서, 항체가 변형되거나, 또는 변형된 세포에서 발현되고, 여기서, 이러한 변형 결과로 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 FcR 이펙터 기능이 증가된 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 34

제24항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 글리코실화된 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 35

제24항에 있어서, 항체가 변형되거나, 또는 변형된 세포에서 발현되고, 여기서 이러한 변형 결과로 항체, 항체

단편 또는 항원 결합 분자의 FcR 이펙터 기능이 증가된 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 생체내에서 상승된 $T_{eff}:T_{reg}$ 비를 유도하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 37

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 생체내에서 강화된 면역 반응을 유도하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 38

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 비인간 영장류 GITR과 교차 반응하고, 설치류 GITR과 교차 반응하지 않는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 39

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 40

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 종양 연관된 항원, CTLA4, LAG3, 또는 TIM3의 길항제, 또는 PD-1/PD-L1 상호작용의 억제제를 표적화하는 결합 분자를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 42

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 포함하는 키트.

청구항 43

T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 항원, CTLA4, LAG3, 또는 TIM3의 길항제, PD-1/PD-L1 상호작용의 억제제와 함께 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 화학요법제 또는 세포독소와 함께 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 46

제43항에 있어서, T 세포 반응이 CD8⁺ 세포독성 T 림프구 (CTL) T 세포 반응인 방법.

청구항 47

제43항에 있어서, 개체가 종양 연관된 항원을 발현하는 암을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 개체로부터의 암 세포와 함께 공동 투여되는 것인 방

법.

청구항 49

제47항에 있어서, 암이 흑색종, 난소암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 유방암 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 50

제43항에 있어서, T 세포 반응이 CD4+ 헬퍼 T 세포 (Th) 반응인 방법.

청구항 51

종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 치료하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 종양 연관된 항원과 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자가 CTLA4, LAG3, 또는 TIM3의 길항제, 또는 PD-1/PD-L1 상호작용의 억제제와 함께 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 화학요법제 또는 세포독소와 함께 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 55

제51항에 있어서, 항체 또는 항체 단편이 개체로부터의 암 세포와 함께 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 56

제51항에 있어서, 암이 흑색종, 난소암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 림프종, 유방암 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 57

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위한 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

청구항 58

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에서 종양 성장을 치료하는 데 사용하기 위한 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2014년 10월 8일 출원된 미국 가출원 번호 62/061,644, 2015년 7월 29일 출원된 미국 가출원 번호 62/198,673, 및 2015년 9월 18일 출원된 미국 가출원 번호 62/220,764의 우선권 및 이점을 주장하고, 상기 출원들은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 18/글루코코르티코이드 유도성 TNFR-관련 단백질 ("GITR")에 결합하고, 더욱 구체적으로는, 효능제이고/거나, 수용체를 통한 신호전달을 자극시키고/거나, 면역 반응을 조정하는 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 글루코코르티코이드-유도성 TNFR-관련 단백질 ("GITR")은, 모두가 공통 구조상의 특징으로 시스템이 풍부한 도메인을 갖는 것인 20종 초과 I형 막형단 단백질, 수개의 스플라이싱 변이체 및 수개의 바이러스 단백질을 포함하는 종양 괴사 인자 슈퍼패밀리 (TNFRSF)의 구성원이다. GITR의 세포외 도메인 (ECD)은 3개의 시스템이 풍부한 도메인 (CRD)으로 이루어지고, 그 다음으로 막형단 도메인 (TM) 및 세포내 도메인 (ICD)이 이어진다.

[0006] GITR 발현은 활성화시 추가로 증가될 수 있는 뮤린 및 인간 CD4+CD25+ 조절 T 세포 상에서 구성적으로 검출된다. 그에 반해, 이펙터 CD4+CD25- T 세포 및 CD8+CD25- T 세포는 저수준 내지 검출불가능한 수준으로 GITR을 발현하며, 이는 T 세포 수용체 활성화 이후에 빠르게 상향조절된다. GITR 발현은 또한 활성화된 NK 세포, 수지상 세포, 및 대식세포 상에서도 검출될 수 있다. GITR 하류의 신호전달 경로는 MAPK 및 정규 NFκB 경로를 포함하는 것으로 밝혀졌다. 다양한 TRAF 패밀리 구성원이 GITR 하류의 신호전달 중간체로서 관련되어 있다 (Nocentini et al. (2005) Eur. J. Immunol., 35:1016-1022).

[0007] GITR을 통한 세포 활성화는 세포 유형 및 미세환경에 의존하여, 증식 및 이펙터 기능을 증강시키는 공동 자극, 조절 T 세포에 의한 억제, 및 활성화-유도성 세포 사멸로부터의 보호를 포함하나, 이에 제한되지 않는 여러 기능을 하는 것으로 여겨진다 (Shevach and Stephens (2006) Nat. Rev. Immunol., 6:613-618). 코(Ko) 등 ((2005) J. Exp. Med., 202:885-891)은 마우스 GITR에 대한 효능작용 모노클로날 항체가 마우스 동계 종양 모델에서 효과적으로 종양 특이적 면역을 유도하였고, 확립된 종양을 근절시켰다는 것을 최초로 입증하였다. 추가로 및/또는 대안적으로, 기능적 Fc 이펙터 활성을 갖는 항-mGITR은 일부 임상전 모델에서 조절 T 세포를 고갈시킬 뿐만 아니라, 선택된 종양 환경에서 T 이펙터 세포 증식 및 시토카인 분비를 증진시키는 것으로 밝혀졌다. 이러한 관찰 결과는 mGITR에 대한 효능작용 항체가 면역 관용 균형을 파괴시킬 수 있고, 이를 통해서 결국에는 T 세포가 종양 및 지속적인 바이러스 감염을 퇴치시킬 수 있을 것이라는 것을 제안한다. 그러나, 현재까지의 연구들은 대체로 설치류 시스템에서 대용 항체 사용하는 것에 주력해 왔다. 마우스와 인간 GITR 사이의 구조상의 차이에 기인하여, 마우스에서의 대용 연구를 통해 관찰된 관찰 결과가 인간 GITR 기능의 변형으로 해석될 수 있는지 여부에 대해서는 알려져 있지 않다.

발명의 내용

[0008] 본 발명자들은 인간 글루코코르티코이드-유도성 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 18 ("GITR")에 특이적으로 결합하는 항체로서, 여기서, 항체는 시험관내에서 가교 결합되었을 때, 시험관내 hGITR 효능제 활성을 갖고, 여기서, 항체는 생체내 hGITR 활성을 부여하고, 종양 부위에서 상승된 Teff:Treg 비를 유도함으로써 종양 진행을 억제시키는 것인 항체를 확인하게 되었다. 따라서, 본 발명은 인간 GITR에 특이적으로 결합하고, 인간 GITR을 발현하는 표적 세포를 통해 세포내 신호전달을 촉진시키고/거나, 면역 반응을 조정하는 효능제 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 인간 GITR에 특이적으로 결합하는 단리된 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자로서, 여기서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 시스템이 풍부한 도메인 1 ("CRD1", 서열식별번호(SEQ ID NO): 4: CGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC) 및 시스템이 풍부한 도메인 2 ("CRD2", 서열식별번호: 5: MCVQPEFHCGDPCCTTCRHPCPPGQGVQSQKGFSGFQC)를 포함하는 에피토프에 결합하고, 여기서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 GITR의 효능제이고, 여기서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 임의적으로 무손상 또는 증가된 FcR 이펙터 기능을 갖는 것인, 단리된 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자를 제공한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 서열식별번호: 88을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 서열식별번호: 88을 포함하는 에피토프에 결합하는 항체 또는 항체 단편과 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 서열식별번호: 88 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하고, 예를 들어, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 서열식별번호: 88과 중첩되는 에피토프에 결합한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 CRD1 (잔기 34-72, 서열식별번호: 4) 및 잔기 78을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 CRD1 (잔기 34-72, 서열식별번호: 4) 및 잔기 78 내의 에피토프에 결합하는 항체 또는 항체 단편과

경쟁한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 CRD1 (잔기 34-72, 서열식별번호: 4) 및 잔기 78 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하고, 예를 들어, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 CRD1 (잔기 34-72, 서열식별번호: 4) 및 잔기 78과 중첩되는 에피토프에 결합한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 1에 결합하고, (a) 인간 중쇄를 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, 여기서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 및 서열식별번호: 27 중 어느 하나로부터 선택되는 서열을 포함하고, iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29 또는 서열식별번호: 109를 포함하는 것인, 중쇄 가변 영역; 및 (b) 경쇄 가변 영역으로서, 여기서, i) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30 또는 서열식별번호: 31을 포함하고, ii) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, iii) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 88에 결합하고, (a) 인간 중쇄를 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, 여기서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 및 서열식별번호: 27 중 어느 하나로부터 선택되는 서열을 포함하고, iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29 또는 서열식별번호: 109를 포함하는 것인, 중쇄 가변 영역; 및 (b) 경쇄 가변 영역으로서, 여기서, i) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30 또는 서열식별번호: 31을 포함하고, ii) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, iii) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0013] 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 추가의 실시양태와 관련하여, 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 16의 가변 영역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 17의 가변 영역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 16을 포함하는 중쇄, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 16을 포함하는 중쇄, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 경쟁한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 중쇄 FR4는 인간 배선 FR4이다. 특정 실시양태에서, 중쇄 FR4는 서열식별번호: 42이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 경쇄 FR4는 인간 배선 FR4이다. 특정 실시양태에서, 경쇄 FR4는 서열식별번호: 50이다.

[0016] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22 또는 서열식별번호: 84를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 28 또는 서열식별번호: 80을 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29 또는 서열식별번호: 109를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30 또는 서열식별번호: 85를 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33 또는 서열식별번호: 82를 포함하고; vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 83을 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.

[0017] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 23을 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.

[0018] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 24를 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 31을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.

[0019] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 25를 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.

[0020] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 26을 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.

- [0021] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 27을 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고; ii) 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 25를 포함하고; iii) 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 109를 포함하고; iv) 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고; v) 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, vi) 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.
- [0023] 추가 측면에서, 본 발명은 GITR에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자로서, 여기서, 항체 또는 항체 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, i) 중쇄의 CDR1은 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 79, 또는 서열식별번호: 84로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; ii) 중쇄의 CDR2는 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 62, 및 서열식별번호: 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; iii) 중쇄의 CDR3은 서열식별번호: 29 또는 서열식별번호: 109를 포함하고; iv) 경쇄의 CDR1은 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 63, 서열식별번호: 81, 서열식별번호: 85, 및 서열식별번호: 86으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; v) 경쇄의 CDR2는 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 64, 및 서열식별번호: 82로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄의 CDR3은 서열식별번호: 34 또는 서열식별번호: 83을 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다.
- [0024] 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 99 및 서열식별번호: 105로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 9 및 서열식별번호: 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 8, 서열식별번호: 10, 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 99 및 서열식별번호: 105 중 어느 것으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 서열식별번호: 6의 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 8의 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 9의 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0025] 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 추가의 실시양태와 관련하여, 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 99의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 7의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 99를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0026] 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 추가의 실시양태와 관련하여, 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 105의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 7의 가변 영역과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 105를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, GITR에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간화 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간 불변 영역을 포함한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab' 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 단일 쇄 항체 (scFv)이다.

일부 실시양태에서, 항체 단편은 단일-도메인 항체 또는 나노바디이다.

- [0029] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 제2 항체 또는 항체 단편에 가고 결합된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 글리코실화된 것이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 IgG이다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 IgG 이소형 항체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 IgG1 또는 IgG2 이소형 항체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 IgG1 또는 IgG2 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 항체 또는 항체 단편의 Fc 수용체와의 결합을 조정하는 (즉, 증가 또는 감소시키는) 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 조정하여 (즉, 증가 또는 감소시켜) Fc 수용체를 활성화시키는 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 항체 또는 항체 단편의 Fc 수용체와의 결합을 증가시키는 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 증가시켜 Fc 수용체를 활성화시키는 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 및 비인간 영장류 GITR과 교차 반응한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 설치류 GITR, 예컨대, 래트 GITR 또는 마우스 GITR과 교차 반응하지 않는다.
- [0032] 관련된 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 52, 서열식별번호: 54 및 서열식별번호: 102로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 51, 서열식별번호: 53, 서열식별번호: 55, 서열식별번호: 56, 서열식별번호: 57, 서열식별번호: 101, 및 서열식별번호: 107로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 52, 서열식별번호: 54, 및 서열식별번호: 102로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 51, 서열식별번호: 53, 서열식별번호: 55, 서열식별번호: 56, 서열식별번호: 57 서열식별번호: 101 및 서열식별번호: 107로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는다.
- [0033] 관련된 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 투여하기 위한, 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 조성물은 표적 항원, 예를 들어, 암 연관된 항원 또는 종양 연관된 항원을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원 또는 기생충 항원이다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 조성물은 CTLA4의 길항제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 LAG3의 길항제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 TIM3의 길항제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1 또는 그의 유사체, PD-1 항체) 상호작용의 억제제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 PD-1의 길항제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 PD-L1의 길항제를 추가로 포함한다.
- [0036] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 키트는 항체와의 공동 투여를 위한 제2 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 표적 항원, 예를 들어, 암 연관된 항원 또는 종양 연관된 항원이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원 또는 기생충 항원이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 CTLA4의 길항제이다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 TIM3의 길항제이다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 LAG3의 길항제이다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1 또는 그의 유사체, PD-1 항체) 상호작용의 억제제이다. 특정 실시양태에서, 제2 작용제는 PD-1의 길항

제이다. 특정 실시양태에서, 제2 작용제는 PD-L1의 길항제이다.

- [0039] 임의적으로, 항체 또는 항체 단편 및 제2 작용제는 혼합물로서 제공된다. 임의적으로, 항체 또는 항체 단편 및 제2 작용제는 별개의 제제로 제공된다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위한 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0041] 추가 측면에서, 본 발명은 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 개체에서 암의 종양 성장을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 추가로 제공한다. 본 발명은 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 감소, 억제 또는 예방하는 데 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0042] 방법 및 의학적 용도의 실시양태와 관련하여, 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 항원과 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항원은 암 연관된 항원 또는 종양 연관된 항원이다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편은 환자로부터의 암 세포, 즉, 자가 유래 암 세포와 함께 공동 투여된다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 CTLA4의 길항제와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 LAG3의 길항제와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 TIM3의 길항제와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편은 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1) 상호작용의 억제제와 함께 공동 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 PD-1의 길항제와 함께 공동 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 PD-L1의 길항제와 함께 공동 투여된다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 화학요법제 또는 세포독소와 함께 공동 투여된다.
- [0045] 일부 실시양태에서, T 세포 반응은 CD8+ 세포독성 T 림프구 (CTL) T 세포 반응이다. 일부 실시양태에서, T 세포 반응은 CD4+ 헬퍼 T 세포 (Th) 반응이다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 환자는 종양 연관된 항원을 발현하는 암을 앓고 있는 환자이다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 암 유형은 췌장암, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 결장직장암, 전립선암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추 신경계 암, 말초 신경계 암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC), 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 충수암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 및 혈액학적 조직의 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 환자는 감염성 질환, 예를 들어, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 항원 또는 기생충 항원을 갖는 환자이다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 (예컨대, HCV, HSV 또는 HIV로부터의) 바이러스 항원과 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 박테리아 항원과 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 진균 항원과 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 기생충 항원 (예컨대, 필라리아병)과 함께 공동 투여된다.
- [0048] 추가의 다른 실시양태에서, 요법에서 사용하기 위한 용도의 단리된 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위해 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에서 종양 성장을 치료하는 데 사용하기 위해 제공된다.

[0049] 정의

[0050] "항체"란 상응하는 항원에 비공유적으로, 가역적으로, 및 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 패밀리의 폴리펩티드를 지칭한다. 예시적인 항체 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 이황화 결합을 통해 연결된, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kD) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kD)를 갖는 것인, 약 2개의 동일한 폴리펩티드 쌍으로 구성된다. 알려진 면역글로불린 유전자로는 κ , λ , α , γ , δ , ϵ 및 μ 불변 영역 유전자 뿐만 아니라, 무수히 많은 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 κ 또는 λ 로 분류된다. 중쇄는 γ , μ , α , δ 또는 ϵ 로 분류되고, 이는 차례로 각각 면역글로불린 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다. 본 발명의 항체는 임의의 이소형/부류 (예컨대, IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE), 또는 임의의 서브부류 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2)일 수 있다. 각 쌍의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 초과인 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 정의한다. 가변 경쇄 (V_L) 및 가변 중쇄 (V_H)라는 용어는 각각 경쇄 및 중쇄의 상기 영역을 지칭한다. V 영역 이외에도, 중쇄 및 경쇄 둘 모두는 불변 (C) 영역 또는 도메인을 함유한다. 면역글로불린 C 영역의 분비 형태는 3개의 C 도메인, CH1, CH2, CH3, 임의적으로 CH4 (C_μ), 및 힌지 영역으로 구성된다. 면역글로불린 C 영역의 막 결합 형태는 또한 막 및 세포내 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 N-말단에 V_L 를 갖고, 이어서, 그의 다른 단부에 불변 도메인 (C)를 갖는다. V_L 은 V_H 와 함께 정렬되고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬된다. V_H 및 V_L 의 쌍 형성을 통해 이는 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 본원에서 사용되는 바, "통상의 항체"인 IgG 면역글로불린이란, 자연상에 존재하는 입체구조의 항체를 의미한다. 전형적으로, 통상의 항체 IgG는 이황화 결합을 통해 함께 연결된 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄인 4개의 쌍을 갖는다. 본원에서 사용되는 바, "항체"는 또한 즉, G1TR에 대하여 특성의 결합 특이성을 갖는 항체 및 통상의 항체 구조의 변형도 포함한다. 따라서, G1TR에 대하여 특성의 결합 특이성을 갖는 전장 항체, 키메라 항체, 및 인간화 항체가 본 개념의 범주 내에 포함된다.

[0051] 항체는 무손상 면역글로불린으로서, 또는 다양한 펩티다제를 사용한 소화에 의해 생성된, 특징이 잘 규명된 다수의 단편으로서 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 영역 내의 이황화 연결부 아래에서 항체를 소화시켜, 그 자체가 이황화 결합에 의해 V_H - C_H1 에 연결된 경쇄인 Fab'의 이량체인 $F(ab')_2$ 를 생성한다. $F(ab')_2$ 를 온화한 조건하에서 환원시켜 힌지 영역 내의 이황화 연결을 파괴함으로써 $F(ab')_2$ 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킬 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (문헌 [Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993)]). 다양한 항체 단편이 무손상 항체의 소화의 측면에서 정의되지만, 통상의 기술자는 상기 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법을 이용하여 새로 합성될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 바, "항체 단편"이란, G1TR에 대한 결합 특이성 또는 효능제 활성을 보유하는, 전체 항체의 변형에 의해 생성된, 또는 재조합 DNA 방법을 이용하여 새로 합성된 것인, 하나 이상의 항체 부위를 지칭한다. 항체 단편의 예로는 같은 결합 특이성을 갖는, Fv 단편, 단일 쌍 항체 (ScFv), Fab, Fab', Fd (V_H 및 CH1 도메인), dAb (V_H 및 단리된 CDR); 및 상기 단편의 다량체 버전 (예컨대, $F(ab')_2$)을 포함한다. 항체 단편은 또한 본 발명에서 제공되는 결합 특이성 및 활성을 달성하기 위해 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, vNAR, 비스-scFv, 및 항체 유사 화합물의 다른 변형 내로 도입될 수도 있다.

[0052] 본 발명과 관련하여 사용되는 바, "Fab" 도메인은 중쇄 가변 도메인, 불변 영역 CH1 도메인, 경쇄 가변 도메인, 및 경쇄 불변 영역 CL 도메인을 포함한다. 상기 도메인의 상호작용은 CH1과 CL 도메인 사이의 이황화 결합에 의해 안정화된다. 일부 실시양태에서, Fab의 중쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단 순서로 V_H -CH로 존재하고, Fab의 경쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단 순서로 V_L -CL로 존재한다. 일부 실시양태에서, Fab의 중쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단 순서로 CH- V_H 로 존재하고, Fab의 경쇄 도메인은 CL- V_L 순서로 존재한다. 비록 Fab가 역사적으로는 무손상 면역글로불린의 파파인 소화에 의해 확인되기는 하였지만, 본 발명과 관련하여, "Fab"는 전형적으로는 임의의 방법에 의해 재조합적으로 생성된다. 각 Fab 단편은 항원 결합과 관련하여 1가이고, 즉, 이는 단일 항원 결합 부위를 갖는다.

[0053] CH2 및 CH3 도메인을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 부위가 "Fc" 도메인이다. 본원에서 사용되는 바, "Fc 영역"이란, 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 배제한, 항체의 불변 영역을 지칭한다. Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 두 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 세 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 상기 도메인에의 가용성 힌지 N-말단을 지칭한다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 쌍을 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc는 면역글로불린 도메인 $C\gamma 2$ 및 $C\gamma 3$, 및 $C\gamma 1$ 과 $C\gamma$ 사이의 힌지를 포함할 수 있다. 관련 기술분야에서는 Fc 영역의 경계가 달라질 수 있다고 이해되고 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 보통 카바트 (Kabat) 등 (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)에

서와 같은 EU 인덱스에 따른 넘버링을 사용하여 잔기 C226 또는 P230에서 그의 카르복실-말단까지를 포함하는 것으로 정의된다. "Fc 영역"은 단리에서 상기 영역 또는 항체 또는 항체 단편과 관련하여 상기 영역을 지칭할 수 있다. "Fc 영역"은 Fc 영역, 예컨대, CH2 및 CH3 영역의 자연적으로 발생된 대립유전자 변이체 뿐만 아니라, 이펙터 기능을 조정하는 변형을 포함한다. Fc 영역은 또한 생물학적 기능을 변경시키지 않는 변이체도 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 실질적인 생물학적 기능의 손실 없이, 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, C-말단 리신은 대체 또는 제거되는 변형이 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, Fc 영역 중의 하나 이상의 C-말단 잔기는 변경되거나, 또는 제거된다. 특정 실시양태에서, Fc 중의 하나 이상의 C-말단 잔기 (예컨대, 말단 리신)는 결실된다. 특정의 다른 실시양태에서, Fc 중의 하나 이상의 C-말단 잔기는 대체 아미노산으로 치환된다 (예컨대, 말단 리신은 대체된다). 상기 변이체는 활성에 최소의 영향을 미치도록 하기 위해 관련 기술분야에 공지된 일반 규칙에 따라 선택될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Bowie, et al., Science 247:306-1310, 1990] 참조). Fc 도메인은 세포 수용체, 예컨대, FcR에 의해 인식되는 Ig의 부위이며, 보체 활성화 단백질인 C1q가 그에 결합한다. CH2 엑손의 5' 부위에서 코딩되는 하부의 힌지 영역은 FcR 수용체에의 결합을 위해 항체 내애 가요성을 제공한다.

[0054] "상보성-결정 도메인" 또는 "상보성-결정 영역 ("CDR")은 상호교환적으로 V_L 및 V_H 의 초가변 영역을 지칭한다. CDR은 표적 단백질에 대한 특이성을 보유하는, 항체쇄의 상기 표적 단백질 결합 부위이다. 각 인간 V_L 또는 V_H 에는 3개의 CDR (N-말단에서부터 순차적으로 넘버링된 CDR1-3)이 존재하며, 이는 가변 도메인의 약 15-20%를 구성한다. CDR은 표적 단백질의 에피토프에 대해 구조적으로 상보적이며, 따라서, 결합 특이성의 직접적인 원인이 된다. V_L 또는 V_H 의 나머지 스트레치, 소위 프레임워크로 불리는 영역은 아미노산 서열에서 더 적은 변이를 나타낸다 (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0055] CDR 및 프레임워크 영역의 위치는 관련 기술분야 널리 공지된 각종의 정의, 예컨대, 카바트, 코티아(Chothia), 국제 이뮤노게네틱스(ImMunoGeneTics) 데이터베이스 (IMGT) (월드와이드 웹 상의 imgt.cines.fr/) 및 AbM을 이용하여 결정될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001)]; [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)]; [Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992)]; [Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)] 참조). 항원 결합 부위의 정의 또한 하기에 기술되어 있다: 문헌 [Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000)]; 및 [Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001)]; [MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)]; 및 [Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989)]; [Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991)]; 및 [Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)].

[0056] 카바트 하에, V_H 중의 CDR 아미노산 잔기는 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링되고; V_L 중의 CDR 아미노산 잔기는 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), 및 89-97 (LCDR3)로 넘버링된다. 코티아 하에, V_H 중의 CDR 아미노산 잔기는 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링되고; V_L 중의 아미노산 잔기는 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), 및 91-96 (LCDR3)으로 넘버링된다. 카바트 및 코티아, 둘 모두의 CDR 정의를 조합함으로써, CDR은 인간 V_H 중의 아미노산 잔기 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3), 및 인간 V_L 중의 아미노산 잔기 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), 및 89-97 (LCDR3)로 이루어진다.

[0057] "결합 특이성 결정기" 또는 "BSD"라는 용어는 상호교환적으로 항체의 결합 특이성을 결정하는 데 필요한 상보성 결정 영역 내의 최소의 연속적 또는 비-연속적 아미노산 서열을 지칭한다. 최소 결합 특이성 결정기는 하나 이상의 CDR 서열 내에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 최소 결합 특이성 결정기는 항체의 중쇄 및 경쇄의 CDR3 서열의 일부 또는 전장 내에 존재한다 (즉, 오직 그에 의해서만 결정된다).

[0058] 본원에서 사용되는 바, "항체 경쇄" 또는 "항체 중쇄"는 각각 V_L 또는 V_H 를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 내인성 V_L 은 유전자 세그먼트 V (가변부) 및 J (접합부)에 의해 코딩되고, 내인성 V_H 는 V, D (다양성 부위), 및 J에 의해 코딩된다. V_L 또는 V_H 는 각각 CDR 뿐만 아니라, 프레임워크 영역을 포함한다. 본 출원에서, 항체 경쇄 및/또는 항체 중쇄는 때때로 "항체 쇄"로 집합적으로 지칭될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 인지하는 바와 같이, 상기 용어는 V_L 또는 V_H 의 기본 구조를 파괴하지 않는 돌연변이를 함유하는 항체 쇄를 포함한다.

[0059] 본원에서 사용되는 바, "결합가"라는 용어는 폴리펩티드 중 잠재적인 표적 결합 부위의 개수를 의미한다. 각각

의 표적 결합 부위는 한 표적 분자에, 또는 표적 분자 상의 특이 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩티드가 1개 초과와 결합 부위를 포함할 때, 각 표적 결합 부위는 동일하거나, 또는 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다 (예컨대, 상이한 분자, 예컨대, 상이한 항원에, 또는 동일 분자 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 통상의 항체는 예를 들어, 2개의 결합 부위를 갖고, 2가이다. 항체, 항원 결합 분자, 및 그의 단편은 1가 (즉, 한 표적 분자에 결합), 2가, 또는 다가 (즉, 1개 초과와 표적 분자에 결합)일 수 있다.

[0060] 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 제조를 위해, 관련 기술분야에 공지된 임의의 기술이 사용될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)]; [Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983)]; [Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985] 참조). 단일쇄 항체 제조 기술 (미국 특허 번호 4,946,778)은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 제조할 수 있도록 적합화될 수 있다. 또한, 트랜스제닉 마우스, 또는 다른 유기체, 예컨대, 다른 포유동물을 사용하여 영장류화 또는 인간화 항체를 발현시킬 수 있다. 대안적으로, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이중중합체 Fab 단편을 확인할 수 있다 (예컨대, 문헌 [McCafferty *et al.*, *상기 문헌 동일*]; [Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10:779-783, (1992)] 참조).

[0061] 비인간 항체를 영장류화 또는 인간화하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 영장류화 또는 인간화 항체는 비-영장류 또는 비인간 공급원으로부터 그 안으로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-영장류 또는 비인간 아미노산 잔기는 종종 임포트 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로 임포트 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter)와 공동 연구자들의 방법에 따라 (예컨대, 문헌 [Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)] 참조) 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR들 또는 CDR 서열로 치환함으로써 수행할 수 있다. 따라서, 상기 인간화 항체는, 무손상 인간 가변 도메인보다 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 실질적으로 덜 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 번호 4,816,567). 실제로, 영장류화 또는 인간화 항체는 전형적으로 일부 상보성 결정 영역 ("CDR") 잔기 및 가능하게는 일부 프레임워크 ("FR") 잔기가 결합 특이성 부위를 위하여 원래의 중 (예컨대, 설치류 항체) 내 유사 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 영장류 또는 인간 항체이다.

[0062] "키메라 항체"는 (a) 항원 결합 부위 (가변 영역)가 상이한 또는 변경된 부류, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 완전히 상이한 분자, 예컨대, 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물에 연결되도록 불변 영역 또는 그의 일부가 변경, 대체 또는 교환되거나; 또는 (b) 가변 영역 또는 그의 일부가, 상이한 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 변경, 대체 또는 교환된 항체 분자이다.

[0063] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 분자는 다른 단백질과의 융합 단백질에 화학적으로 접합되거나, 또는 다른 단백질과의 융합 단백질로서 발현되는 하나 이상의 면역글로불린쇄를 추가로 포함한다. 이는 또한 이중특이적 항체를 포함한다. 이중특이적 또는 이작용성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 본 발명의 다른 항원 결합 단편 또는 항체 부위는 2가 scFv (디아바디), 항체 분자가 2개의 상이한 에피토프를 인식하는 이중특이적 scFv 항체, 단일 결합 도메인 (dAb) 및 미니바디를 포함한다.

[0064] 본원에 기술된 다양한 항체 또는 항원 결합 단편은 무손상 항체의 효소적 또는 화학적 변형에 의해 제조되거나, 또는 재조합 DNA 방법을 이용하여 새로 합성되거나 (예컨대, 단일쇄 Fv), 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인할 수 있다 (예컨대, 문헌 [McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554, 1990] 참조). 예를 들어, 미니바디는 예컨대, 문헌 [Vaughan and Sollazzo, *Comb Chem High Throughput Screen.* 4:417-30 2001]에 기술된 방법과 같이, 관련 기술분야에 기술된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 비롯한 다양한 방법에 의해 생산될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990)]; [Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)]를 참조할 수 있다. 단일쇄 항체는 파지 디스플레이 라이브러리 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리, 유전자 서플링된 라이브러리를 사용하여 확인할 수 있다. 상기 라이브러리는 합성, 반합성 또는 천연 및 면역적극 공급원으로부터 구축될 수 있다.

[0065] "항원 결합 분자" 또는 "비-항체 리간드"라는 용어는 애드넥틴, 아비머, 단일쇄 폴리펩티드 결합 분자, 및 항체-유사 결합 펩티도모방체를 비롯한, 비-면역글로불린 단백질 스캐폴드를 사용하는 항체 모방체를 지칭한다.

[0066] "가변 영역" 또는 "V 영역"이라는 용어는 상호교환적으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 중쇄 또는 경쇄를 지칭한다. 내인성 가변 영역은 면역글로불린 중쇄 V-D-J 유전자 또는 경쇄 V-J 유전자에 의해 코딩

된다. V 영역은 자연적으로 발생된 것, 재조합 또는 합성인 것일 수 있다.

- [0067] 본원에서 사용되는 바, "가변 세그먼트" 또는 "V-세그먼트"라는 용어는 상호교환적으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3를 포함하는 가변 영역의 서브서열을 지칭한다. 내인성 V-세그먼트는 면역글로불린 V-유전자에 의해 코딩된다. V-세그먼트는 자연적으로 발생된 것, 재조합 또는 합성인 것일 수 있다.
- [0068] 본원에서 사용되는 바, "J-세그먼트"라는 용어는 CDR3의 C-말단 부위 및 FR4를 포함하는, 코딩된 가변 영역의 서브서열을 지칭한다. 내인성 J-세그먼트는 면역글로불린 J-유전자에 의해 코딩된다. J-세그먼트는 자연적으로 발생된 것, 재조합 또는 합성인 것일 수 있다.
- [0069] "인간화" 항체는 인간에서는 더 작은 면역원성을 띠면서, 비인간 항체의 반응성 (예컨대, 결합 특이성, 활성)을 유지하는 항체이다. 이는, 예를 들어, 비인간 CDR 영역은 유지하고, 항체의 나머지 부분은 인간 대응부로 대체함으로써 달성될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]; [Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988)]; [Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)]; [Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991)]; [Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994)]를 참조할 수 있다.
- [0070] "상응하는 인간 배선 서열"이라는 용어는 인간 배선 면역글로불린 가변 영역 서열에 의해 코딩되는 모든 다른 모든 다른 공지된 가변 영역 아미노산 서열과 비교하여 참조 가변 영역 아미노산 서열 또는 서브서열과 가장 높게 측정된 아미노산 서열 동일성을 공유하는 인간 가변 영역 아미노산 서열 또는 서브서열을 코딩하는 핵산 서열을 지칭한다. 상응하는 인간 배선은 또한 모든 다른 평가된 가변 영역 아미노산 서열과 비교하여 참조 가변 영역 아미노산 서열 또는 서브서열과 가장 높은 아미노산 서열 동일성을 갖는 인간 가변 영역 아미노산 서열 또는 서브서열을 지칭할 수 있다. 상응하는 인간 배선 서열은 프레임워크 영역 단독, 상보성 결정 영역 단독, 프레임워크 및 상보성 결정 영역, (상기 정의된 바와 같은) 가변 세그먼트, 또는 가변 영역을 포함하는 서열 또는 서브서열의 다른 조합일 수 있다. 서열 동일성은 본원에 기술된 방법을 이용하여, 예를 들어, BLAST, ALIGN 또는 관련 기술분야에 공지된 또 다른 정렬 알고리즘을 이용하여 두 서열을 정렬함으로써 측정될 수 있다. 상응하는 인간 배선 핵산 또는 아미노산 서열은 참조 가변 영역 핵산 또는 아미노산 서열과 적어도 약 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 상응하는 인간 배선 서열은, 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 국제 이뮤노제네틱스 데이터베이스 (IMGT) (월드와이드 웹 상의 imgt.cines.fr/) 및 V-베이스 (월드와이드 웹 상의 vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk)를 통해 측정될 수 있다.
- [0071] 항원(예컨대, 단백질)과 항체, 항체 단편, 또는 항체 유래 결합체 사이의 상호작용을 기술하는 것과 관련하여 사용될 때, "특이적으로 결합한다" 또는 "선택적으로 결합한다"라는 어구는 예컨대, 생물학적 샘플, 예컨대, 혈액, 혈청, 혈장 또는 조직 샘플 중의 단백질 및 다른 생물체제로 이루어진 이중 집단 내 항원의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 특성의 면역검정 조건하에서, 특성의 결합 특이성을 가진 항체 또는 결합 작용제는 특정 항원에 대해 배경보다 적어도 2배로 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 항원에 실질적으로 유의한 양으로 결합하지 않는다. 한 실시양태에서, 지정된 면역검정 조건하에서, 특성의 결합 특이성을 가진 항체 또는 결합 작용제는 특정 항원에 대해 배경보다 적어도 열배 (10배)로 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 항원에 실질적으로 유의한 양으로 결합하지 않는다. 상기 조건하에서의 항체 또는 결합 작용제에 대한 특이적인 결합은 항체 또는 작용제가 특정 단백질 (예컨대, 인간 GITR)에 대한 그의 특이성에 대해 선택되는 것을 필요로 할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 특이적인 결합은 인간 GITR에 선택적으로 결합하지만, 예컨대, 무관 GITR 분자 또는 다른 TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원과 교차 반응하는 항체는 포함하지 않는 그의 항체 단편 및 결합 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 비인간 영장류 GITR (예컨대, 시노몰구스 GITR)과 교차 반응하는 것인 선택된다.
- [0072] 특정 단백질과 특이적인 면역반응성을 띠는 항체를 선별하는 데 다양한 면역검정 포맷이 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질과 특이적인 면역반응성을 띠는 항체를 선별하는 데 고체상 ELISA 면역검정이 통상 사용된다 (특이적인 면역반응성을 측정하는 데 사용될 수 있는 면역검정 포맷 및 조건에 관한 설명에 대해서는 예컨대, 문헌 [Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998)] 참조). 전형적으로, 특이적 또는 선택적 결합 반응은 배경 신호보다 적어도 2배, 더욱 전형적으로는 배경 신호보다 적어도 10 내지 100배의 신호를 생성할 것이다.
- [0073] "평형 해리 상수 (K_D , M)"라는 용어는 해리 속도 상수 (k_d , 시간⁻¹)를 회합 속도 상수 (k_a , 시간⁻¹, M⁻¹)로 나눈 것을 지칭한다. 평형 해리 상수는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 본 발명

의 항체의 평형 해리 상수는 일반적으로 약 10^{-7} 또는 10^{-8} M 미만, 예를 들어, 약 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만, 일부 실시양태에서, 약 10^{-11} M, 10^{-12} M 또는 10^{-13} M 미만이 될 것이다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 약 1 nM 이하의 평형 해리 상수 (K_D)로 인간 GITR에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 1 nM 미만인 K_D 로 인간 GITR에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 약 0.5 nM 내지 약 1.0 nM 범위인 K_D 로 인간 GITR에 결합한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바, "항원 결합 영역"이라는 용어는 분자와 GITR 사이의 특이적 결합을 담당하는 본 발명의 GITR 결합 분자의 도메인을 지칭한다. 항원 결합 영역은 적어도 하나의 항체 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 적어도 하나의 상기 항원 결합 영역이 본 발명의 각 GITR 결합 분자에 존재하며, 각 항원 결합 영역은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 GITR 결합 분자의 항원 결합 영역 중 적어도 하나는 GITR의 효능제로서 작용한다.

[0075] "항체 효능제" 또는 "효능제"라는 용어는 상호교환적으로 수용체를 활성화시켜 전체 또는 부분적인 수용체 매개 반응을 유도할 수 있는 항체를 지칭한다. 예를 들어, GITR의 효능제는 GITR에 결합하여 GITR 매개 세포내 신호 전달을 유도한다 (예컨대, NF- κ B 발현 활성화를 증가시킨다). 항체 효능제는 천연 리간드인 GITR-L과 유사하게 GITR을 통한 신호전달을 자극시킨다. GITR-L의 GITR에의 결합은 I κ B 분해에 기인하여 NF κ B 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, GITR 항체 효능제는 GITR에 결합할 수 있고, T 세포 (예컨대, CD8⁺ CTL 또는 CD4⁺ Th 세포) 증식, 생존, 세포용해 활성 및/또는 시토킨 생산 (예컨대, IFN γ , IL-10, IL-13, TNF α)을 유도할 수 있는 그의 능력에 의해, 또는 다르게는 본원에 기술된 바와 같이 확인될 수 있다.

[0076] "GITR" 또는 "글루코코르티코이드-유도성 종양 괴사 인자 수용체 수용체" 또는 "종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 18" 또는 "TNFRSF18"이라는 용어는 상호교환적으로 TNF-수용체 슈퍼패밀리의 구성원인 I형 막횡단 단백질을 지칭한다. GITR은 CD4⁺ CD25⁺ 상에서, 및 활성화된 이펙터 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 상에서 고수준으로 발현된다. GITR의 핵산 및 아미노산 서열은 공지되어 있고, 이는 하기와 같이 공개되어 있다:

[0077] 진뱅크 수탁 번호(GenBank Accession No.) NM_004195.2→NP_004186.1 (이소형 1 전구체), 서열식별번호: 1:

```
1 maqhgmgaf ralcglallc alsigqrptg gpgcgprll lgtgtdarcc rvhttrccrd
61 ypgeeccsew dmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgggv qsqgkfsfgf qcidasgtf
121 sggheghckp wtdctqfgfl tvfpgnkthn avcvpgsppa eplgwltvvl lavaacvlll
181 tsaqlglhiw qlrsqcmwpr etqlillevpp stedarscqf peeergersa eekgrlgdlw
241 v;
```

[0078] 및

[0079] NM_148901.1→NP_683699.1 (이소형 2 전구체), 서열식별번호: 2:

```
1 maqhgmgaf ralcglallc alsigqrptg gpgcgprll lgtgtdarcc rvhttrccrd
61 ypgeeccsew dmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgggv qsqgkfsfgf qcidasgtf
121 sggheghckp wtdccwrcrr rpktpeaass prksgasdrq rrrggwetcg cepgrppgpp
181 taaspspgap qaagalrsal grallpwqkqk wvqeggsdqr pgpcssaaaa gpcrreretq
241 swppsslagp dgvgv;
```

[0080]

[0081] 및

[0082] NM_148902.1→NP_683700.1 (이소형 3 전구체), 서열식별번호: 3:

```
1 maqhgmgaf ralcglallc alsigqrptg gpgcgprll lgtgtdarcc rvhttrccrd
61 ypgeeccsew dmcvqpefh cgdpccttcr hhpcppgggv qsqgkfsfgf qcidasgtf
121 sggheghckp wtdctqfgfl tvfpgnkthn avcvpgsppa eplgwltvvl lavaacvlll
181 tsaqlglhiw qlrktqlille vppstedars cqfpeeerge rsaeekgrlg dlwv.
```

[0083]

[0084] 또한, 진뱅크 수탁 번호 NM_005092→NP_005083.2로 참조할 수 있다. 구조상, GITR 아미노산 서열은 3개의 시스테인이 풍부한 도메인 (CRD)을 포함하는 세포외 도메인 (ECD)인 신호 펩티드를 갖는 TNF-수용체 슈퍼패밀리의 구성원이고, 그의 전장에 걸쳐 진뱅크 수탁 번호 NP_004186.1 (서열식별번호: 1), NP_683699.1 (서열식별번호: 2), NP_683700.1 (서열식별번호: 3), 또는 NP_005083.2의 아미노산 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 I형 막횡단 단백질이다. 구조상, GITR 핵산 서열은 그의 전장에 걸쳐 진뱅크 수탁 번호 NM_004195.2, NM_148901.1, NM_148902.1, NM_005092 또는 서열식별번호: 1-4의 핵산 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 기능상, 설치류 GITR의 효능작용은 적어도 일시적으로는 CD25⁺ 조절 T 세포 (Treg)의 억제제 활

성을 억제시킨다. G1TR 효능작용은 활성화된 이펙터 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 면역활성, 예컨대, 증식, 생존, 시토크인 생산 및 세포용해 활성을 추가로 증진시킨다. 예컨대, 문헌 [Nocentini, *et al.*, *Eur J Immunol* (2007) 37:1165-1169]; [Expert Opin Ther Patents (2007) 17(5):567-757]; [Shevach and Stephens, *Nature Reviews Immunology* (2006) 6:613-618]을 참조할 수 있다.

