



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154140
(43) 공개일자 2022년11월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7034534
- (22) 출원일자(국제) 2021년03월12일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년10월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/080470
- (87) 국제공개번호 WO 2021/180205
국제공개일자 2021년09월16일
- (30) 우선권주장
202010174835.4 2020년03월13일 중국(CN)

- (71) 출원인
지양수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
상하이 쉹디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 디스트릭트, 장지양
타운, 하이커 로드 넘버 1288
- (72) 발명자
린, 유안
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
린, 칸
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
안소영

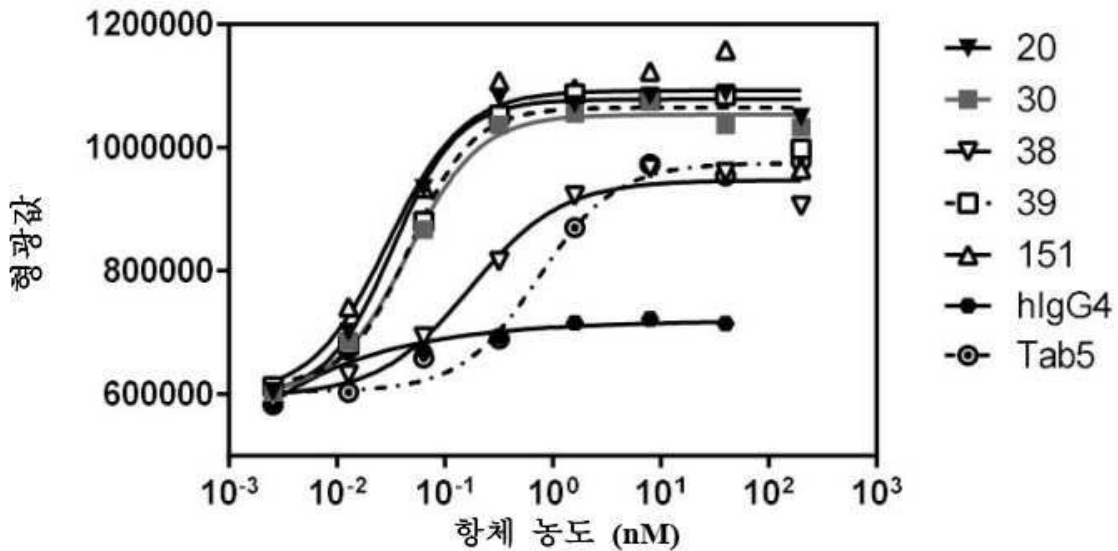
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 PVRIG 결합 단백질 및 이의 의학적 용도

(57) 요약

PVRIG 결합 단백질 및 이의 의학적 용도가 제공된다. 구체적으로, 항-PVRIG 단일-도메인 항체 및 항-PVRIG와 항-TIGIT 이중특이적 항체, 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물, 암을 치료하는 방법, 및 약학적 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

(72) 발명자

진, 신성

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테
크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜산 로드

장, 만

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테
크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜산 로드

리아오, 쉰

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테
크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜산 로드

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 PVRIG 결합 단백질로서,

SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 카바트(Kabat), IMGT, 초티아(Chothia), AbM 또는 컨택트(Contact) 번호 매기기 체계 (numbering scheme)에 따라 정의되고;

바람직하게는, 카바트 번호 매기기 체계에 따르면, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은

각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12 또는 151; 또는

각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9 또는 150; 또는

각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15; 또는

각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18; 또는

각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21로 표시되는, PVRIG 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 VHH, 바람직하게는 인간화 및/또는 친화도-성숙(matured) VHH이고;

더 바람직하게는, 인간화 및/또는 친화도-성숙 VHH는 인간 생식세포계 주형의 중쇄 프레임워크 영역 IGHV3-7 *01 또는 IGHV3-30 *02를 포함하는, PVRIG 결합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 서열은

SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시되거나;

전술된 서열 중 임의의 하나와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는, PVRIG 결합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 면역글로불린 Fc 영역을 추가로 포함하며;

바람직하게는, Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4의 Fc 영역이고;

더 바람직하게는, 인간 IgG4의 Fc 영역은 S228P, F234A, L235A 및/또는 K447A 돌연변이를 갖는, PVRIG 결합 단백질.

청구항 5

PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인 및 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 PVRIG/TIGIT 결합 단백질로서, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인은 하기를 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며:

SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는

SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 카바트, IMGT, 초티아, AbM 또는 컨택트 번호 매기기 체계에 따라 정의되고;

바람직하게는, 카바트 번호 매기기 체계에 따르면, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은

각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12 또는 151; 또는

각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9 또는 150; 또는

각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15; 또는

각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18; 또는

각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21로 표시되는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 항원-결합 도메인 내 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 서열은

SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나; 또는

SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시되거나;

전술된 서열 중 임의의 하나와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며:

중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 115, 116 및 117로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 118, 119 및 120으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 127, 128 및 129로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 130, 131 및 132로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 133, 134 및 135로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 136, 137 및 138로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 139, 140 및 141로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 142, 143 및 144로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 145-147 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 148-149 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인은 전장 중쇄(HC) 및 전장 경쇄(LC)를 포함하며;

바람직하게는, 전장 중쇄는 IgG1 또는 IgG4 이소타입(isotype)의 것이고, 전장 경쇄는 카파 이소타입의 것이고;

더 바람직하게는, 중쇄의 서열은 SEQ ID NO: 102로 표시되거나 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 것이고, 경쇄의 서열은 SEQ ID NO: 103으로 표시되거나 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 것인, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며:

PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역의 N-말단에 위치하고/하거나;

PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역의 C-말단에 위치하고/하거나;

PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 경쇄 가변 영역의 N-말단에 위치하고/하거나;

PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 경쇄 가변 영역의 C-말단에 위치하는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인에 직접 또는 링커를 통해 연결되며;

바람직하게는, 링커는 $(G_4S)_x$ 로 표시된 아미노산 서열이고, x는 독립적으로 1 내지 20의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고;

더 바람직하게는, 링커는 $(G_4S)_2$ 또는 $(G_4S)_3$ 으로 표시된 아미노산 서열인, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하며:

제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 108-112 및 114 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 103으로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나;

제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 104 또는 105로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬

은 SEQ ID NO: 103으로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나;

제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 102로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 106 또는 107로 표시된 아미노산 서열을 포함하는, PVRIG/TIGIT 결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제3항 또는 제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 번역글로블린 단일 가변 도메인을 포함하는 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

바람직하게는, 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 제7항에 따른 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 추가로 포함하는, 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 15

제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법으로서,

제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 제15항에 따른 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및

발현된 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 숙주 세포로부터 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 18

질환을 치료하거나 질환의 진행을 지연시키는 방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제17항에 따른 약학적 조성물, 또는 이의 임의의 조합을 질환을 치료하거나 지연시키기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

바람직하게는, 질환은 증식성 질환이고;

더 바람직하게는, 증식성 질환은 암이며;

더 바람직하게는, 암은 폐암(lung cancer), 전립선암(prostate cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 식도암(esophageal cancer), 위암(gastric cancer), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁암(uterine cancer), 난소암(ovarian cancer), 간암(liver cancer), 흑색종(melanoma), 신장암(renal cancer), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 혈액계의 암(cancer of blood system), 및 비제어된 세포 성장을 특징으로 하는 임의의 다른 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

NK 세포, γ δ T 세포 및/또는 Th1 세포를 활성화시키는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항

에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제17항에 따른 약학적 조성물, 또는 이의 임의의 조합을 질환을 치료하거나 지연시키기에 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

대상체에서 인터페론- γ 의 생산 및/또는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인의 분비를 증가시키는 방법으로, 유효량의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제17항에 따른 약학적 조성물, 또는 이의 임의의 조합을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

질환을 치료하거나 지연시키는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG 결합 단백질, 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 제13항에 따른 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제14항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제17항에 따른 약학적 조성물, 또는 이의 임의의 조합으로서, 바람직하게는 질환은 증식성 질환이며;

더 바람직하게는, 증식성 질환은 암이고;

더 바람직하게는, 암은 폐암, 전립선암, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 결장암, 결장직장암, 방광암, 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 흑색종, 신장암, 편평 세포 암종, 혈액계의 암, 및 비제어된 세포 성장을 특징으로 하는 임의의 다른 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 개시내용은 2020년 3월 13일에 출원된 중국 특허 출원(출원 번호 CN202010174835.4)에 대해 우선권을 주장한다.

[0002] **기술분야**

[0003] 본 개시내용은 PVRIG 결합 단백질, 예를 들어, 항-PVRIG 항체 및 항-TIGIT 항체와 함께 이에 의해 형성된 이중 특이적 항체, 및 암을 치료하기 위한 약제로서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 암은 오늘날 오랫동안 인간 사회가 직면한 가장 큰 건강 문제이다. 전통적인 요법, 예컨대 수술, 화학요법 및 방사선요법은 파종성(disseminated) 고형 종양을 치료하는 데 거의 효능을 보이지 않았다. 종양 면역요법은 종양 치료 분야에서 핫 스팟이며, T 세포의 종양 면역요법은 이의 중심에 있다. 종양 면역요법은 종양 환자에서 킬러(killer) T 세포를 완전히 활용하고 동원하여 종양을 사멸화시키는 것을 특징으로 하고, 이는 아마도 종양을 치료하기 위한 가장 효과적이고 가장 안전한 방식이다. 종양 면역요법은 현재 파종성 전이성 종양을 포함한 몇몇 상이한 유형의 암의 치료에 대해 큰 가능성을 나타낸다.

[0005] 인간에서 T 세포의 활성화는 2개의 신호전달 경로의 시스템을 입양한다. 항원 제시 세포(APC)를 통해 MHC-항원 펩타이드를 제시함으로써 제1 신호를 T 세포에 제공하는 것에 더하여, 일련의 공동-자극성 분자는 또한 제2 신호를 제공하여, T 세포가 정상적인 면역 반응을 생산하는 것을 가능하게 하는 데 필요하다. 이러한 이중-신호전달 경로 시스템은 *생체내에서* 면역계의 균형에 중대한 역할을 하고, 이는 자기(self) 및 비(非)-자기(non-self) 항원에 대한 신체의 상이한 면역 반응의 생산을 엄격하게 조절한다. 공동-자극성 분자에 의해 제공되는 제2 신호가 부재한다면, T 세포 무반응 또는 지속된 특정 면역 반응이 존재하여, 관용(tolerance)을 초래할 것이다. 그러므로, 제2 신호전달 경로는 신체의 면역 반응 전반에 걸쳐 매우 중대한 조절 역할을 한다.

[0006] CD112R로도 알려진 PVRIG는 세포 표면 상에서 발현되는 단백질이며, TIGIT, CD96, CD226 등과 같이 B7/CD28 슈퍼가족에 속하고, 면역계에서 중요한 역할을 한다. 이는 세포외 영역, 막관통 영역 및 세포내 영역을 포함한다. 이의 리간드 PVRL2(CD112로도 알려져 있음)가 PVRIG에 결합할 때, PVRIG 세포내 영역의 ITIM 도메인은 활성화되

므로, PVRIG가 면역억제 역할을 하도록 할 수 있을 것이다.

[0007] PVRIG는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포 및 NK 세포의 표면 상에서 주로 발현된다. PVRIG 및 이의 리간드 PVRL2는 폐암, 유방암, 난소암, 신장암, 위암, 자궁내막암, 두경부암(head and neck cancer) 등을 포함한 많은 고형 종양에서 고도로 발현된다. 이러한 암에서 PVRIG의 발현은 TIGIT 및 PD-1과 고도로 상관 관계가 있다. PD-1 및 TIGIT와 유사하게, PVRIG-양성 T 세포는 또한 Eomes-양성 및 Tbet-음성이고, 이는 PVRIG가 T 세포 결실과 관련이 있음을 나타낸다. 그러므로, PVRIG는 PD-1 및 TIGIT에 더하여 새로운 면역 체크포인트를 나타낼 수 있고, 중복(redundancy) 역할을 한다. 시험관내 세포 실험 및 마우스 모델은, 마우스 PVRIG의 녹아웃(knockout) 또는 저해가 종양의 성장을 효과적으로 저해하고 PD-1 및 TIGIT 저해제와 조화 작용(coordination action)을 생산할 수 있음을 보여준다.

[0008] 또 다른 관심 표적인 TIGIT는 종양 침윤성 림프구(TIL: tumor infiltrating lymphocyte) 및 상이한 유형의 종양을 침윤하는 Treg를 포함한 림프구 상에서 고도로 발현된다. TIGIT 신호전달과 이의 동족(cognate) 리간드 PVR(CD155로도 알려져 있음)의 연대(engagement)는 이의 세포질 ITIM 도메인을 통해 NK 세포 세포독성을 직접 억제시키는 것으로 입증되었다. PVR은 또한 종양에서 광범위하게 발현되며, 이는 TIGIT-PVR 신호전달 축(axis)이 암에 대한 우세한 면역 회피 기전일 수 있음을 시사한다.

[0009] 그러나, 어떠한 PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체 약물도 현재 임상 시험상(trial phase)에 진입하지 못하였다. Compugen에 의한 COM701은 세계에서 임상 시험상에 진입한 FDA에 의해 승인된 PVRIG에 대한 최초의 인간화 하이브리도마 항체이며, 이는 현재 I상 임상기(clinical stage)에 있고 암을 치료하는 데 사용된다. 표면 종양학은 또한 항-PVRIG 항체, SRF-813을 개발하고 있다. 항-TIGIT 항체는 Genentech에 의한 티라글루맷(tiragolumab), BMS와 협력하여 Ono Pharmaceutical에 의해 개발된 BMS-986207, MSD에 의한 MK-7684, iTeos Therapeutics에 의한 EOS-884448, 및 Arcus Biosciences에 의한 AB-154를 포함하며, 이는 모두 II상 임상기에 있다.

[0010] 생체내에서 암 또는 종양 성장을 저해할 수 있는 고-친화도, 고-민감도 및 고-생물활성 항-PVRIG 항체 및 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결여가 당업계에 남아 있고, 본 개시내용은 암을 치료하기 위해 PVRIG 및/또는 TIGIT의 저해성 경로를 차단함으로써 면역력을 활성화시키는 이러한 항체를 제공하는 것을 목표로 한다.

발명의 내용

[0011] 본 개시내용은 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 및 항-TIGIT 항체와 함께 이에 의해 형성된 이중특이적 항체, 뿐만 아니라 인코딩 핵산, 벡터, 숙주 세포, 약학적 조성물, 암을 치료하는 방법 및 이의 약학적 용도를 제공한다.

[0012] 제1 양태에서, 본 개시내용은 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체를 제공한다.

[0013] 일부 구현예에서, PVRIG 결합 단백질은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며:

[0014] CDR1은 SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61 및 64 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나,

[0015] CDR2는 SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 및 65 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나,

[0016] CDR3은 SEQ ID NO: 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 150 및 151 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0017] SEQ ID NO: 7-21, 150 및 151은 카바트 번호 매기기 체계(Kabat numbering scheme)에 기초하며, SEQ ID NO: 22-36은 초티아 번호 매기기 체계(Chothia numbering scheme)에 기초하고, SEQ ID NO: 37-51은 IMGT 번호 매기기 체계에 기초하며, SEQ ID NO: 52-66은 AbM 번호 매기기 체계에 기초한다.

[0018] 일부 구현예에서, PVRIG 결합 단백질은 SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나로 표시된 서

열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, CDR1, CDR2 및 CDR3은 카바트, IMGT, 초티아, AbM 또는 컨택트 번호 매기기 시스템(Contact numbering system)에 따라 정의되고, 일부 구체적인 구현예에서 CDR은 카바트 번호 매기기 체계에 따라 결정된다.

- [0019] 일부 구현예에서, 카바트 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며:
- [0020] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9로 표시되거나;
- [0021] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 150으로 표시되거나;
- [0022] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로 표시되거나;
- [0023] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 151로 표시되거나;
- [0024] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15로 표시되거나;
- [0025] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18로 표시되거나;
- [0026] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21로 표시된다.
- [0027] 일부 구현예에서, 초티아 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며:
- [0028] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24로 표시되거나;
- [0029] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 27로 표시되거나;
- [0030] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 28, 29 및 30으로 표시되거나;
- [0031] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 31, 32 및 33으로 표시되거나;
- [0032] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36으로 표시된다.
- [0033] 일부 구현예에서, IMGT 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며:
- [0034] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 37, 38 및 39로 표시되거나;
- [0035] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 40, 41 및 42로 표시되거나;
- [0036] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 43, 44 및 45로 표시되거나;
- [0037] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 46, 47 및 48로 표시되거나;
- [0038] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 49, 50 및 51로 표시된다.
- [0039] 일부 구현예에서, AbM 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하며:
- [0040] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 52, 53 및 54로 표시되거나;
- [0041] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 55, 56 및 57로 표시되거나;
- [0042] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 58, 59 및 60으로 표시되거나;
- [0043] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 61, 62 및 63으로 표시되거나;
- [0044] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 64, 65 및 66으로 표시된다.
- [0045] 일부 구현예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 PVRIG 결합 단백질이 제공되며, 카바트 번호 매기기 체계에 따르면, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 하기로 표시된다:
- [0046] 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9; 또는

- [0047] 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 150; 또는
- [0048] 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12; 또는
- [0049] 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 151; 또는
- [0050] 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15; 또는
- [0051] 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18; 또는
- [0052] 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21.
- [0053] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 바람직하게는 VHH 항체, 더 바람직하게는 인간화 및/또는 친화도-성숙(matured) VHH 항체이다.
- [0054] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2-6 중 임의의 하나로 표시되거나, 이와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다. 일부 구현예에서, PVRIG 결합 단백질은 상기 기재된 PVRIG 결합 단백질의 CDR1에서 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이, 및/또는 CDR2에서 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이, 및/또는 CDR3에서 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 변이체 단백질이다.
- [0055] 일부 구현예에서, 상기 기재된 PVRIG 결합 단백질에 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항-PVRIG 항체가 제공된다. 항체는 인간화 및/또는 친화도-성숙될 수 있다. 일부 구체적인 구현예에서, 항-PVRIG 항체의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2-6, 75-84 및 86-100 중 임의의 하나로 표시되거나 이와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다. 일부 구체적인 구현예에서, 항-PVRIG 단일-도메인 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 영역에 연결되며, 예를 들어, S228P, F234A, L235A 및/또는 K447A 돌연변이(예를 들어, SEQ ID NO: 101 또는 153으로 표시된 바와 같음)를 갖는 IgG4의 Fc 영역에 연결된다.
- [0056] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질에서 면역글로불린 단일 가변 도메인은 단일-도메인 항체(VHH)이고, 일부 구체적인 구현예에서, VHH는 인간화 및/또는 친화도-성숙 VHH이다.
- [0057] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 항체를 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 항체(예를 들어, VHH)이다.
- [0059] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 낙타과(camelid) 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체이다.
- [0060] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 그 안의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 낙타과 항체이며, VHH의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2-6 중 임의의 하나로 표시되거나 이와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다.
- [0061] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 그 안의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 인간화 항체이고, 항체의 프레임워크 영역은 인간 생식세포계 주형의 중쇄 프레임워크 영역, 예컨대IGHV3-7, 구체적으로 예컨대IGHV3-7 *01 또는IGHV3-30 *02이다.
- [0062] 일부 구체적인 구현예에서, 개시내용의 항-PVRIG 인간화 항체의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 75-84 및 86-100 중 임의의 하나로 표시되거나 이와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다.
- [0063] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 인간 생식세포계 주형의 중쇄 프레임워크 영역을 포함하는 인간화 항체를 포함하거나 이러한 인간화 항체이다.
- [0064] 일부 구현예에서, 인간 생식세포계 주형의 중쇄 프레임워크 영역은IGHV3-7 *01 또는IGHV3-30 *02이다.
- [0065] 일부 구현예에서, 인간화 항체의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 75-84 및 86-100 중 임의의 하나로 표시되거나 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다.
- [0066] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 인간 면역글로불린 Fc 영역, 예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 영역을 추가로 포함한다. 일부 구체적인 구현예에서, 인간 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4의 Fc 영역이다. 일부 구체적인 구현예에서, 인간 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG1의 Fc 영역이다.

Fc 영역은 돌연변이, 예컨대 S228P, F234A, L235A 및/또는 K447A의 아미노산 돌연변이(예를 들어, SEQ ID NO: 101 또는 153으로 표시된 바와 같음)를 가질 수 있다.

- [0067] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질에서, PVRIG에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 면역글로불린 Fc 영역에 직접 또는 링커를 통해 연결된다. 링커는 1-20개, 1-30개, 1-40개, 1-50개 이상의 아미노산 길이를 갖고 2차 또는 더 고차의 구조를 갖지 않는 비-기능적 아미노산 서열일 수 있다. 링커는 가요성(flexible) 링커, 예컨대 GS, GAP, ASGS, G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, YGNGT, (YGNGT)₂, (YGNGT)₃, (YGNGT)₄, (YGNGT)₅ 및 (YGNGT)₆일 수 있다.
- [0068] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질에서 Fc 영역은 PVRIG 결합 단백질이 2개 또는 4개의 PVRIG 결합 도메인을 포함하는 이량체 분자를 형성하게 한다. 이러한 PVRIG 결합 단백질은 또한 2가 또는 4가 PVRIG 결합 단백질로 지칭된다. 이량체는 예를 들어, 동종이량체이다.
- [0069] 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 하기 특징 중 적어도 하나를 갖는다:
- [0070] (a) 1×10^{-7} M 미만의 K_d 값으로 PVRIG에 결합하는 특징;
- [0071] (b) PVRIG와 이의 리간드(예를 들어, PVRL2)의 상호작용을 차단하는 특징;
- [0072] (c) T 세포에 대한 수지상 세포의 피해를 경감시키고 T 세포를 활성화시키는 특징;
- [0073] (d) NK 세포에 대한 종양 세포의 피해를 경감시키는 특징; 및
- [0074] (e) 종양 성장을 저해하는 특징.
- [0075] 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만 또는 1×10^{-10} M 미만의 K_d 값으로 PVRIG에 결합할 수 있다.
- [0076] 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 종양 성장을 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70% 또는 적어도 약 80%만큼 저해시킬 수 있다.
- [0077] 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 단량체이고/이거나, PEG화되고/되거나, 글리코실화되고/되거나, 알부민-접합 또는 알부민-융합되고/되거나, Fc-융합되고/되거나, 하이드록시에틸화되고/되거나, 탈(de)-O-글리코실화될 수 있다.
- [0078] 제2 양태에서, 본 개시내용은 PVRIG에 대한 이중특이적 항체를 제공한다.
- [0079] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되며, 제1 항원-결합 도메인은 PVRIG에 특이적으로 결합한다.
- [0080] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제1 항원-결합 도메인은 PVRIG에 특이적으로 결합하고, 제1 항원-결합 도메인은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대 VHH)을 포함하며:
- [0081] CDR1은 SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61 및 64 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되고/되거나,
- [0082] CDR2는 SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 및 65 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되고/되거나,
- [0083] CDR3은 SEQ ID NO: 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 150 및 151 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 및 이와 비교하여 3, 2, 1개 이상의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택된다.
- [0084] SEQ ID NO: 7-21은 카바트 번호 매기기 체계에 기초하며, SEQ ID NO: 22-36은 초티아 번호 매기기 체계에 기초하고, SEQ ID NO: 37-51은 IMGT 번호 매기기 체계에 기초하며, SEQ ID NO: 52-66은 AbM 번호 매기기 체계에 기초한다.