[0085] 본 발명의 폴리펩티드의 "활성"은 그의 천연 세포 또는 조직에서의 폴리펩티드의 구조적, 조절, 또는 생화학적 기능을 지칭한다. 폴리펩티드의 활성의 예로는 직접적인 활성 및 간접적인 활성, 둘 모두를 포함한다. G1TR 효능작용의 예시적인 활성으로는 NF- κ B 활성화를 증가시키는 세포내 신호전달, 활성화된 이펙터 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 증식, 생존, 시토크인 생산 (예컨대, IFN γ , IL-10, IL-13, TNF α) 및 세포용해 활성 증가를 포함한다. 치료학상, G1TR의 효능작용은 생체내에서 항종양 및 항바이러스 T 세포 반응을 증강시킨다.

[0086] 핵산 또는 단백질에 적용될 때, "단리된"이라는 용어는 핵산 또는 단백질이 천연 상태에서 그와 회합되어 있는 다른 세포 성분을 본질적으로 함유하지 않는다는 것을 나타낸다. 바람직하게, 이는 균질 상태로 존재한다. 이는 건조 상태로 또는 수용액으로 존재할 수 있다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석 화학 기술, 예컨대, 폴리 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 측정된다. 제제 중에 존재하는 우세 종인 단백질이 실질적으로 정제된다. 특히, 단리된 유전자는 상기 유전자를 플랭킹하고, 관심 유전자 이외의 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임으로부터 분리된다. "정제된"이라는 용어는 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생성함을 나타낸다. 특히, 이는 핵산 또는 단백질이 적어도 85% 순수하다는 것, 더욱 바람직하게는 적어도 95% 순수하다는 것, 가장 바람직하게는 적어도 99% 순수하다는 것을 의미한다.

[0087] "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는, 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며, 자연적으로 발생된 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예컨대, 축퇴성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열 뿐만 아니라, 명확하게 명시된 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)]).

[0088] "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연적으로 발생된 아미노산의 인공의 화학적 모방체인 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 자연적으로 발생된 아미노산 중합체 및 비-자연적으로 발생된 아미노산 중합체에 적용된다.

[0089] "아미노산"이라는 용어는 자연적으로 발생된 아미노산 및 합성 아미노산 뿐만 아니라, 자연적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연적으로 발생된 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것 뿐만 아니라, 추후에 변형된 아미노산, 예컨대, 히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉, 수소, 카르복실 기, 아미노 기 및 R 기에 결합된 α -탄소를 갖는 화합물, 예컨대, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 지칭한다. 상기 유사체는 변형된 R 기를 가지거나 (예컨대, 노르류신), 변형된 펩티드 백본을 가지지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 아미노산 모방체란, 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 가지지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학적 화합물을 지칭한다.

[0090] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열, 둘 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체란, 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 지칭하거나, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우에는 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴성에 기인하여, 수많은 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 주어진 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG, 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌이 지정되는 모든 위치에서, 코돈은 코딩되는 폴리펩티드를 변경하지 않으면서, 기술된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 상기 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종인 "침묵 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 통상의 기술자는 핵산 내의 각 코돈 (통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 작용상 동일한 분자를 생

상하도록 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 각각의 기술된 서열에 내포된다.

- [0091] 아미노산 서열에 관하여, 통상의 기술자는 코딩된 서열 중 단일 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에의 개별 치환, 결실 또는 부가가, 변경이 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산의 치환을 생성하는 것인 "보존적으로 변형된 변이체"임을 인지할 것이다. 작용상 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표가 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 상기 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 중간 상동체 및 대립유전자에 부가적인 것이고, 이들을 배제시키지 않는다.
- [0092] 하기 8개의 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예컨대, 문헌 [Creighton, *Proteins* (1984) 참조].
- [0093] "서열 동일성(%)"은 최적으로 정렬된 두 서열을 비교창 상에서 비교함으로써 측정되며, 여기서, 비교창 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적의 정렬을 위해, 부가 또는 결실을 포함하지 않는 참조 서열 (예컨대, 본 발명의 폴리펩티드)과 비교하여 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 상기 동일성(%)은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에 존재하는 위치의 개수를 측정하여 매칭되는 위치의 개수를 산출하고, 매칭되는 위치의 개수를 비교창 내의 위치의 총 개수로 나누고, 그 결과치에 100을 곱하여 서열 동일성(%)을 산출함으로써 계산된다.
- [0094] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "동일성(%)"이라는 용어는 동일한 서열인 2개 이상의 서열 또는 서브열을 지칭한다. 두 서열은, 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 이용하거나, 또는 수동 정렬 및 육안 검사로 측정시 비교창 또는 지정된 영역에 대해서 최대 상응하도록 비교 및 정렬되었을 때, 두 서열이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 특정 백분율로 갖는 경우 (즉, 특정 영역에 걸쳐 또는 특정되지 않는 경우에는 참조 서열의 전체 서열에 걸쳐 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성), "실질적으로 동일하다". 본 발명은 각각 본원에 예시된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 (예컨대, 서열식별번호: 6-10, 12, 14, 59 및 61 중 어느 하나에 예시된 가변 영역; 서열식별번호: 16-17 중 어느 하나에 예시된 가변 세그먼트; 서열식별번호: 22-34 중 어느 하나에 예시된 CDR; 서열식별번호: 35-50 중 어느 하나에 예시된 FR; 및 서열식별번호: 51-58 및 60 중 어느 하나에 예시된 핵산 서열)와 실질적으로 동일한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 임의적으로, 동일성은 길이가 적어도 약 15, 25 또는 50개 뉴클레오티드인 영역, 또는 더욱 바람직하게는 길이가 100 내지 500개 또는 1,000개 이상의 뉴클레오티드인 영역, 또는 참조 서열의 전장에 걸쳐 존재한다. 아미노산 서열과 관련하여, 동일성 또는 실질적인 동일성은 길이가 적어도 5, 10, 15 또는 20개 아미노산인 영역, 임의적으로, 길이가 적어도 약 25, 30, 35, 40, 50, 75 또는 100개 아미노산인 영역, 임의적으로, 길이가 적어도 약 150, 200 또는 250개 아미노산인 영역, 또는 참조 서열의 전장에 걸쳐 존재할 수 있다. 더 짧은 아미노산 서열, 예컨대, 20개 이하의 아미노산의 아미노산 서열과 관련하여, 실질적인 동일성은 본원에 정의된 보존적 치환에 따라 1 또는 2개의 아미노산 잔기가 보존적으로 치환되는 경우에 존재한다.
- [0095] 서열 비교를 위해, 전형적으로 한 서열은 시험 서열과 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우, 시험 서열 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요할 경우, 서브서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 대안적인 파라미터를 지정할 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 기초하여 참조 서열 대비 시험 서열에 대한 서열 동일성(%)을 계산한다.
- [0096] 본원에서 사용되는 바, "비교창"은 두 서열을 최적으로 정렬시킨 후, 서열을 인접 위치의 동일한 개수의 참조 서열과 비교할 수 있는, 20 내지 600개, 통상적으로, 약 50 내지 약 200개, 더욱 통상적으로, 약 100 내지 약 150개로 이루어진 군으로부터 선택되는 인접한 위치의 개수 중 어느 하나의 세그먼트에 대해 언급한 것을 포함한다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예컨대, 문헌 [Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c]의 국부 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444]의 유사성 검색 방법에 의해, 상기 알고리즘의 전산화 실행 (위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 GAP, BESTFIT, FASTA 및

TFASTA (제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group: 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)))에 의해, 또는 수동 정렬 및 육안 검사 (예컨대, 문헌 [Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)] 참조)에 의해 수행될 수 있다.

[0097] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성(%)을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 두 예는 각각 문헌 [Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402] 및 [Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]에 기술되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 입수가 가능하다. 상기 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열 내 동일한 길이의 워드와 정렬되는 경우에 일부 양의 값의 역치 스코어 T에 매칭되거나, 이를 충족시키는, 질의 서열 내의 길이 W의 짧은 워드를 확인함으로써 높은 스코어의 서열 쌍 (HSP)을 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃 워드 스코어 역치를 지칭한다 (Altschul *et al.*, 상기 문헌 동일). 이들 초기 이웃 워드 히트는 이를 함유하는 더 긴 HSP를 찾는 검색을 개시하기 위한 시드로 작용한다. 워드 히트는 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한, 각 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 스코어는 뉴클레오타이드 서열에 대해 파라미터 M (매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 스코어, 항상 > 0) 및 N (미스매칭 잔기에 대한 패널티 스코어, 항상 < 0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열인 경우, 누적 스코어는 스코어링 행렬을 이용하여 계산된다. 누적 정렬 스코어가 그의 최대 달성 값으로부터 X의 양만큼 하락하거나; 하나 이상의 음의 값으로 스코어링된 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 스코어가 0 이하로 떨어지거나; 또는 어느 한쪽의 서열의 단부에 도달한 경우에, 각 방향으로의 워드 히트의 연장은 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X가 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열인 경우)은 디폴트로서 워드길이 (W) 11, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥 비교를 사용한다. 아미노산 서열인 경우, BLASTP 프로그램은 워드길이 3, 및 기대값 (E) 10, 및 BLOSUM62 스코어링 행렬 (문헌 [Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915] 참조) 정렬 (B) 50, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4, 및 양쪽 가닥 비교를 사용한다.

[0098] BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 사이의 유사성에 대한 통계적 분석을 수행한다 (예컨대, 문헌 [Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매칭이 우연히 발생할 확률을 나타내는 최소 합계 확률 (P(N))이다. 예를 들어, 핵산은 참조 핵산 대비 시험 핵산의 비교에서의 최소 합계 확률이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게, 약 0.01 미만, 가장 바람직하게, 약 0.001 미만인 경우에 참조 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0099] 두 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 것은 하기 기술되는 바와 같이 제1 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드가 제2 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역학적으로 교차 반응성을 띠는 것을 암시하는 것이다. 따라서, 폴리펩티드는 전형적으로, 예를 들어, 두 펩티드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우에 제2 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 것이다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 것은 두 분자 또는 그의 상보체가 하기 기술되는 바와 같이 엄격한 조건하에서 서로 하이브리드화된다는 것을 나타내는 또 다른 암시이다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 것은 동일한 프라이머를 사용하여 서열을 증폭시킬 수 있다는 것을 나타내는 또 다른 추가의 암시이다.

[0100] 항원 결합 영역이 본 발명의 GTR 결합 분자 내에서 연결되는 방법을 설명하는 것과 관련하여 사용될 때, "연결하다"라는 용어는 영역을 물리적으로 연결하기 위한 모든 가능한 수단을 포함한다. 다수의 항원 결합 영역은 화학 결합, 예컨대, 공유 결합 (예컨대, 펩티드 결합 또는 이황화 결합), 또는 직접 결합 (즉, 두 항원 결합 영역 사이에 링커 없이 결합) 또는 간접 결합 (즉, 2개 이상의 항원 결합 영역 사이에 적어도 하나의 링커 분자의 도움으로 결합)일 수 있는 비-공유 결합에 의해 빈번하게 연결된다.

[0101] "대상체", "환자" 및 "개체"라는 용어는 상호교환적으로 포유동물, 예를 들어, 인간 또는 비인간 영장류 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 또한 실험실 포유동물, 예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 농경 포유동물 (예컨대, 말, 양, 소, 돼지, 낙타류) 또는 반려 포유동물 (예컨대, 개, 고양이)일 수 있다.

[0102] 본원에서 사용되는 바, 한 실시양태에서, 임의 질환 또는 장애의 "치료하다," 치료하는," 또는 "치료"라는 용어는 질환 또는 장애를 호전시키는 것 (즉, 질환 또는 그의 임상 증상 중 적어도 하나의 발생을 저속화 또는 정지 또는 감소시키는 것)을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다," 치료하는," 또는 "치료"란, 환자가 인식할 수 없는 것을 비롯한, 적어도 하나의 물리적 파라미터를 경감 또는 호전시키는 것을 의미한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, "치료하다," 치료하는," 또는 "치료"란, 물리적으로 (예컨대, 인식이 가능한 증상의 안정화), 생리학적으로 (예컨대, 물리적 파라미터의 안정화), 또는 그 둘 모두의 방식으로 질환 또는 장애를 조정하는 것

을 의미한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, "치료하다," "치료하는," 또는 "치료"란, 질환 또는 장애의 발병 또는 발생 또는 진행을 예방 또는 지연시키는 것을 의미한다.

[0103] "치료학상 허용량" 또는 "치료학상 유효 용량"이라는 용어는 상호교환적으로 원하는 결과 (즉, 종양 크기 축소, 종양 성장 억제, 전이 예방, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 감염 억제 또는 예방)를 일으키는 데 충분한 양을 의미한다. 일부 실시양태에서, 치료학상 허용량은 바람직하지 않은 부작용을 유도하거나, 유발하지 않는다. 치료학상 허용량은 먼저 저용량을 투여한 후, 이어서, 원하는 효과를 달성할 때까지 그 용량을 점진적으로 증가시킴으로써 결정될 수 있다. 본 발명의 GITR 효능작용 항체의 "예방학상 유효 투여량" 및 "치료학상 유효 투여량"은 각각 암 또는 감염성 질환과 연관된 증상을 비롯한 질환 증상의 발병을 예방하거나, 또는 그의 증도를 감소시킬 수 있다.

[0104] "공동 투여하다"라는 용어는 한 개체의 혈액 중에 2종의 활성제가 동시에 존재하는 것을 의미한다. 공동 투여된 활성제는 공동으로 또는 순차적으로 전달될 수 있다.

[0105] 본원에서 사용되는 바, "로 본질적으로 이루어진"이라는 어구는 활성 제약 제제 종류 또는 종 뿐만 아니라, 방법 또는 조성물의 의도하는 목적을 위한 임의의 불활성 담체 또는 부형제도 방법 또는 조성물에 포함되어 있다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, "로 본질적으로 이루어진"이라는 어구는 본 발명의 효능제 항-GITR 항체 이외의 다른 하나 이상의 추가의 활성제를 포함하는 것은 명확하게 배제한다. 일부 실시양태에서, "로 본질적으로 이루어진"이라는 어구는 본 발명의 효능제 항-GITR 항체 및 공동 투여되는 제2 작용제 이외의 다른 하나 이상의 추가의 활성제를 포함하는 것은 명확하게 배제한다.

[0106] "암 연관된 항원" 또는 "종양 연관된 항원" 또는 "종양 특이적 마커" 또는 "종양 마커"라는 용어는 상호교환적으로 정상 세포와 비교하였을 때, 암 세포 표면 상에서 차별적으로 발현되고, 약리학적 작용제를 암 세포에 차별적으로 표적화하는 데 유용한 분자 (전형적으로, 단백질, 탄수화물 또는 지질)를 의미한다. 종종, 암 연관된 항원은 정상 세포와 비교하였을 때, 암 세포에서 과다발현되는, 예를 들어, 정상 세포와 비교하였을 때, 1배 과다발현, 2배 과다발현, 3배 과다발현 또는 그 초과로 과다발현되는 세포 표면 분자이다. 종종, 암 연관된 항원은 암 세포에서 부적절하게 합성되는 세포 표면 분자, 예를 들어, 정상 세포 상에서 발현된 분자와 비교하였을 때, 결실, 부가 또는 돌연변이를 함유하는 분자이다. 종종, 암 연관된 항원은 정상 세포의 표면 상에서는 합성 또는 발현되지 않고, 오직 암 세포의 세포 표면 상에서만 배타적으로 발현될 것이다. 예시되는 세포 표면 종양 마커로는 유방암의 경우, 단백질 c-erbB-2 및 인간 표피 성장 인자 수용체 (HER), 전립선암의 경우, PSMA, 및 유방암, 난소암 및 직장결장암을 비롯한 다수의 암에서 탄수화물 뮤신을 포함한다.

[0107] 본원에서 사용되는 바, 예컨대, Fab와 같은 항원 결합 모이어티와 관련하여, "제1," "제2," "제3," 및 "제4"라는 용어는 각 모이어티가 1개 초과로 존재할 경우, 편의상 구별하기 위해 사용되는 것이다. 상기 용어를 사용하는 것은 달리 언급되지 않는 한, 항체의 특정 순서 또는 배향을 부여하는 것으로 의도되지 않는다.

[0108] "단수 형태" 용어는 문맥상 달리 분명하게 명시되지 않는 한, 복수 개의 지시 대상도 포함한다.

[0109] 효능제 항-GITR 항체

[0110] 본 발명은 GITR에 결합하고, 그를 통한 신호전달을 자극시키고/거나, 생체내에서 강화된 면역 반응을 유도하는 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자를 제공한다. 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자는 표적 항원에 대한 CD4+ T 헬퍼 (Th) 및/또는 CD8+ 세포용해성 T 림프구 (CTL) 반응을 증진시키는 데 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 또한 그의 진행이 효과적인 면역 반응에 의해 역전되거나, 또는 억제될 수 있는 것인 질환 병태 (암 및 감염성 질환 포함)를 치료하는 데에도 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0111] 본 발명의 항체, 항체 단편 및 항원 결합 분자는 인간 환자에서 사용되는 데 적합한 특성을 보이며, 예를 들어, 이는 인간에서 사용하는 데 있어 면역원성 문제의 위험이 낮고 (이는 인간 배선 핵산 서열에 의해 코딩되되, 단, 예외적으로, 결합 특이성 결정 영역 (BSD), 특히, 적어도 CDR3); GITR에의 친화도가 높고 (예컨대, K_D 가 5 nM 미만이다); TNFR 슈퍼패밀리의 다른 구성원과 교차 반응하지 않고; 인간 및 비인간 영장류 GITR과 교차 반응하고; 저용량으로 (예컨대, 시험관내 검정에서 5 nM 미만의 농도에서) GITR 신호전달에 대하여 효능작용한다. 다른 활성 및 특징 또한 본 명세서 전역에서 입증된다.

[0112] 따라서, 본 발명은 GITR의 효능제인 항체, 항체 단편, 및 항원 결합 분자를 제공한다. 제공되는 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 예를 들어, 하기 표 1 및 2에 기술된 항체와 같은, 원래의 또는 참조 모노클로날 항체로부터 유래된 중쇄 및 경쇄의 CDR3 내의 최소 결합 서열 결정기 (BSD)를 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가

변 영역 (CDR 및 FR)의 나머지 서열, 예컨대, V-세그먼트 및 J-세그먼트는 상응하는 인간 배선 및 친화도 성숙 아미노산 서열로부터의 것이다. V-세그먼트는 인간 V-세그먼트 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자의 결합 활성 또는 활성을 최적화시키기 위해 친화도 성숙화, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법에 의해 추가의 서열 개선은 달성할 수 있다.

[0113] 또 다른 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항체 단편의 중쇄 및 경쇄는 예컨대, 인간 V-세그먼트 라이브러리로부터 선택되는, 상응하는 인간 배선 서열 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3)로부터의 인간 V-세그먼트, 및 원래의 모노클로날 항체 (예컨대, 표 1 및 2에 기술된 항체)로부터의 CDR3-FR4 서열 세그먼트를 함유한다. CDR3-FR4 서열 세그먼트는 서열 세그먼트를 상응하는 인간 배선 서열로 대체함으로써 및/또는 친화도 성숙화에 의해 추가로 개선될 수 있다. 예를 들어, BSD 주변의 FR4 및/또는 CDR3 서열은 상응하는 인간 배선 서열로 대체되는 반면, 원래의 모노클로날 항체의 CDR3으로부터의 BSD는 유지된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 중쇄 V-세그먼트에 대한 상응하는 인간 배선 서열은 VH3 3-13/30:

[0115] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (서열식별번호: 89)이다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 89에서 마지막 아미노산인 리신 ("K")은 아르기닌 ("R")으로 치환된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 J-세그먼트에 대한 상응하는 인간 배선 서열은 JH4이다. 일부 실시양태에서, 중쇄 J-세그먼트는 인간 배선 JH4 부분 서열 WGQGTILVTSS (서열식별번호: 90)를 포함한다. 인간 배선 JH4로부터의 전장 J-세그먼트는 YFDYWGGTILVTSS (서열식별번호: 91)이다. 가변 영역 유전자는 번역글로불린 가변 영역 유전자에 대한 표준 명명법에 따라 지칭된다. 현행 번역글로불린 유전자 정보는 월드와이드 웹을 통해서, 예를 들어, 이뮤노제네틱스 (IMGT), V-베이스 및 PubMed 데이터베이스 상에서 이용가능하다. 또한, 문헌 [Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16]; [Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(3):161-74]; [Exp Clin Immunogenet. 2001;18(4):242-54]; 및 [Giudicelli, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D256-61]도 참조할 수 있다.

[0116] 일부 실시양태에서, 경쇄 V-세그먼트에 대한 상응하는 인간 배선 서열은 VKIII L16/A27:

[0117] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP (서열식별번호: 92)이다. 일부 실시양태에서, 상응하는 경쇄 J-세그먼트에 대한 인간 배선 서열은 JK2이다. 일부 실시양태에서, 경쇄 J-세그먼트는 인간 배선 Jk2 부분 서열 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 93)을 포함한다. 인간 배선 Jk2로부터의 전장 J 세그먼트는 YTFGQGTKLEIK (서열식별번호: 94)이다.

[0118] 일부 실시양태에서, 중쇄 V-세그먼트는 아미노산 서열 (E/Q)VQLVESGGGLVQ(P/S)GSLRLSCAASGFTFSYGVWVRQAPGKLEW(L/V)GIWGGGGTY(A/T)(A/S)S(L/V)M(A/G)RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA(K/R)(H/N)AYGHDGGFAMDYWGQGTILVTSS (서열식별번호: 16)와 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다.

[0119] 일부 실시양태에서, 경쇄 V-세그먼트는 아미노산 서열 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS(E/Q)SVSSN(L/V)AWYQQ(K/R)PGQAPRLLIYGASNRATGIP(D/A)RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YCQSYSPFTFGQGTKLEIK (서열식별번호: 17)와 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다.

[0120] 일부 실시양태에서, i) 중쇄 CDR3은 아미노산 서열 HAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 29) 또는 NAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 109)를 포함하고; ii) 경쇄 CDR3 가변 영역은 아미노산 서열GQSYSPFT (서열식별번호: 34), 또는 SYSPF (서열식별번호: 83)를 포함한다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열SYGVD (서열식별번호: 22), 또는 GFSLSY (서열식별번호: 84)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 VIWGGGGTY(A/T)(A/S)S(L/V)M(A/G) (서열식별번호: 28), 또는 WGGGG (서열식별번호: 80)를 포함하는 CDR2; 및 HAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 29) 또는 NAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 109)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 RAS(E/Q)SVSSN(L/V)A (서열식별번호: 32) 또는 S(E/Q)SVSSN (서열식별번호: 87)을 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 GASNRAT (서열식별번호: 33), 또는 GAS (서열식별번호: 82)를 포함하는 CDR2; 및 GQSYSPFT (서열식별번호: 34), 또는 SYSPF (서열식별번호: 83)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 SYGVD (서열식별번호: 22), 또는 GFSLSY

(서열식별번호: 84)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 VIWGGGGTYT(A/T)(A/S)(L/V)M(A/G) (서열식별번호: 28) 또는 WGGGG (서열식별번호: 80)를 포함하는 CDR2; 및 HAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 29) 또는 NAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 109)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 상기 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 RAS(E/Q)SVSSN(L/V)A (서열식별번호: 32), 또는 S(E/Q)SVSSN (서열식별번호: 87)을 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 GASNRAT (서열식별번호: 33), 또는 GAS (서열식별번호: 82)를 포함하는 CDR2; 및 GQSYSPFT (서열식별번호: 34), 또는 SYSPF (서열식별번호: 83)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 SYGVD (서열식별번호: 22), 또는 GFSLRSY (서열식별번호: 79)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 VIWGGGGTNYNSALMA (서열식별번호: 62), 또는 WGGGG (서열식별번호: 80)를 포함하는 CDR2; 및 HAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 29) 또는 NAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 109)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간화 항체 또는 항체 단편이다.

[0125] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 KASENVDTFVS (서열식별번호: 63), 또는 SENVDTF (서열식별번호: 81)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 GASNRYT (서열식별번호: 64), 또는 GAS (서열식별번호: 82)를 포함하는 CDR2; 및 GQSYSPFT (서열식별번호: 34), 또는 SYSPF (서열식별번호: 83)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간화 항체 또는 항체 단편이다.

[0126] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 SYGVD (서열식별번호: 22), 또는 GFSLRSY (서열식별번호: 79)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 VIWGGGGTNYNSALMA (서열식별번호: 62), 또는 WGGGG (서열식별번호: 80)를 포함하는 CDR2; 및 HAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 29) 또는 NAYGHDGGFAMDY (서열식별번호: 109)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 상기 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 KASENVDTFVS (서열식별번호: 63), 또는 SENVDTF (서열식별번호: 81)를 포함하는 CDR1; 아미노산 서열 GASNRYT (서열식별번호: 64), 또는 GAS (서열식별번호: 82)를 포함하는 CDR2; 및 GQSYSPFT (서열식별번호: 34), 또는 SYSPF (서열식별번호: 83)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간화 항체 또는 항체 단편이다.

[0127] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 (E/Q)VQLVESGGGLVQ(P/S)GGSLRLSCAASGFSLS (서열식별번호: 37)의 아미노산 서열을 포함하는 FR1; WVRQAPGKGLEW(L/V)G (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하는 FR2; RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCA(K/R) (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 및 WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 QVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFSLS (서열식별번호: 35) 및 QVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFSLS (서열식별번호: 36)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; WVRQAPGKGLEWVG (서열식별번호: 38) 및 WVRQAPGKGLEWLG (서열식별번호: 39)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 및 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다. 확인된 아미노산 서열은 (예컨대, 친화도 성숙화로부터) 하나 이상의 치환된 아미노산 또는 1 또는 2개의 보존적으로 치환된 아미노산을 가질 수 있다.

[0128] 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (서열식별번호: 43)의 아미노산 서열을 포함하는 FR1; WYQQ(K/R)PGQAPRLLIY (서열식별번호: 46)의 아미노산 서열을 포함하는 FR2; GIP(A/D)RFGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 49)의 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 및 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 FR1; WYQRPQAPRLLIY (서열식별번호: 44) 및 WYQKPGQAPRLLIY (서열식별번호: 45)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; GIPARFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 47) 및 GIPDRFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 48)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 및 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 50)의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다. 확인된 아미노산 서열은 (예컨대, 친화도 성숙화로부터) 하나 이상의 치환된 아미노산 또는 1 또는 2개의 보존적으로 치환된 아미노산을 가질 수 있다.

[0129] 그의 전장에 걸쳐, 본 발명의 항-GITR 항체의 가변 영역은 일반적으로 상응하는 인간 배선 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 예를 들어, 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 전체 가변 영역 (예컨대, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다.

예를 들어, 항-GITR 항체의 중쇄는 인간 배선 가변 영역 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK - YFDYWQGTLVTVSS (서열식별번호: 89 및 91)(VH3 3-13/30+CDR3+JH4, 하이픈 표시는 CDR3을 나타내고, 이는 그 길이는 가변적일 수 있다)과 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 89에서 마지막 아미노산인 리신 (K)은 아르기닌 (R)으로 치환된다. 항-GITR 항체의 경쇄는 인간 배선 가변 영역 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC-YTFGQGTKLEIK (서열식별번호: 98 및 94) (VKIII L16/A27+CDR3+JK2; 하이픈 표시는 CDR3을 나타내고, 이는 그 길이는 가변적일 수 있다)와 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 오직 프레임워크 영역 내의 아미노산만이 부가, 결실, 또는 치환된다. 일부 실시양태에서, 서열 동일성 비교는 CDR3을 배제시킨다.

[0130]

<표 1> 본 발명의 항-GITR 효능제 항체의 예

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
61: VH, MAB1	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLRSYGVDWVRQPPGKGLEWLGVIW GGGGTNYNSALMAKLSISKDKSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGSVTVSS
59: VL, MAB1	NIVMTQSPKSMMSVGERVTL SCKASENVDTFVSWYQQKPDHSPKLLIYGA SNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQSYSPFTFGSGTKL EIK
60: SEQ ID NO: 61 (VH)을 코딩하는 VH, MAB1의 PN	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGA GCCTGTCCATCACTTGCACTCTCTCTGGGTTTTTCATTAAGGAGCTATGGTG TAGACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGT TATATGGGGTGGTGGAGGCACAAATTATAATTACAGCTCTCATGGCCAAAC TGAGTATCAGCAAAGACAAGTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAA CAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAACATGCCT ATGGTCACGACGCGCGGTTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCA GTCACCGTCTCCTCA
58: SEQ ID NO: 59 (VL)를 코딩하는 VL, MAB1의 PN	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGT CAGTAGGAGA GAGGGTCACCTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTTTGTAT CCTGGTATCAACAGAAACCAGACCACTCTCTAAACTACTGATATACGGG GCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC TGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTG CAGATTATCACTGTGGACAGAGTTACAGCTATCCATTCACGTTCCGGCTCG GGGACAAAAGTTGGAAATAAAA
6: VH, MAB2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGV DWVRQAPGKGLEWVGVI WGGGGTY YASSVMARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGT LVTVSS
7: VL, MAB2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
65: 중쇄, MAB2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGV DWVRQAPGKGLEWVGVI WGGGGTY YASSVMARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0131]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
66: 경쇄, MAB2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
51: SEQ ID NO: 6 을 코딩하는 VH, MAB2 의 PN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTCATGGCCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCA
52: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB2 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAG

[0132]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
67: SEQ ID NO: 65 를 코딩하는 HC, MAB2 의 PN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTGTCATGGCCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCAGTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGG CCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGA GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCTCCGTGTTCTCTGTTC CCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC CTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
68: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB2 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
8: VH, MAB3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWLGVI WGGGGTYTASLMGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0133]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
9: VL, MAB3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
69: 중쇄, MAB3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWLVGI WGGGGTYYTASLMGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
70: 경쇄, MAB3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS NRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
53: SEQ ID NO: 8 을 코딩하는 VH, MAB3 의 PN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCA
54: SEQ ID NO: 9 를 코딩하는 VL, MAB3 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGG GGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGCG TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTTTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCC AGGGCACCAAGCTTGAAATTTAAA

[0134]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
71: SEQ ID NO: 69 를 코딩하는 HC, MAB3 의 PN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTGCTTCTCTCATGGGCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGG CCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGA GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGG ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTC CCCCCAAGCCCAAGGACACCCGTATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT GCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCA GGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTA CAAGACCAACCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAG CTGCAGCGTGTGACAGGCCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC CTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
72: SEQ ID NO: 70 을 코딩하는 LC, MAB3 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTACGG GGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGG TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTTTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCC AGGGCACCAAGCTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGT CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCG AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACC CACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
10: VH, MAB4	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFVVRQAPGKGLEWYGV WGGGGTYIYASSLMGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAIVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0135]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
7: VL, MAB4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
73: 중쇄, MAB4	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWVGV WGGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: 경쇄, MAB4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
55: SEQ ID NO: 10 을 코딩하는 VH, MAB4 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACTCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCA
52: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB4 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGGCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAG

[0136]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
74: SEQ ID NO: 73 을 코딩하는 HC, MAB4 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTTCAGTCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGTGTGGACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGAGTTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATGCTTCTTCTCTCATGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCTTGTGACCGTGAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGGCCAGCAGCAGCCTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCAAGCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTA CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGCAAG
68: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB4 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACGGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
12: VH, MAB5	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWLGVIWGGGGTYTSSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYGHDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0137]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
7: VL, MAB5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
75: 중쇄, MAB5	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKGLEWLGVI WGGGGTYITSSLMGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: 경쇄, MAB5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
56: SEQ ID NO: 12 를 코딩하는 VH, MAB5 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCA
52: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB5 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAG

[0138]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
76: SEQ ID NO: 75 를 코딩하는 HC, MAB5 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTTCAGTCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGGCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGG CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGA GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCAAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTC CCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCA GTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC CTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
68: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB5 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTACTACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
14: VH, MAB6	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWLGVI WGGGGTYTSSLMARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0139]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
7: VL, MAB6	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
77: 중쇄, MAB6	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWLGVI WGGGGTTYTSSLMARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHAYG HDGGFAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: 경쇄, MAB6	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
57: SEQ ID NO: 14 를 코딩하는 VH, MAB6 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCA
52: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB6 의 PN	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTAATACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAG

[0140]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
78: SEQ ID NO: 77 을 코딩하는 HC, MAB6 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGTCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTATGGT GTGGACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TTATATGGGGTGGTGGAGGCACATATTATACTTCTTCTCTCATGGCCAGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCCAAACATGCC TATGGCCATGATGGCGGCTTTGCTATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCCT TGTGACCGTGAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGG CCCCAGCAGCAAGAGCACCGAGCGGGCCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGA GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTC CCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAC CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC CTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
68: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB6 의 PN	GAAATAGTGATGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTTTCTCCAGGAGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTTAGCAGTAATGTA GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCACCCAGGCTCCTCATCTACG GGGCATCCAACCGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTAATACTGCGGCCAGAGCTATAGCTATCCATTTACCTTTGGC CAGGGCACCAAGCTTGAAATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
99: VH, MAB7	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKLEWVGVI WGGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0141]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
7: VL, MAB7	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
100: 중쇄, MAB7	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFWVRQAPGKGLEWVGV WGGGGTTYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHAYG HDGGFAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: 경쇄, MAB7	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
101: SEQ ID NO: 99 를 코딩하는 VH, MAB7 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCT CTCTGAGACTGTCTTGCGCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCCTCTTACGGCG TGGACTGGGTGCACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGT GATCTGGGGCGGAGGCGGCACCTACTACGCCTCTTCCCTGATGGGCGGCT TCACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAAC TCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCT ACGGCCACGACGGCGGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTCTCC
102: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB7 의 PN	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGA GAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCCTCCAACGTG GCCTGGTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGG CGCTCTAACCAGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTC GCCGTGTACTACTGCGGCCAGTCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0142]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
103: SEQ ID NO: 100 을 코딩하는 HC, MAB7 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGTCCGGCGGCT CTCTGAGACTGTCTTGCGCTGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTCTTACGGCG TGGACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGT GATCTGGGGCGGAGGCGGCACCTACTACGCCTCTTCCCTGATGGGCGGCT TCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAAC TCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGCCT ACGGCCACGACGGCGGCTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCTTG CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACCTGCTGCCCTGGGTTGCCGT GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACCTTGGGGC TCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGAACC CAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCC CTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCTT CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGAGCGGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAG GAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAA GGCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACA AGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGCT GCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GAGCCTGAGCCCCGGCAAAG
104: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB7 의 PN	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGA GAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCCAACGTG GCCTGGTATCAGCAGAGACCTGGTCAAGGCCCTCGGCTGTCTACGG CGCTCTAACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCCGCTGGAACCCGAGGACTTC GCCGTGTACTACTGCGGCCAGTCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTT ATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAACGA GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
105: VH, MAB8	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVDFVVRQAPGKGLEWVGV WGGGGTYTYASSLMGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSS

[0143]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오 티드 (PN) 설명	서열
7: VL, MAB8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI K
106: 중쇄, MAB8	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLSYGVVDWVRQAPGKGLEWVGVI WGGGGTYIYASSLMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNAYG HDGGFAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66: 경쇄, MAB8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSSNVAWYQQRPGQAPRLLIYGAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCGQSYSPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
107: SEQ ID NO: 105 를 코딩하는 VH, MAB8 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTA GCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGC GTGGACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCCGAG TGATCTGGGGCGGAGGCGGAACCTACTACGCCTCTAGCCTGATGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACAACCTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGA ACTCACTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGC CTACGGTCACGACGGCGGCTTCGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGAGTTCA
102: SEQ ID NO: 7 을 코딩하는 VL, MAB8 의 PN	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGA GAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCCAACGTG GCCTGGTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGG CGCCTCTAACCAGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTC GCCGTGTACTACTGCGGCCAGTCCTACTCATACCCCTTCACCTTCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0144]

SEQ ID NO: 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 (PN) 설명	서열
108: SEQ ID NO: 106 을 코딩하는 HC, MAB8 의 PN	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGTCAGGCGGTA GCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGGCTTTAGCCTGTCTAGCTACGGC GTGGACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTTCGGAG TGATCTGGGGCGGAGGCGGAACCTACTACGCCTCTAGCCTGATGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACAACCTCTAAGAACACCCGTGTACCTGCAGATGA ACTACTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAAACGC CTACGGTCACGACGCGCGCTTCGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGAGTTCAGCTAGCACTAAGGGCCCCAAGTGTGTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCC TGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAA CCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCC CCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCTG CCCCAAGCCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACT GGTACGTGGACGCGCTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTA CAAGACCAACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
104: SEQ ID NO: 66 을 코딩하는 LC, MAB8 의 PN	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGA GAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGTCTCCAACGTG GCCTGGTATCAGCAGAGACCTGGTCAGGCCCTCCGGCTGCTGATCTACGG CGCCTCTAACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCA GCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCCCGGTGGAACCCGAGGACTTC GCCGTGTACTACTGCGGCCAGTCCCTACTCATACCCCTTCACTTCCGGCCA GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTT ATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAACGA GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C

[0145]

[0146]

표 1에 열거된 항체의 CDR은 본원에 기술된 것을 비롯한, 관련 기술분야에 알려져 있는, 널리 공지된 넘버링 체계에 의해 결정될 수 있다. 하기 표 2에는 (1) 문헌 [Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), NIH publication No. 91-3242]에 기술된 넘버링 체계를 사용하여; 및 (2) 코티아 (문헌 [Al-Lazikani et al., (1997) "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins," J.Mol.Biol. 273:927-948] 참조)에 의해 정의된 CDR이 열거되어 있다.

[0147]

<표 2> 카바트 및 코티아 CDR 비교

CDR	SEQ ID NO: 카바트 CDR (Kabat et al., 1991)	SEQ ID NO: 코티아 CDR (Al-Laikani et al., 1997)
MAB1 CDRH1	22: SYGVD	79: GFSLRSY
MAB1 CDRH2	62: VIWGGGGTNYNSALMA	80: WGGGG
MAB1 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB1 CDRL1	63: KASENVDTFVS	81: SENVDTF
MAB1 CDRL2	64: GASNRYT	82: GAS
MAB1 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB2 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB2 CDRH2	23: VIWGGGGTTYASSVMA	80: WGGGG
MAB2 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB2 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB2 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB2 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB3 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB3 CDRH2	24: VIWGGGGTTYTASLMG	80: WGGGG
MAB3 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB3 CDRL1	31: RASQSVSSNLA	86: SQSVSSN
MAB3 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB3 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB4 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB4 CDRH2	25: VIWGGGGTTYASSLMG	80: WGGGG
MAB4 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB4 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB4 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB4 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB5 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB5 CDRH2	26: VIWGGGGTTYTSSLMG	80: WGGGG
MAB5 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB5 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB5 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB5 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB6 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB6 CDRH2	27: VIWGGGGTTYTSSLMA	80: WGGGG
MAB6 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB6 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB6 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB6 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF
MAB7 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB7 CDRH2	25: VIWGGGGTTYASSLMG	80: WGGGG
MAB7 CDRH3	29: HAYGHDGGFAMDY	29: HAYGHDGGFAMDY
MAB7 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB7 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB7 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF

CDR	SEQ ID NO: 카바트 CDR (Kabat et al., 1991)	SEQ ID NO: 코티아 CDR (Al-Laikani et al., 1997)
MAB8 CDRH1	22: SYGVD	84: GFSLSSY
MAB8 CDRH2	25: VIWGGGGTTYASSLMG	80: WGGGG
MAB8 CDRH3	109: NAYGHDGGFAMDY	109: NAYGHDGGFAMDY
MAB8 CDRL1	30: RASESVSSNVA	85: SESVSSN
MAB8 CDRL2	33: GASNRAT	82: GAS
MAB8 CDRL3	34: GQSYSPFT	83: SYSYPF

일부 실시양태에서, G1TR (예컨대, 서열식별번호: 1, 세포 프로세싱된 서열식별번호: 1)에 결합하는 본 발명의 항-G1TR 항체 또는 항체 단편은 i) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 23을 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; ii) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 24를 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 31을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을

포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; iii) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 25를 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; iv) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 26을 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; v) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 27을 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 29를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자; 및 vi) 중쇄 CDR1은 서열식별번호: 22를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열식별번호: 25를 포함하고, 중쇄 CDR3은 서열식별번호: 109를 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열식별번호: 30을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열식별번호: 33을 포함하고, 경쇄 CDR3은 서열식별번호: 34를 포함하는 것인, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간화 항체 또는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 IgG Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 글리코실화된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 변형된 세포에서 변형되거나, 발현되고, 여기서, 이러한 변형 결과로 항체 또는 항체 단편의 FcR 이펙터 기능은 증가된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 단편은 생체내 Teff:Treg 비의 상승을 유도한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 생체내 강화된 면역 반응을 유도한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편이 제2 항체 또는 항체 단편에 가교 결합되었을 때, 이는 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 3의 효능제이다.

- [0151] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 16의 중쇄 가변 영역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 17의 경쇄 가변 영역과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0152] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 6의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0153] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 8의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 9의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0154] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 10의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0155] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 12의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0156] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 14의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 폴리펩티드를 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 폴리펩티드를 포함한다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 99의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0158] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 105의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열식별번호: 7의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 61의 중쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 폴리펩티드를 포함하고, 서열식별번호: 59의 경쇄 가변 영역과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 폴리펩티드를 포함한다.
- [0160] 그의 전장에 걸쳐, 본 발명의 항-GITR 항체는 일반적으로 인간 IgG1/카파 불변 영역 아미노산 서열과 적어도 약 85%, 예를 들어, 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 전체 불변 영역 (예컨대, IgG1) 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 예를 들어, 항-GITR 항체의 중쇄는 인간 IgG1 불변 영역
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHQKSLSPGK (서열식별번호: 20)와 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 굵은체로 표시된 류신/류신 잔기는 알라닌/알라닌으로 치환된다. 한 실시양태에서, 마지막 아미노산인 리신 (K)은 아르기닌 (R)으로 치환된다. 항-GITR 항체의 경쇄는 인간 카파 경쇄 불변 영역
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열식별번호: 21)와 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 내의 아미노산은 부가, 결실 또는 치환된다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체이다. VH, VL, 전장 경쇄, 및 전장 중쇄 서열 (아미노산 서열, 및 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열)은 "혼합 및 매칭되어" 본 발명의 다른 GITR 결합 항체를 생성할 수 있다. 상기 "혼합 및 매칭된" GITR 결합 항체는 활성을 확인하기 위해 관련 기술분야에 공지된 결합 검정 (예컨대, ELISA), 및 실시예 섹션에 기술되어 있는 다른 검정을 사용하여 시험될 수 있다. 쇄가 혼합 및 매칭되는 경우, 특정 VH/VL 쌍 형성으로부터의 VH 서열은 구조상 유사한 VH 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 전장 중쇄/전장 경쇄 쌍 형성으로부터의 전장 중쇄 서열은 구조상 유사한 전장 중쇄 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 VH/VL 쌍 형성으로부터의 VL 서열은 구조상 유사한 VL 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 전장 중쇄/전장 경쇄 쌍 형성으로부터의 전장 경쇄 서열은 구조상 유사한 전장 경쇄 서열로 대체되어야 한다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 서열식별번호: 6, 8, 10, 12, 14, 99 및 105로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 7 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 단리된 모노클로날 항체 또는 항체 단편으로서; 여기서, 항체는 GITR에 특이적으로 결합하는 것인, 단리된 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 제공한다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 77, 서열식별번호: 100 및 서열식별번호: 106 중 어느 것으로부터 선택되는 중쇄 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 폴리펩티드를 포함하고; 서열식별번호: 66 또는 서열식별번호: 70의 경쇄와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 77, 서열식별번호: 100 및 서열식별번호: 106 중 어느 것으로부터 선택되는 중쇄 폴리펩티드를 포함하고; 서열식별번호: 66 또는 서열식별번호: 70의 경쇄 폴리펩티드를 포함한다.
- [0163] 길이가 20개 미만의 아미노산 길이인 확인된 아미노산 서열의 경우, 원하는 특이적 결합 및/또는 효능제 활성은 여전히 유지하면서, 1 또는 2개의 보존적 아미노산 잔기 치환을 허용할 수 있다.
- [0164] 본 발명의 항-GITR 항체 및 항체 단편은 일반적으로 약 10^{-8} M 또는 10^{-9} M 미만, 예를 들어, 또는 약 10^{-10} M 또

는 10^{-11} M 미만, 및 일부 실시양태에서, 약 10^{-12} M 또는 10^{-13} M 미만인 평형 해리 상수 (K_D)로 1 (서열식별번호: 1), 이소형 2 (서열식별번호: 2) 및 이소형 3 (서열식별번호: 3)을 비롯한 GITR에 결합할 것이다.

[0165] 동일 에피토프에 결합하는 항체

[0166] 본 발명은 인간 GITR의 시스템이 풍부한 도메인 1 ("CRD1", 서열식별번호: 4: CGPGRLLLTGTDAARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDC) 및 시스템이 풍부한 도메인 2 ("CRD2", 서열식별번호: 5: MCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQKFSFGFQC)를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체 및 항체 단편으로서, 여기서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 hGITR의 효능제이고, 여기서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 임의적으로 무손상 또는 증가된 FcR 이펙터 기능을 갖는 것인 항체 및 항체 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 인간 GITR의 서열식별번호: 88을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 서열식별번호: 88 내의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 인간 GITR의 잔기 34-72 및 78 내의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서, 상기 항체 및 항체 단편은 hGITR의 효능제이다.

[0167] 본 발명은 또한 표 1에 기술된 GITR 결합 항체와 같이 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 항체 단편을 제공한다. 그러므로, 추가의 항체 및 항체 단편은 GITR 결합 검정에서 본 발명의 다른 항체와 교차 경쟁할 수 있는 (예컨대, 통계학상 유의적인 방식으로 본 발명의 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제시킬 수 있는) 그의 능력에 기초하여 확인할 수 있다. 본 발명의 항체 및 항체 단편의 GITR 단백질 (예컨대, 인간 GITR)에의 결합을 억제시킬 수 있는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 hGITR에의 결합에 대하여 상기 항체 또는 항체 단편과 경쟁할 수 있고; 비-제한적인 이론에 따라 상기 항체는 그가 경쟁하는 항체 또는 항체 단편과 동일하거나, 또는 관련이 있는 (예컨대, 구조상 유사하거나, 또는 공간상 인접해 있는), GITR 단백질 상의 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 입증한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편과 동일한, hGITR 상의 에피토프에 결합하는 항체는 인간 인간화 모노클로날 항체이다. 상기 인간 또는 인간화 모노클로날 항체는 본원에 기술된 바와 같이 제조되고, 단리될 수 있다.

[0168] 조작 및 변형된 항체

[0169] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 변형된 항체 또는 항체 단편을 조작하기 위해 출발 물질로서 본원 (예컨대, 표 1)에 제시된 CDR 및/또는 VH 및/또는 VL 서열 중 하나 이상의 것을 갖는 항체를 사용하여 추가로 제조될 수 있고, 변형된 항체는 출발 항체로부터 변경된 특성을 가질 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 둘 모두의 가변 영역 (즉, VH 및/또는 VL) 내, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 영역 내 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내의 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어, 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시키기 위해 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다.

[0170] 수행될 수 있는 가변 영역 조작의 한 유형은 CDR 그래프팅이다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 위치하는 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 개별 항체 사이에서 CDR 외부의 서열보다 더 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 갖는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 특정 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써 특정 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다 (예컨대, 문헌 [Riechmann, L. *et al.*, 1998 Nature 332:323-327]; [Jones, P. *et al.*, 1986 Nature 321:522-525]; [Queen, C. *et al.*, 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033]; 미국 특허 번호 5,225,539 (윈터(Winter)), 및 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (퀸(Queen) 등) 참조).

[0171] 따라서, 본 발명의 또 다른 실시양태는 각각 서열식별번호: 22, 79, 및 84로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR1 서열; 서열식별번호: 23, 24, 25, 26, 27, 62, 및 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR2 서열; 서열식별번호: 29, 34 및 109로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 각각 서열식별번호: 30, 31, 63, 81, 85, 및 86으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR1 서열; 서열식별번호: 33, 64, 및 82로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR2 서열; 및 서열식별번호: 34 및 83으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 그의

항원 결합 단편에 관한 것이다. 따라서, 상기 항체는 모노클로날 항체의 VH 및 VL CDR 서열을 함유하지만, 이들 항체로부터의 상이한 프레임워크 서열을 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 본 단락의 상응하는 서열과 적어도 약 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0172] 상기 프레임워크 서열은 배선 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고문헌으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 배선 DNA 서열은 "VBase" 인간 배선 서열 데이터베이스 (인터넷 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 이용가능) 뿐만 아니라 문헌 [Kabat, E. A., *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; [Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 J. mol. Biol. 227:776-798]; 및 [Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836]에서 살펴볼 수 있다.

[0173] 본 발명의 항체에 사용하기 위한 프레임워크 서열의 예는 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 프레임워크 서열, 예컨대, 본 발명의 모노클로날 항체에 의해 사용되는 컨센서스 서열 및/또는 프레임워크 서열과 구조적으로 유사한 것이다. VH CDR1, 2 및 3 서열, 및 VL CDR1, 2 및 3 서열은 프레임워크 서열의 유래 기점이 된 배선 번역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 프레임워크 영역 상에 그래프팅될 수 있거나, 또는 CDR 서열은 배선 서열과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 프레임워크 영역 상에 그래프팅될 수 있다. 예를 들어, 특정 경우에 프레임워크 영역 내의 잔기를 돌연변이화시켜 항체의 항원 결합 능력을 유지 또는 증진시키는 것이 유익한 것으로 밝혀졌다 (예컨대, 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (권 등) 참조).

[0174] 또 다른 유형의 가변 영역 변형은 VH 및/또는 VL CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이화시켜 관심 항체의 하나 이상의 결합 특성 (예컨대, 친화도)을 개선시키는 것으로, 이는 "친화도 성숙"으로 공지되어 있다. 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR 매개 돌연변이유발은 돌연변이(들)를 도입하기 위해 수행될 수 있고, 항체 결합에 대한 효과 또는 다른 관심 기능적 특성은 본원에 기술되고, 실시예에 제공되는 것과 같은 시험관내 또는 생체내 검정에서 및/또는 관련 기술분야에 공지된 대안적 또는 추가의 검정에서 평가될 수 있다. 보존적 변형이 도입될 수 있다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있다. 또한, 전형적으로, CDR 영역 내에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0175] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 예컨대, 항체의 특성을 개선시키기 위해 VH 및/또는 VL 내의 프레임워크 잔기에 대하여 변형이 이루어진 것을 포함한다. 전형적으로, 상기 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이루어진다. 예를 들어, 한가지 접근법은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 배선 서열로 "복귀돌연변이화"시키는 것이다. 더욱 구체적으로, 체세포 돌연변이가 일어난 항체는 항체의 유래 기점이 된 배선 서열과는 상이한 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 상기 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체의 유래 기점이 된 배선 서열과 비교함으로써 확인될 수 있다. 프레임워크 영역 서열을 그의 배선 배위로 되돌리기 위해, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발에 의해 체세포 돌연변이를 배선 서열로 "복귀돌연변이화"시킬 수 있다. 상기 "복귀돌연변이화된" 항체 또한 본 발명에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

[0176] 또 다른 유형의 프레임워크 변형은 T 세포 에피토프를 제거함으로써 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키기 위해 프레임워크 영역 내, 또는 심지어는 하나 이상의 CDR 영역 내의 하나 이상의 잔기를 돌연변이화시키는 것을 포함한다. 이 접근법은 또한 "탈면역화"로도 지칭되며, 미국 특허 공개 번호 20030153043 (칼(Carr) 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.

[0177] 존재하는 경우, 항-GITR 항체 또는 항체 단편의 불변 영역은, 적절하다면, 임의의 유형 또는 서브유형일 수 있고, 본 발명의 방법에 의해 치료하고자 하는 대상체 중 (예컨대, 인간, 비인간 영장류 또는 다른 포유동물, 예를 들어, 농경 포유동물 (예컨대, 말, 양, 소, 돼지, 낙타류), 반려 포유동물 (예컨대, 개, 고양이) 또는 설치류 (예컨대, 래트, 마우스, 햄스터, 토끼))으로부터의 것이 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 인간화 항체 또는 휴머니어드(Humaneered)® 항체를 생성하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 이소형은 IgG, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4이다. 특정 실시양태에서, 불변 영역 이소형은 IgG₁이다.

[0178] 프레임워크 또는 CDR 영역 내에서 이루어진 변형에 추가로 또는 대안적으로, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 전형적으로 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예컨대, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포성 세포독성을 변경시키기 위하여 Fc 영역 내에 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 항체 또는 항체 단편의 하나 이상의 기능적 특성을 다시 변경시키기 위해 화학적으로 변형될 수 있거나 (예컨대, 하나 이상의 화학적 모이어티가 항체에 부착될 수 있거나), 또는 그의 글리코실

화가 변경되도록 변형될 수 있다.

- [0179] 한 실시양태에서, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 개수가 변경되도록, 예컨대, 증가 또는 감소되도록 변형된다. 상기 접근법은 미국 특허 번호 5,677,425 (보드머(Bodmer) 등)에 추가로 기술되어 있다. CH1의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 개수는, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄의 어셈블리를 용이하게 하거나, 또는 항체 또는 항체 단편의 안정성을 증가 또는 감소시키도록 변경된다.
- [0180] 또 다른 실시양태에서, 항체의 Fc 힌지 영역은 항체의 생물학적 반감기를 감소시키기 위해 돌연변이화된다. 더욱 구체적으로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 Fc-힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 영역에 도입되어, 항체는 천연 Fc-힌지 도메인 스태필로코실 단백질 A (SpA) 결합과 비교하여 손상된 SpA 결합을 가지게 된다. 상기 접근법은 미국 특허 번호 6,165,745 (워드(Ward) 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0181] 또 다른 실시양태에서, 항체는 그의 생물학적 반감기를 증가시키도록 변형된다. 다양한 접근법이 가능하다. 예를 들어, 하기 돌연변이 중 하나 이상이 것이 도입될 수 있다: 미국 특허 번호 6,277,375 (워드)에 기술된 바와 같은 T252L, T254S, T256F. 대안적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해, 항체는 미국 특허 번호 5,869,046 및 6,121,022 (프레스타(Presta) 등)에 기술된 바와 같이, IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 두 루프로부터 취해진 샬비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 함유하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있다.
- [0182] 추가의 다른 실시양태에서, Fc 영역은 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체함으로써 변경되어 항체의 이펙터 기능을 변경한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체되어, 항체가 이펙터 리간드에 대해 변경된 친화도를 가지지만, 모체 항체의 항원 결합 능력은 보유하도록 할 수 있다. 그에 대한 친화도가 변경된 이펙터 리간드는, 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 상기 접근법은 미국 특허 번호 5,624,821 및 5,648,260 (둘 모두 윈터 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0183] 또 다른 실시양태에서, 아미노산 잔기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산은, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소 또는 폐지된 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 가지도록 다양한 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 상기 접근법은 미국 특허 번호 6,194,551 (아이두소기에(Idusogie) 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0184] 상기 돌연변이를 함유하는 항체는 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)이 감소되거나 없도록 매개한다. 일부 실시양태에서, IgG1 불변 영역의 아미노산 잔기 L234 및 L235는 Ala234 및 Ala235로 치환된다. 일부 실시양태에서, IgG1 불변 영역의 아미노산 잔기 N267은 Ala267로 치환된다.
- [0185] 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 변경되어 보체를 고정할 수 있는 항체의 능력을 변경시킨다. 상기 접근법은 PCT 공개 WO 94/29351 (보드머 등)에 추가로 기술되어 있다.
- [0186] 추가의 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 매개할 수 있는 항체의 능력을 증가시키고/거나, Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키도록 변형된다. 상기 접근법은 PCT 공개 WO 00/42072 (프레스타)에 추가로 기술되어 있다. 또한, 인간 IgG1 상의 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 결합 부위가 맵핑되었고, 결합이 개선된 변이체가 기술되어 있다 (문헌 [Shields, R.L. *et al.*, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604] 참조).
- [0187] 추가의 또 다른 실시양태에서, 항체의 글리코실화는 변형된다. 예를 들어, 비글리코실화 항체가 제조될 수 있다 (즉, 항체는 글리코실화되지 않은 항체이다). 글리코실화는, 예를 들어, "항원"에 대한 항체의 친화도를 증가시키기 위해 변경될 수 있다. 상기 탄수화물 변형은, 예를 들어, 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위를 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위의 제거를 유발하는 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있고, 이로써, 그 부위에서 글리코실화가 제거될 수 있다. 상기 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 상기 접근법은 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861 (코(Co) 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0188] 추가로 또는 대안적으로, 변경된 글리코실화 유형을 갖는 항체, 예컨대, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화된 항체 또는 증가된 이분성 GlcNAc 구조를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 상기 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 상기 탄수화물 변형은, 예를 들어, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포 내에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 관련 기술분야에 기술되어 있고, 본 발명의 제조항체를 발현시켜 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, EP 1,176,195 (행(Hang) 등)에는 푸코실 트랜스퍼라제를 코딩하는, 기능적으로 파괴된 FUT8 유전자를 갖는 세포주가 기재되어 있으며, 상기 세포주에서 발현된 항체는 저푸코실화

를 나타낸다. PCT 공개 WO 03/035835 (프레스타)에는 Asn(297)-연결된 탄수화물에 푸코스를 부착시킬 수 있는 능력이 감소되어 있고, 그 결과로서 또한 해당 숙주 세포에서 발현되는 항체가 저푸코실화되는 것인 변이체 CHO 세포주, Lec13 세포가 기술되어 있다 (문헌 [Shields, R.L. *et al.*, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740] 또한 참조). PCT 공개 WO 99/54342 (유마나(Umana) 등)에는 조작된 세포주에서 발현된 항체가 증가된 이분성 GlcNAc 구조를 나타내고, 이로써, 항체의 ADCC 활성을 증가시킬 수 있게 당단백질 변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예컨대, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주가 기술되어 있다 (문헌 [Umana *et al.*, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180] 또한 참조).

[0189] 대안적 프레임워크 또는 스캐폴드 내로의 항원 결합 도메인 그래프팅

[0190] 생성되는 폴리펩티드가 G1TR에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 결합 영역을 포함하는 한, 매우 다양한 항체/면역글로불린 프레임워크 또는 스캐폴드가 사용될 수 있다. 상기 프레임워크 또는 스캐폴드는 인간 면역글로불린의 5가지 주요 이디오타입 또는 그의 단편을 포함하고, 바람직하게는 인간화 측면을 갖는 다른 동물 종의 면역글로불린을 포함한다. 이와 관련하여, 낙타류에서 확인된 것과 같은 단일 중쇄 항체가 특히 관심 대상이다. 신규 프레임워크, 스캐폴드 및 단편이 통상의 기술자에 의해 계속해서 발견되고 개발되고 있다.

[0191] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 CDR이 그래프팅될 수 있는 비-면역글로불린 스캐폴드를 사용하여 비-면역글로불린 기반 항체를 생성하는 것에 관한 것이다. 공지된 또는 향후 비-면역글로불린 프레임워크 및 스캐폴드는 그들이 표적 G1TR 단백질 (예컨대, 인간 및/또는 시노몰구스 G1TR)에 특이적인 결합 영역을 포함하는 한은 사용될 수 있다. 공지된 비-면역글로불린 프레임워크 또는 스캐폴드는 피브로넥틴 (컴파운드 테라퓨틱스, 인크.(Compound Therapeutics, Inc.: 미국 매사추세츠주 윌섬)), 안키린 (몰레큘라 파트너스 아게(Molecular Partners AG: 스위스 취리히)), 도메인 항체 (도만티스, 리미티드(Domantis, Ltd.: 미국 매사추세츠주 캠브리지) 및 아블링스 엔브이(Ablynx nv: 벨기에 츠뷔나아르트)), 리포칼린 (피에리스 프로테오랩 아게(Pieris Proteolab AG: 독일 프라이징)), 소형 모듈 면역약제 (트루비온 파마슈티칼스 인크.(Trubion Pharmaceuticals Inc.: 미국 워싱턴주 시애틀)), 맥시바디 (아비디아, 인크.(Avidia, Inc.: 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)), 단백질 A (아피바디 아게(Affibody AG: 스웨덴) 및 아필린 (감마-크리스탈린 또는 유비퀴틴) (실 프로테인스 게엠베하(Scil Proteins GmbH: 독일 할레))를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0192] 피브로넥틴 스캐폴드는 피브로넥틴 유형 III 도메인 (예컨대, 피브로넥틴 유형 III의 10번째 모듈 (10 Fn3 도메인))을 기반으로 한다. 피브로넥틴 유형 III 도메인은 그 자체가 단백질의 코어를 형성하도록 서로에 대해 패키징된 두 베타 시트 사이에 분포된 7개 또는 8개의 베타 가닥을 가지며, 베타 가닥들을 서로 연결하고, 용매 노출된 루프 (CDR과 유사)를 추가로 함유한다. 베타 시트 샌드위치의 각 가장자리에는 상기와 같은 루프가 적어도 3개 존재하고, 여기서, 상기 가장자리는 베타 가닥의 방향에 수직인 단백질의 경계이다 (US 6,818,418 참조). 이들 피브로넥틴 기반 스캐폴드는 면역글로불린이 아니지만, 전반적인 폴드는 낙타 및 라마 IgG 내의 전체 항원 인식 단위를 포함하는 중쇄의 가변 영역인 최소의 기능적 항체 단편의 그것과 밀접한 관련이 있다. 이러한 구조로 인해, 비-면역글로불린 항체는 숙성 및 친화도가 항체의 것과 유사한 항원 결합 특성을 모방한다. 이들 스캐폴드는 생체내 항체의 친화도 성숙 과정과 유사한 시험관내 루프 무작위화 및 서플링 전략에 사용될 수 있다. 이러한 피브로넥틴 기반 분자는 표준 클로닝 기술을 이용하여 분자의 루프 영역이 본 발명의 CDR로 대체될 수 있는 스캐폴드로 사용될 수 있다.

[0193] 안키린 기술은 상이한 표적에 대한 결합에 사용될 수 있는 가변 영역을 보유하도록 안키린 유래의 반복 모듈을 가진 단백질을 스캐폴드로서 사용하는 것에 기초한다. 안키린 반복 모듈은 2개의 역평행 α -헬릭스 및 β -턴으로 이루어진 33 개의 아미노산으로 구성된 폴리펩티드이다. 가변 영역의 결합은 리보솜 디스플레이를 사용함으로써 대부분 최적화된다.

[0194] 아비머는 천연 A-도메인 함유 단백질, 예컨대, LRP-1로부터 유래된 것이다. 이들 도메인은 원래 단백질-단백질 상호 작용을 위해 사용되고, 인간에서는 250종 초과 단백질이 구조적으로 A-도메인을 기반으로 한다. 아비머는 아미노산 링커를 통해 연결된 다수의 상이한 "A-도메인" 단량체 (2-10개)로 이루어진다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20040175756; 20050053973; 20050048512; 및 20060008844에 기술된 방법론을 사용하여 표적 항원에 결합할 수 있는 아비머를 생성할 수 있다.

[0195] 아피바디 친화성 리간드는 단백질 A의 IgG 결합 도메인 중 하나의 스캐폴드를 기준으로 하는 3개의 헬릭스 다발로 구성된 소형의 단순 단백질이다. 단백질 A는 박테리아 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 표면 단백질이다. 이 스캐폴드 도메인은 58개의 아미노산으로 이루어지며, 이 중 13개는 무작위화되어 다수의 리간드 변이체를 가진 아피바디 라이브러리를 생성한다 (예컨대, US 5,831,012 참조). 아피바디 분

자는 항체를 모방하고, 분자량이 150 kDa인 항체와 비교하였을 때, 그의 분자량은 6 kDa이다. 아피바디 분자는 작은 크기에도 불구하고, 그의 결합 부위가 항체의 결합 부위와 유사하다.

[0196] 안티칼린은 피에리스 프로테오랩 아게라는 회사에 의해 개발된 제품이다. 이는 화학적으로 감수성이거나, 또는 불용성인 화합물의 생리학적 수송 또는 보관에 통상 관여하는 소형의 강건한 단백질의 광범위한 집단인 리포칼린으로부터 유래된 것이다. 수개의 천연 리포칼린이 인간 조직 또는 체액 중에 존재한다. 단백질 구조는 초가변 루프가 경질 프레임워크의 상부에 존재하는 면역글로불린을 연상시킨다. 그러나, 항체 또는 그의 재조합 단편과 대조적으로, 리포칼린은 160 내지 180개의 아미노산 잔기를 가진 단일 폴리펩티드 쇄로 구성되어, 단일 면역글로불린 도메인보다 단지 약간 더 크다. 결합 포켓을 구성하는 4개의 루프 세트는 현저한 구조적 가소성을 나타내고, 다양한 측쇄를 허용한다. 따라서, 상이한 형상의 규정된 표적 분자를 높은 친화도 및 특이성으로 인식하도록 하기 위해 결합 부위를 독점적 방법으로 재구성시킬 수 있다. 리포칼린 패밀리의 한 단백질인, 피에리스 브라시카에(*Pieris Brassicae*)의 빌린 결합 단백질(BBP)은 4개 루프 세트를 돌연변이화함으로써 안티칼린을 개발하는 데 사용되어 왔다. 안티칼린을 기술하는 특허 출원의 한 예로는 PCT 공개 번호 WO 199916873이 있다.

[0197] 아필린 분자는 단백질 및 소분자에 대한 특이적 친화도를 위해 디자인된 소형의 비-면역글로불린 단백질이다. 신규 아필린 분자는, 각각의 것이 상이한 인간 유래의 스캐폴드 단백질에 기초한 것인 2개의 라이브러리로부터 매우 빠르게 선택될 수 있다. 아필린 분자는 면역글로불린 단백질과 어떠한 구조적 상동성도 나타내지 않는다. 현재, 2종의 아필린 스캐폴드가 사용되는데, 그 중 하나는 감마 결정질의 인간 구조적 눈 수정체 단백질이고, 나머지 다른 하나는 "유비퀴틴" 슈퍼패밀리 단백질이다. 두 인간 스캐폴드 모두 매우 작고, 고온 안정성을 나타내고, pH 변화 및 변성제에 대해 거의 내성을 띤다. 이러한 높은 안정성은 주로 단백질의 확장된 베타 시트 구조에 기인하는 것이다. 감마 결정질 유래의 단백질의 예는 W0200104144에 기술되어 있고, "유비퀴틴-유사" 단백질의 예는 W02004106368에 기술되어 있다.

[0198] 단백질 에피토프 모방체 (PEM)는 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 주요 2 차 구조인 단백질의 베타-헤어핀 2 차 구조를 모방하는, 중간 크기의 시클릭 펩티드-유사 분자 (MW 1-2kDa)이다.

[0199] 인간 항체 또는 인간화 항체

[0200] 본 발명은 G1TR 단백질 (예컨대, 인간 G1TR)에 특이적으로 결합하는 조작된 인간 항체를 제공한다. 키메라 항체, 영장류화 항체 또는 인간화 항체와 비교하여, 본 발명의 인간 G1TR-결합 항체는 인간 대상체에 투여되었을 때, 추가로 감소된 항원성을 갖는다.

[0201] 인간 G1TR 결합 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 휴머니어드[®] 기술 플랫폼 (칼로바이오스(KaloBios: 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코))을 사용하여 비인간 항체를 조작된 인간 항체로 전환시켰다. 미국 특허 공개 번호 20050008625에는, 비인간 항체의 것과 동일한 결합 특징을 유지시키거나, 또는 그와 비교하였을 때, 더욱 우수한 결합 특징을 제공하면서, 항체에서 비인간 항체 가변 영역을 인간 가변 영역을 대체하는 생체내 방법이 기술되어 있다. 상기 방법은 비인간 참조 항체의 가변 영역을 에피토프 가이드 방식으로 완전 인간 항체로 대체하는 것에 의존한다. 생성된 인간 항체는 일반적으로 참조 비인간 항체와 구조상 관련이 없지만, 참조 항체와 동일한 항원 상의 동일한 에피토프에 결합한다.

[0202] 본 발명의 항-G1TR 항체는 참조 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서, 인간 배선 V 영역과 실질적인 아미노산 서열 동일성을 갖는 V 영역을 포함하는 조작된 인간 항체에 기초한 것이다. 미국 특허 공개 2005/0255552 및 미국 특허 공개 2006/0134098을 참조할 수 있고, 상기 두 특허는 모두 본원에서 참조로 포함된다. 개선 방법은, 참조 항체의 가변 영역으로부터 항원 결합 특이성을 결정하는 데 필요한 최소 서열 정보를 확인하고, 상기 정보를 인간 부분 V 영역 유전자 서열의 라이브러리에 전달하여 인간 항체 V 영역의 에피토프 집중 라이브러리를 생성한다. 미생물 기반 분비 시스템을 이용하여 항체 Fab 단편으로서 라이브러리의 구성원을 발현시킬 수 있고, 라이브러리를 예를 들어, 콜로니 리프트 결합 검정을 이용하여 항원 결합 Fab에 대해 스크리닝한다. 예컨대, 미국 특허 공개 2007/0020685를 참조할 수 있다. 친화도가 가장 높은 클론을 확인하기 위해 양성 클론을 추가로 특징화될 수 있다. 생성된 조작된 인간 Fab는 모체 항체, 즉, 참조 항-G1TR 항체의 결합 특이성을 유지하고, 전형적으로, 모체 항체와 비교하여 항원에 대해 등가의 또는 더 높은 친화도를 가지며, 인간 배선 항체 V 영역과 비교하여 고도의 서열 동일성을 가진 V 영역을 포함한다.

[0203] 에피토프 집중 라이브러리를 생성하는 데 필요한 최소 결합 특이성 결정기 (BSD)는 전형적으로 중쇄 CDR3 ("CDRH3") 내의 서열 및 경쇄 CDR3 ("CDRL3") 내의 서열에 의해 제시된다. BSD는 CDR3의 일부 또는 전장을 포

합할 수 있다. BSD는 연속적인 또는 비-연속적인 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다. 일부 경우에서, 에피토프 집중 라이브러리는 BSD를 함유하는 참조 항체로부터의 고유의 CDR3-FR4 영역에 연결된 인간 V-세그먼트 서열 및 인간 배선 J 세그먼트 서열로부터 구축된다 (미국 특허 공개 2005/0255552 참조). 대안적으로, 인간 V 세그먼트 라이브러리는 참조 항체 V 세그먼트의 일부만이 처음에 인간 서열의 라이브러리로 대체되는 순차적인 카세트 대체에 의해 생성될 수 있다. 이어서, 나머지 참조 항체 아미노산 서열과 관련하여 결합을 지지하는 확인된 인간 "카세트"를 제2 라이브러리 스크린에서 재조합하여 완전한 인간 V 세그먼트를 생성한다 (미국 특허 공개 2006/0134098 참조).

[0204] 각 경우에, 라이브러리로부터 얻은 항원 결합체가 참조 항체의 에피토프 특이성을 유지하도록 결합 특이성을 한정하는 데 참조 항체로부터의 특이성 결정기를 함유하는, 쌍형성 한 중쇄 및 경쇄 CDR3 세그먼트, CDR3-FR4 세그먼트, 또는 J 세그먼트가 사용된다. 최적의 결합 동역학적 성질을 갖는 항체 확인을 위해 라이브러리 구축 동안 각 쇄의 CDR3 영역 내에 추가의 성숙 변이를 도입할 수 있다. 생성된 조작된 인간 항체는 인간 배선 라이브러리로부터 유래된 V-세그먼트 서열을 가지며, CDR3 영역 내부로부터의 짧은 BSD 서열을 유지하고, 인간 배선 프레임워크 4 (FR4) 영역을 갖는다.

[0205] 낙타류 항체

[0206] 뉴 월드 구성원, 예컨대, 라마 종 (예컨대, 라마 파코스(*Lama paccos*), 라마 글라마(*Lama glama*) 및 라마 비쿠그나(*Lama vicugna*))를 비롯한, 낙타 및 단봉낙타 (카멜루스 박트리아누스(*Camelus bactrianus*) 및 카멜루스 드로메다리우스(*Camelus dromedarius*)) 과의 구성원으로부터 수득된 항체 단백질은 인간 대상체를 위해 크기, 구조적 복잡성 및 항원성에 관하여 특징화되었다. 자연에서 발견되는 바와 같이 상기 포유동물 과로부터의 특정 IgG 항체에는 경쇄가 결핍되어 있으며, 따라서, 다른 동물로부터의 항체에 대해 전형적인 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 갖는 4개의 쇄로 이루어진 4차 구조와는 구조상 상이하다. PCT/EP93/02214 (1994년 3월 3일 공개된 WO 94/04678)를 참조할 수 있다.

[0207] VHH로 확인된 소형 단일 가변 도메인인 낙타류 항체 영역은 "낙타류 나노바디"로 공지된 저분자량 항체-유래 단백질을 생성하는, 표적에 대해 높은 친화도를 갖는 소형 단백질을 생성하기 위한 유전자 조작에 의해 수득될 수 있다. 1998년 6월 2일에 등록된 미국 특허 번호 5,759,808을 참조할 수 있고; 문헌 [Stijlemans, B. *et al.*, 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261]; [Dumoulin, M. *et al.*, 2003 Nature 424: 783-788]; [Pleschberger, M. *et al.* 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448]; [Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Cancer 89: 456-62]; 및 [Lauwereys, M. *et al.* 1998 EMBO J 17: 3512-3520] 또한 참조할 수 있다. 낙타류 항체 및 항체 단편의 조작된 라이브러리는, 예를 들어, 아블링스 (벨기에 젠트)로부터 상업적으로 이용가능하다. 비인간 기원의 다른 항체와 같이, 낙타류 항체의 아미노산 서열은 인간 서열에 더욱더 가까운 유사한 서열을 수득하기 위해 재조합적으로 변경될 수 있으며, 즉, 나노바디는 "인간화"될 수 있다. 따라서, 인간에 대한 낙타류 항체의 자연적으로 낮은 항원성을 추가로 감소시킬 수 있다.

[0208] 낙타류 나노바디의 분자량은 인간 IgG 분자 분자량의 대략 1/10이고, 상기 단백질의 물리적 직경은 단지 수 나노미터이다. 작은 크기에 기인하여 발생할 수 있는 하나의 결과는 더욱 큰 항체 단백질에서는 기능상 볼 수 없는 항원 부위에 결합할 수 있는 낙타류 나노바디의 능력이며, 즉, 낙타류 나노바디는 고전적인 면역학적 기술을 사용하여 달리 알 수 없는 항원을 검출하는 시약으로서 및 가능한 치료제로서 유용하다. 따라서, 작은 크기에 기인하여 발생할 수 있는 추가의 또 다른 결과는 낙타류 나노바디는 표적 단백질의 홈 또는 좁은 틈새 내의 특이적 부위와의 결합의 결과로서 억제할 수 있기 때문에, 고전적인 항체의 기능보다 고전적인 저분자량 약물의 기능에 더욱 가깝게 유사한 능력을 제공할 수 있다는 것이다.

[0209] 저분자량 및 조밀한 크기는 추가로, 낙타류 나노바디가 극도로 열안정성이고, 극한 pH 및 단백질분해적 소화에 대해 안정적이고, 낮은 항원성을 가지도록 한다. 또 다른 결과는 낙타류 나노바디는 순환계로부터 조직 내로 용이하게 이동하고, 심지어는 혈액 뇌 장벽을 횡단하며, 신경 조직에 영향을 미치는 장애를 치료할 수 있다는 것이다. 나노바디는 추가로 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 약물 수송을 촉진시킬 수 있다. 2004년 8월 19일 공개된 미국 특허 출원 20040161738을 참조할 수 있다. 인간에 대한 낮은 항원성과 조합된 이들 특징은 높은 치료학적 잠재능을 나타낸다. 추가로, 이들 분자는 원핵 세포, 예컨대, E. 콜라이(*E. coli*)에서 발현될 수 있고, 박테리오파지와와의 융합 단백질로서 발현되며, 기능적이다.

[0210] 따라서, 본 발명의 특징은 GITR에 대해 고친화도를 갖는 낙타류 항체 또는 나노바디이다. 본원의 특정 실시양태에서, 낙타류 항체 또는 나노바디는 낙타류 동물에서 자연적으로 생산되며, 즉, 다른 항체에 대해 본원에 기재된 기술을 사용하여 GITR 또는 그의 펩티드 단편으로 면역화시킨 후, 낙타류에 의해 생산된다. 대안적으로,

GITR 결합 낙타류 나노바디는 조작되며, 즉, 예를 들어, 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 표적으로서 GITR을 사용하는 패닝 방법을 사용하여 적절하게 돌연변이화된 낙타류 나노바디 단백질을 디스플레이하는 파지의 라이브리로부터의 선택에 의해 생산된다. 조작된 나노바디는 수용 대상체 내에서의 반감기가 45분 내지 2주가 되도록 하는 유전자 조작에 의하여 추가로 맞춤화될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 낙타류 항체 또는 나노바디는 예를 들어, PCT/EP93/02214에 기술된 바와 같이, 본 발명의 인간 항체의 중쇄 또는 경쇄의 CDR 서열을 나노바디 또는 단일 도메인 항체 프레임워크 서열로 그래프팅함으로써 수득된다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 기술되는 방법에 따라 다가 낙타류 항체 또는 나노바디를 제공한다.

[0211] 다가 항체

[0212] 또 다른 측면에서, 본 발명의 GITR 결합 항체 또는 그의 단편을 포함하는 다가 분자 (단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적)를 제공한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 영역은 유도체화되거나, 또는 또 다른 기능적 분자, 예컨대, 또 다른 펩티드 또는 단백질 (예컨대, 또 다른 항체 또는 수용체에 대한 리간드)에 연결되어 적어도 2개의 상이한 결합 부위 (이는 동일하거나, 상이한 표적 부위 또는 분자일 수 있다)에 결합하는 다가 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 유도체화되거나, 또는 1개 초과와 다른 기능적 분자에 (예컨대, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 회합에 의해 또는 다른 방식으로) 기능적으로 연결되어 동일 표적 분자 상의 동일하거나, 상이한 결합 부위인 2개 이상의 상이한 결합 부위에 결합하는 다가 분자를 생성한다. 특정 실시양태에서, 다가 결합 부위는 동일한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 유도체화되거나, 또는 1개 초과와 다른 기능적 분자에 연결되어 적어도 2개의 표적 분자 상의 2개 이상의 상이한 결합 부위에 결합하는 다중-특이적 분자를 생성하고; 상기 다중-특이적 분자는 또한 본원에서 사용되는 "이중특이적 분자" 또는 "다중특이적"이라는 용어에 포괄되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이적 분자를 생성하기 위해, 본 발명의 항체를 하나 이상의 다른 결합 분자, 예컨대, 또 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 (예컨대, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 회합에 의해 또는 다른 방식으로) 기능적으로 연결하여 다가 분자를 생성한다. 본 발명은 GITR에 대한 적어도 하나의 제1 결합 특이성 및 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 예를 들어, 제2 표적 에피토프는 제1 표적 에피토프와 상이한 GITR의 또 다른 에피토프이다. 추가로, 분자가 다중-특이적 분자인 본 발명의 경우에, 일부 실시양태에서, 분자는 제1 및 제2 표적 에피토프 이외에, 제3 결합 특이성을 추가로 포함한다.

[0213] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 분자는 결합 특이체로서 적어도 하나의 항체, 또는 예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 또는 단일 쇠 Fv를 비롯한, 그의 항체 단편을 포함한다. 항체는 또한 미국 특허 번호 4,946,778 (라드너(Ladner) 등)에 기술된 바와 같은 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 그의 임의의 최소 단편, 예컨대, Fv 또는 단일 쇠 구축물일 수 있다.

[0214] 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇠 상에서 발현되고, 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커로 연결된 2가, 이중특이적 분자이다. VH 및 VL 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍형성함으로써 2개의 항원 결합 부위를 생성한다 (예컨대, 문헌 [Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]; [Poljak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123] 참조). 디아바디는 동일한 세포 내에 구조 VHA-VLB 및 VHB-VLA (VH-VL 구성), 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA (VL-VH 구성)를 갖는 2개의 폴리펩티드 쇠를 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 그들 대부분은 박테리아에서 가용성 형태로 발현될 수 있다. 단일 쇠 디아바디 (scDb)는 대략 15개의 아미노산 잔기로 이루어진 링커로 2개의 디아바디-형성 폴리펩티드 쇠를 연결함으로써 제조된다 (문헌 [Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30]; [Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36] 참조). scDb는 박테리아에서 가용성인 활성 단량체 형태로 발현될 수 있다 (문헌 [Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34)]; [128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36]; [Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2):83-105]; [Ridgway *et al.*, 1996 Protein Eng., 9(7):617-21] 참조). 디아바디는 Fc와 융합되어 "디-디아바디"를 생성할 수 있다 (문헌 [Lu *et al.*, 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65] 참조).

[0215] 본 발명의 이중특이적 분자에 사용될 수 있는 다른 항체는 뮤린, 키메라 및 인간화 모노클로날 항체이다.

[0216] 본 발명의 이중특이적 및/또는 다가 분자는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 구성성분 결합 특이체를 접합시켜 제조할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 및/또는 다가 분자의 각 결합 특이체는 개별적으로 생성할 수 있고, 이어서, 서로 접합시킬 수 있다. 결합 특이체가 단백질 또는 펩티드인 경우, 공유 접합을 위해 다양한 커플링제 또는 가교제가 사용될 수 있다. 가교제의 예는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌디말레이미드 (oPDM), N-숙신이미

딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트 (술포-SMCC)를 포함한다 (예컨대, 문헌 [Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686]; [Liu, MA *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648] 참조). 다른 방법은 문헌 [Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132]; [Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83], 및 [Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375]에 기술된 것을 포함한다. 접합체는 SATA 및 술포-SMCC이며, 이 둘 모두 피어스 케미칼 컴퍼니 (Pierce Chemical Co.: 미국 일리노이주 록퍼드)로부터 이용가능하다.

[0217] 결합 특이체가 항체인 경우, 이는 두 중쇄의 불변 도메인 힌지 영역의 술포히드릴 결합에 의해 접합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 힌지 영역은 접합 이전에 홀수 개, 예를 들어, 1개의 술포히드릴 잔기를 함유하도록 변형된다.