- [0085] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 내 PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인은 SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, CDR1, CDR2 및 CDR3은 카바트, IMGT, 초티아, AbM 또는 컨택트 번호 매기기 시스템에 따라 정의되고, 일부 구체적인 구현예에서, CDR은 카바트 번호 매기기 체계에 따라 결정된다.
- [0086] 일부 구체적인 구현예에서, 카바트 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인(예를 들어, VHH)은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며:
- [0087] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9로 표시되거나;
- [0088] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 150으로 표시되거나;
- [0089] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로 표시되거나
- [0090] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 151로 표시되거나;
- [0091] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15로 표시되거나;
- [0092] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18로 표시되거나;
- [0093] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21로 표시된다.
- [0094] 일부 구체적인 구현예에서, 초티아 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인(예를 들어, VHH)은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며:
- [0095] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24로 표시되거나;
- [0096] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 27로 표시되거나;
- [0097] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 28, 29 및 30으로 표시되거나;
- [0098] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 31, 32 및 33으로 표시되거나;
- [0099] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36으로 표시된다.
- [0100] 일부 구체적인 구현예에서, IMGT 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인(예를 들어, VHH)은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며:
- [0101] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 37, 38 및 39로 표시되거나;
- [0102] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 40, 41 및 42로 표시되거나;
- [0103] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 43, 44 및 45로 표시되거나;
- [0104] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 46, 47 및 48로 표시되거나;
- [0105] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 49, 50 및 51로 표시된다.
- [0106] 일부 구체적인 구현예에서, AbM 번호 매기기 체계에 따르면, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인(예를 들어, VHH)은 3개의 상보성 결정 영역, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며:
- [0107] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 52, 53 및 54로 표시되거나;
- [0108] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 55, 56 및 57로 표시되거나;
- [0109] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 58, 59 및 60으로 표시되거나;
- [0110] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 61, 62 및 63으로 표시되거나;
- [0111] CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 64, 65 및 66으로 표시된다.
- [0112] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제1 항원-결합 도메인(예를 들어, VHH)은 SEQ ID NO: 2-6, 75-84 및 86-100 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적

어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

- [0113] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서:
- [0114] 제1 항원-결합 도메인은 제1 항체이고, 이는 VHH이며;
- [0115] 제2 항원-결합 도메인은 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 포함하는 제2 항체이고;
- [0116] 제1 항체로서 VHH는 제2 항체의 HC 또는 LC의 N-말단 및/또는 C-말단에 위치한다.
- [0117] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 1개의 제2 항체 및 2개의 VHH 제1 항체를 포함하며; 제2 항체는 2개의 HC 및 2개의 LC를 포함하고, 제2 항체에서, 하나의 HC의 VH는 하나의 LC의 VL과 항원-결합 부위를 형성하고, 다른 HC의 VH는 다른 LC의 VL과 항원-결합 부위를 형성한다.
- [0118] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서, 하나의 VHH 제1 항체는 제2 항체의 HC 또는 LC의 N-말단에 위치하고, 다른 VHH 제1 항체는 제2 항체의 HC 또는 LC의 C-말단에 위치한다.
- [0119] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서, VHH 제1 항체는 제2 항체의 HC 둘 다 또는 LC 둘 다의 N-말단에 각각 위치하거나; VHH 제1 항체는 제2 항체의 HC 둘 다 또는 LC 둘 다의 C-말단에 각각 위치한다.
- [0120] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서, VHH 제1 항체는 제1 항체의 2개의 HC의 N-말단에 각각 위치하거나; VHH 제1 항체는 제1 항체의 HC 둘 다의 C-말단에 각각 위치한다.
- [0121] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 제1 항체는 동일하거나 상이할 수 있는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 VHH 제2 항체에 연결될 수 있거나, 모두 제1 항체의 HC의 N-말단에 연결될 수 있거나, 모두 제1 항체의 HC의 C-말단에 연결될 수 있거나, 모두 제1 항체의 LC의 N-말단에 연결될 수 있거나, 모두 제1 항체의 LC의 C-말단에 연결될 수 있거나, HC의 N-말단, HC의 C-말단, LC의 N-말단 및 LC의 C-말단의 임의의 조합에 연결될 수 있다.
- [0122] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서 VHH 제1 항체는 제2 항체의 각각의 HC의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 링커를 통해 연결된다. 링커는 $(G_mS_n)_x$, $(GGNGT)_x$ 및 $(YGNGT)_x$ 로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되며, m 및 n은 독립적으로 1 내지 8의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)로 이루어진 균으로부터 선택되고, x는 독립적으로 1 내지 20의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20)로 이루어진 균으로부터 선택된다. 예를 들어, 링커는 G_4S , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$, $(G_4S)_5$ 또는 $(G_4S)_6$ 으로 표시된 아미노산 서열이다.
- [0123] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제2 항체의 HC는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(CH)을 포함하고, LC는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다. 제2 항체는 전장 항체일 수 있다.
- [0124] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제2 항체의 HC는 IgG 이소타입(isotype)(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), 예컨대 IgG1 이소타입의 것이고/이거나; 제2 항체의 LC는 카파 이소타입이다.
- [0125] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제2 항체의 2개의 HC는 동일한 CDR을 포함하고/하거나 2개의 LC는 동일한 CDR을 포함한다. 일부 구체적인 구현예에서, 제2 항체의 2개의 HC는 동일한 VH를 포함하고/하거나 2개의 LC는 동일한 VL을 포함한다. 일부 구체적인 구현예에서, 제2 항체의 2개의 HC는 동일한 아미노산 서열을 갖고/갖거나, 2개의 LC는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0126] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 2개의 VHH 제1 항체는 동일한 또는 상이한 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들어, 2개의 VHH 제1 항체는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0127] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 2개의 제1 폴리펩타이드 사슬 및 2개의 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 각각의 폴리펩타이드 사슬에 대해: a) 제1 폴리펩타이드 사슬은 각각 독립적으로 VHH 제1 항체 및 제2 항체의 중쇄(HC)를 포함하고; b) 제2 폴리펩타이드 사슬은 각각 독립적으로 제2 항체의 경쇄(LC)를 포함하며, VHH는 제1 항체의 HC의 N-말단 및/또는 C-말단에 링커를 통해 연결된다.
- [0128] 또는, i) 제1 폴리펩타이드 사슬은 각각 독립적으로 제2 항체의 중쇄(HC)를 포함하고; ii) 제2 폴리펩타이드 사슬은 각각 독립적으로 VHH 제1 항체 및 제2 항체의 경쇄(LC)를 포함하며; VHH는 제2 항체의 LC의 N-말단 및/또

는 C-말단에 링커를 통해 연결된다.

- [0129] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 2개의 동일한 제1 폴리펩타이드 사슬 및 2개의 동일한 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.
- [0130] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제2 항원-결합 도메인은 임의의 항-TIGIT 항체이다. W02009126688, W02014089113, W02015009856, W02015143343, W02015174439, W02016028656, W02016106302, W02017053748, W02017030823, US20160176963, US20130251720, W02019232484 및 W02019062832에서 TIGIT 항체는 그 전문이 참조로서 본원에 포함된다. 예를 들어, TIGIT 항체는 CPA.9.083.H4(S241P), CPA.9.086.H4(S241P), CHA.9.547.7.H4(S241P) 및 CHA.9.547.13.H4(S241P) 중 임의의 하나일 수 있다 (W02019232484 참조).
- [0131] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체의 제2 항원-결합 도메인은 제2 항체이다. W02019062832에서 항-TIGIT 항체는 제2 항체로서 사용되며 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다. 제2 항체에서:
- [0132] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 115, 116 및 117로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 118, 119 및 120으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0133] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0134] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 127, 128 및 129로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 130, 131 및 132로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0135] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 133, 134 및 135로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 136, 137 및 138로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0136] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 139, 140 및 141로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 142, 143 및 144로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0137] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서 제1 항원-결합 도메인 또는 제1 항체(예를 들어, VHH)는 SEQ ID NO: 7, 8 및 9로 각각 표시된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하거나, SEQ ID NO: 7, 8 및 150으로 각각 표시된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며; 제2 항원-결합 도메인 또는 제2 항체의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0138] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서 제1 항원-결합 도메인 또는 제1 항체(예를 들어, VHH)는 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로 각각 표시된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하거나, SEQ ID NO: 10, 11 및 151로 각각 표시된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며; 제2 항원-결합 도메인 또는 제2 항체의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0139] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체에서 VHH 제1 항체는 SEQ ID NO: 6, 79, 81, 92, 98 및 99 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 항체는 SEQ ID NO: 145-147 중 임의의 하나로 표시된 VH, SEQ ID NO: 148-149 중 임의의 하나로 표시된 VL, SEQ ID NO: 102로 표시된 HC 및 SEQ ID NO: 103으로 표시된 LC 또는 이러한 VH 및 HC 또는 VL 및 LC와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0140] 일부 구체적인 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:
- [0141] SEQ ID NO: 104로 표시된 제1 폴리펩타이드, 및 SEQ ID NO: 103으로 표시된 제2 폴리펩타이드;
- [0142] SEQ ID NO: 105로 표시된 제1 폴리펩타이드, 및 SEQ ID NO: 103으로 표시된 제2 폴리펩타이드;
- [0143] SEQ ID NO: 102로 표시된 제1 폴리펩타이드, 및 SEQ ID NO: 106으로 표시된 제2 폴리펩타이드;
- [0144] SEQ ID NO: 102로 표시된 제1 폴리펩타이드, 및 SEQ ID NO: 107로 표시된 제2 폴리펩타이드;
- [0145] SEQ ID NO: 108-112 및 114 중 임의의 하나로 표시된 제1 폴리펩타이드, 및 SEQ ID NO: 103으로 표시된 제2 폴

리펩타이드; 또는

- [0146] 상기 기재된 제1 폴리펩타이드 사슬 및/또는 제2 폴리펩타이드 사슬과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 변이체.
- [0147] 일부 구현예에서, PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체 및 본 개시내용의 항-TIGIT와 함께 이에 의해 형성된 이중 특이적 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한 돌연변이를 Fc 영역에 갖는다:
- [0148] i) 경쇄 및 중쇄의 조립을 용이하게 하거나 항체의 안정성을 증가 또는 저하시키기 위해 CH1의 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 수를 변경시키는 돌연변이;
- [0149] ii) Fc γ RIIIa에의 결합을 증강시켜 증강된 ADCC를 초래하는 돌연변이 및 Fc γ RIIb에의 결합을 약화시키는 돌연변이, 예컨대 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 299T, 297N 또는 이의 임의의 조합;
- [0150] iii) 생물학적 반감기를 증가시키는 돌연변이, 예컨대 T252L, T254S, T256F, 428L, 434A, 434S 428L/434S 또는 이의 임의의 조합;
- [0151] iv) 부모(parent) 항체의 항원-결합 능력을 보유하는 한편 이펙터 리간드에 대한 항체의 친화도를 변경시키기 위한 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322번 위치, 또는 이의 임의의 조합에서의 하나 이상의 아미노산 돌연변이;
- [0152] v) 항체가 변경된 C1q 결합을 갖고/갖거나 보체 의존적 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity)이 감소되거나 무력화되는 329, 331 및 322번 위치, 또는 이의 임의의 조합에서의 하나 이상의 아미노산 돌연변이;
- [0153] vi) 보체를 고정시키는 항체의 능력이 변경되는 231-239 또는 이의 임의의 조합에서의 하나 이상의 아미노산 돌연변이;
- [0154] vii) ADCC에 대한 수용력(capacity)을 증가시키고/시키거나 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키기 위한 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 및 439, 또는 이의 임의의 조합에서의 하나 이상의 아미노산 돌연변이;
- [0155] viii) S228P, F234A, L235A 및/또는 K447A의 아미노산 돌연변이; 및
- [0156] ix) S354C, E356D, M358L 및/또는 T366W의 아미노산 돌연변이.
- [0157] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 항-PVRIG 단일-도메인 항체, 및 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체와 동일한 에피토프에의 결합에 대해 경쟁하는 항체가 제공된다.
- [0158] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인 및 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 PVRIG/TIGIT 결합 단백질을 제공하며,
- [0159] PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인은 하기를 포함하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하고:
- [0160] SEQ ID NO: 3 및 80-84 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는
- [0161] SEQ ID NO: 2 및 75-79 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는
- [0162] SEQ ID NO: 4 및 86-90 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는
- [0163] SEQ ID NO: 5 및 91-95 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3; 또는
- [0164] SEQ ID NO: 6 및 96-100 중 임의의 하나로 표시된 서열 내 CDR1, CDR2 및 CDR3;
- [0165] CDR1, CDR2 및 CDR3은 카바트, IMGT, 초티아, AbM 또는 컨택트 번호 매기기 시스템에 따라 정의된다.
- [0166] 카바트 번호 매기기 시스템에 따라, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 하기로 표시된다:

- [0167] 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9; 또는
- [0168] 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 150; 또는
- [0169] 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12; 또는
- [0170] 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 151; 또는
- [0171] 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15; 또는
- [0172] 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18; 또는
- [0173] 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21.
- [0174] 구체적인 구현예에서, PVRIG/TIGIT 결합 단백질의 제1 항원-결합 도메인은 SEQ ID NO: 2-6, 75-84, 및 86-100 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0175] 구체적인 구현예에서, PVRIG/TIGIT 결합 단백질의 제2 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며:
- [0176] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 115, 116 및 117로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 118, 119 및 120으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0177] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0178] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 127, 128 및 129로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 130, 131 및 132로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0179] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 133, 134 및 135로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 136, 137 및 138로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0180] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 139, 140 및 141로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 142, 143 및 144로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0181] 구체적인 구현예에서, PVRIG/TIGIT 결합 단백질의 제2 항원-결합 도메인은 전장 중쇄(HC) 및 전장 경쇄(LC)를 포함하며;
- [0182] 구체적으로, 전장 중쇄는 IgG1 또는 IgG4 이소타입의 것이고, 전장 경쇄는 카파 이소타입의 것이며;
- [0183] 더 구체적으로, 중쇄의 서열은 SEQ ID NO: 102로 표시되거나 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 것이고, 경쇄의 서열은 SEQ ID NO: 103으로 표시되거나 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 것이다.
- [0184] 본 개시내용의 PVRIG/TIGIT 결합 단백질의 구체적인 구현예에서, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 VHH는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역 또는 전장 중쇄의 N-말단에 위치하고/하거나;
- [0185] PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 VHH는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역 또는 전장 중쇄의 C-말단에 위치하고/하거나;
- [0186] PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 VHH는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 경쇄 가변 영역 또는 전장 경쇄의 N-말단에 위치하고/하거나;
- [0187] PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 VHH는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 경쇄 가변 영역 또는 전장 경쇄의 C-말단에 위치한다.
- [0188] 본 개시내용의 PVRIG/TIGIT 결합 단백질의 구체적인 구현예에서, PVRIG에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인의 VHH는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인에 직접 또는 링커를 통해 연결되며;
- [0189] 바람직하게는, 링커는 $(G_4S)_x$ 로 표시된 아미노산 서열이고, x는 독립적으로 1 내지 20의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고;

- [0190] 더 바람직하게는, 링커는 (G₄S)₂ 또는 (G₄S)₃으로 표시된 아미노산 서열이다.
- [0191] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 제공된 PVRIG/TIGIT 결합 단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하며:
- [0192] 제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 108-112 및 114 중 임의의 하나로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 103으로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0193] 제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 104 또는 105로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 103으로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0194] 제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 102로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO: 106 또는 107로 표시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0195] 제3 양태에서, 본 개시내용은 전술된 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예컨대 VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA일 수 있다.
- [0196] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드 조성물이 제공되며:
- [0197] 본 개시내용의 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 VH 또는 HC를 인코딩하는 제1 핵산; 및 본 개시내용의 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 VL 또는 LC를 인코딩하는 제2 핵산을 포함한다.
- [0198] 제4 양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 조성물을 포함하는 발현 벡터 또는 발현 벡터 조성물을 제공하며, 발현 벡터는 진핵생물 발현 벡터, 원핵생물 발현 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0199] 일부 구현예에서, 발현 벡터 조성물이 제공되며:
- [0200] 상기 기재된 폴리뉴클레오타이드 조성물에 제1 핵산을 포함하는 제1 발현 벡터; 및
- [0201] 상기 기재된 폴리뉴클레오타이드 조성물에 제2 핵산을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함한다.
- [0202] 제5 양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 발현 벡터 또는 발현 벡터 조성물로 형질전환되거나 이를 포함하는 숙주 세포를 제공하며, 숙주 세포는 진핵생물 세포 또는 원핵생물 세포일 수 있다.
- [0203] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아, 효모 또는 포유류 세포이다. 일부 구체적인 구현예에서, 숙주 세포는 *E. coli*, *Pichia pastoris*, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, 또는 인간 배아 신장(HEK: human embryonic kidney) 293 세포이다.
- [0204] 제6 양태에서, 본 개시내용은 제조 방법을 제공하며, PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예컨대 VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 상기 기재된 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예컨대 VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 숙주 세포로부터 분리하고 회수하는 단계를 포함한다.
- [0205] 구체적인 구현예에서, 본 개시내용은 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법을 제공하며:
- [0206] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 본 개시내용의 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및
- [0207] 발현된 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 숙주 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [0208] 제7 양태에서, 본 개시내용은 치료적 유효량의 상기 기재된 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH), 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체 또는 PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)을 제공한다.
- [0209] 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)은 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH), 및 항-TIGIT 항체를 포함한다. TIGIT 항체는 상기 기재된 임의의 항-TIGIT 항체, 예를 들어, 본 개시내용의 표 23 및 표 24의 항-TIGIT 항체일 수 있다. 이외에도, 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함할 수 있다.

- [0210] 일부 구체적인 구현예에서, 항-TIGIT 항체는 SEQ ID NO: 121, 122 및 123으로 각각 표시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 124, 125 및 126으로 각각 표시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0211] 일부 구체적인 구현예에서, 약학적 조성물은 단위 용량당 0.01 내지 99 중량%의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 포함할 수 있거나, 약학적 조성물 내 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 양은 단위 용량당 0.1 내지 2000 mg 또는 1 내지 1000 mg이다.
- [0212] 제8 양태에서, 질환을 진단하거나, 치료하거나 예방하고 약제 또는 약학적 조성물(예를 들어, 증식성 장애(예컨대 암 또는 종양)를 치료 또는 예방하거나 관련 장애의 진행을 지연시키기 위한 것)을 제조하는 방법에 있어서 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH), 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체, PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 및 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH), 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체 또는 PVRIG/TIGIT 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나 또는 임의의 조합의 용도가 제공된다.
- [0213] 일부 구현예에서, 대상체에서 장애를 치료하거나 완화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 장애는 암이다.
- [0214] 일부 구현예에서, 대상체의 세포독성 T 세포(CTL)를 활성화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 대상체의 CTL의 하위세트가 활성화된다.
- [0215] 일부 구현예에서, 대상체의 NK 세포를 활성화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 대상체의 NK 세포의 하위세트가 활성화된다.
- [0216] 일부 구현예에서, 대상체의 γ δ T 세포를 활성화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 대상체의 γ δ T 세포의 하위세트가 활성화된다.
- [0217] 일부 구현예에서, 대상체의 Th1 세포를 활성화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 대상체의 Th1 세포의 하위세트가 활성화된다.
- [0218] 일부 구현예에서, 대상체에서 적어도 하나의 유형의 조절 T 세포(Treg)의 세포수 및/또는 활성을 활성화시키거나, 감소시키거나 무력화시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0219] 일부 구현예에서, 대상체에서 인터페론- γ 의 생산 및/또는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인의 분비를 증가시키는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0220] 일부 구현예에서, 대상체에서 PVRIG와 PVL2의 상호작용을 저해하는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0221] 일부 구현예에서, 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0222] 일부 구체적인 구현예에서, 상기 기재된 대상체에서의 장애는 증식성 장애(예를 들어, 암 또는 종양)이거나 대상체는 증식성 장애(예를 들어, 암 또는 종양)를 갖는다. 암 또는 종양은 하기 장애 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 전립선암, 간암(HCC), 결장직장암, 난소암, 자궁내막암, 유방암, 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer), 췌장암, 위장/위암(stomach/gastric cancer), 자궁경부암, 두경부암, 갑상선암, 고환암, 요로상피암(urothelial cancer), 폐암(소세포 폐암(small cell lung cancer) 또는 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer)), 흑색종(melanoma), 비-흑색종 피부암(non-melanoma skin cancer)(편평(squamous) 및 기저(basal) 세포 암종), 신경교종(glioma), 신장 암종(RCC: renal carcinoma), 림프종(NHL 또

는 HL), 급성 골수성 백혈병(AML: acute myelogenous leukemia), T-세포 급성 림프모구성 백혈병(T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia), 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 고환 생식 세포 종양(testis germ cell tumor), 중피종(mesothelioma), 식도암, 메르켈 세포암(Merkel cells cancer), MSI-고(high) 암, KRAS-돌연변이체 종양, 성인 T-세포 백혈병/림프종 및 골수이형성 증후군(MDS: myelodysplastic syndrome). 상기 기재된 장애는 PVRIG 및/또는 TIGIT의 비정상적인 발현(aberrant 발현)과 관련이 있을 수 있다. 일부 구체적인 구현예에서, 암 또는 종양은 하기 암 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 삼중 음성 유방암, 위장/위암, 폐암(소세포 폐암 또는 비-소세포 폐암), 메르켈 세포 암종, MSI-고 암, KRAS-돌연변이체 종양, 성인 T-세포 백혈병/림프종 및 골수이형성 증후군(MDS). 일부 구체적인 구현예에서, 암 또는 종양은 하기 암 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 삼중 음성 유방암, 위장/위암, 폐암(소세포 폐암 또는 비-소세포 폐암), 메르켈 세포 암종 및 MSI-고 암.

[0223] 일부 구현예에서, 상기 기재된 대상체는 PVRIG 및/또는 TIGIT와 관련된 병태를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체의 병태는 PVRIG를 발현하거나 발현하지 않는 암을 포함하고, 비-전이성 또는 비-침윤성 암 및 침윤성 또는 전이성 암을 추가로 포함하고, 면역 세포, 기질 세포(stromal cell) 또는 질환 세포(diseased cell)의 PVRIG는 항종양 반응 및 항침윤 면역 반응을 저해한다. 본 개시내용의 방법은 특히 혈관형성된 종양(vascularized tumor)을 치료하기에 적합하다.

[0224] 일부 구현예에서, 대상체에서 감염 또는 패혈증(sepsis)을 치료하거나 예방하는 방법이 제공되며, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, 항-PVRIG 항체(예를 들어, VHH) 또는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 감염은 바이러스-특이적 T 세포 반응, 예컨대 HIV, HCV 또는 HBV의 기능이상(dysfunction)의 상이한 정도를 특징으로 하는 병원체 감염이다. 일부 구현예에서, 패혈증은 중증 패혈증, 패혈성 쇼크(septic shock), 전신 염증성 반응 증후군(SIRS: systemic inflammatory response syndrome), 균혈증(bacteremia), 패혈증(septicemia), 독혈증(toxemia) 및 패혈증 증후군(septic syndrome)을 포함한다.

[0225] 일부 구현예에서, 질환을 치료하거나 지연시키는 데 사용하기 위한 상기 기재된 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질, PVRIG/TIGIT 결합 단백질, 항-PVRIG 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 폴리뉴클레오타이드 또는 조성물이 제공되며, 바람직하게는, 질환은 증식성 질환이며;

[0226] 더 바람직하게는, 증식성 질환은 암이고;

[0227] 더 바람직하게는, 암은 폐암, 전립선암, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 결장암, 결장직장암, 방광암, 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 흑색종, 신장암, 편평 세포 암종, 혈액계의 암(cancers of blood system), 및 비제어된 세포 성장을 특징으로 하는 임의의 다른 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0228] 일부 구현예에서, 질환을 진단하는 방법이 제공되며,

[0229] a) 대상체로부터의 조직을 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체와 접촉시키는 단계; 및

[0230] b) 조직에서 PVRIG의 과발현의 존재를 질환 또는 장애의 존재의 표시(indication)로서 결정하는 단계를 포함한다.

[0231] 조직은 혈액 시료 또는 고형 종양 생검 시료일 수 있다. PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 표지될 수 있고, 추가로 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체에 결합하는 제2 표지된 항체는 전술된 시료와 접촉될 수 있다. 일부 구체적인 구현예에서, PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 방사성 동위원소, 염료(예를 들어, 비오틴-스트렙타비딘 복합체와 함께), 조영제, 형광 화합물 또는 분자, 및 자기 공명 영상(MRI)용 증강제(enhancer)(예를 들어, 상자성 이온)를 포함하여 표지된다. 일부 구체적인 구현예에서, 질환 또는 장애는 상기 기재된 암 또는 종양, 감염 또는 패혈증이다.

[0232] 제9 양태에서, 본 개시내용은 검출에서 PVRIG 결합 단백질의 용도를 제공한다.

[0233] 본 개시내용은 PVRIG를 검출하기 위한 조성물을 제공하며, 이는 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체를 포함한다. 본 개시내용은 또한, 생체내에서 또는 시험관내에서 PVRIG를 검출하기 위한 방법, 시스템 또는 장치를 제공하며, PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체의 사용을 포함한다.

[0234] 일부 구현예에서, 시험관내 검출 방법, 시스템 또는 장치는 예를 들어, (1) 시료를 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체와 접촉시키는 단계; (2) PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체와 시료 사이에서 형성된 복합체를 검출하는 단계; 및/또는 (3) 기준 시료(예를 들어, 대조군 시료)를 항체와 접촉시키는 단계; 및 (4) 기준 시료와의 비교에 의해 항체와 시료 사이의 복합체 형성의 규모(extent)를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 대조군

시료 또는 대상체와 비교하여 시료 또는 대상체에서의 복합체 형성의 변화(예를 들어, 통계학적으로 유의한 변화)는 시료에서 PVRIG의 존재를 나타낸다.

[0235] 다른 구현예에서, *생체내* 검출 방법, 시스템 또는 장치는 하기 단계를 포함할 수 있다: (1) PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체를 대상체에 투여하는 단계; 및 (2) PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체와 대상체 사이에서 복합체의 형성을 검출하는 단계. 검출은 복합체가 형성되는 장소 또는 시간을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. PVRIG에의 항체 결합은 결합된 또는 비결합된 항체의 검출을 용이하게 하기 위해 검출 가능한 성분으로 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 적합한 검출 가능한 성분은 다양한 효소, 보결 분자단(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체와 PVRIG 사이의 복합체 형성은 PVRIG에 결합하거나 결합하지 않는 항체를 측정하거나 시각화함으로써 검출될 수 있다. 통상적인 검출 검정, 예컨대 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역검정(RIA) 또는 조직 면역조직화학이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 시료는 검출 가능한 성분으로 표지된 마커 및 비표지된 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체를 사용하는 경쟁적 면역검정에 의해 PVRIG의 존재에 대해 분석된다. 검출되거나 검정될 생(living) 시료는 조직세포(histocyte), 혈액, 혈장, 혈청, 췌액(pancreatic juice), 소변, 대변, 조직 유체 또는 배양액일 수 있다.

[0236] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질 또는 항-PVRIG 항체는 검출 목적의 형광단 및 발색단으로 표지될 수 있다.

[0237] 일부 구현예에서, PVRIG에 결합하는 단백질 또는 항-PVRIG 항체를 포함하고, 진단 용도를 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있는 키트가 추가로 제공된다. 키트는 또한, 적어도 하나의 추가 시약, 예컨대 표지(label) 또는 추가 진단제를 포함할 수 있다. 생체내 사용을 위해, 항체는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0238] 본 개시내용의 구현예에 제공된 PVRIG 항체 및 항-PVRIG/TIGIT 디아바디는 PVRIG 및/또는 TIGIT에 대해 높은 특이성 및 높은 친화도를 가지며; 우수한 *생체내* 및 *시험관내* 활성을 완전히 보유하는 한편 인간화 항체의 크게 감소된 면역원성을 특징으로 하고; 래트 및 인간 신체의 양호한 대사 동적 특징(metabolic dynamic characteristics)을 가지며; 장기간의 반감기 및 높은 생체이용률을 갖고; 양호한 장기간 안정성을 가지며, 어떠한 유의한 비정상적인 화학적 변형도 갖지 않고, 고농도에서 어떠한 유의한 응집도 갖지 않으며, 더 높은 순도 및 열적 안정성을 가지며; T 세포 및 NK 세포의 활성을 증강시키고 종양의 발증 및 진행을 저해하는 데 있어서 양호한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0239] 도 1은 PVRIG 리포터 세포에서 항-PVRIG 항체의 활성의 검출 결과를 도시한다.

도 2는 NK 세포 사멸화 실험에서 NK 세포를 활성화시키는 데 있어서 항-PVRIG 항체의 활성의 검출 결과를 도시한다.

도 3은 MLR 실험에서 T 세포를 활성화시키는 데 있어서 항-PVRIG 항체의 활성의 검출 결과를 도시한다.

도 4a 내지 도 4b는 PVRIG 리포터 세포에서 인간화 항-PVRIG 항체의 활성의 검출 결과를 도시한다.

도 5a 내지 도 5b는 NK 세포 사멸화 실험에서 인간화 항-PVRIG 항체에 의한 NK 세포 활성의 활성화의 검출 결과를 도시한다.

도 6a 내지 도 6e는 인간 PVRIG 재조합 단백질, 인간 PVRIG를 과발현하는 세포, 시노물구스 원숭이 PVRIG 재조합 단백질 및 시노물구스 원숭이 PVRIG를 과발현하는 세포에의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 활성, 및 인간 PVRL2에의 인간 PVRIG의 결합의 차단에 있어서 이의 활성 각각의 검출 결과를 도시한다.