[0218] 대안적으로, 결합 특이체는 동일한 벡터에서 코딩되고, 동일한 숙주 세포에서 발현 및 어셈블리될 수 있다. 상기 방법은 이중특이적 및/또는 다가 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이적 및/또는 다가 분자는 하나의 단일쇄 항체 및 결합 결정기를 포함하는 단일쇄 분자, 또는 2개의 결합 결정기를 포함하는 단일쇄 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 분자는 적어도 2개의 단일쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 분자를 제조하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,260,203; 미국 특허 번호 5,455,030; 미국 특허 번호 4,881,175; 미국 특허 번호 5,132,405; 미국 특허 번호 5,091,513; 미국 특허 번호 5,476,786; 미국 특허 번호 5,013,653; 미국 특허 번호 5,258,498; 및 미국 특허 번호 5,482,858에 기술되어 있다.

[0219] 이중특이적 및/또는 다가 분자의 그의 특이적 표적에의 결합은 예를 들어, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성면역검정 (REA), FACS 분석법, 생물검정 (예컨대, 성장 억제) 또는 웨스턴 블롯 검정에 의해 확인할 수 있다. 각각의 이들 검정은 일반적으로 관심 복합체에 특이적인 표지된 시약 (예컨대, 항체)을 사용하여 특정 관심의 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다.

[0220] 반감기가 연장된 항체

[0221] 본 발명은 생체내 반감기가 연장된, G1TR 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 항체 단편을 제공한다.

[0222] 많은 인자가 단백질의 생체내 반감기에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 신장 여과, 간에서의 대사, 단백질분해 효소 (프로테아제)에 의한 분해 및 면역원성 반응 (예컨대, 항체에 의한 단백질 중화 및 대식세포 및 수지상 세포에 의한 흡수). 다양한 전략법이 본 발명의 항체의 반감기를 연장시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), reCODE PEG, 항체 스캐폴드, 폴리시알산 (PSA), 히드록시에틸 전분 (HES), 알부민 결합 리간드 및 탄수화물 쉘드에의 화학적 연결에 의해; 혈청 단백질, 예컨대, 알부민, IgG, FcRn 및 트랜스페린에 결합하는 단백질에 대한 유전적 융합에 의해; 혈청 단백질, 예컨대, 나노바디, Fab, DARPin, 아비머, 아피바디 및 안티칼린에 결합하는 다른 결합 모이어티에의 (유전학적 또는 화학적) 커플링에 의해; rPEG, 알부민, 알부민의 도메인, 알부민 결합 단백질 및 Fc에 대한 유전적 융합 의해; 또는 나노캐리어, 저속 방출 제제 또는 의료 장치 내로의 혼입에 의해 이루어질 수 있다.

[0223] 항체의 생체내 혈청 순환을 연장시키기 위해, 불활성 중합체 분자, 예컨대, 고분자량 PEG는 다기능성 링커를 사용하거나, 사용하지 않고, 항체의 N- 또는 C-말단에의 PEG의 부위 특이적인 접합을 통하여, 또는 리신 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통해 항체 또는 그의 단편에 부착될 수 있다. 항체를 PEG화하기 위해, 항체, 또는 그의 단편을 전형적으로는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건하에서 PEG, 예컨대, PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킨다. PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응에 의해 수행될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "폴리에틸렌 글리콜"이라는 용어는 다른 단백질을 유도체화하기 위해 사용되는 임의의 형태의 PEG, 예컨대, 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포괄하는 것으로 의도된다. 특정 실시양태에서, PEG화되는 항체는 비글리코실화된 항체이다. 생물학적 활성을 최소로 손실시키는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 사용될 것이다. PEG 분자가 항체에 적절히 접합될 수 있도록 확실하게 보장하기 위해 접합 정도를 SDS-PAGE 및 질량 분석법에 의해 면밀히 모니터링할 수 있다. 비반응 PEG는 크기 배제 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리시킬 수 있다. PEG-유도체화된 항체는 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어, 본원에 기술된 면역검정에 의해 결합 활성에 대해서 뿐만 아니라, 생체내 효능에 대해서 시험될 수 있다. 단백질을 PEG화하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, EP 0 154 316 (니시무라(Nishimura) 등) 및 EP 0 401 384 (이시카와(Ishikawa) 등)를 참조할 수 있다.

- [0224] 다른 변형된 PEG화 기술로는 tRNA 신테타제 및 tRNA 를 포함하는 재구성된 시스템을 통해 화학적으로 특정된 측쇄를 생합성 단백질에 혼입하는, 화학적으로 직교 지시된 조작 기술의 재구성 (ReCODE PEG)을 포함한다. 상기 기술은 E. 콜라이, 효모 및 포유동물 세포에서 30개 초과와 새로운 아미노산을 생합성 단백질에 혼입할 수 있게 한다. tRNA는 앰버 코돈이 위치하는 임의의 부위에 비천연 아미노산을 혼입시켜, 정지 코돈으로부터의 앰버가 화학적으로 특정된 아미노산의 혼입을 신호전달하는 것으로 전환되게 한다.
- [0225] 재조합 PEG화 기술 (rPEG)은 또한 혈청 반감기 연장을 위해 이용될 수도 있다. 이 기술은 300-600개의 아미노산으로 된 비구조화 단백질 테일을 기존의 제약 단백질에 유전적으로 융합시키는 것을 포함한다. 상기 비구조화 단백질 쇄의 길보기 분자량은 그의 실제 분자량보다 약 15배 더 높기 때문에, 상기 단백질의 혈청 반감기는 크게 증가된다. 화학적 접합 및 재정제를 필요로 하는 통상적인 PEG화와는 달리, 제조 방법이 크게 간소화되고, 생성물은 균질하다.
- [0226] 폴리시알화는 활성 수명을 연장시키고, 치료학적 펩티드 및 단백질의 안정성을 개선시키기 위해 천연 중합체 폴리시알산 (PSA)을 사용하는 또 다른 기술이다. PSA는 시알산의 중합체 (당)이다. 단백질 및 치료학적 펩티드 약물 전달을 위해 사용되는 경우, 폴리시알산은 접합시 보호 미세환경을 제공한다. 이는 순환계 내 치료학적 단백질의 활성 수명을 증가시키고, 그가 면역계에 의해 인식되지 않도록 막는다. PSA 중합체는 인체에서 자연적으로 발견된다. 특정 박테리아는 그를 채택하여 수백만년에 걸쳐서 자신의 벽을 그로 코팅하도록 진화하였다. 이어서, 상기의 자연적으로 폴리시알화된 박테리아는 분자 모방에 의해 신체의 방어 시스템을 이겨낼 수 있었다. 자연계의 궁극적인 은폐 기술인 PSA는 이러한 박테리아로부터 대량으로 미리 결정된 물리적 특징을 갖는 것으로서 용이하게 생산될 수 있다. 박테리아 PSA는 인체 내의 PSA와 화학적으로 동일하기 때문에 단백질에 커플링될 때조차도 완전하게 비-면역원성이다.
- [0227] 또 다른 기술은 항체에 연결된 히드록시에틸 전분 ("HES") 유도체의 사용을 포함한다. HES는 찰옥수수 전분에서 유래된 변형된 천연 중합체이며, 신체의 효소에 의해 대사될 수 있다. HES 용액은 일반적으로 부족한 혈액량을 채우고, 혈액의 레올로지 특성을 개선시키기 위해 투여된다. 항체의 HES화는 상기 분자의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라, 신장 제거율을 감소시켜 순환 반감기의 연장을 가능하게 하여 생물학적 활성을 증가시킨다. 다양한 파라미터, 예컨대, HES의 분자량을 변경시킴으로써, 광범위한 범위의 HES 항체 접합체가 맞춤 제조될 수 있다.
- [0228] 생체내 반감기가 증가된 항체는 또한 하나 이상의 아미노산 변형 (즉, 치환, 삽입 또는 결실)을 IgG 불변 도메인, 또는 그의 FcRn 결합 단편 (바람직하게, Fc 또는 힌지 Fc 도메인 단편)에 도입하여 생성될 수 있다. 예컨대, 국제 공개 번호 WO 98/23289; 국제 공개 번호 WO 97/34631; 및 미국 특허 번호 6,277,375를 참조할 수 있다.
- [0229] 추가로, 항체는 항체 또는 항체 단편을 생체내에서 더욱 안정적이게 하고, 더욱 장기화된 생체내 반감기를 가지도록 하기 위해 알부민에 접합시킬 수 있다. 이 기술은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예컨대, 국제 공개 번호 WO 93/15199, WO 93/15200, 및 WO 01/77137; 및 유럽 특허 번호 EP 413,622를 참조할 수 있다.
- [0230] 반감기를 증가시키는 전략법은 나노바디, 피브로넥틴-기반 결합제, 및 생체내 반감기 증가가 바람직한 다른 항체 또는 단백질에 특히 유용하다.
- [0231] 항체 접합체
- [0232] 본 발명은 이중 단백질 또는 폴리펩티드 (또는 그의 단편, 바람직하게는 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개 또는 적어도 100개의 아미노산의 폴리펩티드)에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합된 (공유 및 비-공유 접합 둘 모두 포함) GPCR 단백질에 특이적으로 결합하여 융합 단백질을 생성하는 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 특히, 본 발명은 본원에 기술된 항체의 항원 결합 단편 (예컨대, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, F(ab)2 단편, VH 도메인, VH CDR, VL 도메인, 또는 VL CDR) 및 이중 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 항체 또는 항체 단편에 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 융합 또는 접합시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, 및 5,112,946; 유럽 특허 번호 EP 307,434 및 EP 367,166; 국제 공개 번호 WO 96/04388 및 WO 91/06570; [Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539]; [Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600]; 및 [Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341]을 참조할 수 있다.
- [0233] 추가의 융합 단백질은 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링 및/또는 코돈-서플링 ("DNA 서플링"으로 총

칭됨)의 기술을 통해 생성될 수 있다. DNA 서플링은 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 활성을 변경시키기 위해 사용될 수 있다 (예컨대, 친화도가 더 높고, 해리율이 더 낮은 항체 또는 그의 단편). 일반적으로, 미국 특허 번호 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, 및 5,837,458; [Patten *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33]; [Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82]; [Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76]; 및 [Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313] (상기 특허 및 공개 문헌은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다. 항체 또는 그의 단편, 또는 코딩된 항체 또는 그의 단편은 재조합 이전에 오류-유발 PCR, 무작위 뉴클레오타이드 삽입 또는 다른 방법에 의한 무작위 돌연 변이유발에 의해 변경될 수 있다. GTR 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 이중 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 절편, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.

[0234] 또한, 항체 또는 그의 단편은 마커 서열, 예컨대, 정제를 용이하게 하는 펩티드에 융합될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 마커 아미노산 서열은 특히 헥사-히스티딘 (HHHHHH 서열식별번호: 11) 펩티드, 예컨대, pQE 벡터 (퀴아젠, 인크.(QIAGEN, Inc.: 미국 91311 캘리포니아주 채츠워스 에톤 애비뉴 9259))에서 제공되는 태그이고, 이들 다수는 상업적으로 이용가능하다. 문헌 [Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824]에 기술되어 있는 바와 같이, 예를 들어, 헥사-히스티딘 (서열식별번호: 11)은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그로는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 헤마글루티닌 ("HA") 태그 (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767) 및 "flag" 태그를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0235] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 진단제 또는 검출가능한 작용제에 접합된다. 상기 항체는 특정한 요법의 효능을 측정하는 것과 같은 임상 시험 절차의 일부로서 질환 또는 장애의 발병, 발생, 진행 및/또는 중증도를 모니터링하거나, 또는 예측하는 데 유용할 수 있다. 상기 진단 및 검출은 항체를 검출가능한 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 다양한 효소, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제; 보결분자단, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴; 형광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 피코에리트린; 발광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 루미놀; 생물발광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 루시페라제, 루시페린 및 에퀴린; 방사성 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 아이오딘 (131I, 125I, 123I 및 121I), 탄소 (14C), 황 (35S), 삼중수소 (3H), 인듐 (115In, 113In, 112In 및 111In), 테크네튬 (99Tc), 탈륨 (201Tl), 갈륨 (68Ga, 67Ga), 팔라듐 (103Pd), 몰리브데넘 (99Mo), 크세논 (133Xe), 플루오린 (18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, 113Sn, 및 117Tm; 및 다양한 양전자 방출 단층촬영을 사용하는 양전자 방출 금속, 및 비-방사성 상자성 금속 이온에 커플링시킴으로써 달성될 수 있다.

[0236] 본 발명은 주어진 생물학적 효과 또는 반응을 변형시키는 치료 모이어티 또는 약물 모이어티에 접합된 항체 또는 그의 단편, 및 치료 모이어티에 접합된 항체 또는 그의 단편의 용도를 포함한다. 치료 모이어티 또는 약물 모이어티는 고전적인 화학적 치료제로 제한되는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 단백질은, 예를 들어, 독소, 예컨대, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예컨대, 종양 괴사 인자, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 아포토시스제, 항혈관신생제; 또는 생물학적 반응 조절제, 예컨대, 예를 들어, 림포카인을 포함할 수 있다. 항체 또는 그의 단편은 치료 모이어티, 예컨대, 세포독소, 예컨대, 세포증식억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예컨대, 알파-방출체에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 해로운 임의의 작용제를 포함한다.

[0237] 예를 들어, 항체는 치료 모이어티, 예컨대, 방사성 금속 이온, 예컨대, 알파-방출체, 예컨대, 213Bi, 또는 131In, 131Lu, 131Y, 131Ho, 131Sm을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 방사성금속 이온을 폴리펩티드에 접합시키는 데 유용한 마크로시클릭 킬레이트화제에 접합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 마크로시클릭 킬레이트화제는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA)이다. 상기 링커 분자로는 예를 들어, 글리신 링커, 예컨대, GGGGS (서열식별번호: 15) (이는 예컨대, GGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 18)와 같이, 임의적으로 반복될 수 있다)를 포함하고, 다른 링커는 관련 기술

분야에 통상적으로 공지되어 있고, 문헌 [Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90]; [Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7]; 및 [Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50] (각 문헌은 그 전문이 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0238] 항체에 치료 모이어티를 접합시키는 기술은 널리 공지되어 있으며, 예컨대, 문헌 [Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)], 및 [Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58]을 참조할 수 있다.

[0239] 항체는 또한 면역결정 또는 표적 항원의 정제에 특히 유용한 고체 지지체에 부착될 수 있다. 상기 고체 지지체로는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0240] **효능제 항-GITR 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드**

[0241] 전장 모노클로날 항체는 예컨대, 하이브리도마 또는 재조합 생산에 의해 획득될 수 있는 반면에, 항-GITR 항체, 항원 결합 분자, 및 그의 단편은 재조합 발현, 화학적 합성, 및 항체 사량체의 효소적 소화를 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 제조될 수 있다. 재조합 발현은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물 숙주 세포, 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포 등으로부터 이루어질 수 있다.

[0242] 본 발명은 본원에 기술된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은, 상보성 결정 영역을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 세그먼트를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 51, 서열식별번호: 53, 서열식별번호: 55, 서열식별번호: 56, 서열식별번호: 57, 서열식별번호: 101, 및 서열식별번호: 107로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 52, 서열식별번호: 54, 및 서열식별번호: 102로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 67의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 68의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0244] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 72의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 73의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0245] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 74의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 68의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0246] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 76의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 68의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0247] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 78의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 68의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0248] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 103으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 104의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0249] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 108의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 104의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0250] 일부 실시양태에서, 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 60의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 58의 폴리뉴클레오티드와 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0251] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 오직 항-GITR 항체의 가변 영역 서열만을 코딩할 수 있다. 이는 또한 항체의 가변 영역 및 불변 영역, 둘 모두를 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열 중 일부는 예시된 마우스 항-GITR 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄, 둘 모두의 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 다른 폴리뉴클레오티드는 각각 마우스 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역과 실질적으로 동일한 두 폴리펩티드 세그먼트를 코딩한다.

[0252] 폴리뉴클레오티드 서열은 신생 고체상 DNA 합성 또는 항-GITR 항체 또는 그의 결합 단편을 코딩하는 기존의 서열 (예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 서열)의 PCR 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 핵산의 직접적인 화학적 합성은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대, 문헌 [Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979]의 포스포트리에스테르 방법; 문헌 [Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979]의 포스포디에스테르 방법; 문헌 [Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981]의 디에틸포스포르아미다이트 방법; 및 미국 특허 번호 4,458,066의 고체 지지체 방법에 의해 달성될 수 있다. PCR에 의해 폴리뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 도입하는 것은, 예컨대, 문헌 [PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992]; [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990]; [Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991]; 및 [Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991]에 기술되어 있는 바와 같이 수행될 수 있다.

[0253] 또한, 본 발명에서는 상기 기술된 항-GITR 항체를 생산하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 항-GITR 항체쇄, 단편, 또는 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위해 다양한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 항체를 생산하기 위해 바이러스-기반 및 비바이러스 발현 벡터 둘 모두가 사용될 수 있다. 비바이러스 벡터 및 시스템으로는 플라스미드, 에피솜 벡터 (전형적으로, 단백질 또는 RNA 발현을 위한 발현 카세트를 가짐), 및 인간 인공 염색체 (예컨대, 문헌 [Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997] 참조)를 포함한다. 예를 들어, 포유동물 (예컨대, 인간) 세포에서 항-GITR 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 발현시키는 데 유용한 비바이러스 벡터로는 pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C (인비트로젠(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 샌디에고)), MPSV 벡터, 및 다른 단백질 발현과 관련하여 관련 기술분야에 공지된 다수의 다른 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 기반의 벡터, SV40, 유두종 바이러스, HBP 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 기반의 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 및 쉴리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus: SFV)를 포함한다. 문헌 [Brent et al., 상기 문헌 동일]; [Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995]; 및 [Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992]를 참조할 수 있다.

[0254] 발현 벡터의 선택은 벡터 발현이 의도되는 숙주 세포에 좌우된다. 전형적으로, 발현 벡터는 항-GITR 항체쇄 또는 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 프로모터 및 다른 조절 서열 (예컨대, 인핸서)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터는 유도 조건하인 경우를 제외한, 삽입된 서열의 발현을 막는 데 사용된다. 유도성 프로모터로는 예컨대, 아라비노스, lacZ, 메탈로티오네인 프로모터 또는 열 쇼크 프로

모터를 포함한다. 형질전환된 유기체의 배양물은 발현 생성물이 숙주 세포에 의해 더욱 우수하게 허용되는 서열을 코딩하는 집단으로 편향되지 않으면서 비유도 조건하에서 확장될 수 있다. 프로모터 이외에도, 항-GITR 항체쇄 또는 단편의 효율적인 발현을 위해 다른 조절 요소 또한 요구되거나 바람직할 수 있다. 이들 요소는 전형적으로 ATG 개시 코돈 및 인접한 리보솜 결합 부위 또는 다른 서열을 포함한다. 추가로, 발현 효율은 사용하는 세포 시스템에 적절한 인헨서를 포함시키는 것에 의해 증진될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994]; 및 [Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987] 참조). 예를 들어, SV40 인헨서 또는 CMV 인헨서가 포유동물 숙주 세포에서의 발현을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0255] 발현 벡터는 또한 삽입된 항-GITR 항체 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 융합 단백질을 형성하는 분비 신호 서열 위치를 제공할 수 있다. 보다 흔히, 항-GITR 항체 서열은 신호 서열에 연결된 후 벡터에 포함된다. 항-GITR 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 코딩하는 서열을 수용하는 데 사용되는 벡터는 때때로 또한 불변 영역 또는 그의 일부를 코딩한다. 상기 벡터는 불변 영역과의 융합 단백질로서 가변 영역의 발현을 허용함으로써 무손상 항체 또는 그의 단편이 생산되게 한다. 전형적으로, 상기 불변 영역은 인간의 것이다.

[0256] 항-GITR 항체쇄를 보유하고 발현하는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. E. 콜라이는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 클로닝하고, 발현시키는 데 유용한 하나의 원핵 숙주이다. 사용하기에 적합한 다른 미생물 숙주로는 바실러스, 예컨대 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 다른 엔테로박테리아세아에, 예컨대, 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*) 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함한다. 이들 원핵 숙주에서, 전형적으로 숙주 세포와 상용성인 발현 제어 서열 (예컨대, 복제 기점)을 함유하는 발현 벡터 또한 제조할 수 있다. 추가로, 임의 개수의 다양한 널리 공지된 프로모터, 예컨대, 락토스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템, 또는 과거 람다로부터의 프로모터 시스템이 존재할 것이다. 프로모터는 임의적으로 오퍼레이터 서열과 함께 전형적으로 발현을 제어하고, 전사 및 번역을 개시 및 완료하기 위한 리보솜 결합 부위 서열 등을 갖는다. 본 발명의 항-GITR 폴리펩티드를 발현시키는 데 다른 미생물, 예컨대, 효모 또한 사용될 수 있다. 바콜로바이러스 벡터와 조합되어 곤충 세포가 또한 사용될 수 있다.

[0257] 일부 바람직한 실시양태에서, 포유동물 숙주 세포는 본 발명의 항-GITR 폴리펩티드를 발현시키고, 제조하는 데 사용된다. 예를 들어, 이는 내인성 면역글로불린 유전자를 발현하는 하이브리도마 세포주 (예컨대, 실시예에 기술된 바와 같은 골수종 하이브리도마 클론) 또는 외인성 발현 벡터를 보유하는 포유동물 세포주 (예컨대, 하기 예시된 SP2/0 골수종 세포)일 수 있다. 이들은 임의의 정상적인 사멸, 또는 정상적이거나 비정상적인 불멸 동물 또는 인간 세포를 포함한다. 예를 들어, CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 골수종 세포주, 형질전환된 B-세포 및 하이브리도마를 비롯한, 무손상 면역글로불린을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 개발되었다. 폴리펩티드를 발현시키기 위한 포유동물 조직 세포 배양의 사용은 예컨대, 문헌 [Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987]에서 일반적으로 논의된다. 포유동물 숙주 세포를 위한 발현 벡터로는 발현 제어 서열, 예컨대, 복제 기점, 프로모터 및 인헨서 (예컨대, 문헌 [Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986] 참조), 및 필요한 프로세싱 정보 부위, 예컨대, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결인자 서열을 포함할 수 있다. 이들 발현 벡터는 통상적으로 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터를 함유한다. 적합한 프로모터는 구성적, 세포 유형-특이적, 단계-특이적 및/또는 조정가능하거나 조절가능한 것일 수 있다. 유용한 프로모터로는 메탈로티오네인 프로모터, 구성적 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 텍사메타손-유도성 MMTV 프로모터, SV40 프로모터, MRP polIII 프로모터, 구성적 MPSV 프로모터, 테트라시클린-유도성 CMV 프로모터 (예컨대, 인간 극초기 CMV 프로모터), 구성적 CMV 프로모터, 및 관련 기술분야에 공지된 프로모터-인헨서 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0258] 관심 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터를 도입하는 방법은 세포 숙주의 유형에 따라 달라진다. 예를 들어, 염화칼슘 형질감염은 원핵 세포에 통상적으로 이용되는 반면에, 인산칼슘 처리 또는 전기천공은 다른 세포 숙주에 사용될 수 있다 (일반적으로 문헌 [Sambrook, et al. 상기 문헌 동일] 참조). 다른 방법으로는 예컨대, 전기 천공, 인산칼슘 처리, 리포솜 매개 형질전환, 주사 및 미세주사, 탄도적 방법, 비로솜, 면역리포솜, 다가양이온:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 헤르페스 바이러스 구조 단백질 VP22에 대한 융합 (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), DNA의 작용제-증진 흡수 및 생체의 형질도입을 포함한다. 재조합 단백질의 장기, 고수를 생산을 위해, 안정한 발현이 종종 요구될 것이다. 예를 들어, 항-GITR 항체쇄 또는 결합 단편을 안정하게 발현하는 세포주는 바이러스 복제 기점 또는 내인성 발현 요소 및 선별가능한 마커 유전자를 함유하는 본 발명의 발현 벡터를 사용하여 제조될 수 있다. 벡터 도입 후, 세포를 선별 배지로 교체시키기 이전에 강화 배지 중에서 1-2일 동안 성장시킬 수 있다. 선별가능한 마커의 목적은 선별에 대한 내성을 부여하

는 것이고, 그의 존재는 선별 배지에서 도입 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 성장을 가능하게 한다. 내성이 있는, 안정하게 형질감염된 세포는 세포 유형에 적절한 조직 배양 기술을 사용하여 증식될 수 있다.

[0259] **효능제 항-GITR 항체를 확인하는 검정**

[0260] 효능제 항-GITR 항체를 확인하는 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기술되어 있다. 효능제 항-GITR 항체는 GITR에 결합하여, GITR을 통한 세포내 신호전달을 촉진, 유도, 자극시킨다.

[0261] 항-GITR 항체의 GITR에의 결합은 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, GITR에의 결합은, 제한 없이, ELISA, 웨스턴 블롯, 표면 플라즈몬 공명 (예컨대, BIA코어(BIAcore)), 및 유동 세포측정법을 비롯한, 공지된 기술을 사용하여 측정될 수 있다.

[0262] GITR을 통한 세포내 신호전달은 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, GITR을 통한 활성화는 NF κ B 및 MAPK 신호전달을 촉진시킨다. NF κ B 및 MAPK 활성화를 측정하는 방법은 관련 기술분야에서 표준적인 것이다 (예컨대, 리포터 유전자 검정, NF κ B 단백질의 핵 이동, MAPK 단백질의 인산화 상태 사용). GITR을 통한 활성화는 T 세포 수용체를 통한 활성화의 존재하에서 (예컨대, 1차 또는 표적 항원의 존재하에서) 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 증식을 촉진시키는 공동 자극 신호이다. 세포 증식을 측정하는 방법은 관련 기술분야에서 표준적인 것이다 (예컨대, ³H-티미딘 혼입 검정, CFSE 표지). GITR을 통한 신호전달은 또한 T 세포 수용체를 통한 활성화의 존재하에 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 공동 자극시켜 시토카인을 생산한다. GITR을 통한 신호전달은 또한 활성화된 NK 세포를 공동 자극시켜 시토카인을 생산한다. 시토카인은 Th1형 시토카인 (예컨대, 인터페론- γ , IL-2 및 TNF) 및 Th2형 시토카인 (예컨대, IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13) 중 어느 하나 또는 그 둘 모두일 수 있다. 시토카인 생산 측정 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예컨대, ELISA 검정, ELISpot 검정). GITR을 통한 활성화는 또한 아포토시스를 유도할 수 있다. 세포의 아포토시스를 측정하는 방법은 관련 기술분야에서 표준적인 것이다 (예컨대, 아넥신(Annexin) V 염색법). 시험관내 검정을 수행할 때, 효능제 항-GITR 항체와 접촉된, 시험 세포, 또는 시험 세포로부터의 배양 상청액을, 효능제 항-GITR 항체와 접촉시키지 않은, 대조군 세포, 또는 대조군 세포로부터의 배양 상청액과 비교할 수 있다.

[0263] 본 항체의 GITR 효능제 기능 또한 생체내에서 측정될 수 있다. 바람직한 효능제 항-GITR 항체는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 활성화 및 확장시킬 수 있는 능력을 갖는다. CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 생체내 활성화 및 확장은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여, 예컨대, 유동 세포측정법에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 효능제 항-GITR 항체는 종양 성장을 억제시키는 데, 또는 종양 퇴축을 촉진시키는 데 있어서 치료학상 유용할 수 있다. 종양 성장, 또는 그의 억제는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법 (예컨대, 육안 검사, 캘리퍼스, 체중, 영상화 기법 (MRI 포함))을 사용하여 측정될 수 있다. 바람직한 효능제 항-GITR 항체는 감염성 질환, 예컨대, 박테리아, 진균, 바이러스 또는 기생충 감염의 발병 인자를 예방, 감소, 억제 또는 제거하는 데 있어서 치료학상 유용할 수 있다. T 세포 반응을 증강시키는 데, 또는 질환의 중증도를 감소시키는 데 있어서 효능제 항-GITR 항체의 효능은 치료 유효량의 항체를 대상체에게 투여하고, 항체 투여 이전과 이후의 대상체를 비교함으로써 측정될 수 있다. T 세포 반응을 증강시키는 데, 또는 질환의 중증도를 감소시키는 데 있어서 효능제 항-GITR 항체의 효능은 또한 치료 유효량의 항체를 시험 대상체에게 투여하고, 시험 대상체를, 항체를 투여받지 않은 대조군 대상체와 비교함으로써 측정될 수 있다.

[0264] **효능제 항-GITR 항체를 포함하는 조성물**

[0265] 본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된 본 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 임의적으로, 제약 조성물은 주어진 장애를 치료 또는 예방하기에 적합한 하나 이상의 다른 치료제(들)를 추가로 함유한다. 제약상 허용되는 담체는 조성물을 향상시키거나 안정화시키거나, 또는 조성물의 제조를 용이하게 한다. 제약상 허용되는 담체는 생리학상 상용성인 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0266] 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라진다. 투여가 정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하이거나, 또는 표적 부위에 근접하게 투여되는 것이 바람직하다. 제약상 허용되는 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 비내, 흡입, 척수 또는 표피 투여 (예컨대, 주사 또는 주입에 의함)에 적합하여야 한다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 예컨대, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편 또는 다가 분자 (예컨대, 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적 분자)는 산

의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.

- [0267] 항체 또는 그의 단편은 단독으로 또는 다른 적합한 성분과 조합하여 에어로졸 제제 (즉, 이는 "연무화"될 수 있음)로 제조되어 흡입을 통해 투여될 수 있다. 에어로졸 제제는 허용가능한 가압 추진제, 예컨대, 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등 중에 위치할 수 있다.
- [0268] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 상태 및 유체이다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예컨대, 만니톨 또는 소르비톨, 및 염화나트륨을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직하다. 주사가 가능한 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴을 조성물 중에 포함시킴으로써 유도될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 보관을 위해 적절한 부형제 (예컨대, 수크로스)를 사용하여 동결건조된 형태로 제조될 수 있다.
- [0269] 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야에 널리 공지되고, 통상적으로 실시되는 방법에 따라 제조될 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 투여되는 특정 조성물에 의해서 뿐만 아니라, 조성물을 투여하는 데 이용되는 특정 방법에 의해서 부분적으로 결정된다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물의 매우 다양한 적합한 제제가 존재한다. 항체를 제제화하고, 적절한 투약 및 스케줄을 결정하는 데 적용가능한 방법은 예를 들어 문헌 [*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005)]; 및 [*Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press.], 및 [*Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 31st Edition., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] (상기 문헌은 각각 본원에서 참조로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다. 제약 조성물은 바람직하게는 GMP 조건하에서 제조된다. 전형적으로, 치료학상 유효 용량 또는 효과적인 용량의 항-GITR 항체가 본 발명의 제약 조성물에 사용된다. 항-GITR 항체는 통상의 기술자에게 공지된 통상의 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제제화된다. 투여 요법은 원하는 반응 (예컨대, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 치료학상 또는 예방학상 유효 용량을 결정하는 데 있어서, 저용량을 투여한 후, 이어서, 최소의 원치않는 부작용과 함께, 또는 어떤 원치않는 부작용도 없이, 원하는 반응을 달성할 때까지, 증분식으로 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수개의 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 또는 용량이 치료 상황의 긴급성에 따라 정해지는 바에 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 바, 투여량 단위 형태는 치료하고자 하는 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하고; 각 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 원하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다.
- [0270] 본 발명의 제약 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 독성이 아니면서, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 수득할 수 있도록 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 다양한 약동학적 인자, 사용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 사용된 특정 조성물과 조합되어 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료할 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 상태 및 이전의 의학적 병력 및 다른 인자에 따라 달라진다.
- [0271] 제2 작용제와의 공동 제제화
- [0272] 일부 실시양태에서, 약리학적 조성물은 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 제2 약리학적 작용제의 혼합물을 포함한다. 본 항-GITR 효능제 항체 또는 항원 결합 분자와의 혼합물에 포함되는 예시적인 제2 작용제로는 제한 없이 1차 또는 표적 항원, 종양 세포의 면역원성을 증가시키는 작용제, 공동 억제성 신호를 저해 또는 억제시키는 작용제를 포함한다.
- [0273] 본 발명의 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 1차 또는 표적 항원과 함께 공동 제제화될 수 있다 (즉, 혼합물로서 제공될 수 있거나, 또는 혼합물로 제제될 수 있다). 표적 항원, 또는 백신은 치료하고자 하는 질환 병태에 의존할 것이다. 예를 들어, 표적 항원은 종양 세포, 박테리아 세포, 진균, 바이러스 또는 기생충으로부터의 것일 수 있다. 표적 항원은 적절한 경우, 캡티드, 폴리캡티드, 세포 또는 폴리뉴클레오티드 형태일 수 있다.
- [0274] 한 실시양태에서, 표적 항원은 예컨대, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 바리셀라, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 I형 (HSV I), 단순 헤르페스 II형 (HSV II), 우역, 리노바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스,

호흡기 세포융합 바이러스, 유두종 바이러스, 파포마 바이러스, 거대세포바이러스, 에키노바이러스, 아르보바이러스, 한타바이러스, 콕삭키 바이러스, 뎀프스 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 폴리오 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 I형 (HIV I), 및 인간 면역결핍 바이러스 II형 (HIV II), 임의의 피코나비리다에, 엔테로 바이러스, 칼리시비리다에, 노워크(Norwalk) 바이러스 군 중 어느 것, 토가바이러스, 에컨대, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 광견병 바이러스, 마르부르크(Marburg) 바이러스, 에볼라 바이러스, 과라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II형, 시미안 면역결핍 바이러스, 렌티 바이러스, 폴리오마바이러스, 파르보바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 6, 세르코피테신 헤르페스 바이러스 1 (B 바이러스), 및 폭스바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스로부터의 것이다.

[0275] 한 실시양태에서, 표적 항원은 예컨대, 네이세리아 종(*Neisseria spp.*), 스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus spp.*), S. 뮈탄스(*S. mutans*), 헤모필루스 종(*Haemophilus spp.*), 모락셀라 종(*Moraxella spp.*), 보르데텔라 종(*Bordetella spp.*), 미코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*), 레지오넬라 종(*Legionella spp.*), 에스케리키아 종(*Escherichia spp.*), 비브리오 종(*Vibrio spp.*), 예르시니아 종(*Yersinia spp.*), 캄필로박터 종(*Campylobacter spp.*), 살모넬라 종(*Salmonella spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*), 스탕필로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*), 엔테로코쿠스 종(*Enterococcus spp.*), 클로스트리디움 종(*Clostridium spp.*), 바실러스 종(*Bacillus spp.*), 코리네박테리움 종(*Corynebacterium spp.*), 보렐리아 종(*Borrelia spp.*), 에를리키아 종(*Ehrlichia spp.*), 리케치아 종(*Rickettsia spp.*), 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*), 랩토스피라 종(*Leptospira spp.*), 트레포네마 종(*Treponema spp.*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아로부터의 것이다.

[0276] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 종양 연관된 항원 (TAA)과의 혼합물로 공동 제제화된다. TAA는 단리된 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있거나, 무손상 세포의 일부분일 수 있거나, 또는 종양 세포 용해물의 일부분일 수 있다. TAA는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 하나 이상의 TAA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 네이키드 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 공지된 TAA의 예로는 제한 없이, 흑색종 연관된 항원 (흑색종과 연관된 MAGE-1, MAGE-3, TRP-2, 메라노솜 막 당단백질 gp100, gp75 및 MUC-1 (뮤신-1)); 예컨대, 난소암, 흑색종 또는 결장암과 연관이 있을 수 있는, CEA (암배아 항원); 난소암에 의해 발현된 플레이트 수용체 알파; 골수종을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다수의 상이한 종양에 의해 발현되는, 유리 인간 용모성 성선자극호르몬 베타 (hCG β) 서브유니트; 유방암과 연관된 HER-2/neu; 소세포 폐암과 연관된 뇌척수염 항원 HuD; 신경모세포종과 연관된 티로신 히드록실라제; 전립선암과 연관된 전립선 특이적 항원 (PSA); 난소암과 연관된 CA125; 및 B 세포 림프종의 이디오타입 결정기 ((이디오타입 특이적 체액성 면역 반응에 기인하는) 종양 특이적 면역을 생성할 수 있다)를 포함한다. 추가로, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 1형의 항원은 바이러스 유도성 인간 성인 T 세포 백혈병 (ATL)에 대한 항종양 면역 및 특이적인 CTL 반응을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 예컨대, 문헌 [Haupt, et al., *Experimental Biology and Medicine* (2002) 227:227-237]; [Ohashi, et al., *Journal of Virology* (2000) 74(20):9610-9616]을 참조할 수 있다. 다른 TAA도 공지되어 있으며, 이는 항-GITR 항체와의 공동 제제화를 위해 사용될 수 있다.

[0277] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 환자로부터의 자가 유래 종양 세포, 또는 또 다른 환자로부터의 동일 조직 유형의 동종이계 종양 세포와 함께 공동 제제화된다. 종양 세포는 무손상 세포, 종양 세포 용해물, 아포토시스성 종양 세포 또는 전체 종양 mRNA 형태일 수 있다. 종양 세포는 환자에서 종양 세포의 면역원성을 증진 또는 증강시키는 폴리펩티드를 발현하도록 형질감염될 수 있고, 예컨대, 과립구 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)를 발현하도록 형질감염될 수 있다. 종양 세포는 제한 없이, 상피암 또는 암종 뿐만 아니라, 육종 및 림프종을 포함하는, 임의의 암성 조직으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 신장암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한 폐암, 유방암, 신경교종, 섬유육종, 혈액암, 또는 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)이다. 예컨대, 문헌 [Pardee, et al., *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 세포는 예컨대, 췌장암, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 결장직장암, 전립선암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추신경계 암, 말초신경계 암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 충수암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 및 혈액학적 조직의 암으로부터의 것이다.

[0278] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 세포독성제와 공동 제제화된다. 예를 들어, 항-GITR

항체 또는 항원 결합 분자는 CD4+ CD25+ 조절 T 세포 (Treg)에 결합하여, 그를 감소시키거나, 또는 고갈시키는 효능제 항체 또는 항원 결합 분자와 공동 제제화된다. 예시적인 Treg 세포-고갈 항체 또는 항원 결합 분자는 CD25 또는 CCR4에 결합한다. 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0279] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 공동 억제성 신호의 억제제와 공동 제제화된다. 예시적인 억제제로는 CTLA-4의 억제제 및 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1) 상호작용의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 CTLA-4에 결합하여, 그를 억제시키는 항체와 공동 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 TIM3에 결합하여, 그를 억제시키는 항체와 공동 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 LAG3에 결합하여, 그를 억제시키는 항체와 공동 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 PD-1에 결합하여, 그를 억제시키는 항체와 공동 제제화된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 B7-H1에 결합하여, 그를 억제시키는 항체와 공동 제제화된다. 예컨대, 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575]; 및 [Melero, *et al.*, *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 공동 억제성 신호의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 CTLA4의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 TIM3의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 LAG3의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 PD-1/PD-L1의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자 및 B7H1의 억제제를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다.

[0280] PD-1 억제제

[0281] 한 실시양태에서, GITR 효능제는 예컨대, WO2015/026684에 기술되어 있는 바와 같이, PD-1 억제제와 함께 조합하여 사용된다. 일부 실시양태에서, PD-1 억제제는 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab) 또는 피딜리주맵(Pidilizumab)으로부터 선택되는 항-PD-1 항체이다.

[0282] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맵이다. 니볼루맵의 대체 명칭으로는 MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, 또는 BMS-936558을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맵 (CAS 등록 번호: 946414-94-4)이다. 니볼루맵은 PD1을 특이적으로 차단하는 완전한 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맵 (클론 5C4) 및 PD1에 특이적으로 결합하는 다른 인간 모노클로날 항체는 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 개시되어 있다. 한 실시양태에서, PD-1의 억제제는 니볼루맵, 및 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는 것이다.

[0283] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 펌브롤리주맵이다. 펌브롤리주맵 (이는 또한 람브롤리주맵 (Lambrolizumab), MK-3475, MK03475, SCH-900475 또는 키트루다(KEYTRUDA)® (머크(Merck))로도 지칭된다)은 PD-1에 결합하는, 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 펌브롤리주맵 및 다른 인간화 항-PD-1 항체는 문헌 [Hamid, O. *et al.* (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44], US 8,354,509 및 WO2009/114335에 개시되어 있다.

[0284] 한 실시양태에서, PD-1의 억제제는 예컨대, US 8,354,509 및 WO 2009/114335에 개시된 펌브롤리주맵 및 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는 것이다.

[0285] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 피딜리주맵이다. 피딜리주맵 (CT-011; 큐어 테크(Cure Tech))은 PD-1에 결합하는, 인간화 IgG1k 모노클로날 항체이다. 피딜리주맵 및 다른 인간화 항-PD-1 모노클로날 항체는 WO2009/101611에 개시되어 있다. 다른 항-PD1 항체로는 특히 AMP 514 (암플리이툼(Amplimmune)), 예컨대, US 8,609,089, US 2010028330, 및/또는 US 20120114649에 개시된 항-PD1 항체를 포함한다.

[0286] 일부 실시양태에서, PD-1 억제제는 면역어드헤신 (예컨대, 불변 영역 (예컨대, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PD-L1 또는 PD-L2의 세포외 또는 PD-1 결합 부위를 포함하는 면역어드헤신))이다. 일부 실시양태에서, PD-1 억제제는 AMP-224 (B7-DCIg; 암플리이툼; 예컨대, WO2010/027827 및 WO2011/066342에 개시된 것)이고, PD-1 및 B7-H1 사이의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0287] 한 실시양태에서, 조합은 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 항-GITR 항체 분자, 및 예컨대, WO 2015/112900에

개시된 바와 같은 항-PD-1 항체, 및 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는 것을 포함한다.