도 7a 내지 도 7e는 인간 TIGIT 재조합 단백질, 인간 TIGIT를 과발현하는 세포, 시노물구스 원숭이 TIGIT 재조합 단백질 및 시노물구스 원숭이 TIGIT를 과발현하는 세포에의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 활성, 및 인간 PVRL2에의 인간 TIGIT의 결합의 차단에 있어서 이의 활성 각각의 검출 결과를 도시한다.

도 8은 MLR 실험에서 T 세포를 활성화시키는 데 있어서 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 활성의 검출 결과를 도시한다.

도 9a 내지 도 9b는 인간 PBMC와 혼합된 인간 흑색종 A375의 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 마우스 체중 및 종양 부피 각각에 미치는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 효과를 도시한다.

도 10a 내지 도 10b는 인간 PBMC와 혼합된 인간 흑색종 A375의 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 마우스 체중 및 종양 부피 각각에 미치는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 효과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0240] 1. 용어
- [0241] 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 일부 기술적 및 과학적 용어는 아래에서 구체적으로 정의된다. 본원 어디에서나 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 다른 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속한 분야의 당업계에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.
- [0242] 본 개시내용에 사용되는 아미노산에 대한 3-글자 또는 1-글자 코드는 문헌[*J. Biol. Chem.*, 243, p3558 (1968)]에 기재되어 있다.
- [0243] "PVRIG", "PVRIG 단백질" 또는 "PVRIG 폴리펩타이드"는 선택적으로, 본원에 기재된 기지의(known) 또는 야생형 PVRIG, 뿐만 아니라 PVRIG의 임의의 천연 발생(naturally occurring) 스플라이스(splice) 변이체, 아미노산 변이체 또는 이소형, 특히 가용성 세포의 도메인(ECD) 단편을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 이러한 단백질 또는 이의 변이체, 접합체 또는 단편을 포함할 수 있다. ECD는 특허 출원 W02016134333호에서와 같이 본원에 정의된다. 완전 인간 PVRIG 서열은 GenBank 수탁 번호 AAH73861.1에 의해 찾아질 수 있다.
- [0244] "PVRIG 결합 단백질"은 PVRIG에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 또는 이러한 단백질을 포함하는 임의의 분자를 지칭한다. PVRIG 결합 단백질은 본원에 정의되어 있고 PVRIG에 대한 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이의 접합체를 포함할 수 있다. PVRIG 결합 단백질은 또한, 면역글로불린 슈퍼계열 항체(IgSF) 또는 CDR-그래프팅된(grafted) 분자를 포괄한다. 본 개시내용의 "PVRIG 결합 단백질"은 PVRIG에 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대 VHH)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, "PVRIG 결합 단백질"은 PVRIG에 결합하는 2, 3, 4개 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대 VHH)을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 PVRIG 결합 단백질은 또한, PVRIG의 면역글로불린 단일 가변 도메인에 더하여, 이펙터 기능을 갖는 링커 및/또는 모이어티, 예컨대 반감기 연장 모이어티(예를 들어, 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인), 및/또는 융합 파트너(예컨대 혈청 알부민) 및/또는 접합된 중합체(예컨대 PEG) 및/또는 Fc 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 "PVRIG 결합 단백질"은 또한, 상이한 항원에 결합하는 면역글로불린을 포함하는 이중특이적/다중특이적 항체(예를 들어, 제1 항원(예를 들어, PVRIG)에 결합하는 제1 항체 및 제2 항원(예를 들어, TIGIT)에 결합하는 제2 항체, 선택적으로 제3 항원에 결합하는 제3 항체, 및 추가로 선택적으로 제4 항원에 결합하는 제4 항체)를 포괄한다.
- [0245] "TIGIT", "TIGIT 단백질" 또는 "TIGIT 폴리펩타이드"는 선택적으로, 본원에 기재된 기지의 또는 야생형 TIGIT, 뿐만 아니라 임의의 천연 발생 스플라이스 변이체, 아미노산 변이체 또는 이소형을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 이러한 단백질 또는 이의 변이체, 접합체 또는 단편을 포함할 수 있다. 완전 TIGIT 서열은 GenBank 수탁 번호 AAI01289.1에 의해 찾아질 수 있다.
- [0246] "PVRIG에의 결합"은 PVRIG 또는 이의 에피토프와 상호작용하는 능력을 지칭하며, PVRIG 또는 이의 에피토프는 인간으로부터 유래될 수 있다. "TIGIT에의 결합"은 TIGIT 또는 이의 에피토프와 상호작용하는 능력을 지칭하며, TIGIT 또는 이의 에피토프는 인간으로부터 유래될 수 있다. "항원-결합 부위"는 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편에 의해 인식되는 항원 상의 불연속적인 3-차원 공간 부위를 지칭한다.
- [0247] "항체" 또는 "면역글로불린"은 넓게는 통상적인 항체(사슬간 이황화 결합을 통해 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄를 연결함으로써 형성된 테트라-펩타이드 사슬 구조를 갖는 항체) 및 항원 결합 활성을 갖는 Fab, Fv, sFv, F(ab')₂, 선형 항체, 단일 사슬 항체, scFv, sdAb, sdFv, 나노바디(nanobody), 펩티바디(peptibody), 도메인 항체(중쇄(VH) 항체 및 경쇄(VL) 항체) 및 다중특이적 항체(이중특이적 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 탠덤(tandem) 디(di)-scFv 및 탠덤 트리(tri)-scFv)를 포괄하며, 따라서 본원에 사용되는 바와 같이 용어 "항체"는 전장 항체, 이의 개별 사슬 및 항원 결합 활성을 갖는 임의의 부분, 도메인 또는 단편, 및 전장 항체의 개별 사슬을 포함하는 다중특이적 항체(항원-결합 도메인 또는 단편, 예컨대 VHH 도메인 또는 VH/VL 도메인을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 및 항원 결합 활성을 갖는 임의의 부분, 도메인 또는 단편을 포함한다. 통상적인 항체 또는 면역글로불린은 통상 사슬간 이황화 결합에 의해 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄를 연결함으로써 형성된 테트라펩타이드 사슬 구조의 것이다. 중쇄 불변 영역은 이의 아미노산 조성 및 배열이 상이하므로 이의 항원 특이성이 상이하다. 이에, 면역글로불린은 다르게는 면역글로불린의 이소타입이라고 하는 5개 부류, 즉, IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 나뉠 수 있으며, 이의 상응하는

중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ϵ 사슬이다. 동일한 부류의 Ig는 힌지(hinge) 영역의 아미노산의 조성 및 중쇄의 이황화 결합의 수와 위치의 차이에 따라 상이한 하위부류로 나뉠 수 있으며; 예를 들어, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 나뉠 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 차이에 따라 κ 또는 λ 사슬로 분류된다. 5개의 Ig 부류는 각각 κ (카파) 사슬 또는 λ (람다) 사슬을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 PVRIg 및/또는 TIGIT에 특이적으로 또는 실질적으로 특이적으로 결합한다.

[0248] 본 개시내용의 "항체"는 하기를 포함하지만 이로 제한되지 않는다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iii) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) 2개의 도메인이 결합하여 항원-결합 부위를 형성하게 하는 펩타이드 링커에 의해 VH 도메인과 VL 도메인이 연결되는 단일 사슬 Fv 분자(scFv)(문헌[Bird 등, 1988, *Science* 242: 423-426]; 문헌[Huston 등, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883]) 242, 그 전문은 본원에 참조로서 포함됨); (iv) 유전자 융합에 의해 작제되는 "이기능성(bifunctional) 항체" 또는 "삼기능성(trifunctional) 항체", 다가(multivalent) 또는 다중특이적 단편(문헌[Tomlinson 등, 2000, *Methods Enzymol.* 326: 461-479]; WO94/13804호; 문헌[Holliger 등, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6444-6448], 모두 그 전문이 본원에 참조로서 포함됨); (v) 다른 종, 예컨대 설치류로부터 유래된 면역글로불린 단일 가변 도메인(예를 들어, WO00/29004호에 개시된 바와 같음), 너스 샤크(nurse shark) 및 낙타과 V-HH dAb를 포함한 "도메인 항체" 또는 "dAb"(이하급 "면역글로불린 단일 가변 도메인"으로 지칭됨); (vi) SMIP(저분자 면역약제(small molecule immunopharmaceuticals)), 낙타과 항체, 나노바디 및 IgNAR; (vii) 상기 (i) 내지 (vi)의 인간화 항체.

[0249] 달리 언급되지 않는 한, 본 개시내용의 항체는 일반적으로 카바트 번호 매기기 시스템을 사용한다. 카바트에서 EU 번호 매기기는 또한 일반적으로 불변 도메인 및/또는 Fc 도메인에 사용된다.

[0250] 본 개시내용의 항체는 다중클론, 단일클론, 이종발생성(xenogenic), 동종이계(allogeneic), 동계(syngeneic), 또는 이의 변형된 형태일 수 있으며, 단일클론 항체는 다양한 구현예에서 특히 유용하다. 일반적으로, 개시내용의 항체는 재조합 항체이다. 본원에 사용된 "재조합"은 일반적으로 이러한 생성물을 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터로서 지칭하고, 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성(heterologous) 핵산 또는 단백질의 도입 또는 네이티브(native) 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나 세포가 이러한 방식으로 변형된 세포로부터 유래됨을 나타낸다. 예를 들어, 재조합 세포는 네이티브(비-재조합) 세포 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 비정상적으로 발현되거나, 하향 발현되거나 전혀 발현되지 않는 네이티브 유전자를 발현한다.

[0251] "단일클론 항체" 및 "단일클론 항체 조성물"은 항원의 특정 에피토프와 면역반응할 수 있는 단지 하나의 종의 항원-결합 부위를 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭하는 한편, "다중클론 항체" 및 "다중클론 항체 조성물"은 특정 항원과 상호작용할 수 있는 다수의 종의 항원-결합 부위를 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 전형적으로 이것이 면역반응하는 특정 항원에 대해 단일 결합 친화도를 나타낸다.

[0252] "항원"은 항원을 인식하는 항체를 생성하기 위해 또는 발현 라이브러리(예를 들어, 특히 파지, 효모 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝하기 위해 면역적격(immunocompetent) 척추동물의 면역화에 사용되는 분자를 지칭한다. 본원에서, 항원은 더 넓게 지칭되고, 일반적으로 항체에 의해 특이적으로 인식되는 표적 분자를 포함하고자 하며, 그러므로 항체를 생성하기 위한 면역화 과정에 또는 항체를 선택하기 위한 라이브러리 스크리닝에 사용되는 분자의 일부 또는 모방체(mimic)를 포함한다.

[0253] "서열"(예를 들어, 용어 "면역글로불린 서열", "항체 서열", "단일 가변 도메인 서열", "VHH 서열" 또는 "단백질 서열"에서)은 추가의 제한된 해석이 본 개시내용에 필요하지 않는 한, 일반적으로 관련 아미노산 서열과 이러한 서열을 인코딩하는 핵산 또는 뉴클레오타이드 서열을 둘 다 포괄하고자 한다.

[0254] "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 DNA 및 RNA를 포함하여 임의의 길이의 뉴클레오타이드 가닥을 지칭한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 가닥 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 존재한다면, 가닥 조립 전에 또는 가닥 조립 후에 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한, 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보환식(carbocyclic) 당 유사체, α -아노머(anomeric) 또는 β -아노머 당, 에피머(epimeric) 당(예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스(lyxose), 피라노스, 푸라노스 또는 세도헵툴로스(sedoheptulose)), 비환식(acyclic) 유사체 및 무염기성(abasic) 뉴클레오사이드 유사체, 예컨대 메틸 리보사이드를 포함하여 일반적으로 당염기에 알려진 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당(sugar)을 함유할 수 있다.

- [0255] "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이에서의 또는 2개의 폴리펩타이드 사이에서의 서열 유사성을 지칭한다. 비교되는 서열 둘 다에서의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 하위단위에 의해 차지하게 될 때, 예를 들어, 2개의 DNA 분자의 각각의 위치가 아데닌에 의해 차지하게 된다면, 분자는 해당 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이에서 상동성 백분율은 2개의 서열에 의해 공유된 일치하는 또는 상동성 위치의 수를 비교되는 위치의 수로 나누고 x 100%를 한 함수이다. 예를 들어, 2개의 서열이 최적으로 정렬될 때 10개 위치 중 6개가 일치하거나 상동성이라면, 2개의 서열은 60% 상동성이다. 일반적으로, 2개의 서열이 정렬될 때, 비교가 수행되어 최대 상동성 백분율을 수득한다.
- [0256] 폴리펩타이드 또는 단백질의 "도메인"은 단백질의 나머지와 독립적으로 이의 3차 구조를 유지할 수 있는 접힌 (folded) 단백질 구조를 지칭한다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 단일 기능적 특성을 책임지며, 많은 경우 단백질 및/또는 도메인의 나머지의 기능의 소실 없이 다른 단백질에 첨가되거나, 제거되거나 옮겨질 수 있다.
- [0257] "면역글로불린 도메인"은 항체 사슬(예를 들어, 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체 또는 중쇄 항체의 사슬)의 구형(globular) 영역 또는 이러한 구형 영역으로 본질적으로 구성된 폴리펩타이드를 지칭한다. 면역글로불린 도메인은 이것이 항체 분자의 면역글로불린 접힘 특징을 보유하는 것을 특징으로 하며, 이는 보존된 이황화 결합에 의해 선택적으로 안정화되는 2개의 β-시트에 배열된 약 7개의 역평행 β-가닥의 2-층 샌드위치로 구성된다.
- [0258] "면역글로불린 가변 도메인"은 당업계에서 그리고 이하 "프레임워크 영역 1" 또는 "FR1", "프레임워크 영역 2" 또는 "FR2", "프레임워크 영역 3" 또는 "FR3", 및 "프레임워크 영역 4" 또는 "FR4"로 지칭되는 4개의 "프레임워크 영역"으로 본질적으로 구성된 면역글로불린 도메인을 지칭하며, 프레임워크 영역은 당업계에서 그리고 이하 "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1", "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2" 및 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로 지칭되는 3개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"에 의해 개재된다(interrupted). 그러므로, 면역글로불린 가변 도메인의 일반적인 구조 또는 서열은 하기와 같이 표현될 수 있다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 면역글로불린 가변 도메인은 항원-결합 부위를 가짐으로써 항원에 대한 특이성을 소유한다.
- [0259] "항체 프레임워크(FR)"는 가변 도메인의 일부를 지칭하며, 이는 가변 도메인의 항원-결합 루프(CDR)에 대한 프레임워크로서 역할을 한다.
- [0260] "CDR"의 결정 또는 정의를 위해, CDR의 결정론적 도시(deterministic depiction) 및 항체의 항원-결합 부위를 포함하는 잔기의 식별은 항체의 구조를 분석하고/하거나 항체-리간드 복합체의 구조를 분석함으로써 달성될 수 있다. 이는 당업자에게 알려진 임의의 여러 가지 기법, 예컨대 X-선 결정학에 의해 달성될 수 있다. 카바트 번호 매기기 시스템, 초티아 번호 매기기 시스템, AbM 번호 매기기 시스템, IMGT 번호 매기기 시스템, 컨택트 정의, 및 입체배좌(conformation) 정의를 포함하지만 이로 제한되지 않는 여러 가지 분석 방법이 CDR을 식별하는 데 사용될 수 있다. 카바트 번호 매기기 시스템은 항체 내 잔기를 번호 매기기하기 위한 표준이고, 일반적으로 CDR을 식별하는 데 사용된다(예를 들어, 문헌[Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8] 참조). 초티아 번호 매기기 시스템은 소정의 구조적 루프 영역의 위치를 고려하는 점을 제외하고는 카바트 번호 매기기 시스템과 유사하다(예를 들어, 문헌[Chothia 등, 1986, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17]; 문헌[Chothia 등, 1989, *Nature*, 342: 877-83] 참조). AbM 번호 매기기 시스템은 Oxford Molecular Group에 의해 제작된 항체 구조를 모델링하기 위한 컴퓨터 프로그램 통합을 채택한다(예를 들어, 문헌[Martin 등, 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86: 9268-9272]; 문헌["AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies", Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.] 참조). AbM 번호 매기기 시스템은 기본 서열로부터 항체의 3차 구조를 모델링하기 위해 지식 데이터베이스와 드-보노(de-novo) 방법의 조합을 채택한다(문헌[Samudrala 등, 1999, "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach", *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3: 194-198]에 기재된 것 참조). 컨택트 정의는 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기초한다(예를 들어, 문헌[MacCallum 등, 1996, *J. Mol. Biol.*, 5: 732-45] 참조). 입체배좌 정의에서, CDR의 위치는 항원 결합에 엔탈피를 기여하는 잔기로서 식별될 수 있다(예를 들어, 문헌[Makabe 등, 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156-1166] 참조). 이에 더하여, 다른 CDR 경계(boundary) 정의는 상기 방법 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있으나, 카바트 CDR 중 적어도 일부와 여전히 중첩되지만, 이는 특정 잔기 또는 잔기의 특정 기가 항원 결합에 유의하게 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험 결과에 기초하여 짧아지거나 길어질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR은 방법의 조합을 포함하여 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 정의되는 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에 사용되는 방법에서, 임의의 이러한 방법에 따라 정의되는 CDR이 사용될 수 있다. 하나 초과의 CDR을 포함하는 임의의 주어진 구현예에 대해, CDR은 임의의 카바트, 초티

아, 익스텐디드(extended), AbM, IMGT, 컨택트, 및/또는 입체배좌 정의에 따라 정의될 수 있다.

- [0261] "면역글로불린 단일 가변 도메인"은 일반적으로 다른 가변 도메인(예를 들어, 통상적인 4-사슬 단일클론 항체의 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 필요한 VH/VL 상호작용 없이)과 상호작용하지 않으면서 기능적 항원-결합 부위를 형성할 수 있는 면역글로불린 가변 도메인(VH, VHH 또는 VL 도메인을 포함한 중쇄 또는 경쇄 도메인일 수 있음)을 지칭하는 데 사용된다. "면역글로불린 단일 가변 도메인"의 예는 나노바디(VHH, 인간화 VHH 및/또는 낙타화(camelized) VH, 예를 들어 낙타화 인간 VH 포함), IgNAR, 도메인, VH 도메인으로서 또는 VH 도메인으로부터 유래되는 (단일-도메인) 항체(예컨대 dAbsTM) 및 VL 도메인으로서 또는 VL 도메인으로부터 유래되는 (단일-도메인) 항체(예컨대 dAbsTM)을 포함한다. 중쇄 가변 도메인(예컨대 VH 또는 VHH 도메인)에 기초하고/하거나 이로부터 유래되는 면역글로불린 단일 가변 도메인이 일반적으로 바람직하다. 면역글로불린 단일 가변 도메인의 구체적인 예는 아래 정의된 바와 같이 "VHH 도메인"(또는 "VHH"로서 약칭됨)이다.
- [0262] 중쇄 단일-도메인 항체, VHH, VHH 항체 단편, VHH 항체 또는 나노바디로도 알려진 "VHH 도메인"은 "중쇄 항체"(즉, "경쇄가 없는 항체")로 알려진 항원-결합 면역글로불린의 가변 도메인이다(문헌[Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R., "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; *Nature* 363, 446-448 (1993)]). 용어 "VHH 도메인"은 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체에 존재하는 중쇄 가변 도메인(본원에서 "VH 도메인"으로 지칭됨) 및 경쇄 가변 도메인(본원에서 "VL 도메인"으로 지칭됨)으로부터 가변 도메인을 구별하는 데 사용된다. VHH 도메인은 구체적으로 추가 항원-결합 도메인에 대한 필요성 없이 에피토프에 결합한다(에피토프가 VH 도메인과 함께 VL 도메인에 의해 인식되는 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체에서의 VH 또는 VL 도메인과 대조적으로). VHH 도메인은 단일 면역글로불린 도메인에 의해 형성되는 작고 안정하며 효율적인 항원 인식 단위이다. 용어 "중쇄 단일-도메인 항체", "VHH 도메인", "VHH", "VHH 도메인", "VHH 항체 단편", "VHH 항체" 및 "도메인"("Nanobody"는 벨기에 헨트 소재의 Ablynx N.V.의 상표명임)은 상호 교환적으로 사용된다. "VHH 도메인"은 낙타과에 의해 생성되는 천연 항체, 낙타과에 의해 생성되고 그 후에 인간화된 항체, 또는 파지 디스플레이 기법으로 스크리닝함으로써 수득된 항체를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0263] VH 도메인 및 VHH 도메인에 대해 당업계에서 잘 알려진 바와 같이, 각각의 CDR 내 아미노산 잔기의 총 수는 다양할 수 있고, 카바트 번호 매기기에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총 수에 상응하지 않을 수 있다(즉, 카바트 번호 매기기에 따른 하나 이상의 위치가 실제 서열에서 차지하지 않게 될 수 있거나, 실제 서열이 카바트 번호 매기기에 의해 허용되는 수보다 더 많은 아미노산 잔기를 함유할 수 있음). 이는 일반적으로, 카바트에 따른 번호 매기기가 실제 서열 내 아미노산 잔기의 실제 번호 매기기에 상응할 수 있거나 상응하지 않을 수 있음을 의미한다. 다른 번호 매기기 시스템 또는 번호 매기기 체계는 초티아, IMGT 및 AbM을 포함한다.
- [0264] VHH 도메인 내 아미노산 잔기의 총 수는 통상 110 내지 120, 종종 112 내지 115 범위에 있을 것이다. 그러나, 더 작은 서열 및 더 긴 서열 또한 본원에 기재된 목적에 적합할 수 있음을 주목해야 한다.
- [0265] 통상적인 VH 도메인, VL 도메인, scFv 및 통상적인 항체 단편(예를 들어, Fab- 또는 F(ab')₂ 단편)과 비교하여, VHH 도메인은 단독으로 또는 더 큰 폴리펩타이드의 부분으로서 많은 탁월한 유의한 이점을 제공한다:
- [0266] -높은 친화도 및 높은 선택성으로 항원에 결합하는 데 단지 단일 도메인이 필요하므로, 존재하는 2개의 별개의 도메인을 가질 필요가 없거나, 이러한 2개의 도메인이 올바른 공간 입체배좌 및 배치로 존재하는 것을 보장할 필요가 없음(예를 들어, 특수하게 설계된 링커의 사용은 일반적으로 scFv에 필요함);
- [0267] -VHH 도메인은 단일 유전자로부터 발현될 수 있고, 번역-후(post-translational) 접힘 또는 변형을 필요로 하지 않음;
- [0268] -VHH 도메인은 다가 및 다중특이적 형식으로 쉽게 조작될 수 있음;
- [0269] -VHH 도메인은 고도로 가용성이고, 응집하는 경향을 갖지 않음;
- [0270] -VHH 도메인은 열, pH, 프로테아제 및 다른 변성 제제 또는 조건에 고도로 안정하므로, 냉장 장비의 사용 없이 제조, 저장 또는 수송될 수 있고, 따라서 비용, 시간 및 환경이 절약될 수 있음;
- [0271] -VHH 도메인은 심지어 제조 규모에서 제조가 용이하고 상대적으로 저렴함;
- [0272] -VHH 도메인은 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체 및 이의 항원-결합 단편(크기는 약 15 kDa이거나 통상적인 IgG의 1/10임)과 비교하여 상대적으로 작고, 따라서 더 높은 조직 투과성을 나타내며 테트라펩타이드

드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체 및 이의 항원-결합 단편과 비교하여 더 높은 용량으로 투여될 수 있음;

- [0273] -VHH 도메인은 소위 캐비티(cavity)-결합 특성을 보여줄 수 있고(특히 통상적인 VH 도메인과 비교하여 이의 연장된 CDR3 루프로 인해), 따라서 또한 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 항체 및 이의 항원-결합 단편에 접근 불가능한 표적 및 에피토프에 접근할 수 있음.
- [0274] 특정 항원 또는 에피토프에 결합하는 VHH를 수득하기 위한 방법은 하기 문헌에 이전에 개시되었다: 문헌[R. van der Linden 등, *Journal of Immunological Methods*, 240 (2000) 185-195]; 문헌[Li 등, *J Biol Chem.*, 287 (2012)13713-13721]; 문헌[Deffar 등, *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (12), pp.2645-2652, 17 June, 2009] 및 W094/04678호.
- [0275] "Fc 변이체" 또는 "변이체 Fc"는 Fc 도메인에 아미노산 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 본 개시내용의 Fc 변이체는 이를 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의된다. 그러므로, 예를 들어, S228P 또는 228P는 부모 Fc 폴리펩타이드에 비해 228번 위치에 치환 프롤린을 갖는 Fc 변이체이며, 번호 매기기는 EU 인덱스에 따른 것이다. WT 아미노산의 동일성은 명시되지 않을 수 있으며, 이 경우 전술된 변이체는 228P로 지칭된다.
- [0276] "인간화"의 예는 원래의 VHH 서열의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 잔기를 테트라펩타이드 사슬 구조를 갖는 통상적인 인간 항체의 VH 도메인 내 상응하는 위치에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기로 대체함으로써 낙타과로부터 유래된 VHH 도메인의 "인간화"를 포함한다(본원에서 "서열 최적화"로도 지칭됨; 인간화에 더하여, "서열 최적화"는 또한 VHH의 향상된 특성을 제공하는 하나 이상의 돌연변이에 의한 서열에의 다른 변형, 예컨대 잠재적인 번역-후 변형 부위의 제거를 포괄할 수 있음). 인간화 VHH 도메인은 하나 이상의 완전 인간 프레임워크 영역 서열을 함유할 수 있고, 일부 구체적인 구현예에서 IGHV3의 인간 프레임워크 영역 서열을 함유할 수 있다. "인간화"의 또 다른 예는 마우스 CDR 서열을 인간 항체 가변 영역 프레임워크, 즉, 상이한 유형의 인간 생식세포계 항체 프레임워크 서열 내로 그래프팅함으로써 생성되는 항체를 포함한다. 따라서, 키메라(chimeric) 항체에 함유된 다량의 마우스 단백질 구성요소에 의해 유도되는 강한 항체 가변 항체 반응은 극복될 수 있다. 인간화 방법은 예를 들어, 단백질 표면 아미노산 인간화(재표면화(resurfacing)) 및 항체 인간화를 위한 유니버설 프레임워크 그래프팅 방법(유니버설 프레임워크에의 CDR 그래프팅), 즉, 다른 "프레임워크" 상으로의 CDR "그래프팅"(인간 스캐폴드(scaffold) 또는 비-면역글로불린 스캐폴드를 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 포함한다. 이러한 CDR 그래프팅에 적합한 스캐폴드 및 기법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 유전자의 생식세포계 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식세포계 서열 데이터베이스(인터넷 주소 www.mrcrpe.com.ac.uk/vbase에서 입수 가능함), 뿐만 아니라 문헌[Kabat, E. A. 등, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5판]에서 찾을 수 있다. 본 개시내용의 인간화 항체는 또한, 파지 디스플레이에 의해 CDR 친화도 성숙을 추가로 받는 인간화 항체를 포함한다. 이에 더하여, 면역원성의 저하에 의해 야기되는 활성 저하를 피하기 위해, 인간 항체 가변 영역 내 FR 서열은 활성을 유지하기 위해 최소의 복귀 돌연변이(reverse mutation) 또는 역돌연변이(back mutation)를 받을 수 있다.
- [0277] "친화도-성숙" 항체는 각각의 부모 항체와 비교하여 항원에 대해 증가된 친화도를 초래하는 하나 이상의 변화를 하나 이상의 CDR에 갖는다. 친화도-성숙 항체는 예를 들어, 아래 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다: 문헌[Marks 등, 1992, *Biotechnology* 10: 779-783] 또는 문헌[Barbas 등, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813]; 문헌[Shier 등, 1995, *Gene* 169: 147-155]; 문헌[Yelton 등, 1995, *Immunol.* 155: 1994-2004]; 문헌[Jackson 등, 1995, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9]; 문헌[Hawkins 등, 1992, *J.MoI.Biol.* 226(3): 889896]; 문헌[KS Johnson 및 RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996].
- [0278] 전형적으로, 본 개시내용의 항체는 Biacore, KinExA 또는 Fortibio 검정에서 측정된 바와 같이 결합될 항원(즉, PVRIG)에 바람직하게는 10^{-7} 내지 10^{-10} mol/L(M), 더 바람직하게는 10^{-8} 내지 10^{-10} mol/L, 더욱 더 바람직하게는 10^{-9} 내지 10^{-10} 이하의 해리 상수(KD)로 그리고/또는 적어도 10^{-7} M, 바람직하게는 적어도 10^{-8} M, 더 바람직하게는 적어도 10^{-9} M 또는 더 바람직하게는 적어도 10^{-10} M의 결합 상수(KA)로 결합할 것이다. 10^{-4} M 초과인 임의의 KD 값은 일반적으로 비-특이적 결합을 나타내는 것으로 여겨진다. 항원 또는 에피토프에의 항원-결합 단백질의 특이적 결합은 본원에 기재된 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 검정, 스캐차드 검정(Scatchard assay), 및/또는 경쟁적 결합 검정(예를 들어, 방사성면역검정(RIA), 효소 면역검정(EIA), 및 샌드위치 경쟁적 검정)을 포함하여 알려진 임의의 적합한 방식으로 결정될 수 있다.
- [0279] 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 항체의 파라토프(paratope)가 결합하는

항원 상의 임의의 항원 결정기를 지칭한다. 항원 결정기는 일반적으로 분자의 화학적으로 활성인 표면 기, 예컨대 아미노산 또는 당(sugar) 측쇄를 포함하고, 통상적으로 특정 3-차원 구조적 특징 및 특정 전하 특징을 갖는다. 예를 들어, 에피토프는 전형적으로 예를 들어, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 개의 인접(contiguous) 또는 비-인접(non-contiguous) 아미노산을 독특한 공간 입체배좌에 포함하고, 이는 "선형" 에피토프 또는 "형태적(conformational)" 에피토프일 수 있다. 선형 에피토프에서, 단백질과 상호작용 분자(예를 들어, 항체) 사이의 상호작용의 모든 지점은 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라 선형으로 존재한다. 형태적 에피토프에서, 상호작용 지점은 서로 분리되는 단백질 상의 아미노산 잔기에 걸쳐 존재한다. 주어진 항원의 에피토프는 당업계에 잘 알려진 많은 에피토프 맵핑 기법을 사용하여 식별될 수 있다(예를 들어, 문헌[에피토프 *Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol 66, G.E.Morris, Ed. (1996), US4708871]). 항체는 당업자에게 알려진 통상적인 기법을 사용하여 동일한 에피토프에의 결합에 대해 경쟁적으로 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 경쟁 및 교차-경쟁 연구는 항원에의 결합에 대해 서로 경쟁하거나 교차-경쟁하는 항체를 획득하기 위해 수행될 수 있다(예를 들어, 고처리량 스크리닝 방법에 대해 W003/48731 참조). 따라서, PVRIG 상의 동일한 에피토프에의 결합에 대해 본 개시내용의 항체 분자와 경쟁하는 항체 및 이의 항원-결합 단편은 당업자에게 알려진 통상적인 기법을 사용하여 획득될 수 있다.

[0280] "특이적 결합" 또는 "선택적 결합"은 예정된 항원 상의 에피토프에의 항체의 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체는, 장비에서 재조합 인간 PVRIG, TIGIT 또는 이의 에피토프를 분석물로서 그리고 항체를 리간드로서 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법에 의해 결정될 때, 예정된 항원 또는 이의 에피토프에 약 10^{-7} M 또는 심지어 그 미만의 평형 해리 상수(K_D)로, 그리고 예정된 항원(또는 이의 에피토프) 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원(예를 들어, BSA)에의 결합에 대한 이의 친화도보다 적어도 2배 높은 친화도로 결합한다. "항원-인식 항체"는 본원에서 "특이적으로 결합되는 항체"와 상호 교환적으로 사용된다.

[0281] "결합 친화도"는 본원에서 2개 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 일부 및 항원) 사이의 비공유 상호작용의 강도의 측정치로서 사용되고, 1가 상호작용(고유의 활성)을 기재하는 데 사용된다. 2개 분자 사이의 결합 친화도는 해리 상수(K_D)를 결정함으로써 정량화될 수 있다. K_D 는 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방법(Biacore)을 사용하여 복합체 형성 및 해리의 동역학을 측정함으로써 결정될 수 있다. 1가 복합체의 결합 및 해리에 상응하는 속도 상수는 결합 속도 상수 k_a (또는 k_{on}) 및 해리 속도 상수 k_d (또는 k_{off})로서 각각 지칭된다. K_D 는 방정식 $K_D = k_d/k_a$ 에 의해 k_a 및 k_d 로 지칭된다. 해리 상수의 값은 잘 알려진 방법에 의해 직접 결정될 수 있다(문헌 [Caceci 등, 1984, Byte 9: 340-362]; 문헌[Wong&Lohman, 1993, PNAS 90: 5428-5432] 참조). 표적 항원에의 항체의 결합 능력을 평가하기 위한 다른 표준 검정은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA 및 유세포측정, 뿐만 아니라 본원 어디에서나 예시된 다른 검정을 포함한다. 유사하게는, 상호작용의 특이성은 관심 상호작용(예를 들어, 항체와 항원 사이의 특정 상호작용)에 대한 K_D 값을 결정하고 이를 관심이 없는 상호작용(예를 들어, PVRIG에 결합하지 않는 것으로 알려진 대조군 항체)에 대한 K_D 값과 비교함으로써 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-PVRIG 항체는 또 다른 비-PVRIG 분자에의 결합에 대한 이의 친화도보다 적어도 2배, 10배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1,000배, 또는 10,000배 더 큰 친화도로 이의 표적에 결합할 수 있고, 이러한 양은 제한적인 것으로 의미되지 않는다.

[0282] "보존적 변형"은 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열에 적용 가능하다. 특정 뉴클레오타이드 서열의 경우, 보존적 변형은 동일한 또는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산의 상호 대체, 또는 아미노산 서열을 인코딩하지 않는 뉴클레오타이드의 경우 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 아미노산 서열의 경우, "보존적 변형"은 변화가 단백질의 생물학적 활성을 변경시키지 않으면서 빈번하게 이루어질 수 있도록 유사한 특징(예를 들어, 전하, 측쇄 크기, 소수성/친수성, 백본 입체배좌, 및 강성(rigidity))을 갖는 다른 아미노산으로의 단백질 내 아미노산의 대체를 지칭한다. 당업자는 일반적으로 말해서, 폴리펩타이드의 비-필수 영역에서의 단일 아미노산 대체가 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않음을 인식한다(예를 들어, 문헌[Watson 등 (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p224, (4판)] 참조).

[0283] "아미노산 돌연변이"는 원하는 특성, 예컨대 증강된 안정성 및 증가된 활성을 소유하는 최종 생성물을 획득하기 위한 아미노산 치환, 결실, 삽입, 변형, 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 아미노산 서열 결실 및 삽입은 아미노-말단 및/또는 카르복실-말단 결실 및 아미노산 삽입을 포함한다. 바람직한 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예를 들어, 항-PVRIG 항체의 결합 특성을 변경시키기 위해, 비-보존적 아미노산 치환이 이루어질 수 있으며, 즉, 하나의 아미노산은 상이한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 대체된다. 바람

직한 아미노산 치환은 친수성 아미노산으로의 소수성 아미노산의 대체를 포함한다. 아미노산 치환은 20개 표준 아미노산의 천연 발생 아미노산 유도체 또는 비-천연 발생 아미노산(예를 들어, 4-하이드록시프롤린, 3-메틸히스티딘, 오르니틴, 호모세린 및 5-하이드록시리신)으로의 대체를 포함한다. 아미노산 돌연변이는 부위-지정 돌연변이발생(site-directed mutagenesis), PCR, 유전자 합성, 화학적 변형 등을 포함하여 당업계에서 잘 알려진 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 아미노산 돌연변이는 항체의 CDR, FR 또는 Fc 영역에서 발생할 수 있다.

[0284]

Fc 영역에서의 아미노산 돌연변이의 경우, 돌연변이는 Fc-매개 관련 활성을 변경시키기 위해 본 개시내용의 항체의 야생형 Fc 서열에 도입될 수 있고, 돌연변이는 하기를 포함하지만 이로 제한되지 않는다: a) Fc-매개 CDC 활성을 변경시키는 돌연변이; b) Fc-매개 ADCC 활성을 변경시키는 돌연변이; 또는 c) *생체내에서* FcRn-매개 반감기를 변경시키는 돌연변이(문헌[Leonard G Presta, *Current Opinion in Immunology* 2008, 20: 460-470]; 문헌[Esohe E.Idusogie 등, *J Immunol* 2000, 164: 4178-4184]; 문헌[RAPHAEL A.CLYNES 등, *Nature Medicine*, 2000, Volume 6, Number 4: 443-446]; 문헌[Paul R.Hinton 등, *J Immunol*, 2006, 176: 346-356] 참조). 구체적으로, 돌연변이는 힌지 영역 내 시스테인 잔기의 수가 변경되도록, 예를 들어 증가되거나 저하되도록 CH1의 힌지 영역을 변형시키는 돌연변이를 포함한다(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 US5,677,425호 참조). Fc γ RIIIa에의 결합을 증강시키는 돌연변이(증강된 ADCC를 초래함) 및 Fc γ RIIb에의 결합을 약화시키는 돌연변이, 예컨대 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 299T 및 297N이 도입된다(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 US11/124,620호 및 US6,737,056호 참조). 생물학적 반감기를 증가시키기 위해 Fc 변형을 수행하는 경우, 예를 들어, 하기 돌연변이 중 하나 이상이 도입될 수 있으며: T252L, T254S 및 T256F(US6,277,375호 참조); 생물학적 반감기를 증가시키기 위해, 항체는 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 얻은 인양 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프를 함유하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있고(US5,869,046호 및 US6,121,022호 참조); 혈청 반감기를 증가시키기 위한 추가 돌연변이는 428L, 434A, 434S 및 428L/434S를 포함한다(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 US8,883,973호, US6,737,056호 및 US7,371,826호 참조). 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 대체함으로써 변경된다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산은, 이펙터 리간드에 대한 항체의 친화도가 변경되지만 부모 항체의 항원 결합력이 보유되도록 대체될 수 있다. 친화도-변경 이펙터 리간드는 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 구성요소일 수 있다(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 US5,624,821 및 US5,648,260호 참조). 231번 및 239번 아미노산 위치 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 변경되어, 보체를 고정하는 항체의 능력을 변경시킨다(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 WO 94/29351호 참조). Fc 영역은 하기 위치에서 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC)을 매개하고/하거나 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키는 항체의 능력을 증가시키도록 변형된다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 및 439(그 전문이 참조로서 본원에 포함된 W000/42072호 참조). 더욱이, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위는 맵핑되었고, 향상된 결합을 갖는 변이체가 기재되었다(문헌[Shields, R. L. 등 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604] 참조). 256, 290, 298, 333, 334 및 339번 위치에서의 특정 돌연변이는 Fc γ RIII에의 결합을 향상시키는 것으로 제시된다. 이에 더하여, 하기 조합 돌연변이체는 Fc γ RIII 결합을 향상시키는 것으로 제시된다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A. 더욱이, M252Y/S254T/T256E 또는 M428L/N434S와 같은 돌연변이는 FcRn에의 결합을 향상시키고, 항체 순환 반감기를 증가시킨다(문헌[Chan CA 및 Carter PJ (2010) *Nature Rev Immunol* 10: 301-316] 참조).

[0285]

본 개시내용의 항체의 변형은 예를 들어, 반감기를 증가시키기 위해 폐길화(PEG화)(PEGylation) 또는 다른 수용성 모이어티의 첨가를 포함한다. "PEG화"는 적어도 하나의 PEG 분자를 또 다른 분자(예를 들어, 치료 분자)에 연결하는 것을 지칭한다. 예를 들어, PEG는 하나의 단부(end)에서 하이드록실기에 연결된 선형 또는 분지형 폴리에테르이고 하기 일반 구조를 갖는다: HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. PEG를 분자(폴리펩타이드, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 작은 유기 분자)에 결합시키기 위해, PEG는 일부 말단 또는 양쪽 말단에 작용기를 갖는 PEG의 유도체를 제조함으로써 활성화될 수 있다. 단백질의 PEG 접합을 위한 보편적인 경로는 리신 및 N-말단 아미노산 기와의 반응에 적합한 작용기로 PEG를 활성화시키는 것이다. 특히, 접합에 관여하는 보편적인 반응성 기는 리신의 α 또는 ϵ 아미노기이다. PEG화 연결기와 단백질의 반응은 주로 하기 부위에서 PEG 모이어티의 부착을 유발한다: 단백질의 N-말단에서 α 아미노기, 리신 잔기의 측쇄 상의 ϵ 아미노기, 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이

미다졸기. 대부분의 제조합 단백질이 단일 α 아미노기 및 다수의 ϵ 아미노기와 이미다졸기를 소유하기 때문에, 연결기의 화학적 특성에 따라 수많은 위치 이성질체가 생성될 수 있다.

[0286] 본 개시내용의 조작된 항체 또는 항원-결합 단편은 통상적인 방법을 사용하여 제조되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 cDNA 서열은 클로닝되고 발현 벡터 내로 재조합될 수 있다. 재조합 면역글로불린 발현 벡터는 CHO 세포 내로 안정하게 형질주입될 수 있다. 포유류 발현 시스템은 특히 Fc 영역의 고도로 보조된 N-말단 부위에서 항체의 글리코실화를 초래할 수 있다. 안정한 클론은 인간-유래 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 발현에 의해 획득된다. 양성 클론은 생물반응기의 무혈청 배지에서 확장되어 항체를 생성한다. 분비된 항체를 갖는 배양 용액은 통상적인 기법에 의해 정제되고 수집될 수 있다. 항체는 통상적인 방법을 사용하여 여과되고 농축될 수 있다. 가용성 혼합물 및 중합체는 또한, 통상적인 방법, 예컨대 분자체 및 이온 교환을 사용하여 제거될 수 있다. 생성된 생성물은 예를 들어, -70°C 에서 즉시 냉동되거나, 동결건조될 필요가 있다.

[0287] "주는", "투여하는" 및 "치료하는"은 동물, 인간, 실험 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용될 때, 동물, 인간, 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체, 예를 들어, 치료적, 약동학적, 진단적, 연구 및 실험 방법과의 외인성 약물, 치료제, 진단제, 또는 조성물의 접촉을 지칭한다. 세포의 처리는 시약을 세포와 접촉시키는 것 및 시약을 유체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 유체는 세포와 접촉된다. "주는", "투여하는" 및 "치료하는"은 또한, 예를 들어, 세포를 시약, 진단 결합 조성물에 의해 또는 시험관내에서 그리고 생체 외에서 또 다른 세포에 의해 처리하는 것을 지칭한다. 인간, 수의학 또는 연구 대상체에게 적용될 때, 이는 치료적 치료, 방지적 또는 예방적 조치, 및 연구 및 진단 적용을 지칭한다.

[0288] "치료하는" 또는 "치료"는 치료제, 예컨대 본 개시내용의 임의의 항체를 포함하는 치료제 또는 이의 약학적 조성물을, 치료제가 치료 효과를 갖는 것으로 알려진 하나 이상의 증식성 질환 또는 이의 증상을 갖고 있거나, 갖고 있는 것으로 의심되거나, 가질 소인이 있는 대상체에게 내부적으로 또는 외부적으로 투여하는 것을 지칭한다. 전형적으로, 치료제는 치료를 받는 대상체 또는 집단에서 질환의 하나 이상의 증상을 완화시키기에 효과적인 양으로 투여되어, 이러한 증상의 퇴행을 유도하거나 임의의 임상적으로 측정 가능한 정도로의 이러한 증상의 발증을 저해한다. 질환의 임의의 특정 증상을 완화시키기에 효과적인 치료제의 양("치료적 유효량"으로도 지칭됨)은 질환 상태, 대상체의 연령 및 체중, 및 대상체에서 원하는 치료 효과를 발휘하는 약물의 능력과 같은 인자에 따라 다양할 수 있다. 질환의 증상이 완화되었는지의 여부는 증상의 중증도 또는 진행을 평가하기 위해 의사 또는 다른 의료 전문가에 의해 보편적으로 사용되는 임의의 임상적 시험 방법에 의해 평가될 수 있다. 본 개시내용(예를 들어, 치료 방법 또는 제조 물품(article of manufacture))의 구현예가 소정의 대상체에서 관심 질환의 증상을 완화시키는 데 효과가 없을 수 있더라도, 이는 당업계에 알려진 임의의 통계학적 검정 방법, 예컨대 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-제곱 검정(Chi-square test), 만 및 휘트니에 의한 U-검정(U-test by Mann 및 Whitney), 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)(H-검정), 존크히어리-테스트(Jonckheere-Terpstra) 및 윌콕슨 검정(Wilcoxon test)에 의해 결정되는 바와 같이, 통계학적으로 유의한 수의 대상체에서 관심 질환의 증상을 완화시켜야 한다.

[0289] "유효량"은 의학적 병태의 증상 또는 징후를 완화시키거나 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 유효량은 또한, 진단을 가능하게 하거나 용이하게 하기에 충분한 양을 지칭한다. 대상체에 대한 유효량은 치료될 병태, 대상체의 일반적인 건강, 투여 방법, 투여 경로, 및 부작용의 중증도와 같은 인자에 따라 다양할 수 있다. 유효량은 유의한 부작용 또는 독성 효과를 피하기 위한 최대 용량 또는 투여 계획일 수 있다. 본 개시내용의 대상체는 동물 또는 인간 대상체일 수 있다.

[0290] "숙주 세포"는 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함하고, 이는 폴리뉴클레오타이드 삽입체의 혼입을 위한 벡터의 수혜자일 수 있거나 수혜자였다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 자손은 천연, 우연적, 또는 고의적(deliberate) 돌연변이로 인해 원래의 부모(parent) 세포와 필수적으로 완전히 동일하지 않을 수 있다(형태 또는 게놈 DNA 보체에서). 숙주 세포는 생체내에서 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드로 형질주입되고/되거나 형질전환된 세포를 포함한다. "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호 교환적으로 사용되고, 모든 이러한 표기는 이의 자손을 포함한다. 또한, 모든 자손은 정교한 또는 의도치 않은 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수 있음을 이해해야 한다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 바와 같이 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 포함된다.

[0291] "벡터"는 하나 이상의 관심 유전자 또는 서열을 숙주 세포에 전달하고 일부 구현예에서는 발현할 수 있는 작제를 지칭한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 나상(naked) DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는

과지 벡터, 양이온성 응축제에 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 소정의 진핵생물 세포, 예컨대 생성자 세포를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0292] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 후속적으로 기재되는 사건 또는 상황이 발생할 수 있으나 반드시 그런 것은 아니며, 설명은 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들어, "선택적으로 1 내지 3개의 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는"은 특정 서열의 항체 중쇄 가변 영역이 존재할 수 있으나 반드시 그런 것은 아님을 의미한다.

[0293] "약학적 조성물"은 하나 이상의 본원에 기재된 항체 및 항원-결합 단편 또는 이의 생리학적으로/약학적으로 허용 가능한 염 또는 전구약물, 및 다른 화학적 구성요소, 예컨대 생리학적으로/약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 함유하는 혼합물을 지칭한다. 약학적 조성물의 목적은 유기체에게의 투여를 촉진하는 것이며, 이는 활성 성분의 흡수를 용이하게 하여 생물학적 활성을 발휘한다.

[0294] "약학적으로 허용 가능한 담체" 또는 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 활성 성분과 조합될 때, 성분이 생물학적 활성을 보유하고 대상체의 면역계와 반응하지 않게 하는 임의의 물질이다. 예는 임의의 표준 약학적 담체, 예컨대 포스페이트 완충 식염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대 유/수 에멀전, 및 다양한 유형의 습윤제를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 에어로졸 또는 비경구 투여를 위한 희석제는 포스페이트 완충 식염수(PBS) 또는 생리(normal)(0.9%) 식염수이다. 이러한 담체를 함유하는 조성물은 잘 알려진 통상적인 방법에 의해 제형화될 수 있다(예를 들어, 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, A. Gennaro, eds., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]; 및 문헌[R Remington, *The Science 및 Practice of Pharmacy*, 20th edition, Mack Publishing, 2000] 참조).

[0295] 본 개시내용의 "PVRIG 결합 단백질" 또는 "PVRIG 항체"는 하나 이상의 이펙터 분자를 예를 들어 접합된 방식으로 포함할 수 있다. "이펙터 분자"는 예를 들어, 항신생물제(antineoplastic agent), 약물, 독소, 생물학적 활성 단백질, 예컨대 효소, 다른 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 천연 발생 중합체, 핵산 및 이의 단편, 예컨대 DNA, RNA 및 이의 단편, 방사성 핵종(radionuclide), 특히 방사성 요오다이드(radioiodide), 방사성 동위원소, 킬레이트화 금속(chelated metal), 나노입자 및 리포터기, 예컨대 형광 화합물 또는 NMR이나 ESR 분광법에 의해 검출될 수 있는 화합물을 포함한다. 이펙터 분자가 중합체일 때, 이는 일반적으로 합성 또는 천연 발생 중합체, 예를 들어, 선택적으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지형 또는 비분지형 다당류, 예컨대 호모-다당류 또는 헤테로-다당류일 수 있다. 상기 기재된 합성 중합체 상에 존재할 수 있는 구체적인 선택적 치환기는 하나 이상의 하이드록실기, 메틸기 또는 메톡시기를 포함한다. 합성 중합체의 구체적인 예는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(비닐 알코올) 또는 이의 유도체, 특히 선택적으로 치환된 폴리(에틸렌 글리콜), 예컨대 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 이의 유도체를 포함한다. 구체적인 천연 발생 중합체는 락토스, 아밀로스, 텍스트란, 글리코젠 또는 이의 유도체를 포함한다. 일 구현예에서, 중합체는 알부민 또는 이의 단편, 예컨대 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편이다. PVRIG 결합 단백질 또는 PVRIG 항체에의 중합체의 접합은 통상적인 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0296] 본 개시내용은 실시예를 참조로 하여 아래에 더 기재되지만, 이는 본 개시내용의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0297] 실시예 또는 시험예에 제시된 특정 조건이 없는 실험 절차는 일반적으로 통상적인 조건에 따라, 또는 출발 물질 또는 상업적 제품의 제조업체에 의해 권고되는 조건에 따라 실시되며, 문헌[Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press]; 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel 등, Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY]를 참조한다. 제시된 특정 기원이 없는 시약은 상업적으로 입수 가능한 통상적인 시약이다.

[0298] **실시예 1: PVRIG 단백질의 서열 및 제조**

[0299] his-태깅된 인간 PVRIG(h-PVRIG-his) 재조합 단백질, 마우스 IgG2a Fc-태깅된 인간 PVRIG(h-PVRIG-mIgG2a Fc) 재조합 단백질 및 인간 IgG1 Fc-태깅된 마우스 PVRIG(m-PVRIG-hIgG1 Fc)를 Acrobiosystems로부터 구매한 정제된 상업적인 단백질 시약이었고, 이의 서열을 표 1에 제시한다.

표 1

표 1. 재조합 단백질의 아미노산 서열

명칭	아미노산 서열의 개시 및 말단	Genbank 수탁 번호
h-PVRIG-his	Thr41-Asp171	Q6DKI7-1
h-PVRIG-mIgG2a Fc	Thr41-Asp171	Q6DKI7-1
m-PVRIG-hIgG1 Fc	Ser35-Asp165	A0A1B0GS01-1

[0300]

[0301]

[0302]

[0303]

[0304]

[0305]

[0306]

[0307]

his-태깅된 시노몰구스 원숭이 PVRIG(cyno-PVRIG-his) 재조합 단백질의 서열은 하기와 같다:

TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGLPGSISLVTVSWGPGDAGGTKLAVLHPELGTQWAPARQARWETQSSISLALED SGASSPFANTTFCKFASFPEG
SWESCGSLPPSSDPGLSAPPTPVPILRADHHHHHHH (SEQ ID NO: 1)

재조합 단백질은 통상적인 방법에 의한 일시적 형질주입에 의해 HEK293 세포에서 발현되었고, 상층액을 수집하고 Ni-NTA에 의해 정제하였다. 검출을 수행하고, cyno-PVRIG-his을 수득하였다.