[0288] *PD-L1 또는 PD-L2 억제제*

[0289] 일부 실시양태에서, PD-L1 억제제는 항체 분자이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 억제제는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, 또는 MDX-1105로부터 선택된다.

[0290] 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C이다. MSB0010718C (이는 또한 A09-246-2 (머크 세로노 (Merck Serono))로도 지칭된다)는 PD-L1에 결합하는 모노클로날 항체이다. 펩트라이두마 및 다른 인간화 항-PD-L1 항체는 WO2013/079174에 개시되어 있고, 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는다.

[0291] 한 실시양태에서, PD-L1 억제제는 YW243.55.S70이다. YW243.55.S70 항체는 WO 2010/077634에 기술된 항-PD-L1 (중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 각각 서열식별번호: 20 및 21에 제시)이고, 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는다.

[0292] 한 실시양태에서, PD-L1 억제제는 MDX-1105이다. BMS-936559로도 또한 공지되어 있는 MDX-1105는 WO2007/005874에 기술된 항-PD-L1 항체이고, 본원에 개시된 서열 (또는 명시된 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 유사한 서열, 예컨대, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 그 초과로 동일한 서열)을 갖는다.

[0293] 한 실시양태에서, PD-L1 억제제는 MDPL3280A (제넨테크(Genentech)/로슈(Roche))이다. MDPL3280A는 PD-L1에 결합하는 인간 Fc 최적화된 IgG1 모노클로날 항체이다. MDPL3280A 및 PD-L1에 대한 다른 인간 모노클로날 항체는 미국 특허 번호: 7,943,743 및 미국 공개 번호 20120039906에 개시되어 있다.

[0294] 다른 실시양태에서, PD-L2 억제제는 AMP-224이다. AMP-224는 PD1과 B7-H1 사이의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체 (B7-DCIg; 암폴리이문; 예컨대, WO2010/027827 및 WO2011/066342에 개시된 것)이다.

[0295] *LAG-3 억제제*

[0296] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 조합은 LAG-3 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조합은 암, 예컨대, 본원에 기술된 암, 예컨대, 고형 종양 또는 혈액 종양을 치료하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 BMS-986016이다. BMS-986016 (이는 또한 BMS986016 (브리스톨-마이어스 스킵(Bristol-Myers Squibb))으로도 지칭된다)은 LAG-3에 결합하는 모노클로날 항체이다. BMS-986016 및 다른 인간화 항-LAG-3 항체는 US 2011/0150892, WO2010/019570, 및 WO2014/008218에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 WO2015/138920에 개시된 인간화 항-LAG3 항체이다.

[0297] *TIM-3 억제제*

[0298] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 조합은 TIM-3 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조합은 암, 예컨대, 본원에 기술된 암, 예컨대, 고형 종양 또는 혈액 종양을 치료하는 데 사용된다. 예시적인 항-TIM-3 항체는 미국 특허 번호: 8,552,156, WO 2011/155607, EP 2581113 및 미국 공개 번호 2014/044728에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-TIM3은 WO2015/117002에 개시된 인간화 ABTIM3 mAb이다.

[0299] *CTLA-4 억제제*

[0300] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 조합은 CTLA-4 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조합은 암, 예컨대, 본원에 기술된 암, 예컨대, 고형 종양 또는 혈액 종양을 치료하는 데 사용된다.

[0301] 예시적인 항-CTLA4 항체는 트렐렐리무마(Tremelimumab) (화이자(Pfizer))로부터 이용가능한 IgG2 모노클로날 항체, 이전에 티실리무마(티실리무마) (CP-675,206); 및 이펠리리무마(이펠리리무마) (CTLA-4 항체, 이는 또한 MDX-010로도 공지, CAS No. 477202-00-9)을 포함한다. 다른 예시적인 예컨대, 항-CTLA-4 항체는 미국 특허 번호 5,811,097에 개시되어 있다.

[0302] 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 또한 하나 이상의 면역자극제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 면역자극성 시토카인, 예를 들어, IL-7, IL-12 또는 IL-15와 함께 공동 제제화된다. 대안적으로, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 제2 면역자극성 항체와 함께 공동 제제화될 수 있

다. 예를 들어, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 또한 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 또 다른 구성원의 효능제 항체 또는 항원 결합 분자와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예시적인 제2 면역자극성 표적은 제한 없이, TNFRSF4 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 4 (이는 또한 OX40로도 공지) 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9 (이는 또한 TNFRSF9, 4-1BB 또는 CD137로도 공지)를 포함한다. 예컨대, 문헌 [Expert Opin Ther Patents (2007) 17(5):567-575]; [Pardee, et al., Immunotherapy (2009) 1(2):249-264]; 및 [Melero, et al., Clin Cancer Res (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0303] 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 또한 화학요법제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 선택되는 작용제는 치료하고자 하는 병태, 예컨대, 예컨대, 암 또는 감염성 질환, 예컨대, 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염 또는 기생충 감염에 의존할 것이다. 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 치료되는 질환 병태를 치료하기 위해 통상의 기술자에게 공지된 화학요법제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 화학요법제, 예컨대, 암 및 감염성 질환 치료용의 화학요법제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이는 예컨대, 문헌 [Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., Brunton, Lazo and Parker, Eds., McGraw-Hill (2006); 2010 Physicians' Desk Reference (PDR), 64th Edition, Thomson PDR]에 기술되어 있다.

[0304] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항신생물제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 항-GITR 항체와 혼합하여 조성물로 사용될 수 있는 것으로 밝혀진 예시적인 항신생물제로는 알킬화제 (예컨대, 질소 머스타드, 에틸렌이민 및 메틸멜라민, 메틸히드라진 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아, 트리아젠 및 백금 배위 결합 복합체); 항대사물질 (예컨대, 폴산 유사체, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체; 천연 생성물 (예컨대, 빈카 알칼로이드, 타산, 에피도도필로톡신, 캄프토테신, 항생제, 및 안트라세네디온)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항대사물질, 항신생물제, 예컨대, 폴산 유사체 (예컨대, 메토틱세이트, 페메트렉시드, 트리메트렉세이트), 피리미딘 유사체 (예컨대, 5-플루오로우라실, 카페시타빈, 시타라빈, 겐시타빈), 퓨린 유사체 (예컨대, 르캅토피린, 펜토스타틴, 클라드리빈 플루다라빈), 또는 그의 혼합물과 함께 공동 제제화. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 알킬화제, 항신생물제, 예컨대, 질소 머스타드 (예컨대, 메클로레타민, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 (예컨대, 알트레타민) 및 메틸멜라민 (예컨대, 티오테파), 메틸히드라진 유도체 (예컨대, 프로카르바진), 알킬 술포네이트 (예컨대, 부술판), 니트로소우레아 (예컨대, 카르무스틴, 스트렙토조신), 트리아젠 (예컨대, 다카르바진, 테모졸로미드) 및 배위결합 복합체 (예컨대, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴)와 함께 공동 제제화된다.

[0305] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항바이러스제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예시적인 항바이러스제로는 제한 없이, 항-헤르페스 바이러스제 (예컨대, 아시클로비르, 시도포비르, 팜시클로비르, 포스카르네트, 티오비르, 포미비르센, 간시클로비르, 이독스우리딘, 펜시클로비르, 트리플루리딘, 발아시클로비르, 발겐시클로비르, 레시퀴모드); 항-인플루엔자제 (예컨대, 아만타딘, 오셀타미비르, 리만타딘, 자나미비르, 페라미비르, E-118958); 항간염제 (예컨대, 아데포비르 디피복실, 인터페론-알파, 라미부딘, 엔테카비르, 클레부딘, 엠트리시타빈, 텔비부딘, 테노포비르, 비라미딘, BILN 2061, NM283) 및 다른 항바이러스제 (예컨대, 리바비린, 이미퀴모드, 마리바비르, sICAM-1, 플레코나틸)를 포함한다. 항바이러스제 항레트로바이러스제일 수 있다. 예시적인 항레트로바이러스제로는 제한 없이, 지도부딘, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 라미부딘, 아바카비르, 테노포비르, 엠트리시타빈, 네비라핀, 에파비렌즈, 델라비르딘, 사퀴나비르, 인디나비르, 리토나비르, 넬피나비르, 암프레나비르, 로피나비르, 아타자나비르, 포삼프레나비르 및 엔푸비르티드를 포함한다.

[0306] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항박테리아제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예시적인 항박테리아제로는 제한 없이, 술폰아미드 (예컨대, 술폰아미드, 술폰디아진, 술폰메톡사졸, 술폰이속사졸, 술폰아세타미드), 트리메토프림, 퀴놀론 (예컨대, 날리딕스산, 시녹사신, 노르플록사신, 시프로플록사신, 오픈록사신, 스파르플록사신, 플레록사신, 페플록사신, 레보플록사신, 가레록사신 및 게미플록사신), 메테나민, 니트로푸란토인, 페니실린 (예컨대, 페니실린 G, 페니실린 V, 메티실린 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 암피실린, 아목시실린, 카르베니실린, 티카르실린, 메즐로실린, 및 피페라실린), 세팔로스포린 (예컨대, 세파졸린, 세팔렉신, 세파드록실, 세폭시틴, 세파클로르, 세프프로질, 세프록심, 세프록심 아세틸, 로라카르베프, 세포탄, 세포라니드, 세포타심, 세프로독심 프록세틸, 세피부텐, 세프디니르, 세프티도렌 피보록실, 세프티죽심, 세프트리악손, 세포페라존, 세프타지덤, 및 세페핀), 카르바페넴 (예컨대, 이미페넴, 아즈트레오남), 및 아미노글리코사이드 (예컨대, 네오마이신, 카나마이신, 스트렙토마이신, 겐타미신, 토라마이신, 네틸미신, 및 아미카신)를 포함한다.

- [0307] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항기생충제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예시적인 항기생충제로는 제한 없이, 항말라리아제 (예컨대, 퀴놀린 (클로로퀸, 메플로퀸, 퀴닌, 퀴니딘, 및 프리마퀸 포함); 디아미노피리미딘 (피리메타민, 술파독신, 테트라시클린, 아토바쿠온, 및 프로구아닐 포함); 항원충제 (암포테리신, 클로로퀸, 에플로르니틴, 에메틴, 푸마길린, 8-히드록시퀴놀린, 멜라르소프롤, 메트로니다졸, 밀테포신, 니푸티목스, 니타록사니드, 파로모마이신, 펜타미딘, 소듐 스티보글루코네이트, 및 수라민 포함)를 포함한다.
- [0308] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 항진균제와 함께 공동 제제화될 수 있다. 예시적인 항진균제로는 제한 없이, 폴리엔 (예컨대, 나타마이신, 리모시딘, 필리핀, 니스타틴, 암포테리신 B, 칸디신, 및 하마이신), 이미다졸 (예컨대, 미코나졸, 케토코나졸, 클로트리마졸, 에코나졸, 비포나졸, 부토코나졸, 펜티코나졸, 이소코나졸, 옥시코나졸, 세르타코나졸, 술코나졸, 티오코나졸), 트리아졸 (예컨대, 플루코나졸, 이트라코나졸, 이사부코나졸, 라부코나졸, 포사코나졸, 보리코나졸, 테르코나졸), 티아졸 (예컨대, 아바편진), 알릴아민 (예컨대, 테르비나핀, 아모롤핀, 나프티핀, 부테나핀), 에키노칸딘 (예컨대, 아니둘라편진, 카스포편진, 미카편진), 벤조산, 시클로피록스, 톨나프테이트, 운데실렌산, 플루시토신 또는 5-플루오로시토신, 글리세오폴빈, 및 할로프로긴을 포함한다.
- [0309] **키트**
- [0310] 본 발명의 항-GITR 조성물은 키트로 제공될 수 있다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 일반적으로 바이알 또는 용기에 존재한다. 항체는 적절히 액상 형태 또는 건조된 (예컨대, 동결건조된) 형태일 수 있다. 키트는 본원에 기술된 바와 같은, 본 발명의 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 포함할 수 있고, 임의적으로는 또한 제2 또는 제3 작용제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본 발명의 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 및 제약상 허용되는 희석제를 포함한다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 동일한 또는 별개의 제제로 (예컨대, 혼합물로서 또는 별개의 용기 중의 것으로) 제2 또는 제3 작용제와 함께 키트로 제공될 수 있다. 키트는 1회 이상의 용량을 제공하는 분취량으로 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 함유할 수 있다. 다회 투여용 분취량으로 제공되는 경우, 상기 용량은 균일하거나, 또는 다를 수 있다. 다른 용량의 투약 요법은 적절히 점차 증분되거나, 또는 감소될 수 있다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 및 제2 작용제의 투여량은 독립적으로 균일하거나, 또는 다를 수 있다.
- [0311] 일부 실시양태에서, 키트는 표적 항원을 추가로 함유한다. 표적 항원, 또는 백신은 치료하고자 하는 질환 병태에 의존할 것이다. 예를 들어, 표적 항원은 종양 세포, 박테리아 세포, 진균, 기생충, 또는 바이러스로부터의 것일 수 있다. 표적 항원은 적절히, 펩티드, 폴리펩티드, 세포, 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, 네이키드 플라스미드 또는 바이러스 벡터) 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 종양 연관된 항원이다. 예시적인 표적 항원은 본원에 논의되어 있으며; 관련 기술분야에 공지된 다른 것 또한 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 키트는 세포독성제를 추가로 함유한다. 예를 들어, 키트는 CD4+ CD25+ 조절 T 세포 (Treg)에 결합하여, 그를 감소 또는 고갈시키는 효능제 항체 또는 항원 결합 분자를 함유할 수 있다. 예시적인 Treg 세포-고갈 항체 또는 항원 결합 분자는 CD25 또는 CCR4에 결합한다. 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.
- [0313] 일부 실시양태에서, 키트는 공동 억제성 신호의 억제제를 추가로 함유한다. 예시적인 억제제로는 CTLA-4, LAG3, TIM3의 억제제, 및/또는 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1) 상호작용의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 CTLA-4에 결합하여 그를 억제시키는 항체를 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 LAG3에 결합하여 그를 억제시키는 항체를 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 TIM3에 결합하여 그를 억제시키는 항체를 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 PD-1에 결합하여 그를 억제시키는 항체를 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 B7-H1에 결합하여 그를 억제시키는 항체를 추가로 함유한다. 예컨대, 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575]; 및 [Melero, *et al.*, *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 면역자극성 작용제를 추가로 함유한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 키트는 면역자극성 시토카인, 예를 들어, IL-7, IL-12 또는 IL-15를 함유한다. 대안적으로, 키트는 제2 면역자극성 항체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 키트는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 또 다른 구성원의 효능제 항체 또는 항원 결합 분자를 함유할 수 있다. 예시적인 제2 면역자극성 표적으로는 제한 없이, TNFRSF4 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 4 (이는 또한 OX40로도 공지) 또는 종양 괴사 인자

수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9 (이는 또한 TNFRSF9, 4-1BB 또는 CD137로도 공지)를 포함한다. 예컨대, 문헌 [Expert Opin Ther Patents (2007) 17(5):567-575]; [Pardee, et al., Immunotherapy (2009) 1(2):249-264]; 및 [Melero, et al., Clin Cancer Res (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0315] 일부 실시양태에서, 키트는 화학요법제를 추가로 함유한다. 선택되는 작용제는 치료하고자 하는 병태, 예컨대, 암 또는 감염성 질환, 예컨대, 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염 또는 기생충 감염에 의존할 것이다. 예시적인 화학요법제로는 관련 기술분야에 공지 및 본원에 기술된 임의의 항신생물제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항기생충제, 및 항진균제를 포함한다.

[0316] **T 세포 반응을 증진시키는 방법**

[0317] 치료 또는 예방하고자 하는 병태

[0318] 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 및 항체 단편은 CD4⁺ T 헬퍼 및 CD8⁺ 세포용해성 T 세포 반응 증강을 필요로 하는 환자에서 그를 증강시키는 데 사용될 수 있음을 알 수 있다. 그러므로, 항체는 예컨대, 증진된 또는 증강된 면역 반응으로 상쇄될 수 있는 질환을 감소, 역전, 억제 또는 예방하기 위해 환자에서 T 세포 반응을 증진 또는 증강시키는 데 사용될 수 있음을 알 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에 게 치료 유효량의, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 반응 증진을 필요로 하는 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위한 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 개체에서 T 세포 반응을 증진시키는 데 사용하기 위한 상기 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0319] 치료하고자 하는 병태로는 암 및 감염성 질환을 포함한다. 치료를 목적으로 하는 경우, 환자는 암 또는 종양 또는 감염성 질환, 예컨대, 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 감염을 앓을 수 있다. 예방을 목적으로 하는 경우, 환자는 암에서 차도를 보일 수 있거나, 또는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 감염에 노출될 것으로 예상될 수 있다. 항체는 또한 예컨대, 백신과 같이, 1차 항원 또는 표적 항원에 대한 면역 반응을 증진 또는 촉진 또는 부스팅시키는 애주변트로서 작용할 수 있다.

[0320] 일부 실시양태에서, 환자는 암을 앓거나, 앓을 것으로 의심되거나, 또는 암에서 차도를 보인 환자이다. 항-GITR 항체를 사용하여 치료하고자 하는 대상이 되는 암은 보통 본원에 기술된 바와 같은 종양 연관된 항원 (TAA)을 발현한다. 치료하 대상이 되는 암으로는 제한 없이, 상피암 또는 암종 뿐만 아니라, 육종 및 림프종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 신장암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한 폐암, 유방암, 신경교종, 또는 섬유육종을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Pardee, et al., Immunotherapy (2009) 1(2):249-264], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 유형은 췌장암, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 결장직장암, 전립선암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추 신경계 암, 말초 신경계 암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 충수암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액학적 조직의 암 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0321] 한 측면에서, 본 발명은 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장 치료를 필요로 하는 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 추가로 제공한다. 본 발명은 개체에서 종양 연관된 항원을 발현하는 암의 종양 성장을 감소, 억제 또는 예방하는 데 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0322] 일부 실시양태에서, 개체에서 암의 진단 또는 예후를 촉진시키는 방법은 개체에서 종양내 또는 종양 주변부에서의 GITR의 발현을 검출하기 위해 본 발명의 항-GITR 효능제 항체 또는 항체 단편을 사용하는 것을 포함한다.

[0323] 일부 실시양태에서, 환자는 감염성 질환, 예를 들어, 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 감염을 앓고 있는 환자이다. 항-GITR 효능제 항체는 예컨대, 필라리아병 및 리슈만편모충증에서와 같이, 기생충을 감소, 억제 및/또는 막는 데 사용될 수 있음을 알 수 있다.

- [0324] 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 제한 없이, 간염 바이러스 감염, 예를 들어, 만성 C형 간염 (HCV) 감염, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 감염 또는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염을 비롯한, 바이러스 감염 치료에서 사용될 수 있음을 알 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 바리셀라, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 I형 (HSV I), 단순 헤르페스 II형 (HSV II), 우역, 리노바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 유두종 바이러스, 파포바 바이러스, 거대세포바이러스, 에키노바이러스, 아르보바이러스, 한타바이러스, 콕삭키 바이러스, 뎀프스 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 폴리오 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 I형 (HIV I), 및 인간 면역결핍 바이러스 II형 (HIV II), 임의의 피코나비리다에, 엔테로바이러스, 칼리시비리다에, 노워크 바이러스 군 중 어느 것, 토가바이러스, 에킨대, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 광견병 바이러스, 마르부르크 바이러스, 에볼라 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II형, 시미안 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 폴리오마바이러스, 파르보바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 6, 세르코피데신 헤르페스 바이러스 1 (B 바이러스), 및 폭스바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스 감염 치료에서 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0325] 일부 실시양태에서, 항-GITR 효능제 항체는 제한 없이, 네이세리아 종, 스트렙토코쿠스 종, S. 류탄스, 헤모필루스 종, 모락셀라 종, 보르데텔라 종, 미코박테리움 종, 레지오넬라 종, 에스케리키아 종, 비브리오 종, 예르시니아 종, 캄필로박터 종, 살모넬라 종, 리스테리아 종, 헬리코박터 종, 슈도모나스 종, 스탕필로코쿠스 종, 엔테로코쿠스 종, 클로스트리디움 종, 바실러스 종, 코리네박테리움 종, 보렐리아 종, 에를리키아 종, 리케치아 종, 클라미디아 종, 랩토스피라 종, 트레포네마 종의 감염을 비롯한, 박테리아 감염 치료에서 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0326] 항-GITR 항체 투여
- [0327] 의사 또는 수의학자는 제약 조성물 중에 사용되는 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 원하는 치료학적 효과를 달성하는 데 필요한 수준보다 더 낮은 수준으로 투약하는 것으로 시작하여, 원하는 효과를 달성할 때까지, 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로 본 발명의 조성물의 유효 용량은 치료하고자 하는 특정 질환 또는 병태, 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 또는 동물인지 여부, 투여되는 다른 약물, 및 처치가 예방적 처치인지 또는 치료학적 처치인지 여부를 비롯한, 다수의 상이한 인자에 따라 달라진다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 적정되어야 한다. 항체와 함께 투여되는 경우, 투여량 범위는 약 0.0001 내지 100 mg/kg (호스트 체중), 및 더욱 일반적으로, 0.01 내지 5 mg/kg (호스트 체중)이다. 예를 들어, 투여량은 1 mg/kg (체중) 또는 10 mg/kg (체중), 또는 1-10 mg/kg 범위일 수 있다. 투약은 필요에 따라 또는 원하는 경우, 매일, 매주, 2주마다, 매월, 또는 그보다 더 빈번하게 또는 덜 빈번하게 이루어질 수 있다. 예시적인 치료 요법은 매주 1회, 매 2주마다 1회 또는 매월 1회 또는 매 3 내지 6개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다.
- [0328] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 투여된다. 작용제가 핵산인 실시양태에서, 전형적인 투여량 범위는 약 0.1 mg/kg (체중) 내지 최대 약 100 mg/kg (체중) (약 100 mg/kg (체중) 포함), 예컨대, 약 1 mg/kg (체중) 내지 약 50 mg/kg (체중)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 mg/kg (체중)일 수 있다.
- [0329] 항체 또는 항체 단편은 단일 용량 또는 분할된 용량으로 투여될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 보통 다회에 걸쳐 투여된다. 단일 투여 간격은 필요에 따라 또는 원하는 경우, 매주, 2주마다, 매월 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 혈중 항-GITR 항체 또는 항체 단편 수준을 측정함으로써 지시되는 대로 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 1-1000 $\mu\text{g/ml}$, 및 일부 방법에서, 25-300 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 혈장 항체 또는 항체 단편을 달성하기 위해 조정된다. 대안적으로, 항체 또는 항체 단편은 덜 빈번하게 투여되는 것이 요구되는 경우, 지효성 제제로서 투여될 수 있다. 투여량 및 빈도는 환자에서 항체 또는 항체 단편의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화 항체는 키메라 항체 및 비인간 항체보다 더욱 긴 반감기를 보인다. 투여량 및 투여 빈도는 처치가 예방적 처치인지 또는 치료학적 처치인지 여부에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서는 비교적 낮은 투여량으로 장기간 동안에 걸쳐 비교적 저빈도인 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그의 여생 동안 처치를 계속 해서 받는다. 치료학적 적용에서는 종종 질환 진행이 감소되거나, 종료될 때까지, 및 바람직하게, 환자가 질환 증상의 부분적인 또는 완전한 호전을 보일 때까지, 비교적 높은 투여량으로 비교적 짧은 간격으로 이루어지는 것이 요구된다. 이후 환자는 예방적 요법으로 투여받을 수 있다.

[0330] 제2 작용제와의 공동 투여

[0331] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 제2 또는 제3 약리학적 작용제와 함께 공동 투여된다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 및 제2 작용제는 혼합물로서 또는 별개의 제제로 투여될 수 있다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 및 제2 작용제는 공동으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자 및 제2 작용제는 적절히 동일한 투여 경로를 통해 또는 상이한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자와 함께 공동 투여하기 위한, 예시적인 제2 작용제 및 제3 작용제로는 제한 없이, 1차 또는 표적 항원, 종양 세포의 면역원성을 증가시키는 작용제, 공동 억제성 신호를 저해 또는 억제시키는 작용제를 포함한다. 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 또한 예컨대, 화학요법제의 효능을 증진시키기 위해, 또는 표적 항원에 대한 면역 반응을 추가로 증진시키기 위해, 치료되는 질환 병태를 치료하는 데 사용되는 화학요법제와 함께 공동 투여될 수 있다. 항-GITR 효능제 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 또한 지정된 질환 병태 치료용으로 확립된 방법, 예컨대, 방사선 조사 또는 수술과 함께 조합 요법으로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0332] 본 발명의 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 1차 또는 표적 항원과 함께 공동 투여될 수 있다. 표적 항원, 또는 백신은 치료하고자 하는 질환 병태에 의존할 것이다. 예를 들어, 표적 항원은 종양 세포, 박테리아 세포, 진균, 바이러스 또는 기생충으로부터의 것일 수 있다. 표적 항원은 적절히 펩티드, 폴리펩티드, 세포 또는 폴리뉴클레오티드 형태일 수 있다.

[0333] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 예컨대, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 바리셀라, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 I형 (HSV I), 단순 헤르페스 II형 (HSV II), 우역, 리노바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 유두종 바이러스, 파코바 바이러스, 거대세포바이러스, 에키노바이러스, 아르보바이러스, 한타바이러스, 콕사키 바이러스, 뎀프스 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 폴리오 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 I형 (HIV I), 및 인간 면역결핍 바이러스 II형 (HIV II), 임의의 피코나비리다에, 엔테로바이러스, 칼라시비리다에, 노워크 바이러스 군 중 어느 것, 토가바이러스, 예컨대, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 광견병 바이러스, 마르부르크 바이러스, 에볼라 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타 바이러스, 오르비바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II형, 시미안 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 폴리오마바이러스, 파르보바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 6, 세르코피테신 헤르페스 바이러스 1 (B 바이러스), 및 폭스바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스로부터의 표적 항원과 함께 공동 투여된다.

[0334] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 네이세리아 종, 스트렙토코쿠스 종, S. 류탄스, 헤모필루스 종, 모락셀라 종, 보르데텔라 종, 미코박테리움 종, 레지오넬라 종, 에스케리키아 종, 비브리오 종, 예르시니아 종, 캄필로박터 종, 살모넬라 종, 리스테리아 종, 헬리코박터 종, 슈도모나스 종, 스태필로코쿠스 종, 엔테로코쿠스 종, 클로스트리디움 종, 바실러스 종, 코리네박테리움 종, 보렐리아 종, 에를리키아 종, 리케치아 종, 클라미디아 종, 렙토스피라 종, 트레포네마 종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아로부터의 표적 항원과 함께 공동 투여된다.

[0335] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 종양 연관된 항원 (TAA)과 함께 공동 투여된다. TAA는 단리된 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있거나, 무손상 세포의 일부분일 수 있거나, 또는 종양 세포 용해물의 일부분일 수 있다. 예시적인 TAA는 상기 논의되어 있으며; 관련 기술분야에 공지된 다른 것 또한 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0336] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 환자로부터의 자가 유래 종양 세포, 또는 또 다른 환자로부터의 동일 조직 유형의 동종이계 종양 세포와 함께 공동 투여된다. 종양 세포는 무손상 세포, 종양 세포 용해물, 아포토시스성 종양 세포 또는 전체 종양 mRNA 형태일 수 있다. 종양 세포는 환자에서 종양 세포의 면역원성을 증진 또는 증강시키는 폴리펩티드를 발현하도록 형질감염될 수 있고, 예컨대, 파립구 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)를 발현하도록 형질감염될 수 있다. 종양 세포는 제한 없이, 상피암 또는 암종 뿐만 아니라, 육종 및 림프종을 포함하는, 임의의 암성 조직으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 신장암, 결장직장암, 전립선암, 비소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한 폐암, 유방암, 신경교종, 또는 섬유육종이다. 예컨대, 문헌 [Pardee, *et al.*, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 세포는 예컨대, 췌장암, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관

지암, 결장직장암, 전립선암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추 신경계 암, 말초 신경계 암, 식도암, 자궁 경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 충수암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액학적 조직의 암 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)으로부터의 것이다.

[0337] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 세포독성제와 함께 공동 투여된다. 예를 들어, 항-GITR 항체 또는 항원 결합 분자는 CD4+ CD25+ 조절 T 세포 (Treg)에 결합하여, 그를 감소 또는 고갈시키는 효능제 항체 또는 항원 결합 분자와 함께 공동 투여된다. 예시적인 Treg 세포-고갈 항체 또는 항원 결합 분자는 CD25 또는 CCR4에 결합한다. 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0338] 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 공동 억제성 신호의 억제제와 함께 공동 투여된다. 예시적인 억제제로는 CTLA-4, LAG3, TIM3의 억제제, 및/또는 PD-1/PD-L1 (예컨대, B7-H1) 상호작용의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 CTLA-4에 결합하여 그를 억제시키는 항체와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 TIM3에 결합하여 그를 억제시키는 항체와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 LAG3에 결합하여 그를 억제시키는 항체와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 PD-1에 결합하여 그를 억제시키는 항체와 함께 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체는 B7-H1에 결합하여 그를 억제시키는 항체와 함께 공동 투여된다. 예컨대, 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575]; 및 [Melero, *et al.*, *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0339] 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 또한 하나 이상의 면역자극성 작용제와 함께 공동 투여된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항-GITR 항체 또는 항체 단편은 면역자극성 시토카인, 예를 들어, IL-7, IL-12 또는 IL-15와 함께 공동 투여된다. 대안적으로, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 제2 면역자극성 항체와 함께 공동 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 또한 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 또 다른 구성원의 효능제 항체 또는 항원 결합 분자와 함께 공동 투여될 수 있다. 예시적인 제2 면역자극성 표적으로는 제한 없이, TNFRSF4 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 4 (이는 또한 OX40로도 공지) 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9 (이는 또한 TNFRSF9, 4-1BB 또는 CD137로도 공지)를 포함한다. 예컨대, 문헌 [*Expert Opin Ther Patents* (2007) 17(5):567-575]; [Pardee, *et al.*, *Immunotherapy* (2009) 1(2):249-264]; 및 [Melero, *et al.*, *Clin Cancer Res* (2009) 15(5):1507-1509], 및 상기 문헌에서 논의된 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0340] 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 또한 화학요법제와 함께 공동 투여될 수 있다. 선택되는 작용제는 치료하고자 하는 병태, 예컨대, 암 또는 감염성 질환, 예컨대, 박테리아 감염, 진균 감염, 바이러스 감염 또는 기생충 감염에 의존할 것이다. 항-GITR 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 분자는 치료되는 질환을 치료하기 위해 통상의 기술자에게 공지된 화학요법제와 함께 공동 투여될 수 있다. 예시적인 화학요법제는 상기 논의되어 있으며; 관련 기술분야에 공지된 다른 것 또한 사용될 수 있음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0341] 도 1a-1d는 본 발명의 GITR mAb의 에피토프 맵핑을 도시한 것이다. 도 1a는 Fc-GITR 융합 (상단 및 중간 트레이스) 및 HIS-GITR (하단 트레이스) 융합 단백질 및 MAB1 모체 Ab를 사용한 질량 분석법에 커플링된 수소/중수소 교환 (HDXMS) 분석의 결과를 도시한 것이다. 넘버링은 천연 GITR 신호 펩티드 (AA 1-26) 서열의 제거를 반영한다. 도 1b는 인간 GITR의 세포외 도메인 (hGITR ECD)을 사용하여 제조된 N-말단 결실 구축물의 개략도를 도시한 것이다. 도 1c는 hGITR ECD 구축물에 MAB4 및 MAB5의 결합 결과를 도시한 것이다. 인간 GITR (hGITR) 세포외 도메인 (ECD)으로부터 시스테인이 풍부한 도메인 1 (CRD1)의 N-말단 결실은 hGITR에 MAB4 및 MAB5의 결합을 파괴한다. MAB7에 대해서도 유사한 결과를 얻었다 (데이터는 나타나지 않음). 도 1d는 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발의 결과를 도시한 것이다. MAB7은 GITR 돌연변이체 E78A를 제외한 모든 돌연변이체 단백질에 결합하였다. 프로테마이오(ForteBio)TM 결합 분석을 수행하였고, 그 결과를 통해서 또한 hGITRE78A 돌연변이체 단백질에 MAB7 결합의 손실을 확인하였다 (데이터는 나타나지 않음). 본 결과는 GITR의 ECD의 영역이 MAB1 및 MAB7 (모체 mAb) 결합에 관여하는 영역 및 잠재적 에피토프로서 CRD1 및 E78 (서열식별번호: 88: RPTGGPGCGPGRLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGECCSEWDCMCVQPEFHCGD)을 포함한다는 것을 나타낸다.

도 2a-2e는 항-GITR MAB 항체의 결합 실험의 결과를 도시한 것이다. 도 2a 및 2b는 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같이, MAB4, 및 MAB5가 설치류로부터의 것이 아닌 (2b), 인간 및 시노물구스 원숭이로부터의 (2a) GITR에

특이적으로 결합한다는 것을 도시한 것이다. 도 2c는 ELISA 검정에 의하면, MAB7이 뮤린 GITR이 아닌, 인간 및 시노 GITR에 대하여 결합하는 유사한 프로파일을 공유한다는 것을 도시한 것이다. 도 2d는 FACS 경쟁 분석에 의해 측정된 바, MAB7이 GITR 리간드와 결합에 대해 경쟁한다는 것을 도시한 것이다. 도 2e는 본 발명의 항-GITR 항체 (예컨대, MAB4, MAB5)가 TNF 수용체 슈퍼패밀리 (TNFRSF)의 다른 구성원에는 결합하지 않는다는 것을 보여주는 ELISA 검정의 결과를 도시한 것이다. 프로타젠(Protagen)TM 칩 검정을 통해서도 또한 항체가 다른 오프-타겟 단백질에는 결합하지 않는다는 것을 확인하였다 (나타내지 않음).

도 3a-3d는 GITR을 발현하도록 조작된 293 세포에서의 세포내 신호전달을 도시한 것이다. 도 3a는 인간 GITR을 과다발현하도록 안정하게 형질감염된 293 세포에서 재조합 인간 GITR 리간드 (GITR-L)가 세포내 신호전달을 활성화시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 3b는 인간 GITR을 과다발현하도록 안정하게 형질감염된 293 세포에서 모노클로날 항체 MAB4 및 MAB5가 항체가 가교 결합되었을 때, GITR-L과 유사하게, 세포내 신호전달을 활성화시킨다는 것을 도시한 것이다 (GITR-L에 대한 EC₅₀ = 약 65 nM 대 가교제의 존재하에 효능제 항체에 대한 EC₅₀ = 약 2.5 nM). 도 3c는, MAB7 및 MAB8 또한 가교 결합된 MAB4와 유사한 유사한 방식으로 인간 GITR 및 NFκB-루시페라제 리포터 유전자로 안정하게 형질감염된 293 세포에서 NFκB 활성화를 촉진시킨 바, 가교 결합된 MAB 항체가 세포에서 세포내 신호전달을 활성화시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 3d는 시노 GITR 및 NFκB-루시페라제 리포터 유전자로 안정하게 형질감염된 293 세포에서 가교 결합된 MAB4 및 MAB5가 NFκB 활성화를 촉진시킨다는 것을 도시한 것이다. 가교 결합된 MAB7 경우에 대해서도 유사한 활성화가 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

도 4a-4c는 T 세포에 대한 MAB7의 시험관내 공동 자극 활성화는 T 세포 활성화에 의존한다는 것을 도시한 것이다. 항-CD3 (OKT3), 항-CD28 (CD28.2) 및 항-GITR mAb를 비드 상에 (1:1:3 비로) 가교 결합시킨 후, PBMC와 함께 인큐베이션시켰다. 도 4a는 MAB7이 CD4+ T 세포의 공동 활성화인자이며, 이는 CD4+ T 세포에서 T 세포 증식을 자극시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 4b는 MAB7이 CD8+ T 세포의 공동 활성화인자이며, 이는 CD8+ T 세포에서 T 세포 증식을 자극시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 4c는 TCR 체결 이후, 시토킨 생산, 예컨대, IFNγ 생산은 MAB7과 함께 증가한다는 것을 도시한 것이다. MAB4 및 5 경우에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

도 5a-d는 다양한 수준으로 GITR을 발현하는 세포에서의 MAB7의 시험관내 ADCC 활성을 도시한 것이다. 도 5a, 도 5b, 도 5c, 및 도 5d는 각각 다양한 수준의 GITR 발현하에서의 대조군 또는 MAB7 항체를 이용한 ADCC 활성의 결과를 도시한 것이다. MAB7은 FcγRIIIa를 통해 신호전달을 유도할 수 있고, 여기서, GITR 신호전달 수준 증가 시, 활성이 증가한다.

도 6a-6d는 GITR이 hGITR-hGITRL 녹-인(knock-in) 마우스에서 기능적이라는 것을 도시한 것이다. 비장세포를 hGITR-hGITRL 녹-인 마우스로부터 분리시키고, 자극 없이, 또는 aCD3 및 aCD8 항체로 자극시키면서 48시간 동안 배양한 후, 30분 동안 대조군 또는 다양한 농도의 MAB7로 필싱한 후, 고정시키고, 형광단-접합된 항체로 염색시키고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 도 6a는 자극받은 CD8+ T 세포 상에서 hGITR의 발현이 상향조절되었음을 보여주는 결과를 도시한 것이다. 도 6b는 MAB7이 마우스 CD8+ T 세포 상에서 발현된 hGITR에 결합할 수 있다는 것을 보여주는, hFc 염색에 의한 T 세포에의 항 hGITR 항체 결합의 결과를 도시한 것이다. 도 6c 및 6d는 자극받은 CD8+ T 세포에의 MAB7 결합은 T 세포 활성화 (세포내 pIKK 염색에 의해 제시) (6c) 및 T 세포 활성화 (6d) 증가와 상관관계가 있다는 것을 도시한 것이다. *p<0.05, **p<0.005.

도 7a-7c는 MAB7이 생체내에서 기능적이라는 것을 도시한 것이다. Colon26 종양이 확립된, hGITR-hGITRL 이중 녹-인 마우스를 비히클 (n=8/시점) 또는 MAB7 (n=10/시점) 항체의 단일 투약으로 처리하였다. 도 7a는 매주 2회에 걸쳐 실시된 종양 측정 결과 및 공식 $(L \times W^2)/2$ 를 사용하여 계산된 종양 부피를 도시한 것이다. 제시된 데이터는 십오일째 (15일째) 시점 군으로부터의 것이다. 도 7b 및 7c는 전혈로부터의 결과를 도시한 것이고, 도 7c 및 7d는 종양으로부터의 결과를 도시한 결과로서, 종양은 투약 후 3일째 수집되었고, 유동 세포측정법에 의해 면역 세포 상의 세포 표면 hGITR 발현에 대하여 분석함으로써 얻은 것이다 (*p<0.05, ****p<0.00005).

도 8a-8e는 MAB7이 생체내에서 Colon26 종양에 대한 항-종양 면역 반응을 유도한다는 것을 도시한 것이다. Colon26 종양이 확립된, hGITR-hGITRL 이중 녹-인 마우스를 비히클 (n=8/시점) 또는 MAB7 (n=10/시점)의 단일 투약으로 처리하였다. 도 8a는 투약 후 3일째 T조절 세포의 결과를 도시한 것이다. 도 8b-8c는 투약 후 15일째 종양 내의 처리 후 종양 부위에 존재하는 림프구 (8b) 및 활성화된 CD8+ T 세포 (8c) 수준의 결과를 도시한 것이다. 비히클과 및 MAB7 처리군 사이에서의 종양 크기의 유의적인 차이를 설명하기 위해 절대 세포 개수를

종양 크기에 대해 정규화하였다. 도 8d는 T_{eff}/T_{reg} 비를 생성하기 위해 CD4+ FOXP3+ Treg 대비의 전체 종양내 활성화된 CD8+ T 세포에 의해 측정된, 처리된 동물에서의 T_{eff}/T_{reg} 비 결과를 도시한 것이다. 도 8e는 생체에서 Colon26 종양 세포와 함께 인큐베이션된 정제된 CD8+ T 세포로부터의, 및 IFN γ ELISPOT 검정을 사용하여 CTL 반응을 측정함으로써 얻은 비장세포 검정의 결과를 도시한 것이다 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$).

도 9a-9c는 PD-1 발현은 무린 대용 GITR 항체, DTA-1로 처리한 후, Colon26 종양 뿐만 아니라, 비장 중 CD8+ T 세포 상에서 상향조절된다는 것을 도시한 것이다. DTA-1을 2회 투여한 후 유동 세포측정법에 의해 전체 종양 또는 전체 비장의 단일 세포 현탁액을 프로파일링하였다. 도 9a는 PD-1 양성 세포를 전체 CD19-CD3+CD8+ T 세포에 대한 상대적인 비율(%)로서 평가한 결과를 도시한 것이다. 도 9b는 종양 부피 1 mm³당 PD-1+CD19-CD3+CD8+ T 세포의 절대 개수에 의해 종양 크기에 대하여 정규화된 PD-1 양성 세포의 결과를 도시한 것이다. 도 9c는 DTA-1로 처리한 후, Colon26 종양을 보유하는 마우스의 비장 중 CD8+ T 세포 상에서 PD-1 발현이 상향조절되었다는 결과를 도시한 것이다. PD-1 양성 세포를 전체 CD19-CD3+CD8+ T 세포에 대한 상대적인 비율(%)로서 평가하였다 (* $p < 0.05$ 및 **** $p < 0.0005$).