실시예 2: 항-인간 PVRIG 단일-도메인 항체의 생성

낙타를 면역화함으로써 항-인간 PVRIG 단일클론 단일-도메인 항체를 생성하였다. 면역 항원은 his-태깅된 인간 PVRIG 재조합 단백질(h-PVRIG-his)이다. Freund's 아주반트(Sigma, 로트 번호: F5881/F5506)를 에멀전화에 사용하고, Freund's 완전 아주반트(CFA) CFA를 1차 면역화에 사용하고, Freund's 불완전 아주반트(IFA)를 잔여 부스트(boost) 면역화에 사용하였다. 면역화 주사 시간은 제0일, 제14일, 제28일 및 제42일이었다. 혈액 시험을 위해 혈액을 제56일에 수집하고, 낙타 혈청을 ELISA 방법에 의해 시험하여 낙타 혈청 내 항체 역가를 결정하였다.

200 mL의 낙타 말초 혈액을 얻고, PBMC를 이로부터 분리하고, 트리졸(Trizol)을 사용하여 RNA를 세포로부터 추출하고, cDNA로 역전사시켰다. 단일-도메인 항체의 가변 영역의 유전자를 PCR 방법에 의해 증폭시키고, 파지 벡터 내로 클로닝함으로써, 항-인간 PVRIG 단일-도메인 항체의 파지 라이브러리를 확립하였다.

파지 라이브러리를 BSA로 희석시키고 차단시키고, 자기 비드(magnetic bead) Dynabeads(M-280, Invitrogen)와 함께 인큐베이션하였다. 음성 스크리닝 및 인큐베이션 후 파지를 수집하였다. Dynabeads를 비오틴화된 his-태깅된 인간 PVRIG에 의해 코팅시키고 차단하고, 음성 스크리닝 후 수집된 파지 현탁액과 함께 인큐베이션한 다음, 파지를 판크레아틴(pancreatin)으로 용리하였다. 3 차례의 스크리닝 후, 세번째 차례의 스크리닝으로부터 수득된 400개 클론을 선택하고 시퀀싱하였고, 5개의 단일-도메인 항체의 중쇄 서열을 표 2에 제시하고, 상이한 번호 매기기 체계의 CDR을 표 3에 제시한다.

표 2

표 2. 항-PVRIG 항체의 중쇄 가변 영역(HCVR)의 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
20	HCVR	DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASRYTSRTDCMG WFRQAPGKEHEGV AHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQD HAKNTLYLQMNSLKPEDSATYYCVVGFKFD DDYCA PNDWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 2
30	HCVR	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSYSGDCMG WFRRAPGKERDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISH GNGKYILYLQMNSLKPEDTDMYYCAAGWTFGGNCS PADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 3
38	HCVR	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASPSTYGPSDMA WFRQAPGKQREGVATISAAGRLLTYTDSVGRFTISR DNAKNTMYLQMNSLKPEDTAMYYCAADFAGGSSLF ADYKYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 4
39	HCVR	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRYTSRTDCMG WFRQAPGKEREGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQD HAKNTLYLQMNSLKPEDSATYYCVVGFKFGDYCAP NDWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:5
151	HCVR	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCM AWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASR DNAGFSLFLQMN DLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCP PLGQGLNYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:6

[0308]

표 3

표 3. 항-PVRIG 항체의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)의 서열

항체 번호	CDR	카바트 번호 매기기 체계	호리아 번호 매기기 체계	IMGT 번호 매기기 체계	AbM 번호 매기기 체계
20	HCDR1	TDCMG (SEQ ID NO: 7)	RYTSRTD (SEQ ID NO: 22)	RYTSRTDC (SEQ ID NO: 37)	RYTSRTDCMG (SEQ ID NO: 52)
	HCDR2	HIDSDGIPRYVDSVKG (SEQ ID NO: 8)	DSDGI (SEQ ID NO: 23)	IDSDGIP (SEQ ID NO: 38)	HIDSDGIPR (SEQ ID NO: 53)
	HCDR3	GFKFD DDYCAPND (SEQ ID NO: 9)	GFKFD DDYCAPND (SEQ ID NO: 24)	VVGFKFD DDYCAPND (SEQ ID NO: 39)	GFKFD DDYCAPND (SEQ ID NO: 54)
30	HCDR1	GDCMG (SEQ ID NO: 10)	GYSYSGD (SEQ ID NO: 25)	GYSYSGDC (SEQ ID NO: 40)	GYSYSGDCMG (SEQ ID NO: 55)
	HCDR2	TIDNAGRIKYADSVKG (SEQ ID NO: 11)	DNAGR (SEQ ID NO: 26)	IDNAGRI (SEQ ID NO: 41)	TIDNAGRIK (SEQ ID NO: 56)
	HCDR3	GWTFGGNCSPAD (SEQ ID NO: 12)	GWTFGGNCSPAD (SEQ ID NO: 27)	AAGWTFGGNCSPAD (SEQ ID NO: 42)	GWTFGGNCSPAD (SEQ ID NO: 57)
38	HCDR1	PSDMA (SEQ ID NO: 13)	PSTYGPS (SEQ ID NO: 28)	PSTYGPSD (SEQ ID NO: 43)	PSTYGPSDMA (SEQ ID NO: 58)
	HCDR2	TISAAGRLLTYTDSVR G(SEQ ID NO: 14)	SAAGRLL (SEQ ID NO: 29)	ISAAGRLLT (SEQ ID NO: 44)	TISAAGRLLTY (SEQ ID NO: 59)
	HCDR3	DFAGGSSLFADYKY (SEQ ID NO: 15)	DFAGGSSLFADYKY (SEQ ID NO: 30)	AADFAGGSSLFADYKY(S EQ ID NO: 45)	DFAGGSSLFADYK Y(SEQ ID NO: 60)
39	HCDR1	TDCMG (SEQ ID NO: 16)	RYTSRTD (SEQ ID NO: 31)	RYTSRTDC (SEQ ID NO: 46)	RYTSRTDCMG (SEQ ID NO: 61)
	HCDR2	HIDSDGIPRYVESVKG (SEQ ID NO: 17)	DSDGI (SEQ ID NO: 32)	IDSDGIP (SEQ ID NO: 47)	HIDSDGIPR (SEQ ID NO: 62)
	HCDR3	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 18)	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 33)	VVGFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 48)	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 63)
151	HCDR1	YRYPYMA (SEQ ID NO: 19)	ASGFTYRYPY (SEQ ID NO: 34)	ASGFTYRYPY (SEQ ID NO: 49)	ASGFTYRYPYMA (SEQ ID NO: 64)
	HCDR2	GIDIFGGTTYADSVKG (SEQ ID NO: 20)	DIFGG (SEQ ID NO: 35)	IDIFGGT (SEQ ID NO: 50)	GIDIFGGTT (SEQ ID NO: 65)
	HCDR3	GDSPDGRCPPLGQGL NY(SEQ ID NO: 21)	GDSPDGRCPPLGQ GLNY(SEQ ID NO: 36)	AAGDSPDGRCPPLGQGL NY(SEQ ID NO: 51)	GDSPDGRCPPLGQ GLNY (SEQ ID NO: 66)

[0309]

[0310] 실시예 3: 전장 항-PVRIG 항체의 제조

[0311] 실시예 2의 5개 항체의 중쇄 가변 영역을 각각 인간 IgG4 중쇄의 Fc 영역에 연결하여, 전장 항-PVRIG 항체를 작 제하였다. 중쇄의 Fc 영역은 힌지 영역을 포함하였고, S228P, F234A, L235A 및 K447A 돌연변이(Eu 명명 시스 템)를 운반하였다. W02016134333호에서 제시된 항-PVRIG 항체 CPA.7.021을 항체의 과지 라이브러리로부터 스크 리닝하였고, 이는 IgG1 하위유형의 것이고 인간 PVRIG에 양호하게 결합할 수 있었으나, 이는 시노물구스 원숭이 PVRIG에 결합하지 않았다. CPA.7.021의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역(S228P, F234A, L235A 및 K447A 돌연변이를 가짐) 및 인간 카파의 경쇄 불변 영역에 연결하여, 양성 항체 Tab5를 작제하였다.

[0312] 5개 항체의 전장 서열 및 양성 항체를 표 4에 제시한다.

표 4

표 4. 완전 인간 항-PVRIG 항체의 중쇄 및 경쇄의 전장 서열

항체 번호		중쇄/경쇄의 전장 아미노산 서열	서열 번호
20	HC	DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASRYTSRTDCMGWFR QAPGKEHEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQDHAKNT LYLQMNSLKPEDSATYYCVVGFKFDYCAPNDWGQG TQVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLPPKPKDIL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL LSLGA	SEQ ID NO: 67
30	HC	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSYSGDCMGWF RRAPGKERDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISHGNGK YILYLQMNSLKPEDTDMYYCAAGWTFGGNCSPADWGQ GTQVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLPPKPKDI LMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLGA	SEQ ID NO: 68
38	HC	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAWFR QAPGKQREGVATISAAGRLLTYTDSVGRFTISRDAKNT TMYLQMNSLKPEDTAMYYCAADFAGGSSLFADYKYW GQGTQVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNGKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLGA	SEQ ID NO: 69
39	HC	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRYTSRTDCMGWF RQAPGKEREGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQDHAKN TLYLQMNSLKPEDSATYYCVVGFKFGDYCAPNDWGQG TQVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLPPKPKDIL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL LSLGA	SEQ ID NO:70
151	HC	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASAGFTYRYPYMA WFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDN AGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPLGQ GLNYWGQGTQVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSV FLPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLGA	SEQ ID NO:71
Tab5	HC	EVQLVESGGGVVVKPGGSLRLSCAASGFTFGTSSMNVWR	SEQ ID NO:72

[0313]

	<p>QAPGKGLEWVAVISFDGTEIHYADSVKGRFTISRDNKS TVFLQMNSLRPDDTALYYCAKSGNIYFYSGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPC PAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYRSLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGA</p>	
LC	<p>DIQMTQSPSTLSASVGRVITTCRAGQSISGWLAWFQQK PGKAPNLLIYETSTLESGVPSRFSGSGSTEYTLTISSLQP DDFATYYCQQYYSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLILSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	SEQ ID NO:73

(각주: 밑줄 표시된 부분은 중쇄의 Fc 도메인임)

[0314]

[0315]

상기 서열을 합성하고, BamHI 및 XhoI로 절단하고, BamHI/XhoI 효소 절단 부위를 통해 pcDNA3.1 발현 벡터 (Life Technologies 카탈로그 번호 V790-20) 내로 삽입하였다. 발현 벡터 및 형질주입 시약 PEI(Polysciences, Inc. 카탈로그 번호 23966)를 HEK293 세포(Life Technologies 카탈로그 번호 11625019) 내로 1:2 비로 형질주입하고, 세포를 CO₂ 인큐베이터에 넣고 4일 내지 5일 동안 인큐베이션하였다. 발현된 항체를 원심분리에 의해 분리하고, 통상적인 방법에 의해 정제하였다. 검출을 수행하고, 관심 항체를 수득하였다.

[0316]

실시예 4: PVRIG 재조합 단백질에의 항-PVRIG 항체의 결합에 대한 실험

[0317]

ELISA 검정을 사용하여, 항-PVRIG 항체의 결합 특성을 검출하였다. 마이크로플레이트를 his-태깅된 PVRIG 재조합 단백질로 코팅하였다. 항체를 첨가한 후, 2차 항체(HRP-접합된 항-1차 항체 Fc 항체) 및 HRP 기질 TMB를 첨가함으로써 항원에의 항체의 결합 활성을 검출하였다.

[0318]

인간, 시노몰구스 원숭이 또는 마우스 PVRIG 단백질(1 µg/mL의 농도에서)을 96-웰 마이크로플레이트 상에 웰당 100 µL로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. 각각의 세척에 대해, 플레이트를 10초 동안 진탕시켜 적절한 세정을 보장하였다. 차단액(PBS + 0.05% Tween20 + 1% BSA)을 웰당 300 µL로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. 각각의 세척에 대해, 플레이트를 10초 동안 진탕시켜 적절한 세정을 보장하였다. 희석제에서 희석된 시험 항-PVRIG 항체를 웰당 100 µL로 첨가하였다. 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. HRP-표지된 항-인간 IgG 2차 항체 (Sigma, A8667)를 웰당 100 µL로 첨가하였다. 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. TMB를 웰당 100 µL로 첨가하고, 혼합물을 암실에서 15분 동안 반응시켰다. 0.16 M/L 황산을 웰당 50 µL로 첨가하였다. 450 nm에서의 OD 값을 Thermo MultiSkanFc 마이크로플레이트 판독기에 의해 판독하고, PVRIG에의 항-PVRIG 항체의 결합의 EC₅₀ 값을 계산하였다. 모든 항체는 인간 또는 시노몰구스 원숭이 PVRIG 재조합 단백질에의 상대적으로 강한 결합력을 가졌으나, 이는 마우스 PVRIG 재조합 단백질에 결합하지 않았다.

표 5

표 5. 상이한 종의 PVRIG 재조합 단백질에의 항-PVRIG 항체의 결합에 대한 실험 결과

항체 번호	인간 PVRIG-his ELISA EC ₅₀ (nM)	시노몰구스 원숭이 PVRIG-his ELISA EC ₅₀ (nM)	마우스 PVRIG-Fc ELISA EC ₅₀
20	0.40	0.14	결합 없음
30	0.26	0.16	결합 없음
38	0.26	0.40	결합 없음
39	0.27	0.16	결합 없음
151	2.15	2.43	결합 없음
Tab5	2.86	결합 없음	결합 없음
IgG4	결합 없음	결합 없음	결합 없음

[0319]

[0320] 실시예 5: PVRIG를 발현하는 세포에의 항-PVRIG 항체의 결합에 대한 실험

[0321] 유세포측정기(FACS)를 사용하여 항-PVRIG 항체의 결합 특성을 검출하였다. 인간 또는 시노몰구스 원숭이 PVRIG를 과발현하는 세포 균주를 작제하고, 항체의 첨가 후, 항원에의 항체의 결합 활성을 2차 항체의 첨가에 의해 검출하였다.

[0322] 인간 또는 시노몰구스 원숭이 PVRIG 유전자 서열을 운반하는 발현 플라스미드를 HEK293 세포 내로 형질주입하고, 과발현성 안정한 형질주입 단일클론 세포 균주를 항생제 스크리닝 및 무한 희석에 의해 수득하였다. 과발현 세포를 웰당 2×10^5 세포로 96-웰 플레이트 내로 시딩하였다. 세포를 300 g에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고, 100 μ L의 시험 항체를 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 원심분리하고, 상층액을 제거하고, 플레이트를 200 μ L의 세척액(PBS + 2% FBS)으로 3회 세척한 다음, 1:500에서 희석된 Alexa Fluor 488로 표지된 100 μ L의 항-인간 IgG 2차 항체(Invitrogen, A-11013)를 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 원심분리하고, 상층액을 제거하고, 플레이트를 200 μ L의 세척액(PBS + 2% FBS)으로 3회 세척하였다. 세포를 100 μ L의 PBS에 재현탁시키고, 유세포측정기(BD FACS Calibur 또는 BD FACS Canto_ II)에 의해 검출하였다. 모든 항체는 세포 표면 상에서 발현되는 인간 또는 시노몰구스 원숭이 PVRIG에의 상대적으로 강한 결합력을 가졌고, 결합력은 양성 항체 Tab5보다 유의하게 더 강하였고, Tab5는 심지어 시노몰구스 원숭이 PVRIG에 전혀 결합하지 않았다.

표 6

표 6. 상이한 종의 PVRIG를 발현하는 세포에의 항-PVRIG 항체의 결합에 대한 실험 결과

항체 번호	인간 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)	원숭이 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)
20	N.A.	N.A.
30	N.A.	0.02
38	0.24	0.34
39	0.004	6.97
151	0.01	2.23
Tab5	2.13	결합 없음
IgG4	결합 없음	결합 없음

(각주: N.A., 적용 가능하지 않음은, 결합이 너무 강해서 심지어 저농도에서 항체의 어떠한 해리도 존재하지 않고 정확한 EC₅₀을 얻기 위한 맞춤형 불가능함을 의미함)

[0323]

[0324] 실시예 6: 항-PVRIG 항체에 의해 PVRL2에의 PVRIG의 결합을 차단시키는 것에 대한 실험

[0325] 이 실험에서, 시험관내 차단 실험에 의해, PVRIG가 이의 리간드 PVRL2에 결합하는 것을 차단하는 선택된 항-PVRIG 항체의 능력을 검출하였다. 구체적으로, 마우스 IgG2a Fc-태깅된 인간 PVRIG 재조합 단백질(h-PVRIG-mIgG2a Fc)을 96-웰 마이크로플레이트 상에 코팅하고, 항-PVRIG 항체를 첨가하여 에피토프에 완전히 결합하고 차지하게 한 다음, his-태깅된 PVRL2(PV2-H52E2, Acrobiosystems)를 첨가한 다음, his 태그를 검출함으로써 PVRIG 및 PVRL2의 결합 양을 계산하고, PVRIG 활성 부위를 차단하기 위한 항-PVRIG 항체의 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0326] h-PVRIG-mIgG2a Fc 단백질(1 µg/mL의 농도에서)을 웰당 100 µL로 96-웰 마이크로플레이트 상에 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. 각각의 세척에 대해, 플레이트를 10초 동안 진탕시켜 적절한 세정을 보장하였다. 차단액을 웰당 300 µL로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. 각각의 세척에 대해, 플레이트를 10초 동안 진탕시켜 적절한 세정을 보장하였다. 50 µL의 희석된 시험 항-PVRIG 항체 및 50 µL의 his-태깅된 리간드 PVRL2를 각각의 웰에 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. 1:2000으로 희석된 HRP-표지된 항-his-태깅된 2차 항체(Genscript)를 웰당 100 µL로 첨가하였다. 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 웰당 250 µL로 세척액으로 3회 세척하였다. TMB를 웰당 100 µL로 첨가하고, 혼합물을 암실에서 15분 동안 반응시켰다. 0.16 M/L 황산을 웰당 50 µL로 첨가하였다. 450 nm에서의 OD 값을 Thermo MultiSkanFc 마이크로플레이트 판독기에 의해 판독하고, 항-PVRIG 항체에 의한 PVRL2에의 PVRIG의 결합의 차단의 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0327] 결과는, 시험된 모든 항체가 인간 PVRL2에의 인간 PVRIG의 결합을 저해하는 데 있어서 강한 효과를 가졌음을 보여주었다.

표 7

표 7. 항체에 의한 인간 PVRIG/PVRL2 결합의 차단에 대한 실험

항체 번호	ELISA IC ₅₀ (nM)
20	1.18
30	1.11
38	0.93
39	0.76
151	0.37
Tab5	1.16
IgG4	차단 없음

[0328]

[0329]

실시예 7: PVRIG에 대한 항-PVRIG 항체의 친화도의 결정

[0330]

습윤 처리를 위해 단백질 A 바이오센서(Fortebio, # 18-5010)를 200 μL의 KB 완충제(PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA)에 60초 동안 침지시켰다. 그 후에, 항-PVRIG 항체를 KB 완충제로 10 μg/mL까지 희석시키고, 판독이 1.2 nm에 있을 때까지 센서를 200 μL의 용액에 침지시켰다. 센서를 KB 완충제에 100초 동안 침지시켜 과량의 항체를 용리하였다. His-태깅된 인간 PVRIG를 KB 완충제로 64-4 nM까지 2배 구배로 희석시켰다. 결합을 위해 센서를 혼합물에 300초 동안 침지시켰다. 해리를 위해 센서를 KB 완충제에 600초 동안 침지시켰다. 데이터를 동적(dynamic) 1:1 결합 방식으로 맞추었다. 인간 PVRIG에의 항-PVRIG 항체의 친화도를 표 8에 제시한다.

[0331]

결과는, 시험된 모든 항체가 인간 PVRIG에 대한 높은 친화도를 가졌음을 보여주었다.

표 8

표 8. 인간 PVRIG에 대한 항-PVRIG 항체의 친화도

항체 번호	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
20	3.43E+05	8.07E-05	2.36E-10
30	2.84E+05	2.05E-04	7.23E-10
38	1.32E+05	2.87E-04	2.17E-09
39	2.42E+05	1.69E-04	6.96E-10
151	2.61E+05	5.22E-05	2.00E-10
Tab5	7.37E+05	1.61E-05	2.19E-10

[0332]

[0333]

실시예 8: 리포터 세포에서 항-PVRIG 항체의 활성화에 대한 실험

[0334]

첫째, p1vx-OS8(G418 내성) 플라스미드를 작제하고 293F 세포 내로 형질주입하고, G418 스크리닝을 수행하고, 유세포측정기를 동시에 사용함으로써 클론 세포 OS8의 발현 및 OS8에 의한 Jurkat 세포의 활성화를 검출하고, 중간 활성화 정도를 갖는 클론을 스크리닝하고, 이로써 293F-OS8 세포 균주를 획득하였고; p1vx-PVRL2 플라스미드를 작제하고 사용하여 293F-OS8 세포를 감염시키고, 유세포측정기를 사용함으로써 PVRL2의 최고 발현 수준을 갖는 클론을 스크리닝하고, 이로써 293F-OS8-PVRL2 세포 균주를 획득하였다.

[0335]

둘째, p1vx-NFAT-Luc(하이그로마이신 내성)를 작제하고 렌티바이러스 내로 패키징하여 Jurkat E6.1 세포를 감염시키고, 하이그로마이신을 첨가하여 내성 클론을 스크리닝하고, OKT3을 사용하여 클론을 자극시키고, 중간 루시퍼라제 신호를 갖는 클론을 스크리닝하고, 이로써 Jurkat-NFAT-Luc 세포주를 획득하였고; p1vx-PVRIG(퓨로마이신 내성) 벡터를 작제하고 렌티바이러스 내로 패키징하여 Jurkat-NFAT-Luc 세포를 감염시키고, 유세포측정기를 사용함으로써 최고 PVRIG 발현 수준을 갖는 클론을 스크리닝하여, Jurkat-NFAT-Luc-PVRIG 세포 균주를 획득하였다.

[0336]

1E4 Jurkat-NFAT-Luc-PVRIG 세포를 37°C에서 20분 동안 시험 항체와 함께 인큐베이션하였다. 1E5 293F-OS8-

PVRL2 세포를 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 혼합물을 원심분리하고, 상층액을 제거하고, 루시퍼라제 완충제(Promega, E6130)를 첨가하여 세포를 용해시키고, 형광값을 검출하였다. EC₅₀ 값을 계산하여 항-PVRIG 항체의 시험관내 세포 활성을 평가하였다. 실험 결과를 도 1 및 표 9에 제시한다.

[0337] 결과는, 시험된 모든 항체가 Jurkat 세포에서 루시퍼라제를 활성화시키는 상대적으로 강한 능력을 가졌고 활성은 양성 항체의 3.7배 내지 18.5배였음을 보여주었고, 이는 항체가 PVRIG에 결합하고 PVRIG에의 PVRL2의 결합을 차단할 수 있음을 보여준다.

표 9

표 9. 리포터 세포에서 항-PVRIG 항체의 활성에 대한 실험 결과

항체 균주 번호	PVRIG 리포터 세포에서 활성에 대한 실험 EC ₅₀ (nM)
20	0.04
30	0.06
38	0.20
39	0.06
151	0.04
Tab5	0.74
IgG4	결합 없음

[0338]

실시예 9: 항-PVRIG 항체의 NK 세포 사멸화 실험

[0340] PVRIG는 NK 세포 상에서 발현되는 한편, PVRL2는 K562 세포를 포함한 많은 종양 세포에서 발현된다. 항-PVRIG 항체는 PVRIG에의 PVRL2의 결합을 차단함으로써 종양 세포에 의한 NK 세포 활성의 저해를 경감시킬 수 있다.

[0341] 배양된 NK92 세포주(인간 악성 비-호지킨 림프종 환자의 NK 세포)를 세척액(RPMI 1640, 5% FBS 및 10 ng/mL IL-2를 포함함)으로 2회 세척하고, 2x10⁶ 개 세포/mL의 밀도로 재현탁시켰다. NK92 세포를 웰당 50 μL(총 1 x10⁵ 개 세포)로 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 50 μL의 20 nM 또는 100 nM 시험 항체를 첨가하고, 혼합물을 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 세척액으로 2회 세척하고, 세포를 2x10⁵/mL의 밀도로 재현탁시켰다. 인간 만성 골수성 백혈병 K562 세포를 웰당 50 μL(총 1 x10⁴ 개 세포)로 첨가하여, NK92 세포의 수 : K562 세포의 수의 비(ratio)는 10:1이 되었다. 혼합물을 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. CytoTox-Glo 세포독성 시스템(Promega, G9292)을 사용하여 사멸화 활성을 측정하였다. 우선, 50 μL의 AAF-Glo 시약을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 다음, NK92 세포에 의해 사멸화된 K562 세포의 형광을 측정하였다. 50 μL의 용해 완충제를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 웰 내 모든 세포를 용해시킨 다음, 모든 세포의 형광을 측정하였다. 배양액만 함유하는 시료(대조군 1), NK92 세포만 함유하는 시료(대조군 2), 및 K562 세포만 함유하는 150 μL의 시료(대조군 3)를 포함하여 3개의 대조군을 준비하고, 이를 동일한 절차를 받게 하였다.

[0342] 사멸화 활성을 하기 식에 따라 계산하였으며:

[0343]
$$\text{사멸화 활성 (\%)} = \{[(R - BG) - (T - BG) - (E - BG)] / [(TL - BGL) - (T - BG)]\} \times 100$$

[0344] 상기 식에서, R은 AAF-Glo를 첨가한 후의 형광값이며, BG는 AAF-Glo를 첨가한 후의 대조군 1의 형광값이고, E는 AAF-Glo를 첨가한 후의 대조군 2의 형광값이며, T는 AAF-Glo를 첨가한 후의 대조군 3의 형광값이고; TL은 용해 완충제를 첨가한 후의 대조군 3의 형광값이며, BGL은 용해 완충제를 첨가한 후의 대조군 1의 형광값이다.

[0345] 실험 결과를 도 2 및 표 10에 제시하며, 이는 시험된 모든 항-PVRIG 항체가 NK92 세포를 유의하게 활성화시키고 K562 세포를 사멸화시킬 수 있음을 보여준다.