도 10은 항-GITR 및 항-PD-1 조합이 이소형 대조군에 비하여 생존상 이점을 부여한다는 것을 도시한 것이다. 결과는 이소형 대조군과 비교하여, 항-GITR (IgG2a-DTA-1) 및 항-PD-1 (RMP1-14)로 개별적으로 또는 조합하여 처리된 Colon26 마우스 모델에서의 것으로 제시되어 있다.

도 11은 Colon26 종양이 확립된 마우스에서의, 이소형 대조군 Ab 처리와 비교하여, 항-GITR, 항-PD-1 및 항-GITR/항-PD-1 조합 처리 이후의 LAG3 (첫번째 열), TIM3 (중간 열), 및 PD1 (우측 열)의 발현을 도시한 것이다. 결과는 이소형 대조군과 비교하여, 항-GITR (IgG2a-DTA-1) 및 항-PD-1 (RMP1-14)로 개별적으로 또는 조합하여 처리된 Colon26 마우스 모델에서의 것으로 제시되어 있다. 상단의 행은 종양 샘플에서의 결과를 보여주는 것이고, 하단의 행은 비장 샘플에서의 결과를 도시한 것이다. LAG3, TIM3 및 PD1 발현은 a-GITR, 및 a-PD1 처리 후 Colon26 종양 중 CD8+ T 세포 상에서 상향조절된다. PD-1 발현은 항-GITR/항-PD-1 조합 처리 후 Colon26 종양 중 CD8+ T 세포 상에서 상향조절된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

GITR 효능제 항체 MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 및 MAB8 생성

무린 모노클로날 GITR 효능제 항체 MAB1을 인간 배선 항체와 더욱 큰 서열 상동성을 가지도록 조작하여 인간 항체 MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 및 MAB8을 생성하였다. MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 및 MAB8은 모체 무린 항체인 MAB1의 에피토프 특이성, 친화성, 및 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque) GITR 교차 반응성을 유지한다. MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 및 MAB8은 인간 배선 서열과 원래의 무린 항체보다 훨씬 더 높은 상동성을 가지며, 따라서, 인간 면역계에 의해 더욱 우수하게 허용되어야 한다.

칼로바이오스 (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 (월드와이드 웹 상의 kalobios.com에서))를 통해 이용가능한 휴머니어드[®] 기술 플랫폼을 사용하여 마우스 모노클로날 MAB1을 그의 단백질이 인간 배선 서열과 더욱 유사하도록, 및 그의 면역원성을 감소시키도록 조작하였다. 휴머니어드[®] 항체는 모체 또는 참조 항체의 특이성 및 친화성을 여전히 보유하면서, 인간 배선 서열과 높은 상동성을 갖는 V 영역 서열을 갖는 인간 항체에 매우 가깝다 (미국 특허 공개 2005/0255552 및 2006/0134098). 상기 방법은 먼저 참조 Fab의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 중의 최소 항원 결합 특이성 결정기 (BSD) (전형적으로 중쇄 CDR3 및 경쇄 CDR3 내의 서열)를 확인한다. 상기 중쇄 및 경쇄 BSD는 방법 동안 구축된 모든 라이브러리에서 유지되는 바, 각 라이브러리는 에피토프 집중되고, 생성된 휴머니어드[®] 항체는 원래의 마우스 항체의 에피토프 특이성을 보유한다.

이어서, (전체 경쇄 또는 중쇄 가변 영역이 인간 서열의 라이브러리로 대체된) 전장의 쇠 라이브러리 및/또는 (마우스 Fab의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 일부분이 인간 서열의 라이브러리로 대체된) 카세트 라이브러리를 생성한다. 박테리아 분비 시스템을 사용하여 항체 Fab 단편으로서의 라이브러리의 구성원을 발현시키고, 라이브러리를 콜로니 리프트 결합 검정 (CLBA)을 사용하여 항원에 결합하는 Fab에 대해 스크리닝한다. 친화도가 가장 높은 클론을 확인하기 위해 양성 클론을 추가로 특징화한다. 이어서, 잔류 무린 서열과 관련하여 결합을 지지하는 것으로 확인된 인간 카세트를 최종 라이브러리 스크린에서 조합하여 완전한 인간 V 영역을 생성한다.

생성된 휴머니어드[®] 항체 Fab는 인간 라이브러리로부터 유래된 V-세그먼트 서열을 갖고, CDR3 영역 내에서 확인

된 짧은 BSD 서열을 보유하며, 인간 배선 프레임워크 4개 영역을 갖는다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 IgG 발현 벡터로 클로닝함으로써 상기 Fab를 완전 IgG로 전환시킨다. 상기 방법에서 생성된 휴머니어드[®] 항체는 모체 유린 항체의 결합 특이성을 보유하고, 전형적으로는 모체 항체와 동가이거나, 또는 그 보다 높은 항원 친화도를 가지며, 단백질 수준에서의 인간 배선 항체 유전자와 비교하여 고도의 서열 동일성을 갖는 V 영역을 포함한다.

[0348] 방법

[0349] 유린 항-GITR mAb MAB1 생성

[0350] 다중 부위에서의 반복적 면역화(Repetitive Immunization at Multiple Sites: RIMMS) (McIntyre GD. 하이브리도마 1997)를 필요로 하는 방법을 사용하여 인간 GITR의 N-말단 영역(aa 26-161)으로 Bcl-2 트랜스제닉 마우스(C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 웨이(wehi) 계통)를 면역화시킨 후, 고역가 마우스로부터 하이브리도마를 생성하였다. 하이브리도마 분비 MAB1을 확인하고, hGITR 결합 및 효능제 활성을 확인하기 위해 hGITR에 대한 샌드위치 ELISA 및 NF κ B 리포터 유전자 검정을 사용하여 선별하였다.

[0351] 유린 V 영역 스크리닝

[0352] 유린 모노클로날 MAB1로부터의 가변 영역 DNA를 표준 방법을 사용하여 하이브리도마 세포주로부터 수득된 RNA로부터의 RT-PCR에 의해 증폭시켰다. 중쇄 가변 영역을 HV3 (5'-GGGTCTAGACACCATGGCTGTCTGGGGCTCTCTTC-3' (서열식별번호: 95)) 및 HC불변 (5'-GCGTCTAGAACTCCACACAGRRCCAGTGGATAGAC-3' (서열식별번호: 96))을 이용하여 MAB1 cDNA로부터 증폭시켰다. 경쇄 가변 영역을 LV3 (5'-GGGTCTAGACACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA-3' (서열식별번호: 97)) 및 LC불변 (5'-GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' (서열식별번호: 19))을 이용하여 같은 cDNA로부터 증폭시켰다. 가변 중쇄 및 경쇄 생성물을 pcDNA3.1 벡터 내로 삽입하고, 서열을 확인하였다. 중쇄 및 경쇄 벡터를 PCR을 위한 주형으로서 사용하였고, 클로닝을 위한 제한 효소 부위를 칼로바이오스 벡터 내로: Vh를 KB1292-His (CH1 상의 아미노산 서열 AAGASHHHHHH (서열식별번호: 13)의 6-His 태그 (서열식별번호: 11) 및 C-말단 가요성 링커를 코딩하는 KB1292의 변형된 버전) 내로 NcoI (5') 및 NheI (3')에; Vk를 KB1296 내로 NcoI (5') 및 BstXI (3')에 도입하였다. 이어서, BssHII 및 ClaI를 이용한 제한 소화 및 라이게이션에 의해 상기 별개의 중쇄 및 경쇄 벡터를 단일의 디시스트론성 칼로바이오스 Fab 발현 벡터로 조합하였다. Fab 단편을 E. 콜라이에서 상기 벡터로부터 발현시켰다. 상기 Fab를 hGITR-항원 결합에 대해 시험하였고, 이를 MAB1rFab로 지칭한다.

[0353] Fab 정제

[0354] 칼로바이오스 발현 벡터를 사용하여 E. 콜라이로부터의 분비에 의해 Fab 단편을 발현시켰다. 세포를 OD500가 ~0.6이 될 때까지 2 x YT 배지 중에서 성장시켰다. IPTG를 100 μ M까지 첨가하고, 33°C에서 4시간 동안 진탕시켜 발현을 유도하였다. 표준 방법에 따라 삼투성 용해 및 Ni-NTA 칼럼 히스트랩(HisTrap) HP 칼럼 (GE 헬스케어(GE Healthcare) 카탈로그 번호 #17-5247-01)을 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 주변 분획으로부터 어셈블리된 Fab를 수득하였다. 500 mM 이미다졸을 함유하는 완충제 중에서 Fab를 용리시키고, 칼슘 및 마그네슘을 함유하지 않는 PBS (pH 7.4)에 대하여 완전하게 투석하였다.

[0355] 라이브러리 구축

[0356] 인간 GITR 결합에서 BSD-FR4를 지지하는 상보성 인간 CDR을 확인하기 위해 복잡성을 제한하기 위한 목적으로, 모체 유린 V-세그먼트 중 일부분만이 인간 서열의 라이브러리로 대체된 카세트 라이브러리 접근법을 취하였다. 원래의 유린 MAB1 Vk가 인간 배선 VkIII와 가장 유사한 바, 이에, Vk 카세트 라이브러리를 제조하는 데 VkIII 배선을 함유하는 두 칼로바이오스 라이브러리 (KB1423 및 KB1424)의 혼합물을 사용하였다. VH3 배선을 함유하는 칼로바이오스 라이브러리 (KB1413, KB1414)를 사용하여 Vh 카세트 라이브러리를 구축하였다. 중첩 PCR에 의해 2가지 유형의 카세트를 구축하였고: FR1, CDR1 중 인간 서열을 함유하는 전단 카세트 (8C1VK3FE-01, 및 MAB1VH3FE-01), 및 FR3 중 인간 서열을 함유하는 FR2, 및 FR3 카세트 (MAB1VK3FR3-01, 및 MAB1VH3FR3-01)를 상기 언급된 배선 한정 칼로바이오스 라이브러리를 사용하여 증폭시켰다. 각 Vh 카세트 라이브러리를 벡터 KB1292-His 내로 NcoI (5') 및 KpnI (3')에 클로닝하였고; 각 Vk 카세트 라이브러리를 벡터 KB1296-B (침묵 HindIII 부위가 FR4에 추가된, 칼로바이오스 벡터 KB1296의 변형된 버전) 내로 NcoI (5') 및 HindIII (3')에 클로닝하였다. 이어서, BssHII 및 ClaI로 소화시키고, 이어서, 라이게이션시켜 생성된 Vh 또는 Vk 플라스미드 라이브러리를 최적화된 참조 Fab로부터의 상보성 쇄 (MAB1opVK 또는 MAB1 opVH)와 조합하여 (예컨대, Vh 전단 라이브러리 최적화된 참조 Vk 벡터와 조합하여) 전장의 Fab를 발현하는 디시스트론성 벡터의 라이브러리를 생성

하였다.

- [0357] 어떤 VH3 전단 클론도 인간 GITR에 고친화도로 결합하지 않았고, 따라서, 제2 VH3 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-02)를 구축하였다. 상기 라이브러리는 모든 위치에 모체 뮤린 잔기 또는 선택된 인간 배선 잔기를 코딩하는 인간 서열을 FR1, FR2, 및 CDR2 콜렉션에 함유한다. 상기 라이브러리의 FR3 영역 서열은 VH3FR3 라이브러리 (MAB1VH3FR3-01)로부터 선별된 6개의 클론으로부터의 것이었다.
- [0358] VK 전단 및 VKFR3 카세트 라이브러리로부터의 클론을, 모든 위치의 모체 뮤린 또는 선택된 인간 배선 잔기를 코딩하는 돌연변이원성 VK CDR2와 조합하여 최종의 Vk 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1VK3FCL-01)를 구축하였다. 생성된 Vk 전장의 쇠 라이브러리를 KB1296b로 *NcoI* 및 *HindIII* 부위에 클로닝하였다. 상기 VK 전장의 쇠 라이브러리를 다수의 선별된 VH3FR3 라이브러리 클론과 쌍형성하여 기능성 Fab를 발현시키고, CLBS에 의해 스크리닝하였다. 인간 GITR 특이적 ELISA에 의해 항원 특이적 클론을 확인하고, 항원 친화도 적정 ELISA에 의해 등급화하였다. 각 위치에 모체 뮤린 또는 인간 잔기를 함유하는 CDR2 서열의 콜렉션을 포함하는 제2의 VH3 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-02)로부터 선별된 클론을 사용하여 VH3 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1VH3FCL-01)를 생성하였다. 상기 VH 전장의 쇠 라이브러리를 KB1292-his로 *NcoI* 및 *KpnI* 부위에 클로닝하였다. 최종의 전장의 쇠 인간 Fab 발현 라이브러리를 수득하기 위해, 선별된 VK 전장의 쇠 클론을 *BssHII* 및 *Clal* 부위에서 VH 전장의 쇠 라이브러리와 조합하였다.
- [0359] 일반 ELISA
- [0360] 제조합 인간 GITR 및 인간 Fc 융합 단백질 (hGITR-hFc)을 모든 ELISA 검정을 위해 사용하였다. 전형적으로, PBS (pH 7.4)에 희석된 hGITR-hFc 항원을 4℃에서 밤새도록 인큐베이션시켜 96웰 마이크로타이터 플레이트에 200 ng/웰로 결합시켰다. PBST로 3회에 걸쳐 세정한 후, 플레이트를 37℃에서 1시간 PBS 중 1% BSA 용액으로 차단한 후, PBST로 1회에 걸쳐 세정하였다. 이어서, Fab-함유 세포 배지 또는 희석된, 정제된 Fab (50 μ l)를 각 웰에 첨가하였다. 37℃에서 1시간 동안 또는 4℃에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 PBST로 3회에 걸쳐 세정하였다. PBST (50 μ l) 중에 1:5,000으로 희석된 항-인간-카파 쇠 HRP 접합체 (시그마(Sigma) #A7164)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 45 min 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBST로 3회에 걸쳐 세정한 후, 100 μ l의 슈어블루(SureBlue) TMB 기질 (KPL #52-00-03)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 약 10 min 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 분광광도계에서 650 nm에서 판독하였다.
- [0361] 친화도 적정 ELISA
- [0362] 선별된 Fab 생산 클론의 항원 결합을 평가하기 위하여, 친화도 적정 ELISA를 개발하였다. 상기 검정은 염소 항-인간 Fab (잭슨 이뮤노리서치 랩(Jackson ImmunoResearch Lab) #109-005-097) 포획 및 염소 항-인간 카파 (시그마 #A7164) 검출을 사용하여 세포 배양 배지 중 Fab 농도를 측정하여 제2 항원 적정에 사용되는 Fab의 양을 정규화하는 제1 ELISA; 일반 항원 특이적 ELISA가 동량의 출발 Fab를 사용하여 항원 결합 희석 곡선을 생성하는 제2 ELISA인 것인, 두 연속 ELISA 단계를 조합한다. 상이한 클론의 희석 곡선을 비교하여 고친화도 클론을 확인한다.
- [0363] 콜로니 리프트 결합 ELISA (CLBA)
- [0364] PBS (pH 7.4) 중 2.0 μ g/mL의 hGITR-hFc로 코팅된 니트로셀룰로스 필터를 사용하여 본질적으로 (미국 특허 공개 2005/0255552 및 2006/0134098)에 기술된 바와 같이 Fab 단편의 휴머니어드® 항체 라이브러리의 스크리닝을 수행하였다. 항원 코팅된 필터에 결합한 Fab를, PBST 중 1:5,000으로 희석된 염소 항-인간 카파 쇠 HRP 접합체 (시그마 #A7164)를 사용하여 검출하고, ECL + 웨스턴 블롯팅 검출 시스템 (GE 헬스케어 #RPN2132)으로 블롯을 현상시켰다.
- [0365] MAB4 중 당화 부위 제거
- [0366] 리신을 아르기닌으로 대체하여, 또는 리신을 아르기닌으로 및 히스티딘을 아스파라긴으로 대체하여 MAB4 중쇄의 FR3 및 CDR3의 접합부 중의 당화 부위 "KH"를 제거하였다. KH에서 RH으로의 및 KH에서 RN으로의 전환은 DNA 주형으로서 p50H 플라스미드를 사용하여 PCR 기반 돌연변이유발법에 의해 달성하였다. 역방향 프라이머 (TCTGGCGCAGTAATACACGGCC, 서열식별번호: 110)는 리신 대신 아르기닌을 도입하고; 정방향 프라이머 (NNKGCTATGGCCATGATGGCG, 서열식별번호: 111)는 히스티딘 부위에 축퇴성 NNK 트리뉴클레오타이드를 가졌다. 50 μ l 반응 부피 중 100 ng의 주형, 0.2 μ M의 각 프라이머, 200 μ M dNTP, 및 2.5 U pfuUltraII DNA 폴리머라제 (스트라테젠(Stratagene))를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 3 min 동안 1 사이클; 94℃에서 15초, 52℃에서 20초, 및 65℃에서 5분 동안 30 사이클; 및 마지막으로, 72℃에서 5분 동안 1 사이클이

었다. DpnI (2 U)를 PCR 반응에 첨가하고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션시켜 주형 p50H를 제거하였다. 증폭된 MAB4 중쇄 변이체를 1% SYBR 겔에 의해 분리시키고, 퀴아젠 겔 정제용 키트(Qiagen Gel Purification 키트)를 사용하여 정제하였다. 겔 정제된 PCR 생성물을 T4 DNA 폴리뉴클레오타이드 키나제로 처리하고, 라이게이션시키고, 암피실린 선별을 사용하여 DH5 α 화학적으로 적격인 세포 (인비트로젠)로 형질전환시켰다.

[0367] 정방향 (GCCTTTCTCTCCACAGG, 서열식별번호: 112) 및 역방향 (GGCAACAACAGATGGCTGG, 서열식별번호: 113) 프라이머를 사용하여 고태크클리어(GoTaqClear) 프로토콜 (프로메가(Promega))에 따라 콜로니 PCR에 의해 MAB7 및 MAB8 중쇄를 호스팅하는 클론을 선별하였다. PCR 조건은 94℃에서 3분 동안 1 사이클; 94℃에서 10초, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초 동안 25회; 및 마지막으로, 72℃에서 5분 동안 1 사이클이었다. 엑소뉴클레아제 I(Exonuclease I) 및 쉬림프 알칼리성 포스파타제(Shrimp Alkaline Phosphatase)와 함께 37℃에서 30분 및 80℃에서 15분 동안 샘플을 인큐베이션시켜 서열분석을 위해 PCR 반응물을 세정하였다. PCR 샘플을 서열분석하고, 클론 매니저(Clone Manager) 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

[0368] 항체 생산 및 정제

[0369] 293펙틴(293fectin) 형질감염 시약 (인비트로젠 #51-0031)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 293 프리스타일(Freestyle) 세포로 하기 벡터를 공동 형질감염시킴으로써, 생성된 항체 MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7 및 MAB8 (IgG1 카파)을 제조하였다.

[0370] MAB2 - p35H + p35카파

[0371] MAB3 - p38H + p38카파

[0372] MAB4 - p50H + p35카파

[0373] MAB5 - p51H + p35카파

[0374] MAB6 - p56H + p35카파

[0375] MAB7 - pMAB7H + p35카파

[0376] MAB8 - pMAB8H + p35카파.

[0377] 5-mL 하이트랩 단백질 A HP 칼럼 (GE 헬스케어 #17-0403-03)을 사용하여 293 프리스타일 세포 상청액으로부터 항체를 정제하였다. IgG 용리 완충제 (피어스(Pierce) #21004)를 사용하여 항체를 용리시키고, 투석에 의해 완충제를 PBS로 교체하였다. AKTA-FPLC liquid 크로마토그래피 system (GE 헬스케어) 상에서 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 수행하였다.

[0378] 특이성 ELISA

[0379] 특이성 ELISA를 위해, TNFRSF 패밀리의 구성원을 발현하는 박테리아로부터 조 세포 용해물을 제조하였다. 플레이트에의 비특이적 결합을 막기 위해, 박테리아 용해물 1 mL당 50 μ L의 5% BSA를 첨가하였다. 웰당 100 μ L의 용해물/BSA로 박테리아 용해물을 사용하여 TNFRSF로 히스그랩 니켈(HisGrab Nickel) 96웰 플레이트 (피어스 #15142)를 코팅하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3회에 걸쳐 세정한 후, MAB를 PBS 중 10% FBS에 0.5 μ g/mL로 희석시키고, 100 μ L씩 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBST로 3회에 걸쳐 세정하였다. HRP에 접합된 항-인간 카파 항체 (시그마 #A7164)를 1:1 PBST:PBS 중 10% FBS 중에 1:5,000으로 희석시키고, 100 μ L씩 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBST로 3회에 걸쳐 세척하였다. 100 μ L의 슈어블루 TMB 기질을 각 웰에 첨가하고, 100 μ L/웰의 2 N H₂SO₄로 반응을 정지시키기 이전에 실온에서 약 10 min 동안 플레이트를 인큐베이션시켰다. 플레이트를 분광광도계에서 450 nm에서 판독하였다.

[0380] ELISA (GITR 결합(binind), 중 교차 반응성, 알라닌 스캐닝)

[0381] 50 ng/웰로 래트, 마우스, 인간 또는 시노 GITR 세포외 도메인 (ECD)으로 코팅되고, 4℃에서 밤새도록 인큐베이션된 384웰 플레이트를 사용하여 다양한 중, 다양한 알라닌 돌연변이체 구축물 또는 GITR 세포외 도메인으로 부터의 GITR에의 MAB의 결합을 평가하였다. 플레이트를 PBS 중 1% BSA 용액으로 실온에서 1시간 동안 차단한 후, PBST로 3회에 걸쳐 세정하였다. 이어서, MAB를 PBS 중에 0.5 μ g/mL 또는 1 μ g/mL로 희석하고, 20 μ L씩 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBST로 3회에 걸쳐 세척하였다. 항-인간 카파 항체 (시그마 #A7164), 항-인간 감마 항체 (잭슨 이뮤노리서치 109-036-098), 염소 항-마우스 항체 (잭슨 이

뉴노리서치 115-035-071) (HRP에 접합)를 차단용 완충제 (25 μ l) 중에 1:5,000으로 희석하고, 각 웰에 첨가하거나, 차단용 완충제 중에 1:1,000으로 희석된 hrp 접합된 HIS 항체 (QIAGEN 1014992)를 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBST로 6회에 걸쳐 세척하였다. 25 μ l의 슈어블루 TMB (KPL 52-00-02) 기질을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 약 10 min 동안 플레이트를 인큐베이션시켰다. 플레이트를 분광광도계에서 650 nm에서 판독하였다.

[0382] 세포주, 세포

[0383] 세포주

[0384] 293-hGTR-NF κ B 리porter 유전자 세포주를 생성하기 위해, 293 세포를 NF κ B-루시페라제 리porter 유전자 및 인간 GTR (또는 시노 GTR)로 안정하게 형질감염시켰다. GTR-L 또는 효능작용 항체와의 24시간 동안의 인큐베이션 후, 세포내에서 유도된 루시페라제 수준을 측정함으로써 상기 세포에서의 GTR 신호전달 경로의 활성화를 측정하였다. 교차 결합 Ab의 효과를 평가하기 위해, 리porter 유전자 검정에서 사용하기 전에 과량의 F(ab')₂ 염소 항-인간 Fc γ 단편 특이적 항체 또는 단백질 A와 함께 인큐베이션시켰다.

[0385] 인간 면역 세포 상에서 관찰되는 수준의 GTR을 발현하는 클로날 다우디(Daudi) 세포주를 생성하였다.

[0386] 시노물구스 원숭이 PBMC를 제조하고, MAB를 사용하여 GTR 결합을 측정하였다. 간략하면, 시노물구스 혈액을 50 mL 원뿔형 튜브 (팔콘(Falcon), #352098)로 옮겨 놓고, 이어서, PBS (하이클론(HyClone), #SH30256.01) 중에 1:2로 희석하고, 혼합하였다. 희석된 혈액을 18 mL의 90% 피콜 플라크 플러스(Ficoll Paque PLUS) (PBS 중에 희석된 GE 헬스케어 #17-1440-03) 위에 조심히 놓아 층상을 만들고, 브레이크 없이 실온에서 30분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 2,000 x g로 회전시켰다. 피콜 상의 확산 PBMC 층을 건드리지 않으면서, 혈장 층을 조심히 제거하였다. 이어서, PBMC를 수거하고, 원뿔형 튜브 중의 부피가 45 mL가 될 때까지 PBS를 단리된 PBMC에 첨가하고, 혼합한 후, 실온에서 15분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 300 x g로 회전시켰다. 상청액을 조심히 흡인하고, 4 mL의 1x BD 용해용(Lysing) 용액 (BD #555899)을 첨가하고, 샘플을 온화하게 와동시켰다. 암실 실온에서 3분 동안 인큐베이션시킨 후, 40 mL의 PBS를 각 샘플에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 200 x g로 회전시켰다. 상청액을 조심히 흡인하고, 펠릿을 45 mL의 PBS 중에서 2회에 걸쳐 세척한 후, 실온에서 10분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 200 x g로 회전시켰다. 생성된 펠릿을 여과하고, 페니실린/스트렙토마이신/글루타민 (하이클론 #SV30082.01)으로 보충된 CTL 시험 배지 (CTLT-005) 중에 1 x 10⁶개의 세포/mL로 재현탁시켰다. 100 μ l의 정제된 시노물구스 PBMC를 96웰 둥근 바닥 플레이트 (코닝(Corning), #3799)에 놓았다. PBMC를 활성화시키기 위해, SP34-2/CD28.2 항체에 접합된, 100 μ l의 M-280 토실활성화된 다이아비즈(dynabeads) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies) #142.04)를 각 웰에 첨가하였다. 3:1 비의 CD3/CD28 비즈 대 PBMC를 사용하였고, 플레이트를 48시간 동안 37°C 조직 배양 인큐베이터에서 인큐베이션시켰다. 0일째 염색을 위해, 200 μ l의 PBMC를 96웰 둥근 바닥 플레이트 (코닝, #3799)에 놓았다. 48시간 동안 자극시킨 샘플의 경우, 100 μ l의 상청액을 조심히 제거하고, 웰의 남은 내용물은 조심히 재현탁시키고, 200 μ l를 FACS 염색 플레이트로 옮겨 놓았다.

[0387] FACS

[0388] 200 μ l의 냉 PBS 중에 재현탁된 세포를 이용하여 플레이트를 제조하였다. 라이브/데드(LIVE/DEAD) 고정가능 염료 (라이프 테크놀로지스 #L23105)를 50 μ l의 DMSO 중에서 재구성하고, 냉 PBS 1 mL당 1 μ l의 재구성된 염료를 첨가하고, 세포 펠릿을 즉시 100 μ l의 라이브/데드 PBS 용액 중에 재현탁시키고, 차광 상태로 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 세척하고, 2 μ g/mL의 MAB7 또는 이소형 인간 IgG1 대조군 항체를 함유하는 100 μ l의 냉 FACS 완충제 중에 재현탁시키고, 플레이트를 차광 상태로 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 100 μ l의 항체 각테일 (FACS 완충제 (잭슨 이뮤노 #109-116-098) 중 PerCP Cy5.5 항-인간 CD3 (BD #552852), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 700 항-인간 CD4 (BD #560836), V450 항-인간 CD8 (BD #561426), PE-Cy7 항-인간 CD25 (BD #561405) 및 PE 항-인간) 중에서의 세척 및 재현탁 후, 이어서, 플레이트를 차광 상태로 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 4°C에서 1분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 3,200 RPM으로 회전시켰다. 세포를 FACS 완충제 중에서 세척한 후, 100 μ l의 BD 시토픽스(CytoFix) (BD #554655) 중에 재현탁시키고, 플레이트를 차광 상태로 실온에서 15분 동안 인큐베이션시킨 후, 2회 세척하고, 100 μ l의 FACS 완충제 중에 재현탁시켰다. 플레이트를 호일 (베크만 쿨터(Beckman Coulter), #538619)로 커버링하고, 판독이 준비될 때까지 4°C에서 보관하였다. FACS 판독 당일, 플레이트를 1분 동안 벤치 탑 원심분리기에서 3,200 RPM으로 회전시키고, FACS 완충제 중 4 x 10⁵/mL의, 50 μ l의 CML 라텍스 비드 (라이프 테크놀로지스 #C37259)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 BD

포르테사(BD Fortessa) 유세포 분석기 상에서 판독하고, 플루오조(FlowJo)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0389] 트랜스제닉 마우스

[0390] 마우스 GITR의 전체 코딩 서열 (엑손 및 인트론)을 인간 GITR cDNA 서열로 대체함으로써 hGITR 녹-인 마우스를 생성하였다. 출발 코돈 상류 및 정지 코돈 하류의 비번역 서열은 마우스 게놈으로부터의 것이다. BALB/c 유래 상동성 아암을 보유하는 표적화 벡터를 사용하여 BALB/c ES 세포에서 표준 기법에 의해 유전자 표적화를 수행하였다. 수개의 ES 세포 클론을 PCR에 의해 확인하고, 정확한 인간 cDNA 녹인을 함유하는지 써던 블롯팅에 의해 확인하였다. 표준 마우스 배발생학 기술을 사용하여, 양성 ES 세포 클론을 배반포에 주사하고, 가임신 수용 위탁모로 옮겨 키메라 자손을 유도하였다. 수컷 키메라 마우스를, 네오마이신 내성 카세트 플랭킹된 loxP를 잘라내기 위해 그의 배선에서 Cre 리코비나제를 발현하는 BALB/c 암컷을 교배시켰다. 한 클론을 통해 백색 자손을 얻었는데, 이는 표적화된 ES 세포의 배선 전달을 시사하는 것이다. PCR 유전자형 분석에 의해 loxP 플랭킹된 카세트가 잘렸는지 확인하였다. 이어서, BALB/c wt 마우스와의 후속 브리딩 단계를 거쳐 Cre 리코비나제를 제거하였다.

[0391] 마우스의 엑손 1의 코딩 부위를 인간 GITRL cDNA 서열, 이어서, 소 성장 호르몬 폴리-A 신호로 대체하여 hGITRL 녹-인 마우스를 생성하였다. 모든 ES 세포 작업 및 마우스 배발생학적 과정을 상기 기술된 방법과 유사하게 수행하였다. 동형 접합성 이중 녹-인 마우스를 생산하는 2 세대를 위해 2마리의 시조 세포주를 이중 교배시켜 hGITR-hGITRL 이중 녹-인 마우스를 생성하였다.

[0392] 기능 검정

[0393] MAB의 기능 활성을 NFkB 리포터 유전자 검정에서 효능제 활성에 대하여 시험하였다. MAB를 PBS 중에 6 µg/mL로 희석하고, 3배 과량의 F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 Fcγ 특이적 가교제의 존재/부재하에 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 대안적으로, MAB를 PBS 중에 6 µg/mL로 희석하고, 2배 과량의 단백질 A의 존재/부재하에 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 10 µL의 인큐베이션된 MAB를 384 웰 흰색 투명한 바닥 검정 플레이트에 첨가하였다. hGITR 및 NFkB 리포터 유전자로 안정하게 형질감염된 HEK-293 세포주를 5 x 10⁵개의 세포/mL로 희석하고, 20 µL의 세포 현탁액을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 조직 배양 인큐베이터에서 인큐베이션시켰다. 30 µL의 셀 브라이트 글로(Cell Bright Glo)를 각 웰에 첨가하고, 어퀘스트(Acquest) 상에서 발광에 대해 플레이트를 판독하였다.

[0394] HEK293 NFkB 리포터 모체 세포를 사용하여 리간드 결합을 차단할 수 있는 MAB의 능력을 평가하였고, hGITR 안정 세포를 경쟁 결합 검정 및 FACS 분석에서 사용하였다. 간략하면, 수거된 세포를 96웰 둥근 바닥 FACS 플레이트(코닝)에 100 µL/웰, 1x10⁶개의 세포/mL로 플레이팅한 후, 이어서, 웰당 200 µL의 냉 FACS 완충제(1X PBS + 1% FBS-HI + 0.1% 소듐 아지드) 중에 재현탁시켰다. 100 µL/웰 FACS 완충제 중 270 nM 내지 1.52 µM으로 인간 GITR 리간드 적정을 준비하였다. 플레이트를 차광 상태로 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 세포를 세척한 후, 제조된 4 nM 이소형 대조군 또는 MAB 용액을 제조하고, 100 µL/웰로 적절한 웰에 첨가하고, 플레이트를 차광 상태로 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 세포를 세척한 후, FACS 완충제 중 1:100 희석액으로 제조된 PE-접합된 염소-항-인간 검출 항체(잭슨 이뮤노리서치)를 100 µL/웰로 첨가하고, 플레이트를 차광 상태로 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 FACS 완충제 중에서 세척하고, 세포를 100 µL/웰의 BD 시토픽스(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))로 고정시키고, 차광 상태로 얼음 상에서 추가로 15분 동안 인큐베이션시켰다. 고정된 세포를 2회 세척하고, FACS 완충제 웰당 150 µL의 최종 부피로 재현탁시키고, 샘플을 1주 이내에 BD 포르테사 유세포 분석기(BD 바이오사이언시스(BD Bioscience)) 상에서 분석하였다.

[0395] MAB의 효능제 활성 또한 1차 T 세포로부터의 증식 및 시토카인 분비를 통한 내인성 수준의 GITR을 발현하는 1차 T 세포 상에서 관찰할 수 있었다. MAB를 제조사의 설명에 따라 M-280 토실활성화된 비드(인비트로젠 #142.04) 상에 접합시켰다. 일부 실시양태에서, 효능제 CD3(OBT3) 및 CD28(CD28.2) 항체 또한 비드에 접합시켰다. 1 x 10⁵개의 새로 정제된 CFSE-표지된 인간 PBMC를 96웰 둥근 바닥 조직 배양 플레이트 내 10 µL의 CTL 시험 배지(CTL #CTLW-010)에 플레이팅하였다. 이어서, 100 µL의 MAB 접합체된 비드를 1 T 세포:1 비드인 비로 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 37°C 조직 배양 인큐베이터에서 3일 동안 인큐베이션시켰다. MSD 다중 검정을 사용하여 제조사의 설명에 따라 배지 중 분비된 시토카인의 수준을 측정하였다. 염색되는 세포를 고정시킨 후, 세포를 항-CD4, -CD8a, -CD25, -GITR 항체 및 라이브/데드 염료로 염색하고, 유세포 분석기 상에서 판독하였다. CFSE 염색 염색체 의해 각 CD4 및 CD8 세포의 증식을 평가하고, 샘플을 정규화할 수 있도록 FACS 판독 이

전에 계수용 비드를 첨가하였다.

[0396] IFN γ 검출용 ELISpot 방법을 사용하여 T 세포 상의 MAB의 공동 자극 활성 또한 측정하였다. 간략하면, 70% 에탄올로 2분 동안 코팅한 후, 이어서, PBS로 세척하고, PBS (맵테크(Mabtech) 3321-3) 중 50 ug IFN γ 모노클로날 항체와 함께 밤새도록 인큐베이션시켜 ELISPOT 플레이트 (밀리포어(Millipore) MSIPS4510)를 제조하였다. 투약 후 15일째 비히클 또는 MAB7로 처리된 마우스의 비장으로부터 정제된 CD8 $^{+}$ T 세포를 분리시켰다. T 세포를 CTL 배지 (CTL 시험 배지 (CTL CTLT-005), 1 mM Hepes (메디아테크(Mediatech) MT25-060-C1), 2mM L-글루타민 (메디아테크 MT25-005-C1), 1 mM 피루브산 나트륨 (메디아테크 MT25-000-C1), 100uM MEM 비필수 아미노산 (메디아테크 MT25-025-C1), 66 uM 2-메트캅토에탄올 (기브코(Gibco) 21985-023), 100U/mL Pten/Strep (기브코 10378016) 중에 웰당 0.25x10⁶개의 세포로 코팅된 ELISPOT 플레이트에 플레이팅하였다. Colon26 세포를 37°C에서 48시간 동안 10% ConA sup (BD 바이오사이언시스 354115)로 처리하여 MHC 부류 II 발현을 상향조절시키고, T 세포에 첨가하기 이전에 CTL 배지로 세척하였다. Colon26 종양 세포 (20,000/웰)를 CTL에 첨가하고, 37°C에서 24-48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 0.05% 트윈-20/PBS로 세척하고, 10 ug의 비오틴일화된 항-IFN γ Mab (맵테크 R4-6A2-비오틴)를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 0.05% 트윈-20/PBS로 세척하고, 벡타스테인(Vectastain) ABC 용액 (벡터 랩스(Vector Labs) PK6100)을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 0.05% 트윈-20/PBS로 세척하고, 제조사의 프로토콜에 따라 제조된 AEC 기질 (시그마 A6926)을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 4분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 수돗물로 세정하고, 건조시키고, 판독 전 암실에서 24시간 동안 보관하였다.

[0397] 리포터 검정을 사용하여 ADCC를 유도할 수 있는 MAB의 능력을 측정하였다. 96웰 백색 플레이트 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer) F6178)에서, 50 uL의 RPMI + 10% FBS 중에서 2 x 10³개의 hGTR-다우디 세포를 (인간 Fc γ RIIIa의 V158 변이체 및 NFAT 리포터를 안정하게 발현하는) 4 x 10⁴개의 주르카트(Jurkat)-V158 세포와 함께 1 다우디 세포 대 20 주르카트 세포인 비로 인큐베이션시켰다. 동일 부피의 MAB를 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C 조직 배양 인큐베이터에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 60 uL의 브라이트 글로를 각 웰에 첨가하고, 발광측정기 상에서 플레이트를 판독하였다.

[0398] 마우스로부터 분리된 비장을 사용하여 시험관내 비장세포 검정을 수행하였다. 간략하면, 젠틀MACS 옥토 해리기(gentleMACS Octo Dissociator) (밀테니이 바이오테크(Miltenyi Biotech) 130-095-937) 상에서 젠틀MACS C 튜브 (밀테니이 바이오테크 130-096-334) 상에서 5% BSA (밀테니이 바이오테크 130-091-376)를 함유하는 5 mL 오토MACS 세정액(AutoMACS Rinsing Solution) (밀테니이 바이오테크 130-091-222) 중에서의 자동 균질화에 의해 마우스로부터의 비장을 해리시켰다. 균질액을 공극 크기가 0.70 uM인 세포 스트레인너 (피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) 22363548)를 통해 거르고, 10 mL 오토MACS 완충제로 세척하였다. 비장세포를 재현탁시키고, 96웰 조직 배양 플레이트 (코스타(Costar) 3799)에서 RPMI (하이클론 SH30027.02) + 10% 인간 혈청 (셀그로(Cellgro) 35-060.C1) + 1x Pen/Strep/L-Glut (기브코 15 140-112)에 100,000개의 세포/웰로 플레이팅하였다. T 세포를 자극시키기 위해, 0.4 ug/mL의 항-마우스 CD3 (e바이오사이언스(eBioscience) 16-0031-86) 및 0.8 ug/mL의 항-마우스 CD28 (e바이오사이언스 13-0281-86) 항체를 적절한 웰에 첨가하였다. 48시간 후, 세포를 즉시 분석하거나, 또는 30분 내지 96시간 동안 대조군 또는 치료학적 항체로 펄싱하고, 형광단-접합된 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.

[0399] 유동 세포측정법: 표면 마커를 위해, 세포를 4°C에서 30분 동안 항-CD19 (BD 바이오사이언시스 562291), 항-CD8 (바이오레전드(Biolegend) 100725), 항-CD4 (e바이오사이언스 25-0041), 항-CD69 (BD 바이오사이언시스 561238), 항-hGTR (밀테니이 바이오테크 130-092-895) 및 항-hIgG (라이프 사이언시스(Life Sciences) A-10631) 항체로 염색하였다. 세포내 염색을 위해, 세포 표면 항체와 함께 인큐베이션시킨 후, 세포를 세척하고, 제조사의 프로토콜에 따라 FOXP3 Fix/Perm 완충제 (바이오레전드 421403)로 고정 및 투과시키고, 4°C에서 30분 동안 항-포스포-INKa/b 항체 (셀 시그널링(Cell Signaling) 2697) 또는 항-FOXP3 항체 (e바이오사이언스 50-4774-42)와 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 BD FACS디바(BD FACSDiva) 소프트웨어 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 BD LSR포르테사 유세포 분석기 상에서 판독하고, 플로우조 소프트웨어 (트리스타 인크.(TreeStar Inc.))를 사용하여 유동 데이터를 분석하였다.

[0400] 종양 및 비장으로부터 단일 세포 현탁액을 생성하고, 유동 세포측정법에 의한 분석을 위해 염색하였다. 예를 들어, 세포 마커를 하기 항체를 사용하여 평가하였다: a-CD8-BUV395 (클론 53-6.7, BD 바이오사이언시스 563786), a-CD19-APC-Cy7 (클론 6D5, 바이오레전드 115530), a-CD3-PerCp (클론 145-2C11, BD 바이오사이언시스

553067), a-PD-1-PE-Cy7 (클론 RMP1-30, 바이오레전드 109110). BD LSR포르테사 유세포 분석기 상에서 BD FACS디바 소프트웨어 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 유동 세포측정법을 수행하였다. 플로우조 소프트웨어 (플로우조 LLC)를 사용하여 세포 분석법 데이터를 분석하였다. 그래프를 작성하고, 프리즘 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software))를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 모든 데이터는 평균 \pm 표준 편차 (SD)로 제시하였다. 양측 95% 신뢰 구간으로 스튜던츠 t 검정을 사용하여 군 비교를 수행하였다. 모든 통계학적 평가를 위해, 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 달리 언급되지 않는 한, 비히클 대조군과 비교하여 유의도를 기록한다.

[0401] 생체내 종양 모델. Colon26 무린 결장 암종 세포주를 미국 국립 암 연구소(National Cancer Institute)의 암 치료 및 진단 부서(Division of Cancer Treatment and Diagnosis) (바이알: 0507238)로부터 입수하였다. 무린 Colon26 암종 세포를 10% FBS (기브코 10099-141), 10 mM HEPES (기브코 15630-080) 및 1 mM 피루브산 나트륨 (기브코 11360-070)으로 보충된 RPMI 1640 배지 (하이클론 SH30027.02)에서 배양하였다. 8-10주령된 암컷 hG1TR-hG1TRL 넉-인 마우스 옆구리에 100 μ L RPMI 중의 0.5×10^6 개의 Colon26 세포를 피하로 주사하였다. 디지털 캘리퍼스로 종양을 측정하고, 공식 $(L \times W^2)/2$ 를 사용하여 종양 부피를 계산하였다. 종양 평균 크기가 180 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 무작위화하고, 200 μ L PBS 중 비히클 (PBS) 또는 치료학적 항체 (15 mg/kg)를 복강내로 단일 주사하여 투약하였다. 치료학적 항체 투약 후 7일째, 유동 세포측정법에 의해 분석하기 위하여 마우스를 희생시키고, 종양을 수집하였다. 모든 동물 실험은 IACUC 승인을 받은 프로토콜을 사용하여 AAALAC 공인 시설에서 수행하였다. 양측 95% 신뢰 구간으로 스튜던츠 t 검정을 사용하여 또는 터키(Tukey) 보정으로 일원 ANOVA를 사용하여 프리즘 소프트웨어로 통계 분석을 수행하였다.

[0402] 대용 무린 G1TR Colon26 모델 검사. 6-8주령된 찰스 리버 랩스(Charles River Labs) 암컷 BALB/c 마우스를 실험 동물로서 사용하였다. 이식을 위해, 세포를 헝크스 1x 평형 염 용액(Hank's 1x Balanced Salt Solution) (하이클론 카탈로그 번호 SH30030.02) 중에 재현탁시키고, 28 g 니들 (100 ml 주사 부피)을 사용하여 우측 아래 쪽 옆구리에 피하 주사하여 이식시켰다. 이식 후, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위화하였다. 피하 주사에 의해 5 mg/kg의 IgG2a-DTA-1 또는 마우스 IgG2a 이소형 대조군을 마우스에 투약하였다. DTA-1 가변 영역 서열을 무린 IgG2a Fc 영역에 융합시켜 IgG2a-DTA-1을 생성함으로써, 클론 DTA-1인 래트 항-마우스 G1TR 항체 (S. 사카구치 (S. Sakaguchi), 교토 대학교(Kyoto University: 일본 교토))를 변형시켜 무린 키메라 IgG2a를 생성하였다.

[0403] 조합 요법. 대용 항-PD-1 항체 (래트, IgG2a RMP1-14, 바이오레전드)와 조합된, 대용 항-G1TR 항체 (마우스 IgG2a-DTA-1)의 생체내 활성을 평가하기 위해, 100 μ L 부피로 5×10^5 개의 Colon26 세포를 이용하여 잭슨 래보러토리즈(Jackson Laboratories: 미국 메인주 바 하버)로부터의 6-8주령된 암컷 BALB/cJ 마우스 우측 겨드랑이 위 부위에 피하로 이식하였다. 이식을 위해, Colon26 세포를 론자(Lonza)로부터의, 칼슘 및 마그네슘 무함유의 더블 베코스 PBS(Dulbecco's PBS) (17-512F) 중에 현탁시켰다. 이식 후 10일 경과하였을 때, 평균 \pm SEM 종양 부피가 115 $\text{mm}^3 \pm 7$ 인 마우스를 본 연구에 등록시켰다. 4개 군 중 하나 ($n = 10-16$ /군)로 무작위로 배정한 후, 2주 동안 주 1회로 하기 6에 기술된 바와 같이, 이소형 (1군), RMP1-14 (10 mg/kg, 2군), IgG2a-DTA-1 (5 mg/kg, 3군) 또는 RMP1-14 및 IgG2a-DTA의 조합 (각각 10 mg/kg 및 5 mg/kg, 4군)을 공동으로 마우스에 투약하였다. 0일째를 무작위화를 수행한 당일로서 정의한다. 이소형 대조군은 5 mg/kg의 mIgG2a (바이오레전드) 및 10 mg/kg의 래트 IgG2a (바이오레전드)를 함유하였다. IgG2a-DTA 및 그의 이소형 대조군 (mIgG2a)을 5 mg/kg으로 피하 주사를 통해 투약하였다. RMP1-14 및 그의 이소형 대조군 (rIgG2a)을 복강내 주사를 통해 투약하였다. 모든 처리에 대한 투약 부피는 10 mg/mL였다. 체중 및 종양 부피를 주당 2-3회에 걸쳐 수집하였다. 개체 동물을 종양 부피가 1,200 mm^3 이상에 도달할 때 종점을 달성한 것으로 스코어링하였다. 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 분석에 의해 평가된, 종점까지의 경과 시간 (TTE)의 중앙값의 변화에 기초하여 항-종양 활성을 기록하였다.

[0404] 조합 요법. 항-G1TR 또는 항-PD-1과의 조합으로 항-G1TR을 투여한 이후의 공동 자극성 분자의 발현을 평가하기 위해, G1TR (클론 IgG2a-DTA-1) 또는 항-PD1 (클론 RMP1-14) 또는 조합하여 항-G1TR+PD1을 1회 투약한 후, 전체 종양 및 비장의 단일 세포 현탁액을 유동 세포측정법에 의해 프로파일링하였다. mIgG2a를 대조군으로서 사용하였다. 종양 및 비장에서 전체 CD3+CD8+ T 세포의 백분율로서 LAG3, TIM3 및 PD-1 양성 세포를 평가하였다. P 값은 t 검정으로 계산된 값이다. * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.005$.

[0405] **결과**

[0406] *뮤린 및 참조 V 영역 아미노산 서열*

[0407] MAB1을 발현하는 하이브리도마 세포로부터의 RT-PCR 생성물을 서열분석하였고, 써모일렉트론 LTQ-오르비트랩 질량 분석계(ThermoElectron LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer)를 사용하여 상기 서열을 주로 (95% 이상) 단백질 수준으로 확인하였다. 이어서, 참조 Fab MAB1rFab를 생성하기 위해 MAB1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 칼로바이오스 벡터에 클로닝하였다. 참조 Fab 생성을 위해 칼로바이오스 벡터로 클로닝될 수 있도록 하기 위해서는 MAB1 중의 제1 아미노산을 아스파라긴 (N)에서 글루탐산 (E) 잔기로 변이시켜야 하는 바; 그러므로, MAB1rFab는 제1 VK 위치에 글루탐산을 갖는다. Fab MAB1rFab는 인간 불변 영역과 융합된 MAB1로부터의 무손상 뮤린 V 영역을 갖는다. MAB1rFab 이외에도, 최적화된 Fab인 MAB1opFab를 구축하였다. MAB1rFab 중 수개의 프레임워크 아미노산 잔기를 MAB1opFab 중 인간 배선 잔기로 변이시켰다.

[0408] *참조 및 최적화된 참조 Fab 친화도 분석*

[0409] FR1 및 FR3 중 최적화된 참조 MAB1opFab 내로 도입된 인간 배선 잔기는 인간 V-세그먼트 레퍼토리를 증폭시키는 데 사용된 PCR 프라이머에 의해 지정된 것이며, 따라서, 휴머니어드® 항체 V 영역 라이브러리의 모든 구성원에 존재한다. 인간 배선로의 변이 중 어느 것이 Fab 결합 특성을 변경시키는지 여부를 평가하기 위해 최적화된 참조 Fab를 구축한다. 비오틴화된 hGITR-hFc로 코팅된 스트렙타비딘 고 결합 바이오센서(Striptavidin High Binding Biosensors) 및 프로테마이오 옥테드 QK(ForteBio Octed QK) 시스템을 사용하여 MAB1rFab, MAB1opFab의 친화 상수 (K_a (1/Ms), K_d (1/s), 및 K_D (M))를 검정하였다. MAB1rFab와 비교하여, MAB1opFab의 K_d 는 매우 유사하였지만, K_a 는 5배 개선된 값을 보였고, 이는 MAB1rFab에서의 아미노산 변이가 허용된다는 것을 시사한다.

[0410] *휴머니어드®항체 Fab의 라이브러리 구축 및 선별*

[0411] VH3 및 VKIII으로 한정된 배선 패밀리의, 중쇄 및 경쇄 전단 및 FR3 카세트 라이브러리를 CLBA에 의해 생성하고, 스크리닝하였다. VK의 경우, 인간 GITR에의 결합을 지지하는 클론은 VK 전단 (MAB1VK3FE-01) 및 FR3 (MAB1VK3FR3-01) 카세트 라이브러리 둘 모두로부터 확인되었다. VH의 경우, 인간 GITR에의 결합을 지지하는 클론은 VH3 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-01)로부터가 아닌, FR3 카세트 라이브러리 (MAB1VH3FR3-01)로부터 확인되었다. VK 전단 및 FR3 카세트 라이브러리의 대다수의 구성원은 CLBA에서 양성을 띠기 때문에, 모든 위치의 모체 뮤린 또는 선택된 인간 배선 (VKIII L-16) 잔기를 코딩하는 돌연변이원성 VK CDR2와의 중첩 PCR에 의해 상기 두 라이브러리의 전체 레퍼토리를 사용하여 VK 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1VK3FcL-01)를 구축하였다. CLBA를 통해 VH3FR3 라이브러리 (MAB1VH3FR3-01)로부터 다수의 hGITR 양성 클론을 확인하고, 인간 GITR 특이적 ELISA에 의해 확인하였다. 그 중 6개를 사용하여 VK 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1Vk3FcL-01)와 쌍형성하여 기능성 Fab 발현 및 상기 라이브러리의 스크린이 이루어질 수 있도록 하였다.

[0412] VH 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-01)로부터는, 고 친화도로 hGITR에 결합하는 클론이 전혀 확인되지 않았는 바, 이어서, 제2 VH3 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-02)를 구축하였다. 상기 라이브러리는 선택된 6개의 VHFR3 클론으로부터의 CDR1 및 FR3 서열의 각 위치에 모체 뮤린 또는 인간 배선 (VH3 3-30) 잔기를 갖는다. VK 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1VK3FcL-01) 및 제2 VH 전단 라이브러리 (MAB1VH3FE-02), 둘 모두로부터 다수의 hGITR 결합체가 확인되었다. 상기 클론을 Fab-함유 세포 상청액 상에서 인간 GITR 특이적 ELISA 검정에 의해 확인하고, hGITR 친화도 적정 ELISA에 의해 등급을 순위화하였다.

[0413] hGITR 친화도 적정 ELISA에 기초하여, VK 전장의 쇠 라이브러리 (MAB1VK3FcL01)로부터 4개의 VK 전장의 쇠 클론이 선별되었고, MAB1VH3FE-02 라이브러리로부터 6개의 클론이 선별되었다. CDR2 중 각 위치에 MAB1 뮤린 또는 가장 유사한 인간 배선 (VH3 3-30) 잔기를 갖는 VH 전장의 쇠 라이브러리를 구축하는 데 6개 VH 클론을 백본으로 사용하였다. 상기 VH 전장의 쇠 레퍼토리를 4개의 VK 전장의 쇠 클론과 쌍형성하여 최종 인간 전장의 쇠 Fab 라이브러리를 형성하였다. CLBA를 통해 다수의 hGITR 결합 클론을 확인하였고, 이를, Fab 공급원으로서 각 배양 상청액을 사용하여 ELISA에 의해 확인하였다. DNA 서열 분석 및 hGITR 친화도 적정 ELISA 결과에 기초하여 5개의 인간 전장의 쇠 Fab 클론 (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, 및 MAB6)이 선별되었다.

[0414] *프로테마이오 옥테드 분석을 이용한, GITR 항원에 대한 휴머니어드® 항체 Fab의 친화도 검사*

[0415] 5개의 인간 전장의 쇠 Fab (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, 및 MAB6)를 발현시키고, 정제하였다. 이어서, 프로테마이오 옥테드 시스템을 이용하여 상기 인간 Fab의 결합 동역학적 성질을 최적화된 참조 Fab (MAB1opFab)의 동역학적 성질과 비교하였다 (수치 데이터는 하기 표 3에 요약되어 있다).

[0416] <표 3> 인간 GITR에 대한 Fab의 친화도

Fab	KD [M]
MAB1opFab (a)*	1.25E-8
MAB2 (a)	6.84E-9
MAB3 (a)	2.98E-9
MAB1opFab (b)*	6.59E-9
MAB4 (b)	2.43E-9
MAB5 (b)	3.74E-9
MAB1opFab (c)*	1.47E-8
MAB6 (c)	5.94E-9

[0417]

[0418] *a, b, c는 3회에 걸쳐 수행된 별개의 포르테 실험을 나타낸다. 본 결과는 두 샘플의 복제물의 전역 피팅이다.

[0419] 항체 MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6의 아미노산 서열 및 인간 배선 서열과의 동일성(%)

[0420] 5개의 Fab (MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6)의 가변 영역 아미노산 서열은 표 1에 제시되어 있다. Vh 및 Vk 아미노산 서열을 단일 배선 서열 (각각 VKIII L16/A27 및 VH3 3-30; 하기 표 4)에 대해 정렬함으로써 5개의 Fab의 인간 배선 서열과의 동일성(%)을 측정하였다. CDRH3 및 CDRL3 중의 잔기는 각 채로부터 계산하는 데 누락시켰다.

[0421] <표 4> 5개의 Fab의 인간 배선 서열과의 동일성(%)

Fab	VKIII L15/A27	VH3 3-30	Fv
MAB2	95%	86%	90%
MAB3	98%	85%	91%
MAB4	95%	85%	89%
MAB5	95%	83%	89%
MAB6	95%	82%	88%
MAB7	95%	85%	89%
MAB8	95%	85%	89%

[0422]

[0423] 인간 GITR 항원성 에피토프 보존

[0424] 간접 경쟁 ELISA에 의해 항원 에피토프 보존을 평가하였다. 5개의 Fab 모두 모체 마우스 항체 MAB1의 인간 GITR에의 결합을 차단하였는 데, 이는 상기 인간 Fab가 원래의 뮤린 항체의 에피토프 특이성을 보유한다는 것을 시사하는 것이다.

[0425] ELISA에 의한 MAB4 및 MAB5의 항원 특이성 분석

[0426] 모체 마우스 항체 MAB1의 항원 특이성이 IgG, MAB2, MAB3, MAB4 및 MAB5에 유지되는지 여부를 시험하기 위해, 항체의 인간 TNFR 패널에의 결합을 ELISA 검정으로 시험하였다. MAB4 및 MAB5를 이용하여 수행된 한 검정의 결과 (도 2c)는 뮤린 항체 MAB1과 유사하게 MAB4 및 MAB5가 GITR에 대해 높은 특이성을 보유한다는 것을 나타낸다. MAB2, MAB3 및 MAB6에 대해서도 유사한 결과를 얻었다.

[0427] ELISA에서 설치류 GITR 단백질이 아닌 인간 및 시노물구스 마카크에 결합하는 항체

[0428] 모체 마우스 항체 MAB1은 설치류 GITR 단백질이 아닌, 인간 및 시노물구스에 결합한다. 도 2a-b는 항체 MAB4 및 MAB5가 MAB1과 같이, 설치류 GITR이 아닌, 인간 및 시노물구스 GITR, 둘 모두에 유사한 방식으로 결합할 수 있다는 것을 보여주는 것이다. MAB6, 7, 및 8에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다.

[0429] 비아코어(비아코어) 분석에 의해 인간 (hGITR) 및 시노 (cGITR) GITR에 대한 GITR 효능제 항체 MAB4 및 MAB5의 결합 친화도를 측정하였다. 하기 표 5를 참조할 수 있다. 모노클로날 항체 MAB4 및 MAB5는 나노 몰 이하의 결합 친화도 (KD)로 인간 GITR에 결합한다. 항체 MAB4 및 MAB5는 인간 GITR에 대한 결합 친화도보다 약 2-3배 더 낮은 나노 몰의 결합 친화도로 시노 GITR에 결합한다. 본 발명의 항-GITR 효능제 항체는, 유동 세포측정법, ELISA, 비아코어, 및 프로타겐™ 칩 검정을 비롯한, 다수의 생화학적 검정에서 인간 및 시노 GITR에 선택적으로 결합한다.

[0430] <표 5> MAb의 인간 및 시노 GITR에의 결합 친화도

항원	mAb	KD (nM)
hGITR	MAB4	0.684 (± 0.331)
hGITR	MAB5	0.973 (± 0.167)
hGITR	MAB7	4.29 (± 0.14)
cGITR	MAB4	1.78 (± 0.543)
cGITR	MAB5	1.87 (± 0.520)
cGITR	MAB7	3.67 (± 0.09)

[0431]

[0432] 모노클로날 항체 MAB7은 인간 뿐만 아니라, 시노 CD4+ T 세포에 결합한다. 단리된 시노 또는 인간 PBMC의 FACS 분석을 통해 MAB7이 단리된 CD4+ T 세포에 결합한다는 것이 입증되었다. 추가로, FACS 실험을 통해 PBMC의 CD3/CD28 활성화 후 (CD4+ T 세포) GITR (MAB7의 결합에 의해) 및 CD25 상향조절이 입증되었다 (데이터는 나타내지 않음)

[0433] 리포터 유전자 검정 및 세포 검정에서의 항체의 기능적 활성

[0434] 리포터 유전자 검정에서 기능적 활성에 대하여 항체를 검정하였다 (도 3). MAB4, MAB5, MAB7 및 MAB8 IgG는 각각 가교 결합되었을 때, GITR 리간드 (GITR-L)와 유사한 수준으로 NF κ B 활성을 유도한다. 도 3a-d를 참조할 수 있다. MAB2, MAB3, 및 MAB6에 대해서도 유사한 결과를 얻었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0435] MAB7은 인간 GITR을 발현하는 안정한 세포주와의 결합에 대해 인간 GITR 리간드와 경쟁한다. 경쟁 검정을 삼중의 세트 값으로 수행하고, FACS 경쟁 분석 결과를 통해 리간드 결합 억제에 입증된다. 도 2d를 참조할 수 있다.

[0436] 내인성 GITR에 대한 기능적 활성을 확인하기 위해, 항체를 비드에 접합시키고, 정제된 CFSE 표지된 인간 PBMC와 함께 인큐베이션시켰다. 이소형 대조군 항체와 비교하였을 때, MAB7은 CD4+ T 세포 (도 4a) 및 CD8+ T 세포 (도 4b), 둘 모두의 증식 증가를 유도한다. 상기 증식 증가는 또한 IFN γ (도 4c), TNF α , IL-10 및 IL-13 (나타내지 않음)을 비롯한 수개의 시토카인의 분비 증가를 동반하였다. MAB4, MAB5에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다 (나타내지 않음). 본 발명자들은 MAB7에 의해 유도된 증식 및 IFN γ 생산 증가는 비드 상의 항-CD3 및 항-CD28 효능작용 항체의 존재에 의존하였다는 것을 밝혀낼 수 있었다. 상기 공동 자극성 항체가 누락되었다면, MAB는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포에 대하여 어떤 효능제 효과가 미치지 못했다. MAB2, MAB3, MAB4; MAB5 및 MAB6에 대해서도 유사한 결과를 얻었다.

[0437] MAB7은 또한, GITR이 고수준으로 존재할 때, 시험관내 검정에서 (ADCC 활성과 상관관계가 있는 것으로 밝혀진) Fc γ RIIIa 신호전달을 유도할 수 있는 능력을 보이는 것으로 밝혀졌다. MAB7 또는 대조군 Ab와 인큐베이션된 다우디-hGITR 세포, 및 주르카트-V158 세포주를 통해, MAB7이 시험관내 검정에서 Fc γ RIIIa 신호전달을 유도할 수 있고, Fc γ RIIIa 신호전달을 유도할 수 있는 MAB7의 능력은 다우디 세포의 표면 상에서 발현되는 수용체 수준과 상관관계가 있다는 것 (즉, 수용체 수준이 더 높다는 것은 Fc γ RIIIa 신호전달 유도가 더 크다는 것과 같다는 것)이 밝혀졌다. 도 5를 참조할 수 있다.

[0438] hGITR은 T 세포 상에서 발현되고, hGITR-hGITRL 녹-인 마우스에서 기능적이다. 비장세포를 야생형 또는 hGITR-hGITRL 녹-인 마우스로부터 단리시키고, 자극 없이, 또는 a-CD3 및 a-CD28 항체로 자극시키면서 24, 48, 72 또는 96시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 형광단-접합된 항체로 염색시키고, 유동 세포측정법에 의해 분석하여, 인간 GITR이 발현되고, 공동 자극의 결과로서, 야생형 또는 트랜스제닉 마우스에서 GITR 발현 프로파일이 증가된다는 것을 입증하였다. hGITR-hGITRL 녹-인 마우스로부터 단리된 비장세포는 배양시 공동 자극에 대한 반응으로 GITR 발현의 유도를 입증한다 (도 6a). MAB7은 CD8+ 세포 상에서 발현되는 hGITR에 효과적으로 결합하고 (도 6b); 자극받은 T 세포에의 MAB7 결합은 pIKK 염색 (도 6c) 및 T 세포 활성화 마커 CD25+ (도 6d)에 의해 측정되는 바, T 세포 활성화 증가와 상관관계를 갖는다.

[0439] MAB7은 생체내에서 기능적이다. Colon26 종양이 확립된, hGITR-hGITRL 이중 녹-인 마우스를 상기 기술된 바와 같은 비히클 (n=8/시점) 또는 MAB7 (n=10/시점) 항체의 단일 투약으로 처리하였다. 종양을 주 2회에 걸쳐 측정하고, 공식 $(L \times W^2)/2$ 를 사용하여 종양 부피를 계산하였다. MAB로 처리된 동물은 Colon26 종양 성장이 지연되는 것으로 나타났다. 처리 후 3일째, 전혈 (도 7b-7c) 및 종양 (도 7d-7e)을 수집하고, 면역 세포 상의 세포 표면 hGITR 발현에 대하여 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 본 결과는 hGITR 점유 및 이탈(shedding)이 혈액 및 종양, 둘 모두에서 T조절 세포 및 T헬퍼 세포, 둘 모두에 있어서 처리군으로부터 hGITR을 감소시킨다는 것을 제

안한다 (*p<0.05, ****p<0.00005).

[0440] MAB7은 생체내에서 Colon26 종양에 대한 항-종양 면역 반응을 유도한다. Colon26 종양이 확립된, hGITR-hGITRL 이중 녹-인 마우스를 비히클 (n=8/시점) 또는 MAB7 (n=10/시점)의 단일 투약으로 처리하였다. 도 8a는 투약 후 3일째 결과를 도시한 것으로, Treg이 처리된 동물에서 감소된다는 것을 입증한다. 도 8b-8c는 투약 후 15일째 결과를 도시한 것으로, 처리 후 종양 부위에 증가된 림프구 (8b) 및 증가된 활성화된 CD8+ T 세포 (8c)가 존재한다는 것을 입증한다. 비히클과 및 MAB7 처리군 사이에서의 종양 크기의 유의적인 차이를 설명하기 위해 절대 세포 개수를 종양 크기에 대해 정규화하였다. MAB7 결과는, CD4+ FOXP3+ Treg 대비의 전체 종양내 활성화된 CD8+ T 세포에 의해 측정된 바, 처리가 처리된 동물에서 Teff/Treg 비를 증가시킨다는 것을 제안한다. 도 8d를 참조할 수 있다. 추가로, 생체외에서 Colon26 종양 세포와 함께 인큐베이션된 정제된 CD8+ T 세포로부터의, 및 IFN γ ELISPOT 검정을 사용하여 CTL 반응을 측정함으로써 얻은 비장세포 검정의 결과는 MAB7 처리된 동물로부터의 CD8+ T 세포에서의 종양 특이적 IFN γ 반응의 증가를 제안한다 (*p<0.05, ****p<0.0005). 도 8e를 참조할 수 있다.

[0441] 항-mGITR Ab로 마우스를 처리하면 종양 및 비장에서 PD-1 발현은 상향조절된다. Colon26 종양이 확립된 마우스를 대조군 또는 무인 항-mGITR 항체를 2회 투약하여 처리하였다. 도 9a-9c는, PD-1 발현이 대용 GITR 항체인 IgG2a-DTA-1 처리 후, Colon26 종양 뿐만 아니라, 비장 중 CD8+ T 세포 상에서 상향조절된다는 것을 입증하는 결과를 도시한 것이다.

[0442] GITR 및 PD-1 조합이 이소형 대조군에 비하여 생존상 이점을 부여한다. Colon26 종양이 확립된 마우스에서 항-GITR (DTA-1) 및 항-PD-1 (RMP1-14)을 단독으로 및 또는 조합하여 투여하였다. 도 10을 참조할 수 있다. 조합 투여는 이소형 대조군에 비하여 유의적인 생존상 이점을 나타낸다 (****p<0.0005 쌍별 비교 (게한-브레슬로우-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 검정 사용)). 항-mGITR (IgG2a-DTA-1) 단일 작용제는 이소형 대조군에 비하여 유의적인 생존상 이점을 나타낸다 (*p<0.05 쌍별 비교 (게한-브레슬로우-윌콕슨 검정 사용)). 본 데이터는, 이소형 처리군의 경우, TTE 중앙값이 22일인 것과 비교하여 TTE 중앙값이 42일 초과인 (TTE 중앙값을 얻지 못함) (P<0.0005) 것으로, IgG2a-DTA-1 및 RMP1-14의 조합은 이소형 대조군 처리 대비 통계학상 유의적인 생존상 이점을 부여한다는 것을 보여준다. 특히, 동물 10마리 중 3마리가 완전 관해 (CR)를 달성하였고, 동물 10마리 중 2마리가 안정적 질환 (SD)을 달성하였다. IgG2a-DTA-1 단일요법으로 초래된 TTE 중앙값은 30.5일 (P<0.05)이었고, 동물 10마리 중 3마리가 안정적 질환 (SD)을 달성하였다. RMP1-14 처리군의 생존 기간 중앙값은 24일이었는데, 이는 이소형 처리군과 통계학상 유의적으로 상이하지는 않았다. 카플란 마이어 그래프를 작성하고, 프리즘 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 게한-브레슬로우-윌콕슨 검정을 사용하여 쌍별 비교로서 군 비교를 수행하였다. 모든 통계학적 평가를 위해, 유의 수준은 p < 0.05로 설정하였다. 비히클 대조군과 비교하여 유의도를 기록한다. 안정적 질환이란, 종양 부피를 측정하였을 때, 종양 부피 변화율이 3회 연속 10% 이하인 것으로 정의된다.

[0443] <표 6>

표 6: 조합 요법 IP=복강내; SC=피하			
군	Ab1 (5mg/kg, SC)	Ab2	n/군
1	mIgG2a	rIgG2a (10mg/kg, IP)	n=10
2	RMP1-14 (10mg/kg, IP) mIgG2a	mIgG2a (5mg/kg, SC)	n=16
3	DTA-1	rIgG2a (10mg/kg, IP)	n=10
4	DTA-1	RMP1-14 (10mg/kg, IP)	n=10

[0444]

[0445] 항-GITR 또는 항-PD-1과 조합하여 항-GITR을 투여한 후, 종양에서 공동 자극성 분자의 발현을 평가하였다. 도 11을 참조할 수 있다. 항-GITR 또는 항-PD1 또는 항-GITR+PD1을 조합하여 1회 투약한 후 유동 세포측정법에 의해 프로파일링된, 전체 종양 및 비장의 단일 세포 현탁액의 결과는 GITR, PD-1 및 조합 처리 후 Colon26 종양 중 CD8+T 세포 상에서 LAG3, TIM3 및 PD-1의 발현이 증가되었다는 것을 입증하였다. 단일 조합은 비장 CD8+ 세포에서 PD-1의 발현이 상향조절되었다는 것을 입증하였다.

[0446] 참고로 포함

[0447] 본원에서 언급된 모든 공개 문헌, 및 수탁 번호는 마치 각각의 개별 공개 문헌 또는 특허가 참조로 포함되어 있다고 구체적으로 및 개별적으로 명시된 것과 같이 그의 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

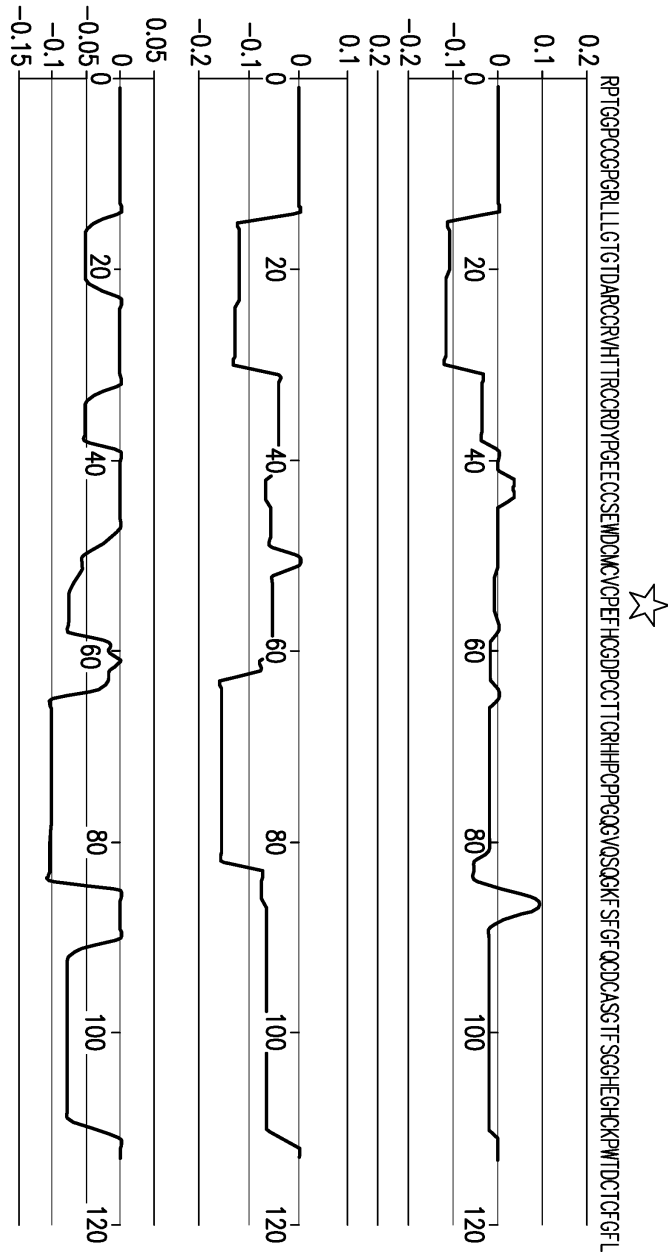
[0448] 등가물

[0449]

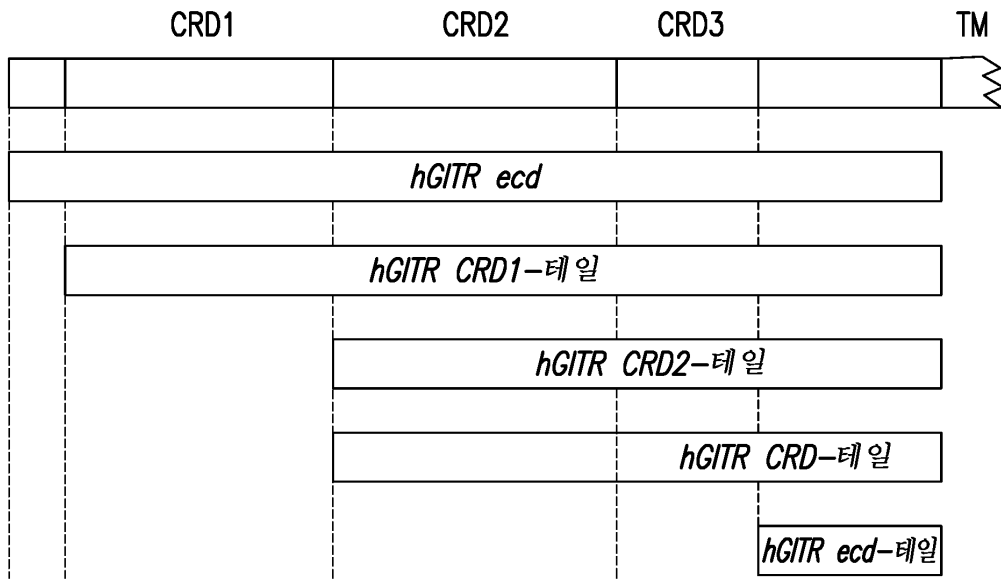
본 대상 발명의 구체적인 실시양태를 논의하였지만, 상기 세부 사항은 제한적인 것이 아니라, 예시적인 것이다. 본 발명의 다수의 변형은 본 명세서 및 하기 특허청구범위 검토시 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명해질 것이다. 본 발명의 전체 범주는 특허청구범위와, 그의 전 범주의 등가물과 함께, 및 본 명세서와, 상기 변형과 함께 그를 참조로 하여 결정되어야 한다.