표 10

표 10. 항-PVRIG 항체의 NK 세포 사멸화 실험

항체 번호	사멸화 활성 (%) (평균±표준 편차)	
	20 nM 항체	100 nM 항체
20	35±2	33±2
30	36±5	39±5
38	29±2	27±2
39	32±3	30±3
151	35±3	33±2
Tab5	32±2	32±3
IgG4	22±1	22±2

[0346]

[0347]

실시예 10: 항-PVRIG 항체의 혼합 림프구 반응(MLR) 실험

[0348]

PVRIG는 T 세포 상에서 발현되는 한편, PVRL2는 수지상 세포(DC 세포)에서 발현된다. PVRIG에의 PVRL2의 결합을 차단함으로써, 항-PVRIG 항체는 수지상 세포에 의한 T 세포의 저해를 경감시키므로 T 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0349]

혼합 림프구 반응은, 정상적인 기능을 갖는 2개의 무관한 개별 림프구를 시험관내에서 공동-배양할 때, 2개의 림프구가 서로의 T 세포를 상호 자극시켜, 상이한 주 조직적합성 항원(major histocompatibility antigen)으로 인해 증식할 수 있음을 의미한다. PBMC를 제1 개체로부터 유래된 말초 혈액으로부터 분리하고 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하고, 사이토카인을 50 ng/mL GM-CSF(Peprotech, 300-03-100UG) 및 50 ng/mL IL-4(Peprotech, 200-04-100UG)의 최종 농도로 첨가하고, 사이토카인을 함유하는 신선한 배지를 2일 내지 3일마다 첨가하였고; 6일의 배양 후, 1 µg/mL LPS(Sigma, L2880-25MG)를 첨가하고, 혼합물을 24시간 동안 인큐베이션하고, 분화 및 성숙에 의해 수득된 DC 세포를 수집하였다. PBMC를 제2 공급원의 말초 혈액으로부터 분리한 다음, EasySep 인간 CD3⁺ T 세포 분리 키트(Stemcell, 17952)를 사용하여 CD3⁺ T 세포를 세포로부터 분리하였다. CD3⁺ T 세포 및 DC 세포의 밀도를 조정하여, 웰당 1x10⁵개 CD3⁺ T 세포 및 2x10⁴개 DC 세포를 첨가하였다. 시험 항체를 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 120시간 동안 인큐베이션하고, 상층액을 얻은 다음, ELISA 키트(R&D, DY202)를 사용함으로써 상층액 내 IFN γ 함량을 검출하였다.

[0350]

실험 결과를 도 3 및 표 11에 제시하고, 이는 대조군 항체 IgG4와 비교하여 시험된 모든 항-PVRIG 항체가, T 세포가 IFN γ 를 분비하도록 이러한 T 세포를 유의하게 활성화시킬 수 있음을 보여준다. 한편, 저용량(예컨대 4 nM 및 20 nM)에서, 본 개시내용의 항체는 양성 대조군 Tab5를 능가한다.

표 11

표 11. 항-PVRIG 항체의 혼합 림프구 반응에서 IFN γ 분비 수준

항체 번호	IFN γ (pg/mL) (평균±표준 편차)		
	4 nM 항체	20 nM 항체	100 nM 항체
30	1675±101	1911±347	1576±288
38	1388±232	2024±491	2126±465
151	1498±175	2224±162	1798±373
Tab5	912±173	1425±330	2349±148
IgG4	984±335	814±112	1309±437

[0351]

[0352]

실시예 11: 항-PVRIG 항체의 인간화

[0353]

수득된 낙타 단일-도메인 항체 20, 30, 38, 39 및 151의 VH 전형적인 구조 외에도, 중쇄 가변 영역 서열을 항체

생식세포계 데이터베이스와 비교하여 높은 상동성을 갖는 인간 생식세포계 주형을 수득하였다. 낙타 단일-도메인 항체의 프레임워크 영역을 인간 생식세포계 주형의 중쇄 프레임워크 영역으로 대체하고, CDR(카바트 번호 매기기 시스템에 따른 것)을 보유한 다음, 이를 인간 IgG의 Fc 영역(S228P, F234A, L235A 및 K447A 돌연변이를 갖는 IgG4 Fc)과 재조합하였다. 낙타 단일-도메인 항체의 3-차원 구조 외에도, 포매된(embedded) 잔기, CDR과 직접 상호작용하는 잔기 및 가변 영역의 입체배좌에 중요한 영향을 가졌던 잔기를 역돌연변이를 받게 하였고, CDR 내 화학적으로 불안정한 아미노산 잔기를 최적화하여 일련의 인간화 단일-도메인 항체를 생산하였다. 각각의 단일-도메인 항체에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 중쇄 가변 영역 서열을 표 12 내지 표 16에 제시한다.

표 12

표 12. 항체 20에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
주형 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
20H1	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFDEDEYCAP NDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 75
20H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRTDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFDEDEYCAP NDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 76
20H3	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQDH AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFDEDEYCAP NDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 77
20H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRTDCMG WFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQD HAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFDEDEYCA PNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 78
20H5	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRTDCMG WFRQAPGKEHEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQD HAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFDEDEYCA PNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 79

[0354]

[0355]

표 12에 따르면, 항체 20H1-20H5는 TDCMG(SEQ ID NO: 7)로 표시된 CDR1, HIDS DGIPRYVDSVKG(SEQ ID NO: 8)로 표시된 CDR2 및 GFKFDEDEYCAPND(SEQ ID NO: 150)로 표시된 CDR3을 포함한다.

표 13

표 13. 항체 30에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
주형 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
30H1	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGW FRQAPGKGLEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPA DWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 80
30H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGW FRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCS ADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 81
30H3	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSGDCMG WFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCS PADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 82
30H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGW FRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISHG NAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCS ADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 83
30H5	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSGDCMG WFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISH GNAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCS PADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 84

[0356]

[0357]

표 13에 따르면, 항체 30H1-30H5는 GDCMG(SEQ ID NO: 10)로 표시된 CDR1, TIDNAGRIKYADSVKG(SEQ ID NO: 11)로 표시된 CDR2 및 GWTFGGQCSPAD(SEQ ID NO: 151)로 표시된 CDR3을 포함한다.

표 14

표 14. 항체 38에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
주형 IGHV3-30 *02	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	SEQ ID NO: 85
38H2	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSPDMAW FRQAPGKGLEGVATISAAGRLLYYTDSVRGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFAD YKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 86
38H4	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPFTYGPSDMAW FRQAPGKGLEGVATISAAGRLLYYTDSVRGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFAD YKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 87
38H7	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAW FRQAPGKQREGVATISAAGRLLYYTDSVRGRFTISR NSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFA DYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 88
38H8	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAW FRQAPGKGLEGVATISAAGRLLYYTDSVRGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFAD YKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 89
38H9	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAW FRQAPGKGLEGVATISAAGRLLYYTDSVRGRFTISR NSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFA DYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 90

[0358]

표 15

표 15. 항체 39에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
주형 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
39H1	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFGDYCAPN DWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 91
39H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRIDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFGDYCAPN DWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 92
39H3	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTDCMGW FRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQDH AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFGDYCAPN DWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 93
39H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRIDCMG WFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQD HAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFGDYCAP NDWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 94
39H5	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRIDCMG WFRQAPGKEREVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQD HAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFGDYCAP NDWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 95

[0359]

표 16

표 16. 항체 151에 대한 인간 생식세포계 주형 및 인간화 항체 서열

항체 번호	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열		서열 번호
주형 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
151H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYRPHYMAW FRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLG QGLNYWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 96
151H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCM AWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCP PLGQGLNYWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 97
151H7	HCVR	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCM AWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASR DNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCP LGQGLNYWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 98
151H8	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCM AWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTISR DNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCP LGQGLNYWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 99
151H9	HCVR	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCM AWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASR DNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCP LGQGLNYWGQGTMTVSS	SEQ ID NO: 100

[0360]

[0361]

상기 기재된 인간화 항체의 중쇄 가변 영역을 인간 IgG4 중쇄의 Fc 영역에 연결하여 전장 항-PVRIG 항체를 작제 하였다. 중쇄의 Fc 영역은 힌지 영역을 포함하고 S228P, F234A, L235A 및 K447A 돌연변이를 운반하였다.

- [0362] >인간 IgG4 중쇄의 Fc 영역(S228P/F234A/L235A/K447A)
- [0363] ESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGA (SEQ ID NO: 101)
- [0364] >인간 IgG4 중쇄의 Fc 영역(S228P/K447A)
- [0365] ESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 153)
- [0366] 항체를 통상적인 방법에 의해 발현시키고 정제하였다. 검출을 수행하고, 관심 항체를 수득하였다.
- [0367] 실시예 12: PVRIG를 발현하는 세포에의 인간화 항-PVRIG 항체의 결합에 대한 실험
- [0368] 실시예 5의 방법에 따라 유세포측정기를 사용함으로써 인간 또는 시노볼구스 원숭이 PVRIG에의 인간화 항-PVRIG 항체의 결합을 검출하였다. 실험 결과를 표 17에 제시한다.

표 17

표 17. 상이한 종의 PVRIG 에의 인간화 항-PVRIG 단일-도메인 항체의 결합에 대한 FACS 실험 결과

항체 번호	인간 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)	원숭이 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)
20H1	0.019	0.658
20H2	0.006	0.338
20H3	0.006	1.500
20H4	0.008	0.591
20H5	0.005	0.007
30H1	0.024	0.374
30H2	0.003	0.005
30H3	0.004	0.003
38H2	0.088	0.137
38H4	0.062	0.095
38H7	0.040	0.049
38H8	0.065	N.T.
38H9	0.068	N.T.
39H1	0.004	0.251
39H2	0.006	0.019
39H3	0.005	0.348
39H4	0.005	0.006
39H5	0.006	0.208
151H4	0.240	0.035
151H7	0.002	0.467
151H8	0.006	N.T.
151H9	0.004	3.942
Tab5	0.160	결합 없음
IgG4	결합 없음	결합 없음

(각주: N.T., 시험되지 않음)

- [0369]
- [0370] 실시예 13: PVRIG에 대한 인간화 항-PVRIG 항체의 친화도의 결정

[0371] 실시예 7의 방법에 따라 인간 PVRIG에 대한 인간화 항-PVRIG 항체의 친화도를 검출하였다. 결과를 표 18에 제시한다. 표에 나열된 모든 항체는 인간 PVRIG에 대해 높은 친화도를 갖는다.

표 18

표 18. 인간 PVRIG에 대한 인간화 항-PVRIG 항체의 친화도

항체 번호	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
20H5	1.93E+05	1.35E-05	6.98E-11
30H2	1.69E+05	3.25E-04	1.92E-09
30H3	1.48E+05	3.58E-04	2.41E-09
39H1	2.64E+05	8.65E-04	3.28E-09
39H2	1.80E+05	1.24E-04	6.92E-10
39H4	1.89E+05	9.11E-05	4.82E-10
151H7	1.57E+05	1.88E-04	1.20E-09

[0372]

[0373] 실시예 14: 리포터 세포에서 인간화 항-PVRIG 항체의 활성화에 대한 실험

[0374] 실시예 8의 방법에 따라 리포터 세포에서 인간화 항-PVRIG 항체의 활성을 검출하였다. 결과를 도 4a 내지 도 4b 및 표 19에 제시한다. 표에 나열된 모든 항체는 Jurkat 세포를 활성화시키는 능력을 갖는다.

표 19

표 19. 리포터 세포에서 인간화 항-PVRIG 항체의 활성화에 대한 실험

항체 번호	PVRIG 리포터 세포에서 활성화에 대한 실험 EC ₅₀ (nM)
20H5	0.042
30H2	0.176
30H3	0.078
39H1	0.191
39H2	0.074
39H4	0.094
151H4	3.549
151H7	0.038
151H8	0.058
Tab5	1.380
IgG4	활성화 없음

[0375]

[0376] 실시예 15: 인간화 항-PVRIG 항체에 의한 NK 세포 사멸화 능력의 활성화에 대한 실험

[0377] 실시예 9의 방법에 따라 NK 세포를 활성화시키는 인간화 항-PVRIG 항체의 능력을 검출하였다. 실험 결과를 도 5a 내지 도 5b 및 표 20 내지 표 21에 제시한다. 결과는 본 개시내용의 인간화 항-PVRIG 항체가 NK 세포를 유의하게 활성화시키고 NK 세포에 의한 표적 세포 K562의 사멸화를 촉진시킬 수 있음을 보여준다.

표 20

표 20. 인간화 항-PVRIG 항체의 NK 세포 사멸화 실험

항체 번호	사멸화 활성 (%) (평균±표준 편차)		
	4 nM 항체	20 nM 항체	100 nM 항체
20	9.6±0.5	10.1±0.5	10.2±0.6
20H5	9.2±0.7	9.9±0.6	13.3±0.5
30	10.4±0.9	11.9±0.9	13.3±0.7
30H2	7.7±0.3	14.5±0.8	17.7±0.7
Tab5	5.9±0.1	7.9±0.6	10.0±1.2
PBS	0.8±0.6		

[0378]

표 21

표 21. 인간화 항-PVRIG 항체의 NK 세포 사멸화 실험

항체 번호	사멸화 활성 (%) (평균±표준 편차)		
	4 nM 항체	20 nM 항체	100 nM 항체
39	21.3±1.4	22.7±1.1	22.8±1.6
39H1	13.7±0.7	17.7±0.9	21.2±1.1
39H2	15.3±0.5	18.7±1.0	19.7±0.9
151	20.9±1.5	22.9±1.5	24.2±2.3
151H7	16.9±0.8	21.0±0.4	18.4±0.9
IgG4	11.2±0.4	11.7±2.1	9.2±0.6
PBS	6.6±1.1		

[0379]

[0380]

실시예 16: 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 제조

[0381]

항체 기능에 미치는 상이하게 배치된 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 효과를 알아보기 위해, 항-PVRIG 단일-도메인 항체 151을 링커 GGGSGGGGS(SEQ ID NO: 152)를 통해 항-TIGIT 항체 1708의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단에 연결하였다. 4개의 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 형성하고, 1708-151-1, 1708-151-2, 1708-151-3 및 1708-151-4로 명명하였고, 이는 151을 1708의 중쇄 N-말단, 중쇄 C-말단, 경쇄 N-말단 및 경쇄 C-말단에 각각 연결한 경우에 상응하였다. 항-TIGIT 항체 1708은 인간 IgG4 하위유형의 것이고 S228P(Eu 명명법 시스템) 돌연변이를 가졌다. 항-TIGIT 항체 1708, 및 151과 함께 이에 의해 형성된 이중특이적 항체의 서열을 아래 표 22에 제시한다. 항-TIGIT 항체의 서열 정보를 표 23 내지 표 24에 제시한다. W02019062832A호에서 TIGIT 항체는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.

표 22

표 22. 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 서열

항체 번호	중쇄/경쇄의 전장 아미노산 서열	서열 번호
1708 (항-TIGIT 항체)	제1 폴리펩타이드 사슬 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYW MHWVRRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFK TRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE GAYGYYFDYWGQGITLVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK LSLSLGK	SEQ ID NO: 102
	제2 폴리펩타이드 사슬 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENTYSYLAW YQQKPGKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSLTILSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 103
1708-151-1 (1708의 중쇄의 N-말단에 연결된 항체 151)	제1 폴리펩타이드 사슬 HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGD SPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYWMHWVRRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNE KFKTRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AREGAYGYYFDYWGQGITLVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	SEQ ID NO: 104
	제2 폴리펩타이드 사슬 1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO: 103
1708-151-2 (1708의 중쇄의 C-말단에 연결된 151)	제1 폴리펩타이드 사슬 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYW MHWVRRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFK TRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE GAYGYYFDYWGQGITLVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ ENWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT	SEQ ID NO: 105

[0382]

		VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMITKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGKGGGGSGGGGSHVQLVESGGGSVQAGGSLRL SCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDI FGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKP EDTAMYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGT QVTVSS	
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-151-3 (1708의 경쇄의 N- 말단에 연결된 151)	제1 폴리펩타이드 사슬	1708의 중쇄와 동일함	SEQ ID NO: 102
	제2 폴리펩타이드 사슬	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGD SPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYL AWYQQKPGKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFGSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO:106
1708-151-4 (1708의 경쇄의 C- 말단에 연결된 151)	제1 폴리펩타이드 사슬	1708의 중쇄와 동일함	SEQ ID NO: 102
	제2 폴리펩타이드 사슬	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAW YQQKPGKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSGGGGSHVQLVESGGGSVQAGGSL RLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAG IDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDL KPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQ GTQVTVSS	SEQ ID NO:107

[0383]

표 23

표 23. 항-TIGIT 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR의 서열 (카바트 번호 매기기 체계)

항체	중쇄		경쇄	
1707	HCDR1	DYHMY (SEQ ID NO: 115)	LCDR1	KASQDVGTSVA (SEQ ID NO: 118)
	HCDR2	YISKGGISTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 116)	LCDR2	WASARHT (SEQ ID NO: 119)
	HCDR3	QSSYDFAMDY (SEQ ID NO: 117)	LCDR3	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 120)
1708	HCDR1	NYWMH (SEQ ID NO: 121)	LCDR1	RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 124)
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT (SEQ ID NO: 122)	LCDR2	NARILAE (SEQ ID NO: 125)
	HCDR3	EGAYGYYFDY (SEQ ID NO: 123)	LCDR3	QYHSGSPLP (SEQ ID NO: 126)
1709	HCDR1	DYYMH (SEQ ID NO: 127)	LCDR1	KASQNVVTAVA (SEQ ID NO: 130)
	HCDR2	LVYPYNDNTGYNRKFKG (SEQ ID NO: 128)	LCDR2	SASNRYT (SEQ ID NO: 131)
	HCDR3	GGPSNWNYYFDY (SEQ ID NO: 129)	LCDR3	QQYTLYPLT (SEQ ID NO: 132)
1710	HCDR1	NYYMH (SEQ ID NO: 133)	LCDR1	RTSENIPTYLA (SEQ ID NO: 136)
	HCDR2	RIDPTSGATKYNDNFKG (SEQ ID NO: 134)	LCDR2	NAKTFAE (SEQ ID NO: 137)
	HCDR3	EGGFGYYFDY (SEQ ID NO: 135)	LCDR3	QHHYGIPLP (SEQ ID NO: 138)
1711	HCDR1	NYWIG (SEQ ID NO: 139)	LCDR1	KSSQSLLYSRNQMNLYLA (SEQ ID NO: 142)
	HCDR2	DIYPPGAYTNYNEKFKD (SEQ ID NO: 140)	LCDR2	WTSTRES (SEQ ID NO: 143)
	HCDR3	GDYYDSSGRAMDY (SEQ ID NO: 141)	LCDR3	QQYYSYPYT (SEQ ID NO: 144)

[0384]

표 24

표 24. 항-TIGIT 항체의 중쇄 VH 및 경쇄 VL의 서열

항체	중쇄 VH 및 경쇄 VL의 서열
1708-VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVMTDRDSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGILVTVSS (SEQ ID NO: 145)
1708-VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVMTVDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGILVTVSS (SEQ ID NO: 146)
1708-VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVMTVDTSTSTAYMESSLRSEDYAVYYCAREGAYGYFDYWGQGILVTVSS (SEQ ID NO: 147)
1708-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 148)
1708-VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPKGKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 149)

[0385]

[0386]

항체의 일시적인 형질주입, 발현 및 정제를 통상적인 방법에 따라 수행하였다. 식별을 수행하고, 본 개시내용의

전장 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체를 획득하였다. 이중특이적 항체의 발현 수준 및 순도를 표 25에 제시한다. 공동 단일클론 항체에의 나노바디의 결합은 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단을 통한 것이든지 간에, 양호한 발현 수준 및 순도를 초래한다.

표 25

표 25. 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 발현 수준 및 순도

항체 번호	발현 수준 (mg/L)	SEC 순도 (%)
1708-151-1	140	97.6
1708-151-2	108	95.7
1708-151-3	160	94.7
1708-151-4	158	96.2

[0387]

[0388]

실시예 17: PVRIG 및 TIGIT에의 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 및 상응하는 리간드의 차단에 대한 실험

[0389]

A) 인간 PVRIG에의 상이한 배치를 갖는 이중특이적 항체의 결합 및 리간드 PVRL2의 차단

[0390]

실험을 실시예 4, 실시예 5 및 실시예 6의 방법에 따라 수행하였고, 결과를 표 26에 제시한다. 결과는, 상이한 배치를 갖는 이중특이적 항체가 기본적으로 동일하고 인간 PVRIG 재조합 단백질 및 인간 PVRIG를 과발현하는 세포에의 결합에서 그리고 PVRIG에의 PVRL2의 결합에서 어떠한 차이도 갖지 않음을 보여준다.

표 26

표 26. PVRIG에의 이중특이적 항체의 결합 및 리간드의 차단

항체 번호	인간 PVRIG 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVRIG를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVRL2에의 인간 PVRIG의 결합의 차단 IC ₅₀ (nM)
1708-151-1	1.864	0.05	0.757
1708-151-2	2.391	0.21	0.824
1708-151-3	1.579	0.06	0.712
1708-151-4	1.671	0.49	0.743
Tab5	1.857	3.15	0.797
IgG4	결합 없음	결합 없음	차단 없음

[0391]

[0392]

B) 인간 TIGIT에의 상이한 배치를 갖는 이중특이적 항체의 결합 및 리간드 PVR의 차단

[0393]

실험을 실시예 4, 실시예 5 및 실시예 6의 방법에 따라 수행하였고(상응하는 수용체 및 리간드를 인간 TIGIT 및 인간 PVR로 대체하였음), 결과를 표 27에 제시한다. 결과는, 상이한 배치를 갖는 이중특이적 항체 및 항-TIGIT 항체가 기본적으로 동일하고 인간 TIGIT 재조합 단백질 및 인간 TIGIT를 과발현하는 세포에의 결합에서 그리고 리간드 PVR에의 TIGIT의 결합을 차단하는 데 있어서 어떠한 차이도 갖지 않음을 보여준다. 항-PVRIG 항체 151의 연결 방식은 대부분 TIGIT에의 항-TIGIT 항체의 결합에 어떠한 효과도 갖지 않는다.

표 27

표 27. TIGIT에의 이중특이적 항체의 결합 및 리간드의 차단

항체 번호	인간 TIGIT 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 TIGIT를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVR에의 인간 TIGIT의 결합의 차단 IC ₅₀ (nM)
1708-151-1	0.101	1.51	0.96
1708-151-2	0.090	1.27	1.04
1708-151-3	0.069	1.92	0.62
1708-151-4	0.054	1.00	0.69
1708	0.055	0.74	0.87
IgG4	결합 없음	결합 없음	차단 없음

[0394]

[0395]

표 24 내지 표 25의 데이터를 참조하여, 항-PVRIG 항체는 항-TIGIT 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단에 연결되었는지 간에 PVRIG 및 TIGIT에의 이의 결합 및 리간드의 차단을 유지하고 양호한 발현 수준 및 순도를 보여주는 것으로 발견된다.

[0396]

실시예 18: 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 제조

[0397]

상기한 인간화 항-PVRIG 항체(20H5, 30H2, 39H2, 151H7 및 151H8)를 각각 항-TIGIT 항체 1708의 중쇄의 N-말단에 연결하여(즉, 1708-151-1과 유사한 이중특이적 항체 배치를 사용함) 디아바디를 작제하였고, 서열을 표 28에 제시한다.

표 28

표 28. 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 전장 서열

항체 번호	제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 전장 아미노산 서열		서열 번호
1708-20H5	제1 폴리펩타이드 사슬	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRID CMGWFRQAPGKEHEGVAHIDSDGIPRYVDSV KGRFTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVVGFKFDYCAPNDWGQGMVTVSSGGG <u>GSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV'SCKA</u> SGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP DSTGSKYNEKFKTRVIMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDVAVYYCAREGAYGYFDYWGQGITLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTV'PSSSLGKTYTCNV'DHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDITLMISRTPEVTCVVVDV'SQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV'SVLTIV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	SEQ ID NO: 108
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-30H2	제1 폴리펩타이드 사슬	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGD CMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSSGGG <u>GSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV'SCKA</u> SGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP DSTGSKYNEKFKTRVIMTRDTSTSTVYMELS	SEQ ID NO: 109

[0398]

		SLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KQGPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKLSLSLGK	
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-39H2	제1 폴리펩타이드 사슬	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRID CMGWFRQAPGKLEGVAHIDSDGIPRYVESV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CVVGFKFGDYCAPNDWGQGMVTVSSGGGG SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKAS GYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPD STGSKYNEKFKTRVTMTRDTSSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK KQGPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKLSLSLGK	SEQ ID NO: 110
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-151H7	제1 폴리펩타이드 사슬	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYR PYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADS VKGRFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGMVTV SSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVK VCSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWM GRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDYWG QGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKKQGPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHNTQKLSLSLGK	SEQ ID NO:111

[0399]

	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-151H8	제1 폴리펩타이드 사슬	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYR PYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADS VKGRFTISRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGMVTVS <u>SGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> VSKKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWM GRIDPDSIGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDYWG QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	SEQ ID NO: 112
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103

[0400]

[0401]

항체의 일시적인 형질주입, 발현 및 정제를 통상적인 방법에 따라 수행하였다. 식별을 수행하고, 관심 디아바디를 수득하였다.

[0402]

실시예 19: PVRIG 및 TIGIT에의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 및 상응하는 리간드의 차단

[0403]

인간 및 시노물구스 원숭이 PVRIG에의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 및 인간 PVRIG에의 리간드의 차단을 실시예 4, 5 및 6의 방법에 따라 검출하였다. 결과를 표 29 및 도 6a 내지 도 6e에 제시한다. 결과는, 각각의 인간화 이중특이적 항체가 인간 PVRIG에 결합하고 PVRL2에의 PVRIG의 결합을 차단할 수 있음을 보여준다. 1708-151H8은 시노물구스 원숭이 PVRIG에의 약한 결합을 보여준다.

표 29

표 29. PVRIG에의 인간화 이중특이적 항체의 결합 및 리간드의 차단

항체 번호	인간 PVRIG 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVRIG를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 원숭이 PVRIG 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 원숭이 PVRIG를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVRL2에의 인간 PVRIG의 결합의 차단 IC ₅₀ (nM)
1708-20H5	2.466	0.075	0.144	0.070	0.628
1708-30H2	0.320	0.056	0.184	3.540	0.552
1708-39H2	1.805	0.079	0.133	0.293	0.619
1708-151H7	0.679	0.043	9.442	11.470	0.598
1708-151H8	0.390	0.094	N.A.	N.A.	0.654
1708	결합 없음	결합 없음	결합 없음	결합 없음	시험되지 않음
Tab5	1.407	0.789	결합 없음	결합 없음	0.964
IgG4	결합 없음	결합 없음	결합 없음	결합 없음	차단 없음

[0404]

[0405]

실시예 4, 5 및 6과 유사하게, 인간 및 시노물구스 원숭이 TIGIT에의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 결합 및 리간드에의 인간 TIGIT의 결합의 차단을 검출하였으며, PVRIG 단백질을 TIGIT로 대체하고 PVRL2를 PVR로 대체하였다. 결과를 표 30 및 도 7a 내지 도 7e에 제시한다. 결과는, 각각의 디아바디가 인간 및 시노물구스

원숭이 TIGIT에 결합하고 PVR에의 TIGIT의 결합을 차단할 수 있음을 보여준다.