도면

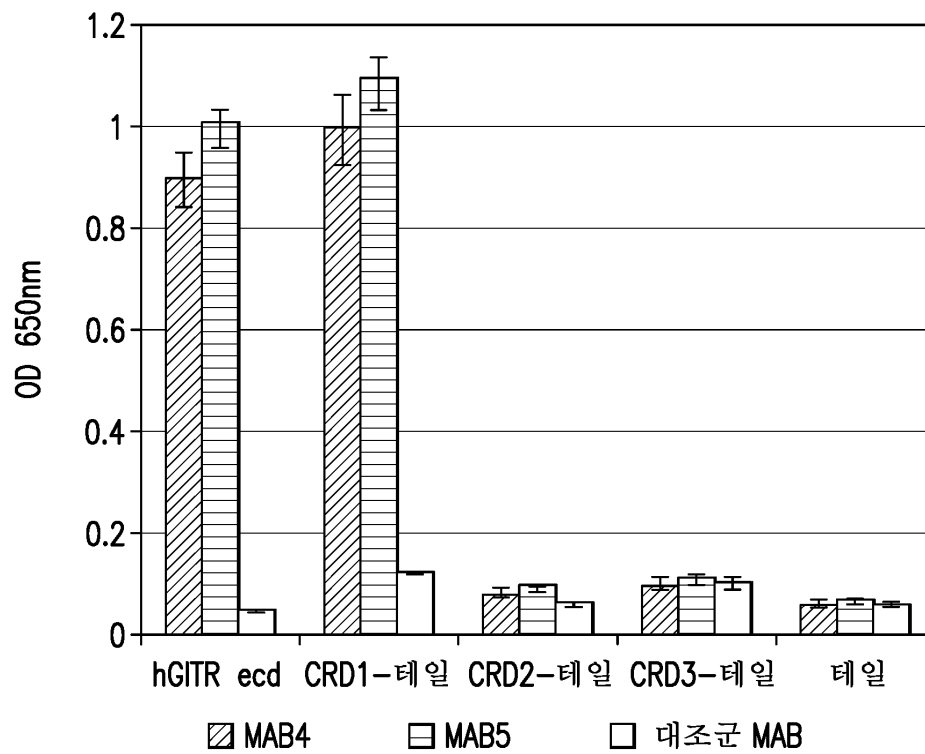
도면1a



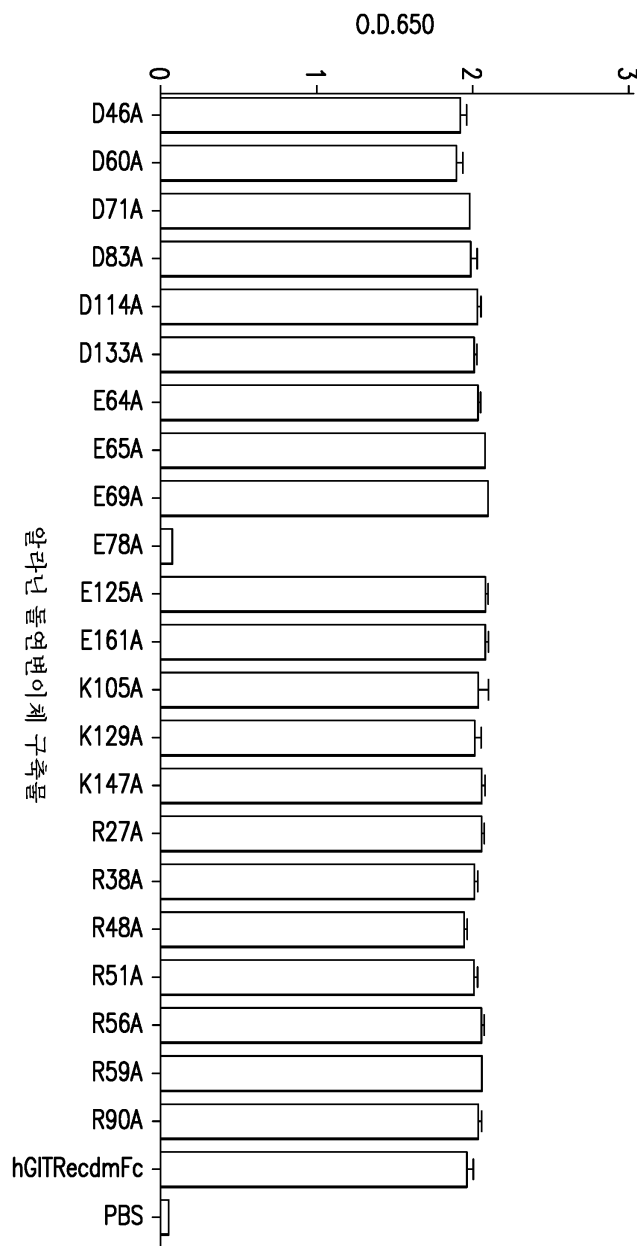
도면1b



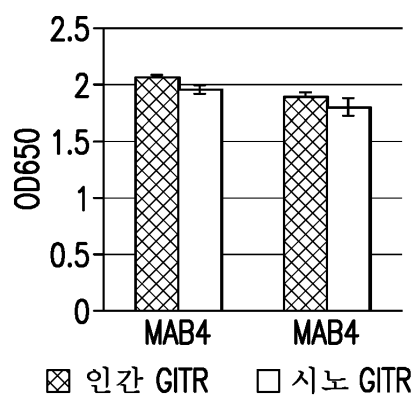
도면1c



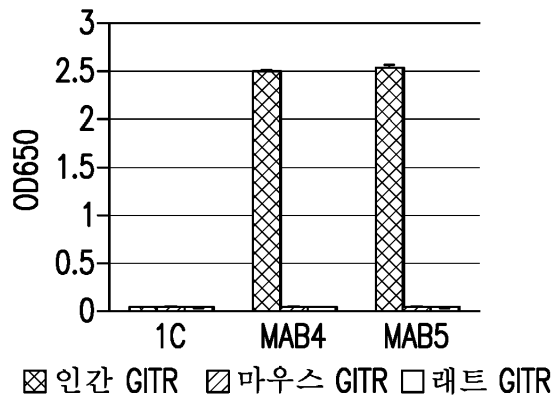
도면1d



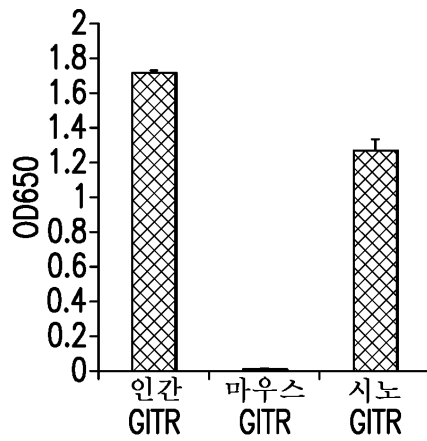
도면2a



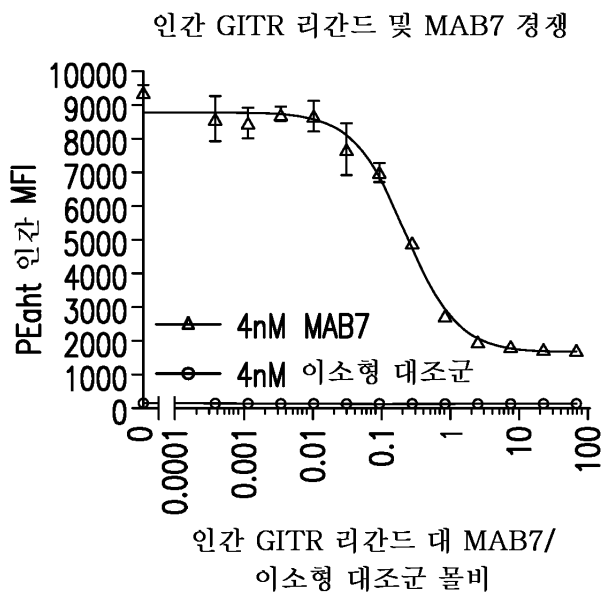
도면2b



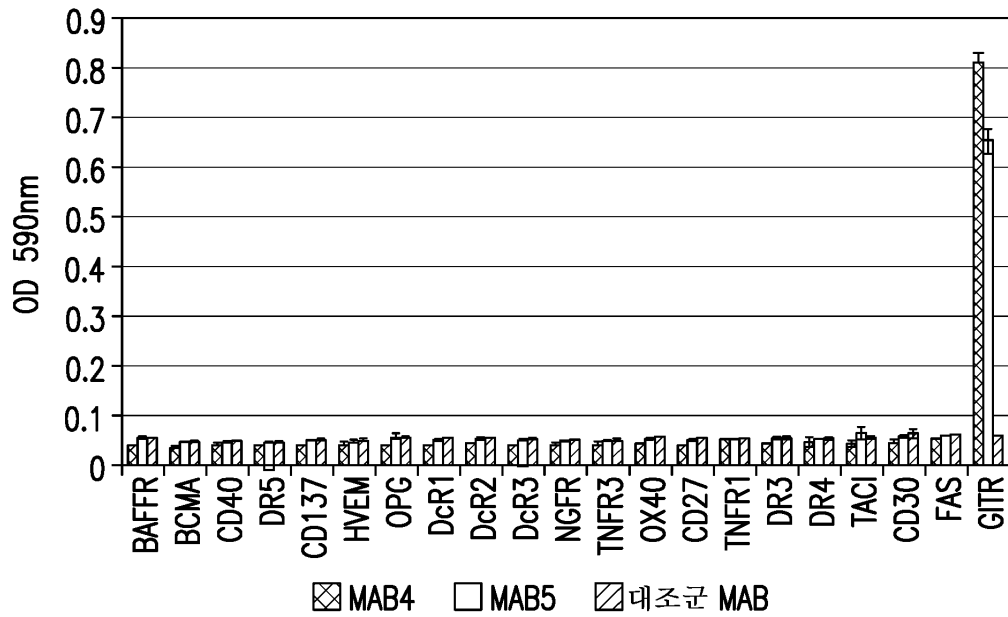
도면2c



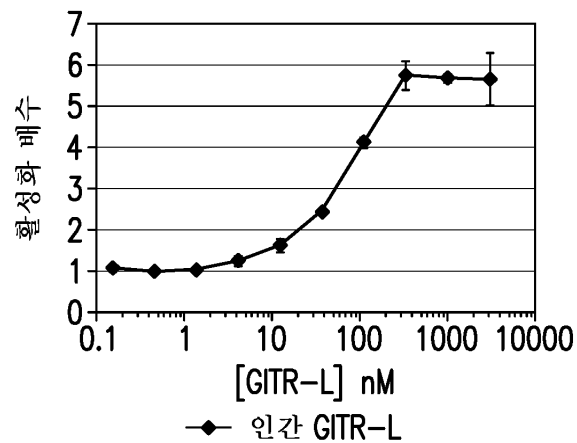
도면2d



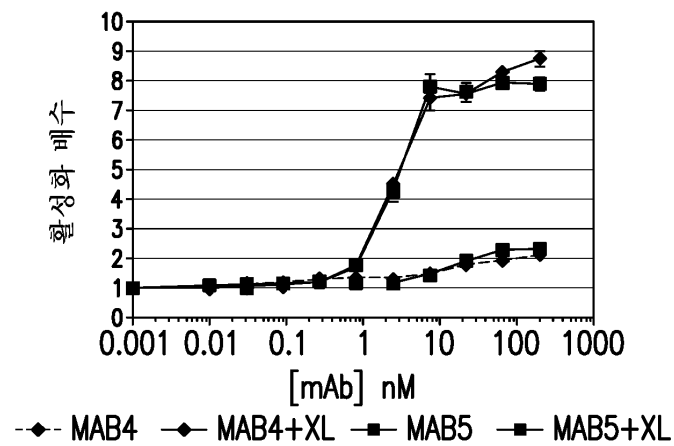
도면2e



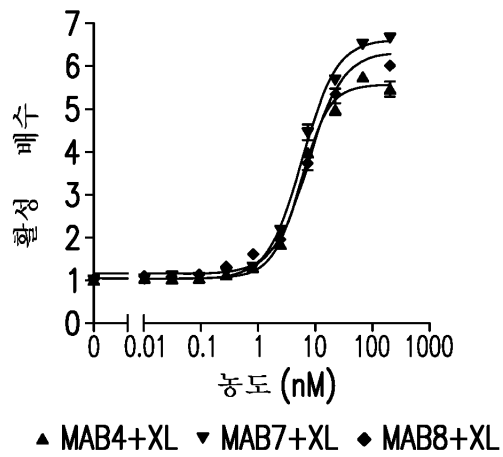
도면3a



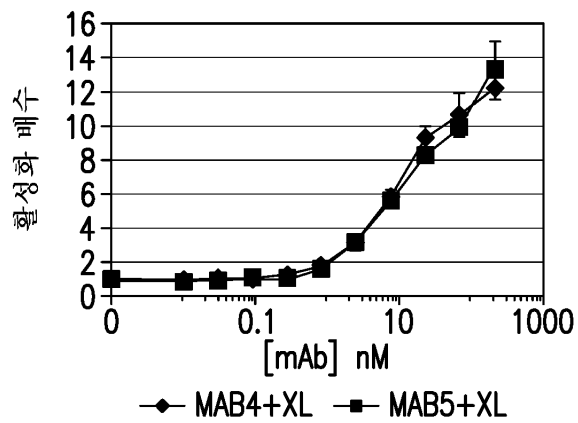
도면3b



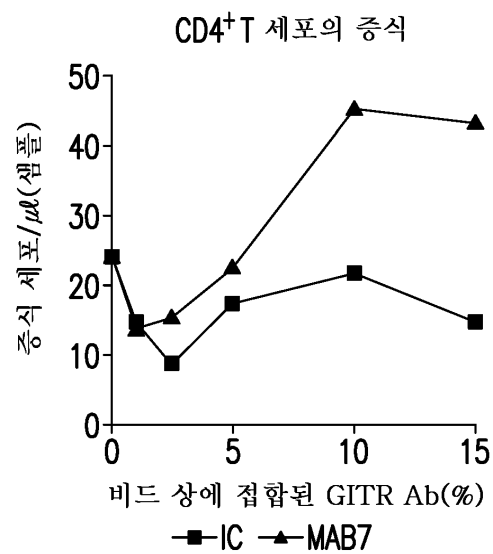
도면3c



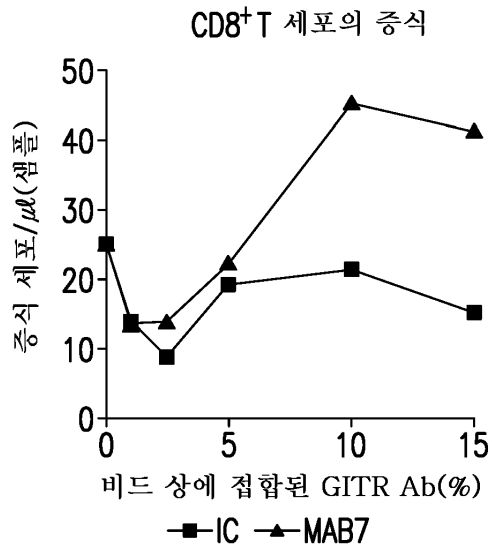
도면3d



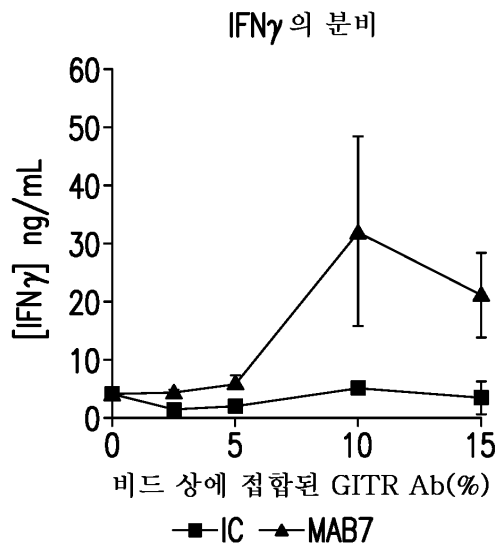
도면4a



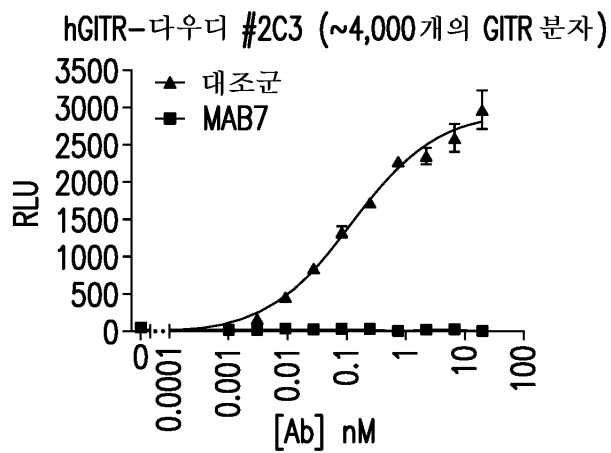
도면4b



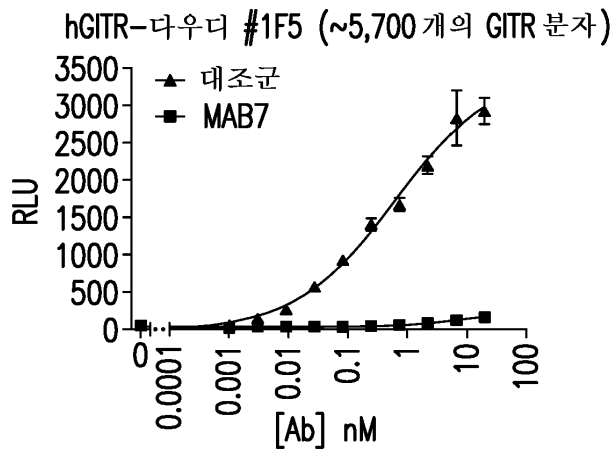
도면4c



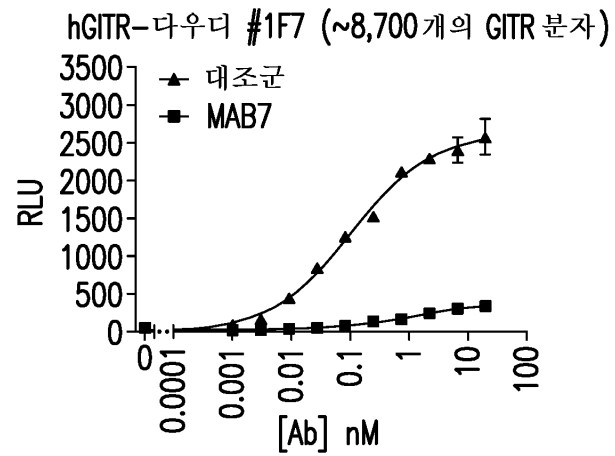
도면5a



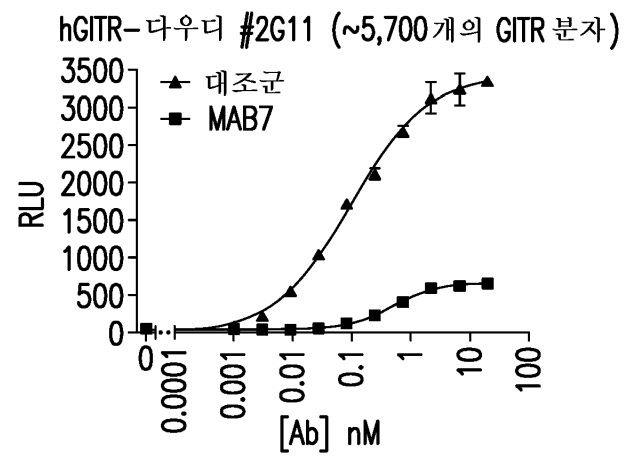
도면5b



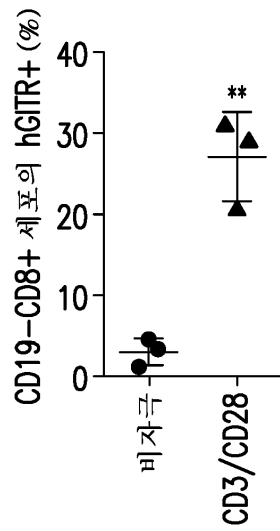
도면5c



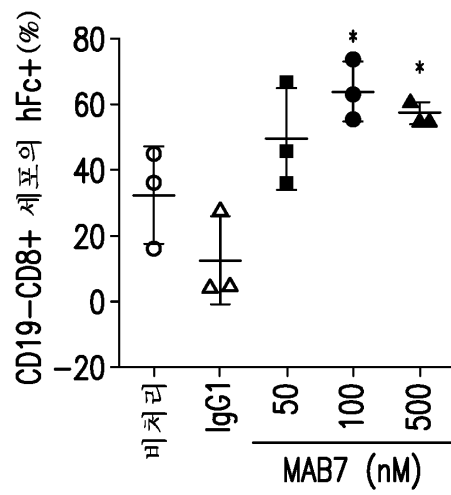
도면5d



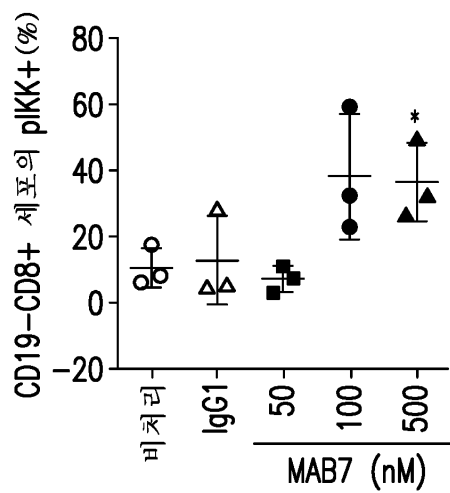
도면6a



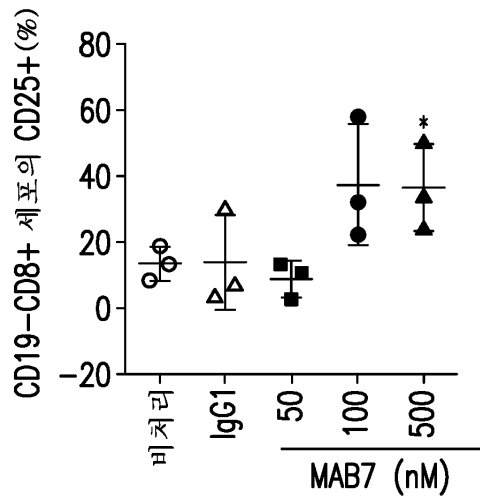
도면6b



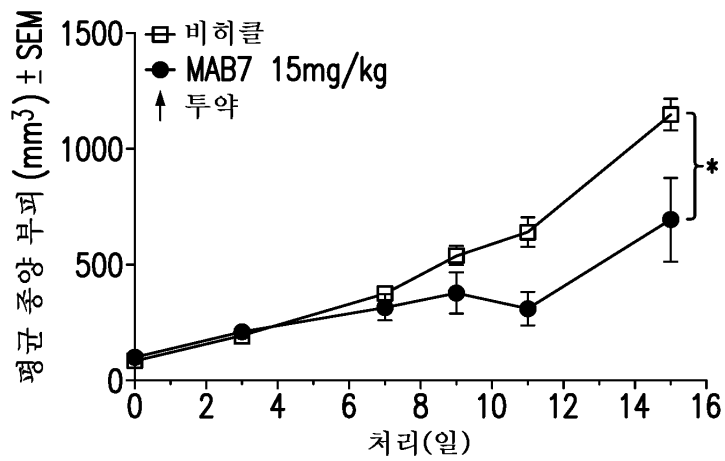
도면6c



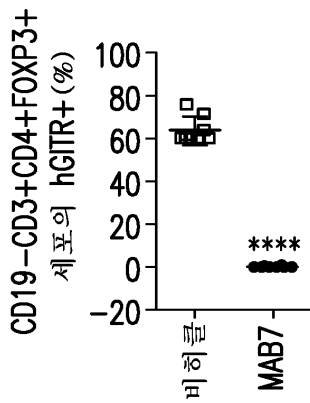
도면6d



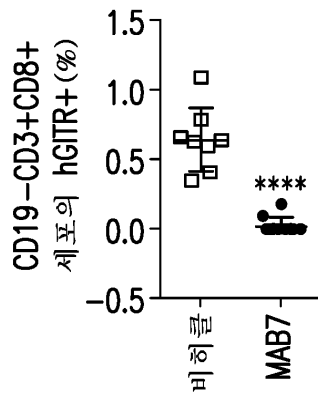
도면7a



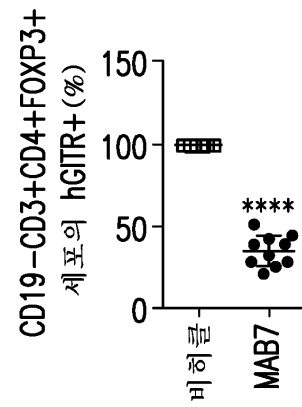
도면7b



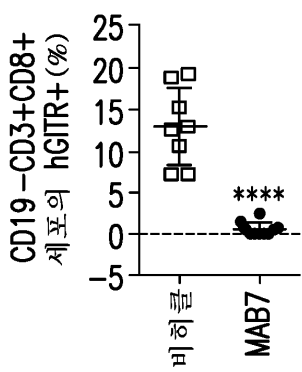
도면7c



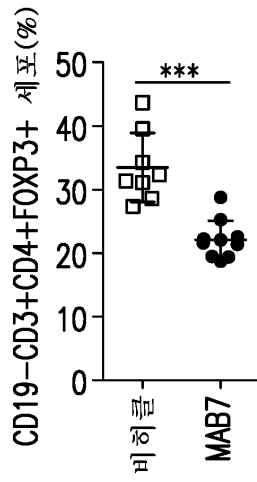
도면7d



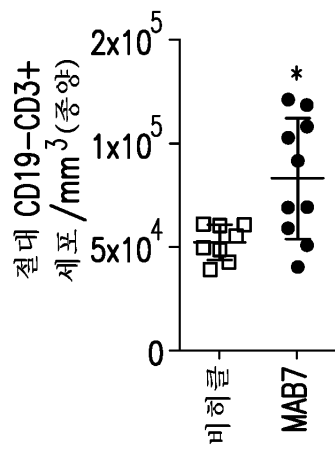
도면7e



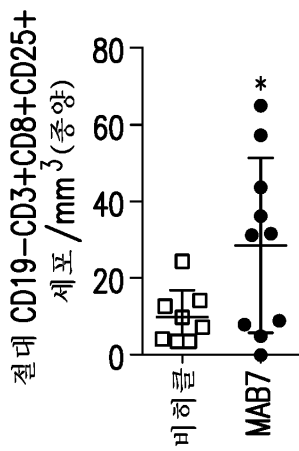
도면8a



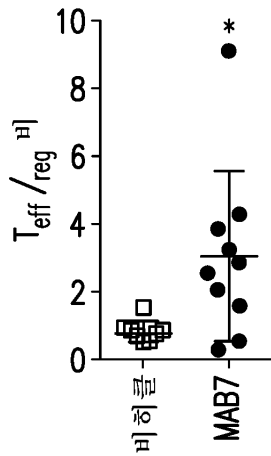
도면8b



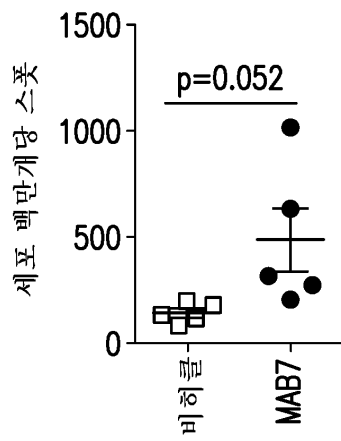
도면8c



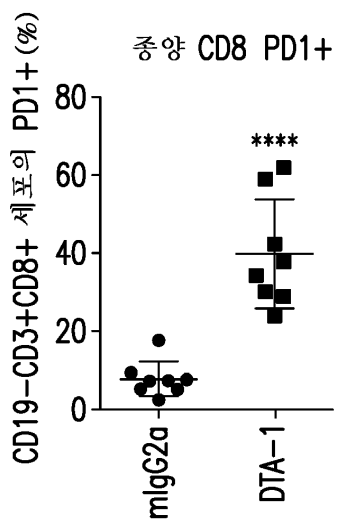
도면8d



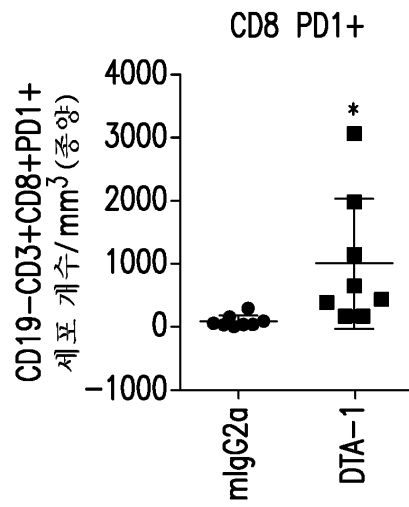
도면8e



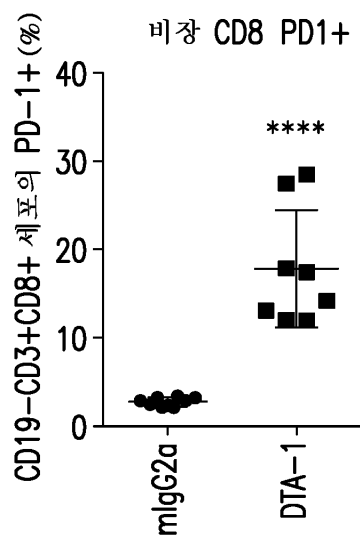
도면9a



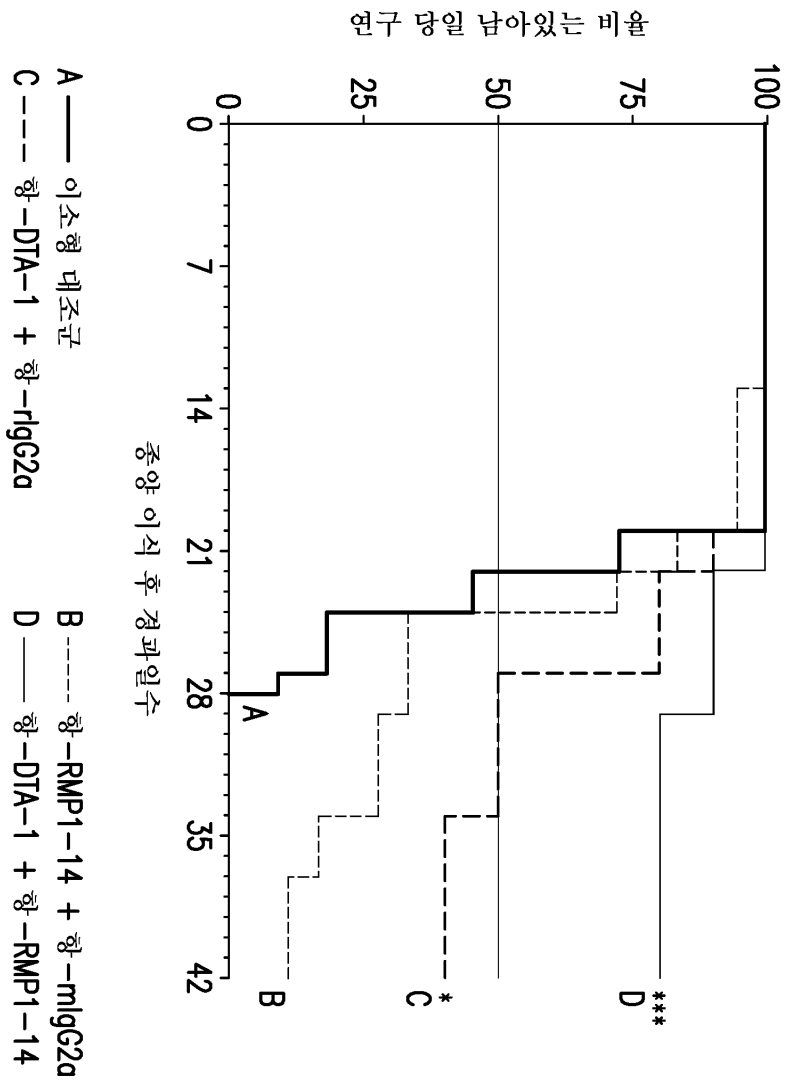
도면9b



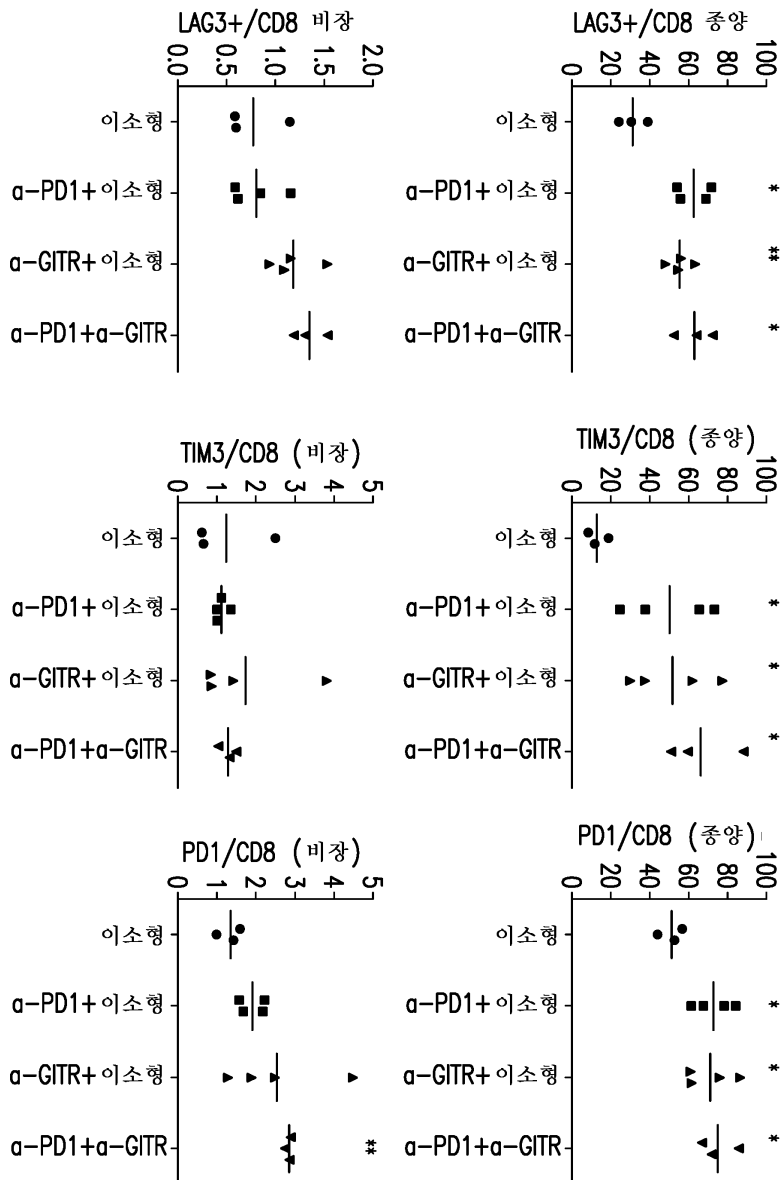
도면9c



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Brogdon, Jennifer

Cipolletta, Daniela

Dranoff, Glenn

Knee, Deborah

Wang, Fei

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR AUGMENTED IMMUNE RESPONSE

AND CANCER THERAPY

<130> PAT056489-WO-PCT

<150> 62/061,644

<151> 2014-10-08

<150> 62/220,764

<151> 2015-09-18

<150> 62/198,673

<151> 2015-07-29

<160> 113

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg

35 40 45

Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu

50 55 60

Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His

65 70 75 80

Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro

85 90 95

Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys

100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys

115 120 125

Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro

130 135 140

Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala

145 150 155 160
 Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys
 165 170 175
 Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
 180 185 190

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

<210> 2

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu

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

65 70 75 80
 Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro
 85 90 95
 Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys
 100 105 110

Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys
115 120 125
Lys Pro Trp Thr Asp Cys Cys Trp Arg Cys Arg Arg Arg Pro Lys Thr
130 135 140
Pro Glu Ala Ala Ser Ser Pro Arg Lys Ser Gly Ala Ser Asp Arg Gln
145 150 155 160
Arg Arg Arg Gly Gly Trp Glu Thr Cys Gly Cys Glu Pro Gly Arg Pro
165 170 175
Pro Gly Pro Pro Thr Ala Ala Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Gln Ala
180 185 190
Ala Gly Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Arg Ala Leu Leu Pro Trp Gln
195 200 205
Gln Lys Trp Val Gln Glu Gly Gly Ser Asp Gln Arg Pro Gly Pro Cys
210 215 220
Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Pro Cys Arg Arg Glu Arg Glu Thr Gln
225 230 235 240
Ser Trp Pro Pro Ser Ser Leu Ala Gly Pro Asp Gly Val Gly Ser
245 250 255
<210> 3
<211> 234
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu
1 5 10 15
Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro
20 25 30
Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg
35 40 45
Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu
50 55 60

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

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

Arg Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala
 195 200 205
 Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu
 210 215 220
 Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
 225 230

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 4

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys

1 5 10 15
 Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu
 20 25 30

Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys

35

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 5

Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr

1 5 10 15

Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly

20 25 30

Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys

35 40

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 6

Gln 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 Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 7

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 Glu Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly 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 Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 8

Gln 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 Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic sequence
<400> 9
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 Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 11

His His His His His His

1 5
 <210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 13

Ala Ala Gly Ala Ser His His His His His His

1 5 10

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> (E/Q)

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> (P/S)

<220><221> VARIANT

<222> (48)..(48)

<223> (L/V)

<220><221> VARIANT

<222> (60)..(60)

<223> (A/T)

<220><221> VARIANT

<222> (61)..(61)

<223> (A/S)

<220><221> VARIANT

<222> (63)..(63)

<223> (L/V)

<220><221> VARIANT

<222> (65)..(65)

<223> (A/G)

<220><221> VARIANT

<222> (97)..(97)

<223> (K/R)

<220><221> VARIANT

<222> (98)..(98)

<223> (H/N)

<400> 16

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Xaa Xaa Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> (E/Q)

<220><221> VARIANT

<222> (33)..(33)

<223> (L/V)

<220><221> VARIANT

<222> (39)..(39)

<223> (K/R)

<220><221> VARIANT

<222> (60)..(60)

<223> (D/A)

<400> 17

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 Xaa Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30
Xaa Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 19

gcgtctagaa ctggatgggtg ggaagatgg

29

<210> 20

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 20

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

1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

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

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

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

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 22

Ser Tyr Gly Val Asp

1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 23

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Met Ala

1 5 10 15

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 24

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met Gly

1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 25

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met Gly

1 5 10 15

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 26

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met Gly

1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 27

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met Ala

1 5 10 15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> (A/T)

<220><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> (A/S)

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> (L/V)

<220><221> VARIANT

<222> (16)..(16)

<223> (A/G)

<400> 28

Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Met Xaa

1 5 10 15

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 29

His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 30

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn Val Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> (E/Q)

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> (L/V)

<400> 32

Arg Ala Ser Xaa Ser Val Ser Ser Asn Xaa Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 33

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 34

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 35

Gln 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 Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> (E/Q)

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> (P/S)

<400> 37

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 38

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

1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> (L/V)

<400> 40

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

1 5 10

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (32)..(32)

<223> (K/R)

<400> 41

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 Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa

20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 43

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> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 44

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

1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 45

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

1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> (K/R)

<400> 46

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

1 5 10 15

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 47

Gly Ile Pro Ala 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> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 48

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

> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> (A/D)

<400> 49

Gly Ile Pro Xaa 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> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 50

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 51

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 51

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccagget 120

ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct 180

tcttctgtca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240

caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300

ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360

tca 363

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 52

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgttt ctccaggaga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtga gagtgttagc agtaatgtag cctggtacca gcagagacct 120

ggccaggcac ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtgtacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag 300

ggcaccaagc ttgaaattaa g 321

<210> 53

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 53

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggt tggactgggt tcgccaggct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatggggtg gtggaggcac atattatact 180

gcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240

caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300

ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360

tca 363

<210> 54

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 54

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagac 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtttacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttgccag 300
 ggcaccaagc ttgaaattaa a 321
 <210> 55
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 55
 gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctcggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct 180
 tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tca 363
 <210> 56
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 56
 gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctcggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
 tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
 ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
 tca 363
 <210> 57
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 57

gaggtgcagc tggctggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag ccctcggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact	180
tcttctctca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcca acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tca	363

<210> 58

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 58

aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttttgtat cctggtatca acagaaacca	120
gaccactctc ctaaactact gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttactctga ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagaccttg cagattatca ctgtggacag agttacagct atccattcac gttcggtctg	300
gggacaaaagt tggaaataaa a	321

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 59

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 60

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 60

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	60
acttgcactg tctctgggtt ttcattaagg agctatgggtg tagactgggt tcgccagcct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac aaattataat	180
tcagctctca tggccaaact gagtatcagc aaagacaagt ccaagagcca agttttctta	240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgcaa acatgcctat	300
ggtcacgacg gcggttttgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 61

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Arg Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

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

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 62

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

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 63

Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Phe Val Ser
1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 64

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 65

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 65

Gln 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 Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

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

 420 425 430

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 66

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 66

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 Glu Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly 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 Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 67

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 67

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct	180
tcttctgtca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc	420
ggcggcacag ccgcccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaaaccca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc	720
ggacctccg tgttctctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagtccaac	840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acagggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gcctgccag ccccatcga aaagaccatc	1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca cctgcccc ctcccgggag	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac	1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320

accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

<210> 68

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 68

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgttt ctccaggaga aagagccacc 60

ctctctgca gggccagtga gagtgttagc agtaatgtag cctggtacca gcagagacct 120

ggccaggcac ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactetca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtgtacta ctgcggccag agctatagct atccatttac ctttggccag 300

ggcaccaagc ttgaaattaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 69

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 69

Gln 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 Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ala Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

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

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

420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys

450

<210> 70

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 70

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 71

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 71

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
gcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat 300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360

tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgcccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgctg gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccea gcagcagcct gggcacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780

cccaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagtccaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggagcagtac 900
aacagcacct acagggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccttgccag ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag 1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

<210> 72

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 72

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctacggg gcatccaacc gggccactgg catcccagac 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtttacta ctgcgccag agctatagct atccatttac ctttgccag 300

ggcaccaagc ttgaaattaa acgtacgggtg gccgctccca gcggttcat cttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 73

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370	375	380	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
405	410	415	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
420	425	430	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
435	440	445	
Pro Gly Lys			
450			
<210> 74			
<211> 1353			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic sequence			
<400> 74			
gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc	60		
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120		
ccaggaaagg gtctggagtg ggtgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatgct	180		
tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240		
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300		
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360		
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccttgcccc ccagcagcaa gaggaccagc	420		
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480		
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540		
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600		
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660		
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc	720		
ggaccctccg tgttctgttt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780		
cccagagtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagtccaac	840		
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggagcagtac	900		

aacagcacct acaggggtgt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gcctgccag ccccatcga aaagaccatc 1020

agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca cctgcccc ctcccgggag 1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagtcagg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

<210> 75

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 76

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 76

gaggtgcagc tggtaggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag ccctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact	180
tcttctctca tgggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgcaa acatgcctat	300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc	360
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc ccctggccc ccagcagcaa gaccaccagc	420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc	720
ggaccctccg tggtcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttaac	840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acaggggtgt gtcctgtctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960

aaggaataca agtgaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag 1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctgggtga agggcttcta cccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

<210> 77

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Met
50 55 60

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

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

Lys His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 78

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 78

gaggtgcagc tggaggagtc cgggggaggc ttagttcagt ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagc agctatgggtg tggactgggt tcgccaggct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggggtg gtggaggcac atattatact 180
tcttctctca tggccagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgcgccaa acatgcctat 300
ggccatgatg gcggctttgc tatggattat tggggccagg gtacccttgt gaccgtgagc 360
tcagctagca ccaagggcc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgtc cagcgtgggtg acagtgccca gcagcagcct gggcacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagccccaga gctgctgggc 720
ggacctccg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780
cccagggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac 900
aacagcacct acaggggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960

aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga aaagaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgcac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 79

Gly Phe Ser Leu Arg Ser Tyr

1 5

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 80

Trp Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 81

Ser Glu Asn Val Asp Thr Phe

1 5

<210> 82

<211> 3

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 82
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 83
 Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe
 1 5
 <210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence

 <400> 84
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic sequence
 <400> 85
 Ser Glu Ser Val Ser Ser Asn
 1 5
 <210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 86

Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> (E/Q)

<400> 87

Ser Xaa Ser Val Ser Ser Asn

1 5

<210> 88

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 88

Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Gly Thr

1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg

20 25 30

Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val

35 40 45

Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp

50 55

<210> 89

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 89

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

35 40 45

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

85 90 95

Ala Lys

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 90

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 91

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

1 5 10 15

<210> 92

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 92

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 Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 93

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 94

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 95

gggtctagac accatggctg tcttggggct gctcttc 37

<210> 96

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 96

gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac 39

<210> 97

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 97

gggtctagac accatggagw cacakwctca ggtctttrta 40

<210> 98

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 98

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

85

<210> 99

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 99

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg His Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

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

275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
Pro Gly Lys

450

<210> 101

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 101

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagt ccggcggctc tctgagactg	60
tcttgcgctg cctccggett ctccctgtcc tcttacggcg tggactgggt gcgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgggagt atctggggcg gaggcggcac ctactacgcc	180
tcttcctga tgggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag acacgcctac	300
ggccacgacg gcggcttcgc catggattat tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc	360
tcc	363

<210> 102

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 102

gagatcgtga tgaccagtc ccccgccacc ctgtctgtgt ctcccggcga gagagccacc	60
ctgagctgca gagcctccga gtccgtgtcc tccaacgtgg cctggatatca gcagagacct	120
ggtcaggccc ctcggtgct gatctacggc gcctctaacc gggccaccgg catccctgcc	180
agattctccg gctccggcag cggcaccgac ttcacctga ccatctccc gctggaaccc	240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgcggccag tcctactcat accccttcac cttcggccag	300
ggcaccaagc tggaaatcaa g	321

<210> 103

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 103

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagt ccggcggctc tctgagactg	60
tcttgcgctg cctccggett ctccctgtcc tcttacggcg tggactgggt gcgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgggagt atctggggcg gaggcggcac ctactacgcc	180

tcttccctga tgggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ccttgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag acacgcctac 300
 ggccacgacg gcggcttcgc catggattat tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
 tccgctagca ccaagggccc aagtgtgttt cccttgcccc ccagcagcaa gtctacttcc 420
 ggcggaactg ctgccctggg ttgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg 480
 tcctggaact ctggggctct gacttccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgcctt ccagctctct gggaacccag 600

acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc ccccccctgcc cagctccaga actgctggga 720
 gggccttccg tgttccgtgt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg acccagaggt gaagttaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggagcagtac 900
 aacagcacct acagggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaagaataca agtgcaaagt ctccaacaag gccttgccag cccaatcga aaagacaatc 1020

agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca cctgcccc cagccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgat 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagtcagg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccttgca caaccactac 1320
 acccagaagt ccttgagcct gagccccggc aag 1353

<210> 104

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 104

gagatcgtga tgaccagtc ccccgccacc ctgtctgtgt ctccggcgga gagagccacc 60
 ctgagctgca gagcctccga gtccgtgtcc tccaacgtgg cctggtatca gcagagacct 120
 ggtcaggccc ctcggtgct gatctacggc gcctctaacc gggccaccgg catccctgcc 180
 agattctccg gtcccggcag gcgcaccgac ttaccctga ccatctcccg gctggaaccc 240
 gaggacttgc ccgtgtacta ctgcggccag tcctactcat accccttac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggaatcaa gcgtacggtg gccgtccca gcgtgttcat cttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 105

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 106

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 106

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

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

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

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

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

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 107

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 107

gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtgcagt caggcggtag cctgagactg	60
agctgcgccg cctccggctt tagcctgtct agctacggcg tggactgggt cgcacaggcc	120
cctggcaaag gcctggagtg ggtcggagtg atctggggcg gaggcggaac ctactacgcc	180
tctagcctga tgggccggtt cactatctct agggacaact ctaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaact cactgagagc cgaggacacc gccgtctact actgcgctag aaacgcctac	300
ggtcacgacg gcggcttcgc tatggactac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgagt	360

tca	363
-----	-----

<210> 108

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 108

gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtgcagt caggcggtag cctgagactg	60
agctgcgccg cctccggctt tagcctgtct agctacggcg tggactgggt cgcacaggcc	120
cctggcaaag gcctggagtg ggtcggagtg atctggggcg gaggcggaac ctactacgcc	180
tctagcctga tgggccggtt cactatctct agggacaact ctaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaact cactgagagc cgaggacacc gccgtctact actgcgctag aaacgcctac	300
ggtcacgacg gcggcttcgc tatggactac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgagt	360
tcagctagca ctaagggcc aagtgtgttt ccctggccc ccagcagcaa gtctacttcc	420
ggcggaaactg ctgccctggg ttgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg	480
tcctggaact ctggggctct gacttcgggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgcctt ccagctctct gggaaccag	600
acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag	660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagctccaga actgctggga	720
gggccttccg tggtcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc	780
cccagagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg acccagaggt gaagttaac	840
tggtacctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac	900
aacagcacct acagggtggt gtcctgtctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960

aaagaataca agtgcaaagt ctccaacaag gccctgccag cccaatcga aaagacaatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt gtcctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtcagg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
 acccagaagt ccctgagcct gagccccggc aag 1353

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 109

Asn Ala Tyr Gly His Asp Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 110

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 110

tctggcgag taatacacgg cc 22

<210> 111

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> degenerate trinucleotide codon sequence nnk

<400> 111

nnkgcctatg gccatgatgg cg 22

<210> 112

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 112

gcctttctct ccacagg

17

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 113

ggcaaacaac agatggctgg

20