표 30

표 30. TIGIT에의 인간화 이중특이적 항체의 결합 및 리간드의 차단

항체 번호	인간 TIGIT 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 TIGIT를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 원숭이 TIGIT 재조합 단백질에의 결합 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 원숭이 TIGIT를 과발현하는 세포에의 결합 EC ₅₀ (nM)	인간 PVR에의 인간 TIGIT의 결합의 차단 IC ₅₀ (nM)
1708-20H5	0.145	0.010	0.112	0.009	1.018
1708-30H2	0.153	0.010	0.114	0.009	1.014
1708-39H2	0.135	0.005	0.105	0.005	0.812
1708-151H7	0.160	0.012	0.119	0.012	0.773
1708-151H8	0.184	0.006	0.135	0.011	1.087
1708	0.133	0.0027	0.104	0.003	0.779
Tab5	결합 없음	결합 없음	결합 없음	결합 없음	시험되지 않음
IgG4	결합 없음	결합 없음	결합 없음	결합 없음	차단 없음

[0406]

[0407]

Biacore를 사용하여 인간 PVRIG, 시노물구스 원숭이 PVRIG 및 인간 TIGIT에 대한 인간화 이중특이적 항체의 친화도를 검출하였다. 인간화 이중특이적 항체를 Biacore 장비(Biacore X100, GE)의 단백질 A 바이오센서 칩(GE lifesciences, 29127557) 상에 각각 포착한 다음, 일련의 농도 구배에서 인간 PVRIG 항원(Acrobiosystems, PVG-H52H4), 시노물구스 원숭이 PVRIG 항원(SEQ ID NO: 1) 또는 인간 TIGIT 항원(Acrobiosystems, TIT-H52H3)은 각각 칩 표면에 걸쳐 유통하였다. Biacore 장비(Biacore X100, GE)를 사용하여 반응 신호를 실시간으로 검출하여 결합 곡선 및 해리 곡선을 획득하였다. BiacoreX100 평가 소프트웨어 2.0 GE와 함께 (1:1) 결합 모델을 사용하여 실험으로부터 획득된 데이터를 맞추어서 친화도 값을 획득하였다(표 31 참조).

표 31

표 31. 인간 PVRIG, 시노물구스 원숭이 PVRIG 및 인간 TIGIT에 대한 인간화 이중특이적 항체의 친화도

항체 번호	항원	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
1708-20H5	인간 PVRIG	1.67E+07	1.30E-04	7.82E-12
1708-30H2		1.29E+07	9.12E-03	7.06E-10
1708-39H2		7.90E+06	2.76E-04	3.49E-11
1708-151H7		6.06E+06	7.57E-04	1.25E-10
1708-20H5	인간 TIGIT	1.97E+06	1.50E-04	7.63E-11
1708-30H2		3.08E+06	1.58E-04	5.12E-11
1708-39H2		1.39E+06	1.13E-04	8.08E-11
1708-151H7		1.40E+06	1.16E-04	8.28E-11
1708-20H5	시노물구스 원숭이 PVRIG	2.56E+07	1.81E-01	7.05E-09
1708-30H2		1.82E+07	5.81E-01	3.19E-08
1708-39H2		8.48E+07	2.52E+00	2.97E-08

[0408]

[0409]

실시예 20: 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 혼합 림프구 반응(MLR) 실험

[0410]

T 세포를 활성화시키는 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 능력을 실시예 10의 방법에 따라 검출하였다. 실험 결과를 도 8 및 표 32에 제시한다. 결과는, 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체 1708-151H8이 T 세포를 유의하게 활성화시키고 T 세포에 의한 IFN γ 의 분비를 촉진할 수 있음을 보여준다. 중요하게는, 이중특이적

항체의 활성은 항-PVRIG 항체 151H8 단독 또는 항-TIGIT 항체 1708 단독보다 더 강하다.

표 32

표 32. 인간화 이중특이적 항체의 혼합 림프구 반응에서 IFN γ 분비 수준

항체 번호	IFN γ (pg/mL) (평균 \pm 표준 편차)	
	20 nM 항체	100 nM 항체
IgG4	74 \pm 5	89 \pm 12
151H8	124 \pm 29	118 \pm 11
1708	106 \pm 16	125 \pm 16
1708-151H8	303 \pm 40	448 \pm 40
Tab5	128 \pm 8.9	185 \pm 63
Keytruda	시험되지 않음	444 \pm 111

[0411]

[0412] 실시예 21: 인간 PBMC와 혼합된 인간 흑색종 A375의 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 항-PVRIG/TIGIT 이중 특이적 항체의 항종양 효과의 평가

[0413] 상기 기재된 IgG4 하위유형의 이중특이적 항체에 더하여 동물 효능에서 이중특이적 항체 하위유형의 역할을 추가로 알아보기 위해, IgG1 하위유형의 상응하는 항체를 또한 동물 효능 시험에 사용하기 위해 합성하였다. 이 실험에 사용되고 이전에 기재되지 않은 다른 항체 서열을 표 33에 제시한다.

표 33

표 33. 유형 IgG1의 인간화 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 전장 서열

항체 번호	제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 전장 아미노산 서열	서열 번호	
1708-IgG1 (중쇄 불변 영역 하위유형이 IgG1으로 변한 점을 제외하고는 1708과 동일함)	HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYWMHWVRRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCAREGAYGYFDYWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO:113
	LC	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103
1708-151-IgG1 (중쇄 불변 영역 하위유형이 IgG1으로 변한 점을 제외하고는 1708-151과 동일함)	제1 폴리펩타이드 사슬	HVQLVESGGGVSQAGGSLRSLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMY YCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYWMHWVRRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCAREGAYGYFDYWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO:114
	제2 폴리펩타이드 사슬	1708의 경쇄와 동일함	SEQ ID NO:103

[0414]

[0415]

4 내지 8 주령이고 체중이 약 18 내지 22 g인 암컷 NCG 마우스를 Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd로부터 구매하였다. 모든 NCG 마우스를 SPF-등급 동물실에서 IVC 항온 및 정압 시스템에서 사육하였다.

[0416]

10% 우태 혈청(FBS)을 함유하는 DMEM 배지에서 A375 세포를 배양하였다. 대수기(exponential phase)에서의 A375 세포를 수집하고 NCG 마우스에서 피하 종양 접종을 위해 HBSS에 적절한 농도로 재현탁시켰다. 공동-배양에 사용된 A375 세포를 미토마이신 C로 2시간 동안 처리하고 PBS로 3회 세척하였다. 정상적인 인간의 말초 혈액을 얻고, 인간 PBMC를 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하고 카운팅하였다. 그 후에, PBMC를 RPMI1640 배지(IL2 및 10% FBS를 함유함)로 3×10^6 개 세포/mL의 농도로 재현탁시키고 미토마이신 C-처리 A375 세포와 함께 공동-배양하였다. 6일의 공동-배양 후, PBMC를 신선하게 분해된 A375 세포와 함께 수확하였다. 각각의 마우스에게 5×10^5 개 PBMC 및 4×10^6 개 A375 세포를 접종하고, 접종 부피는 0.2 mL/마우스(50% 매트릭셀(Matrigel)을 함유함)이고, 세포를 암컷 NCG 마우스의 우측 상에 피하 접종하였다. 마우스를 체중에 따라 약물 투여군으로 무작위로 나누었고, 상세한 투여 방법, 투여 용량 및 투여 경로를 표 34에 제시하고, 그룹화 및 투여 일은 제0일이었다. 항-PVRIG 항체 및 항-TIGIT 항체의 상이한 분자량으로 인해, 투여 용량은 항-PVRIG 항체 및 항-TIGIT 항체가 동일한 출발 물 농도를 갖도록 보장하였다.

표 34

표 34. 투여 계획

군	투여군	N	용량 (mg/kg)	투여 계획	투여 경로
1	hIgG1	7	30	Q2D	i.p.
2	151-IgG4	7	16.1	Q2D	i.p.
3	1708-IgG1	7	30	Q2D	i.p.
4	151-IgG4 + 1708-IgG1	7	16.1	Q2D	i.p.
			30	Q2D	i.p.
5	1708-151 IgG1	7	35.8	Q2D	i.p.
6	1708-151 IgG4	7	35.8	Q2D	i.p.

(각주: N: 사용된 동물의 수; i.p.: 복강내 주사; Q2D: 2일마다 1회; 투여 부피: 종양-보유 마우스의 체중에 따라 조정됨(0.1 mL/10 g))

[0417]

[0418]

투여 시작 후, 마우스의 체중 및 종양 부피를 1주 2회 측정하였다. 결과를 표 35 내지 표 36 및 도 9a 내지 도 9b에 제시한다.

표 35

표 35. 마우스의 체중에 미치는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체

군	제0일의 평균 체중 (g) (평균±표준 편차)	제26일의 평균 체중 (g) (평균±표준 편차)	체중 변화율 (%) (평균±표준 편차)
1	20.5±0.42	23.60±0.64	15.21±2.88
2	20.43±0.4	23.77±0.74	16.54±2.57
3	20.65±0.48	23.85±0.45	15.71±2.08
4	20.69±0.51	22.81±0.78	10.14±1.45
5	20.65±0.56	23.54±1.14	13.77±3.26
6	20.65±0.48	23.8±0.76	15.28±2.58

[0419]

표 36

표 36. 마우스 인간-유래 A375 종양 모델에서 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 항종양 효과

군	제0일의 종양 부피 (mm ³)	제26일의 종양 부피 (mm ³) (평균±표준 편차)	TGI (%)	T/C (%)	P 값
1	0±0	1913.62±188.23	--	--	--
2	0±0	1942.70±223.36	-1.52	101.52	0.916
3	0±0	958.83±204.39	49.89	50.11	<0.001xxx
4	0±0	876.21±243.70	54.21	45.79	<0.001xxx
5	0±0	629.64±163.74	67.10	32.90	<0.001xxx
6	0±0	79.99±36.57	95.82	4.18	<0.001xxx

(각주: *P < 0.05, **P < 0.01 및 ***P < 0.001은 대조군(hIgG1)과 비교하여 유의한 차이를 갖는 것으로 여겨짐)

[0420]

[0421]

실험 종료 시(투여-후 제26일), 항-PVRIG 항체 151 단일 약물군은 대조군과 비교하여 어떠한 유의한 차이도 보여주지 않았다. 항-TIGIT 항체 1708-IgG1 단일 약물군, 항-PVRIG 항체 151과 항-TIGIT 항체 1708-IgG1 병용군

및 1708-151-IgG1 디아바디군에서, 종양 부피는 감소되었다. 1708-151-IgG4 디아바디군은 심지어 종양 성장을 완전히 저해할 수 있었고, 다른 군과 유의한 차이를 나타내었다(도 9b 참조).

[0422] 마우스를 체중에 따라 약물 투여군으로 무작위로 나누었고, 상세한 투여 방법, 투여 용량 및 투여 경로를 표 37에 제시하고, 그룹화 및 투여 일은 제0일이었다.

표 37

표 37. 투여 계획

군	투여군	수	용량 (mg/kg)	투여 계획	투여 경로
1	hIgG4	7	35.8	Q2D	i.p.
2	1708-30H2 IgG4	7	12	Q2D	i.p.
3	1708-151H7 IgG4	7	12	Q2D	i.p.

(각주: N: 사용된 동물의 수; i.p.: 복강내 주사; Q2D: 2일마다 1회; 투여 부피: 종양-보유 마우스의 체중에 따라 조정됨(0.1 mL/10 g))

[0423]

[0424] 투여 시작 후, 마우스의 체중 및 종양 부피를 1주 2회 측정하였다. 결과를 표 38 내지 표 39 및 도 10a 내지 도 10b에 제시한다.

표 38

표 38. 마우스의 체중에 미치는 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 효과

군	제0일의 평균 체중 (g) (평균±표준 편차)	제28일의 평균 체중 (g) (평균±표준 편차)	체중의 변화율 (%) (평균±표준 편차)
1	21.51±0.53	25.38±0.32	18.38±3.27
2	21.57±0.55	24.82±0.46	15.34±2.18
3	21.63±0.47	24.87±0.36	15.15±1.38

[0425]

표 39

표 39. 마우스 인간-유래 A375 종양 모델에서 항-PVRIG/TIGIT 이중특이적 항체의 항종양 효과

군	제0일의 종양 부피 (mm ³)	제28일의 종양 부피 (mm ³) (평균±표준 편차)	TGI (%)	T/C (%)	P 값
1	0±0	2239.26±322.87	--	--	--
2	0±0	1435.36±117.61	35.90	64.10	<0.05*
3	0±0	1468.96±67.07	34.40	65.60	<0.05*

(각주: *P < 0.05, **P < 0.01 및 ***P < 0.001은 대조군(hIgG1)과 비교하여 유의한 차이를 갖는 것으로 여겨짐)

[0426]

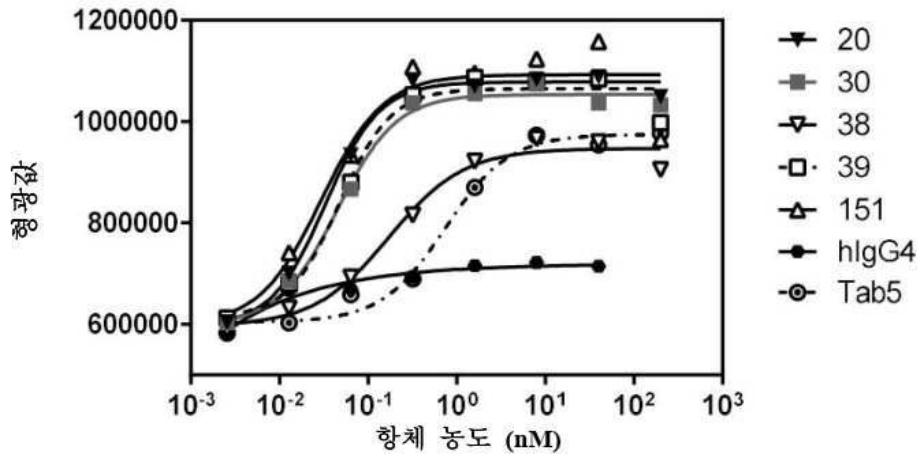
[0427] 실험 종료 시(투여-후 제28일), 1708-30H2 IgG4와 1708-151H7 IgG4 디아바디군은 둘 다 대조군과 비교하여 저용량에서 종양 성장을 저해하는 데 효과적이었고, 대조군으로부터 유의한 차이를 나타내었다(도 10a 및 도 10b 참조).

[0428] 본 개시내용의 구체적인 구현예가 상기 기재되긴 하였지만, 당업자는 이러한 구현예가 단지 예시적이고 많은 변화 또는 변형이 본 개시내용의 원리 및 사상으로부터 벗어나지 않으면서 이러한 구현예에 이루어질 수 있음을

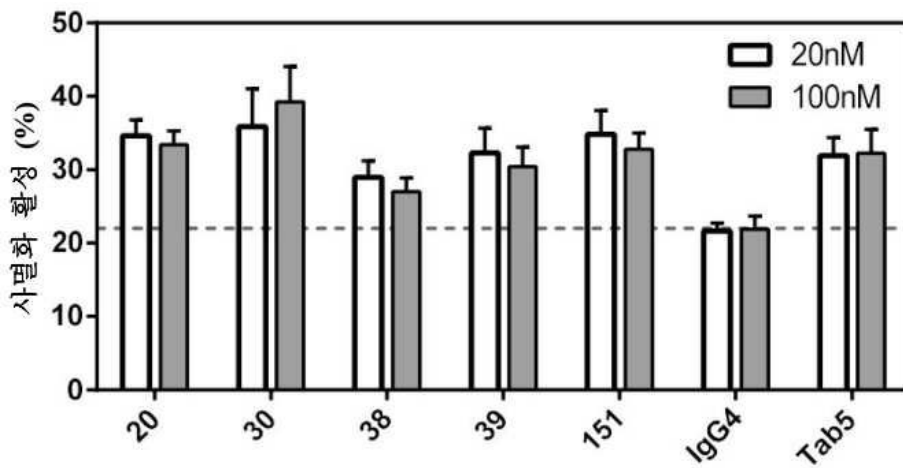
이해할 것이다. 따라서, 본 개시내용의 보호 범위는 첨부된 청구범위에 의해 정의된다.

도면

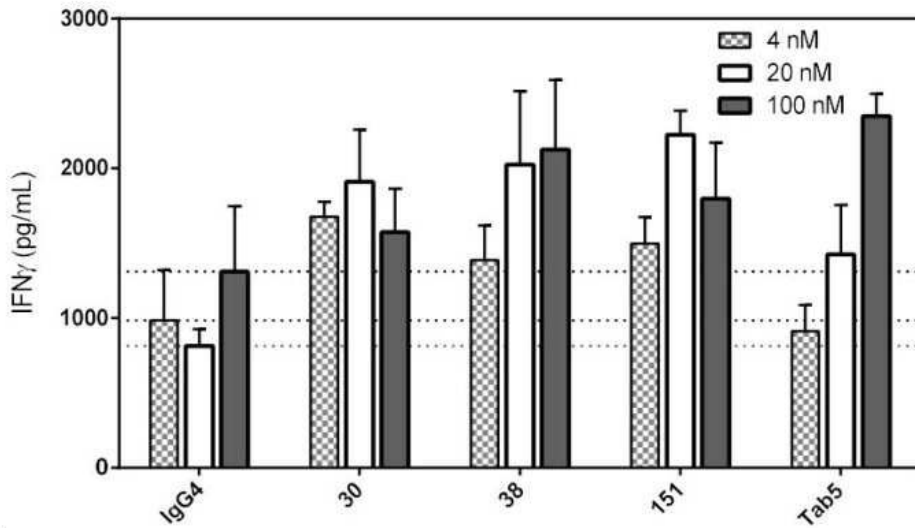
도면1



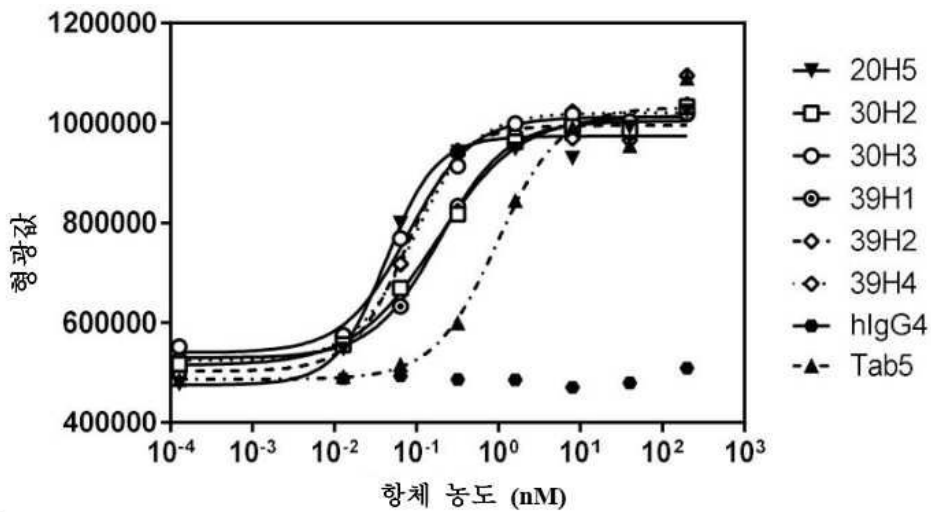
도면2



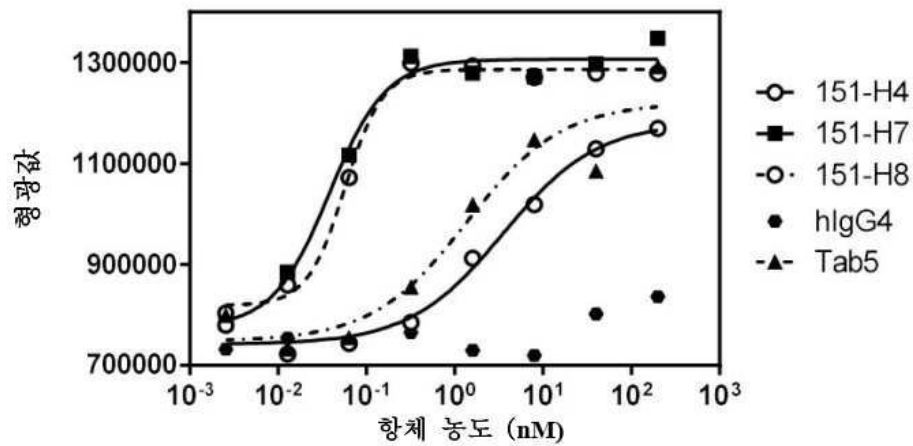
도면3



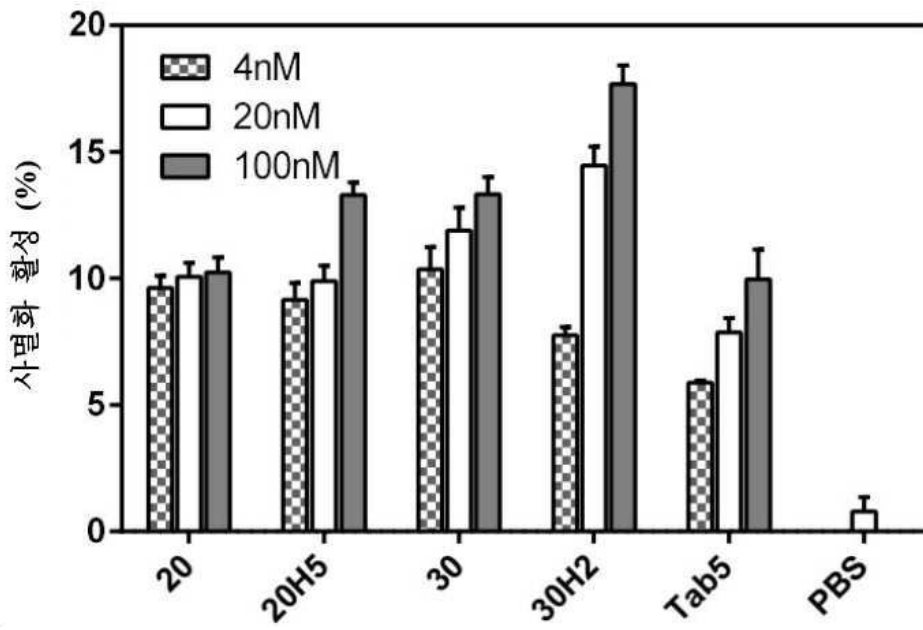
도면4a



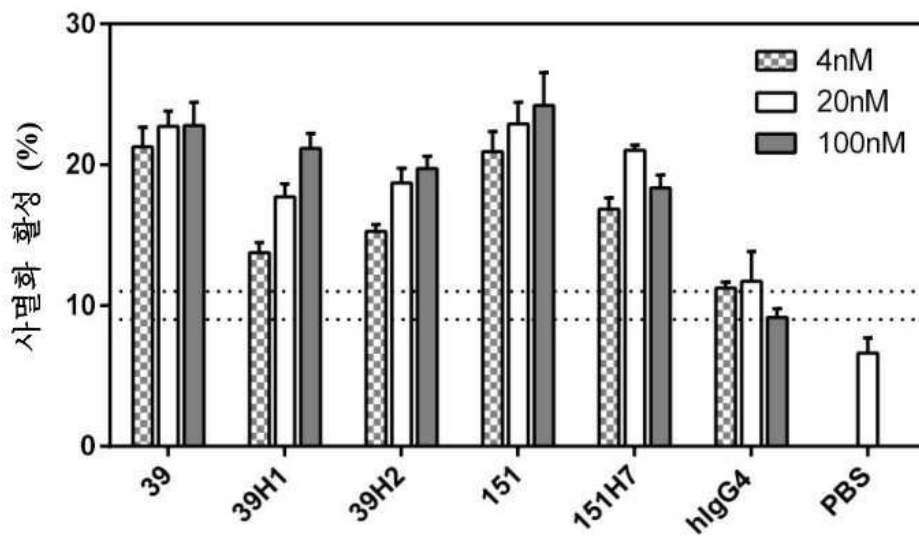
도면4b



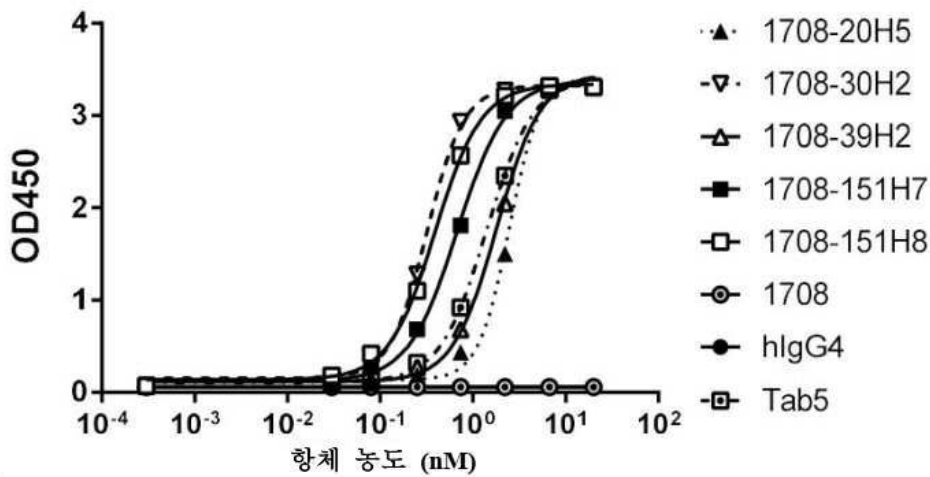
도면5a



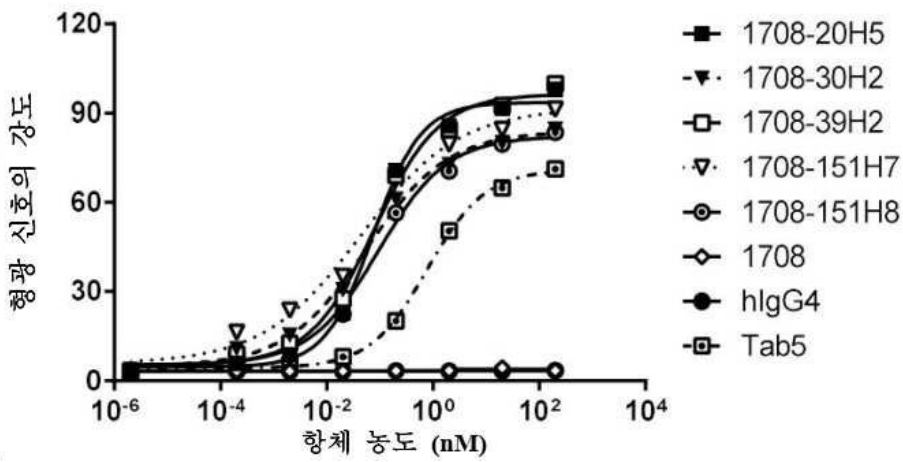
도면5b



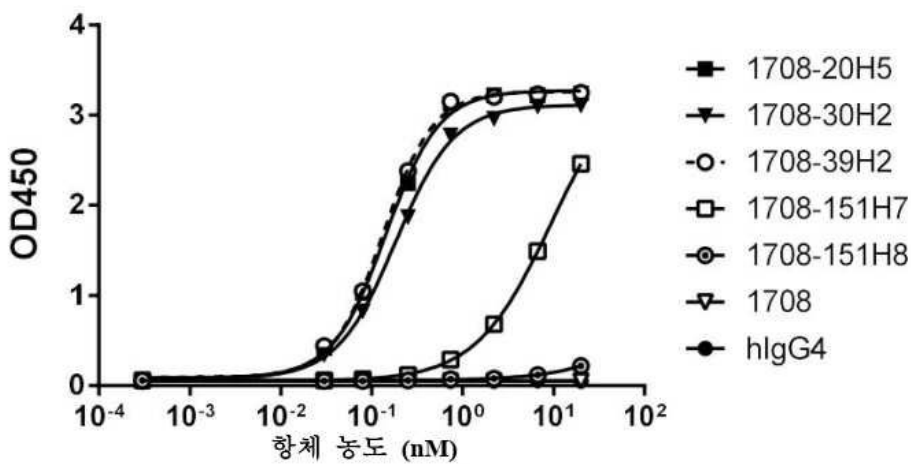
도면6a



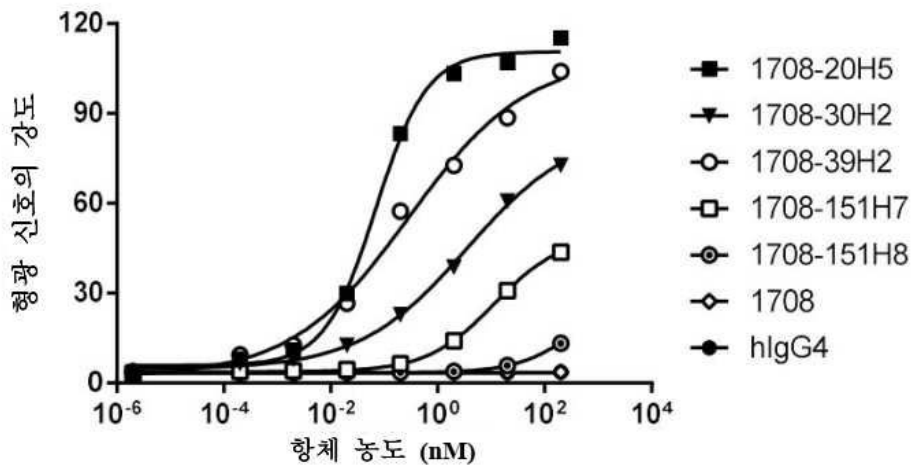
도면6b



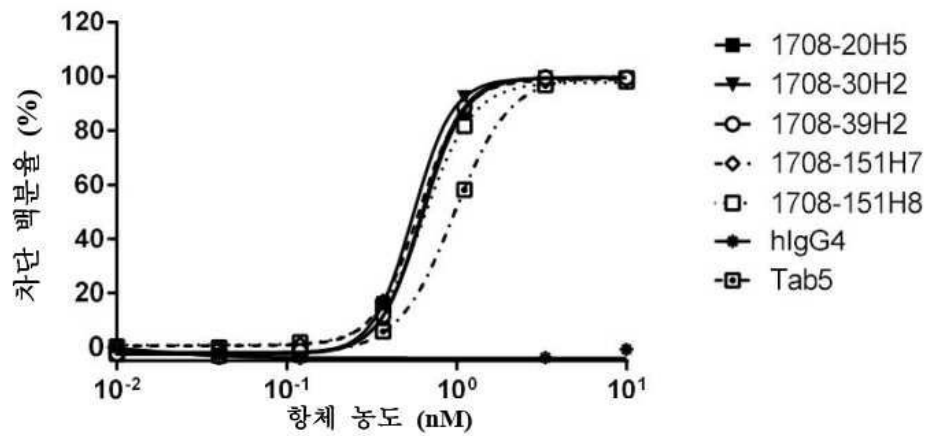
도면6c



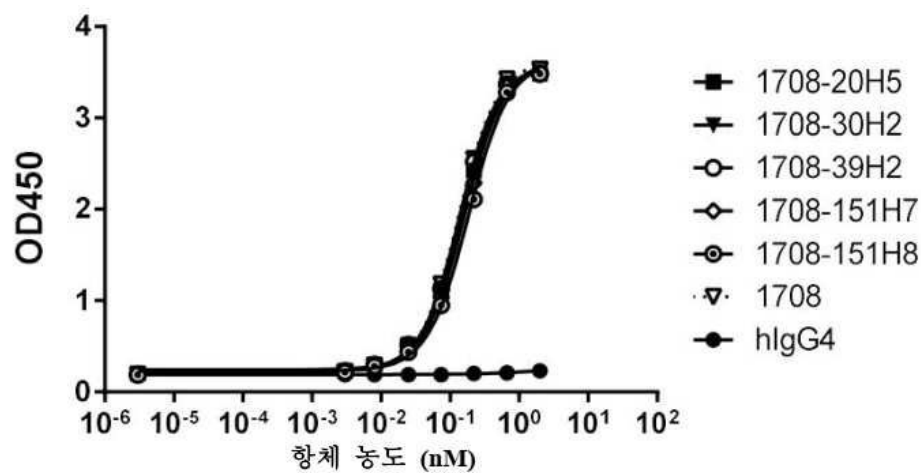
도면6d



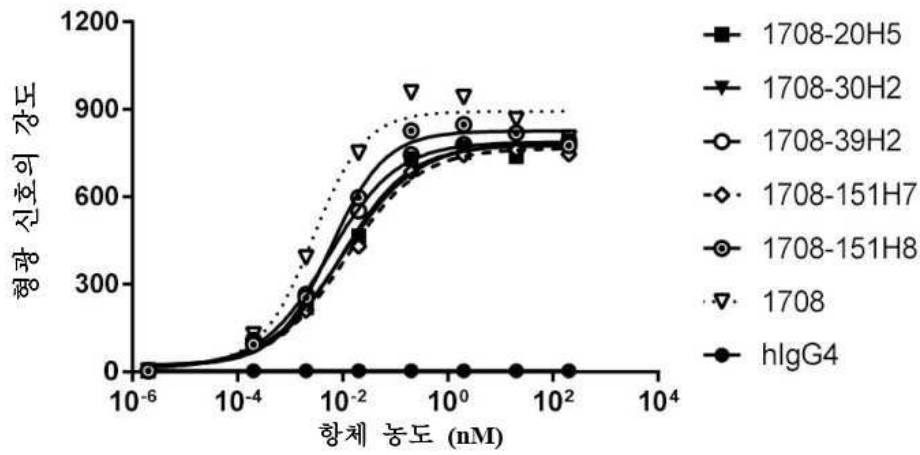
도면6e



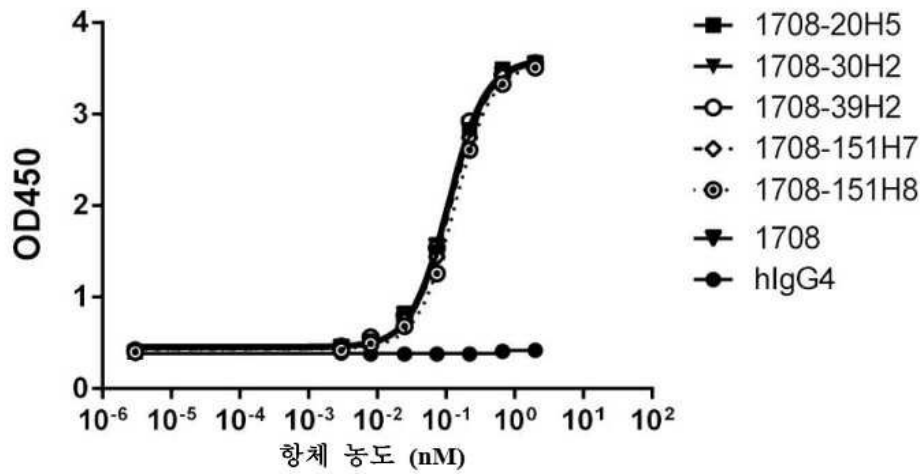
도면7a



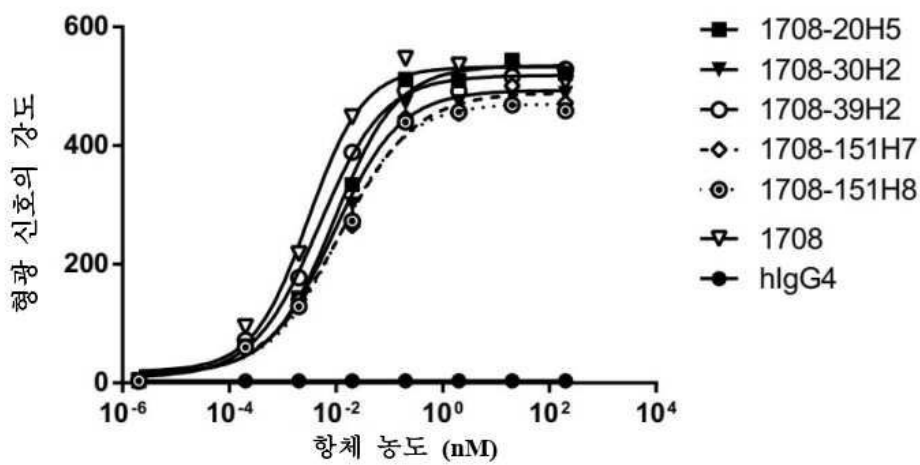
도면7b



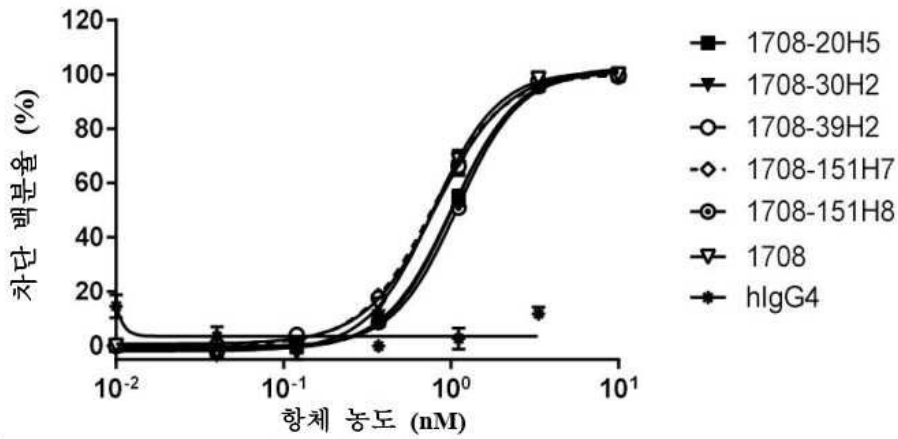
도면7c



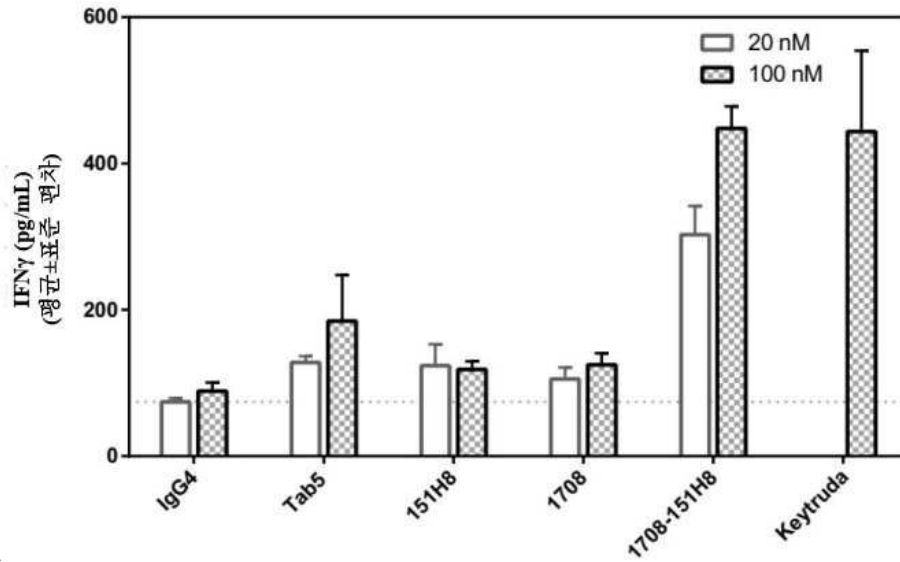
도면7d



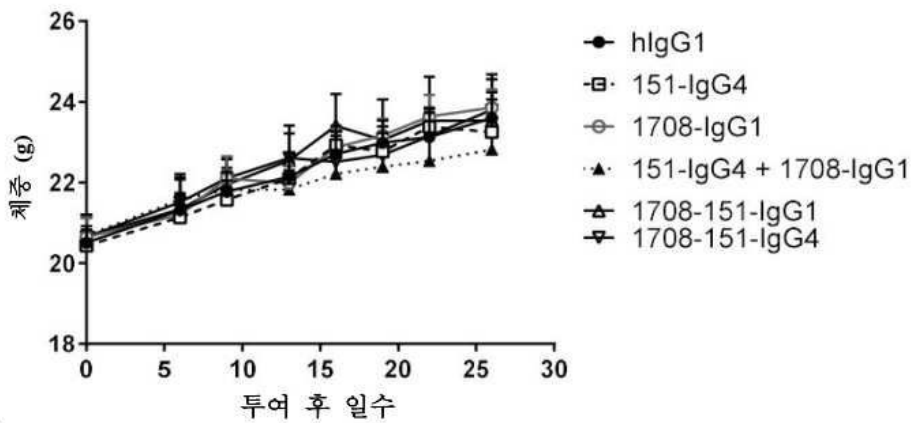
도면7e



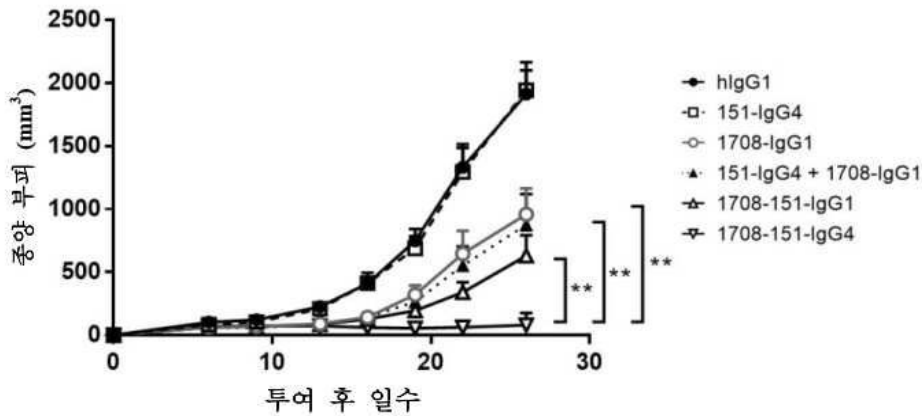
도면8



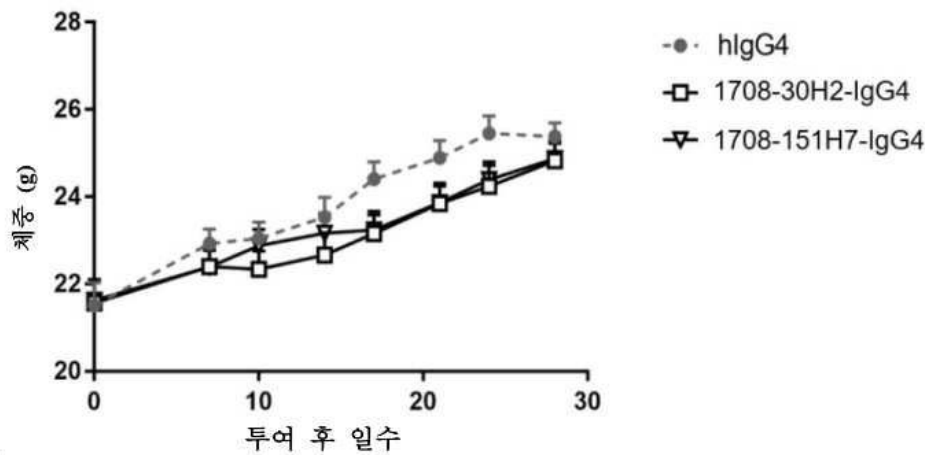
도면9a



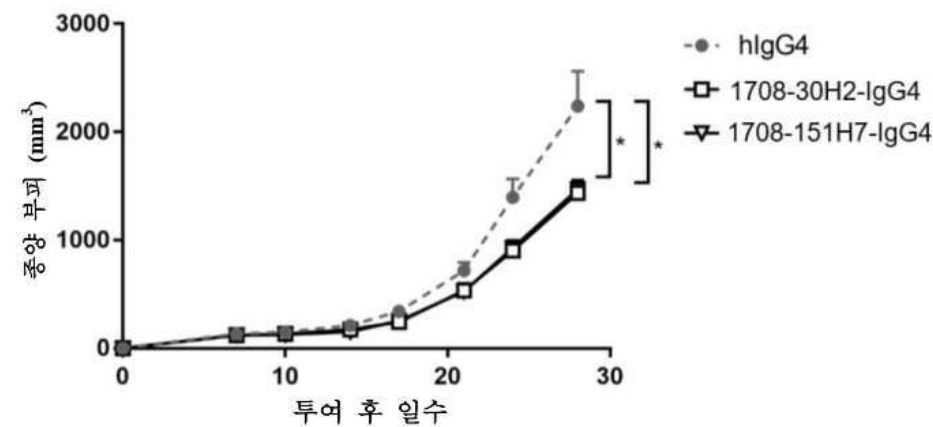
도면9b



도면10a



도면10b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.

Shanghai Shengdi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> PVRIG BINDING PROTEIN AND ITS MEDICAL USES

<130> 721016CPCT

<150> CN202010174835.4

<151> 2020-03-13

<160> 153

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> his1PVRIG (cyno-PVRIG-his)

<400> 1

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Gln Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser
 1 5 10 15

Ser Phe Thr Val His Cys Gly Phe Leu Gly Pro Gly Ser Ile Ser Leu
 20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asp Gly Ala Gly Gly Thr Lys Leu
 35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg
 50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ala Leu Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Ala Ser Ser Pro Phe Ala Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe
 85 90 95

Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ser Cys Gly Ser Leu Pro Pro
 100 105 110

Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Thr Pro Val Pro Ile Leu
 115 120 125

Arg Ala Asp His His His His His His
 130 135

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20-HCVR

<400> 2

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu His Glu Gly Val

 35 40 45

Ala His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg Tyr Val Asp Ser Val Lys

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Val Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30-HCVR

<400> 3

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Glu Gly

 35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Asp Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Gly Trp Thr Phe Gly Gly Asn Cys Ser Pro Ala Asp Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38-HCVR

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39-HCVR

<400> 5

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

 35 40 45

Ala His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg Tyr Val Glu Ser Val Lys

50

55

60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Val Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 6

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151-HCVR

<400> 6

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

<220><223>

20 HCDR3

<400> 9

Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR1

<400> 10

Gly Asp Cys Met Gly

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR2

<400> 11

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

1 5 10 15

<

210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR3

<400> 12

Gly Trp Thr Phe Gly Gly Asn Cys Ser Pro Ala Asp

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR1

<400> 13

Pro Ser Asp Met Ala

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR2

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR3

<400> 15

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

1 5 10

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR1

<400> 16

Thr Asp Cys Met Gly

1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

<223> 39 HCDR2

<400> 17

His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg Tyr Val Glu Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR3

<400> 18

Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR1

<400> 19

Tyr Arg Pro Tyr Cys Met Ala

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR2

<400> 20

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

1 5 10 15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR3

<400> 21

Gly Asp Ser Pro Asp Gly Arg Cys Pro Pro Leu Gly Gln Gly Leu Asn

1 5 10 15

Tyr

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR1 CHO

<400> 22

Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR2 CHO

<400> 23

Asp Ser Asp Gly Ile

1 5

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR3 CHO

<400> 24

Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR1 CHO

<400> 25

Gly Tyr Ser Tyr Ser Gly Asp

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR2 CHO

<400> 26

Asp Asn Ala Gly Arg

1 5

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR3 CHO

<400> 27

Gly Trp Thr Phe Gly Gly Asn Cys Ser Pro Ala Asp

1 5 10

<210> 28

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR1 CHO

<400> 28

Pro Ser Thr Tyr Gly Pro Ser

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR2 CHO

<400> 29

Ser Ala Ala Gly Arg Leu

1 5
<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 38 HCDR3 CHO
<400> 30
Asp Phe Ala Gly Gly Ser Ser Leu Phe Ala Asp Tyr Lys Tyr

1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 39 HCDR1 CHO
<400> 31
Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp

1 5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 39 HCDR2 CHO
<400> 32
Asp Ser Asp Gly Ile

1 5
<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 39 HCDR3 CHO
<400> 33
Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR1 CHO

<400> 34

Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Pro Tyr

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR2 CHO

<400> 35

Asp Ile Phe Gly Gly

1 5

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR3 CHO

<400> 36

Gly Asp Ser Pro Asp Gly Arg Cys Pro Pro Leu Gly Gln Gly Leu Asn

1 5 10 15

Tyr

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR1 IMGT

<400> 37

Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp Cys

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR2 IMGT

<400> 38

Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro

1 5

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR3 IMGT

<400> 39

Val Val Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10 15

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR1 IMGT

<400> 40

Gly Tyr Ser Tyr Ser Gly Asp Cys

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR2 IMGT

<400> 41

Ile Asp Asn Ala Gly Arg Ile

1 5

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR3 IMGT

<400> 42

Ala Ala Gly Trp Thr Phe Gly Gly Asn Cys Ser Pro Ala Asp

1 5 10

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR1 IMGT

<400> 43

Pro Ser Thr Tyr Gly Pro Ser Asp

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR2 IMGT

<400> 44

Ile Ser Ala Ala Gly Arg Leu Thr

1 5

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR3 IMGT

<400> 45

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

1 5 10 15

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR1 IMGT

<400> 46

Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp Cys

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR2 IMGT

<400> 47

Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro

1 5

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213>

> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR3 IMGT

<400> 48

Val Val Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR1 IMGT

<400> 49

Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Pro Tyr Cys

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR2 IMGT

<400> 50

Ile Asp Ile Phe Gly Gly Thr

1 5

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151 HCDR3 IMGT

<400> 51

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

1 5 10 15

Leu Asn Tyr

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR1 ABM

<400> 52

Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp Cys Met Gly

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR2 ABM

<400> 53

His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg

1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR3 ABM

<400> 54

Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR1 ABM

<400> 55

Gly Tyr Ser Tyr Ser Gly Asp Cys Met Gly

1 5 10

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR2 ABM

<400> 56

Thr Ile Asp Asn Ala Gly Arg Ile Lys

1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR3 ABM

<400> 57

Gly Trp Thr Phe Gly Gly Asn Cys Ser Pro Ala Asp

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR1 ABM

<400> 58

Pro Ser Thr Tyr Gly Pro Ser Asp Met Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR2 ABM

<400> 59

Thr Ile Ser Ala Ala Gly Arg Leu Thr Tyr

1 5 10

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38 HCDR3 ABM

<400> 60

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

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR1 ABM

<400> 61

Arg Tyr Thr Ser Arg Thr Asp Cys Met Gly

1 5 10

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39 HCDR2 ABM

<400> 62

His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg

1 5
<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 39 HCDR3 ABM
<400> 63
Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp

1 5 10
<210>
> 64
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 151 HCDR1 ABM
<400> 64
Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Pro Tyr Cys Met Ala

1 5 10
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 151 HCDR2 ABM
<400> 65
Gly Ile Asp Ile Phe Gly Gly Thr Thr

1 5
<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 151 HCDR3 ABM
<400> 66
Gly Asp Ser Pro Asp Gly Arg Cys Pro Pro Leu Gly Gln Gly Leu Asn

1 5 10 15

Tyr

<210> 67

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HC

<400> 67

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu His Glu Gly Val

 35 40 45

Ala His Ile Asp Ser Asp Gly Ile Pro Arg Tyr Val Asp Ser Val Lys

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Val Gly Phe Lys Phe Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp Trp Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 30 HC
 <400> 68

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

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

145 150 155 160
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 165 170 175
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 180 185 190
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 195 200 205
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210 215 220

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

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

 <210> 70
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 39 HC
 <400> 70

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

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

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

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

Ser Leu Gly Ala

355

<210> 72

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> tab5 HC

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Asn Ile Tyr Phe Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

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

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

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> 74

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IGHV3-7 *01 HCVR

<400> 74

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

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

Ala Arg

<210> 75

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20H1 HCVR

<400>

> 75

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

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

<210> 76

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20H2 HCVR

<400> 76

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val

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

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20H3 HCVR

<400> 77

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

50 55 60

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

<210> 78

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20H4 HCVR

<400> 78

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

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

<210> 79

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20H5 HCVR

<400> 79

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

 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp His Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

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

<210> 80

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30H1 HCVR

<400> 80

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

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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
 Ala Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gln Cys Ser Pro Ala Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30H2 HCVR

<400> 81

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

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

<210> 82

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30H3 HCVR

<400> 82

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

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30H5 HCVR

<400> 84

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 Tyr Ser Tyr Ser Gly Asp

 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Glu Gly

 35 40 45

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

 50 55 60

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

 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 85

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IGHV3-30 *02

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val 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 Phe 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> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38H2 HCVR

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 87

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38H4 HCVR

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38H7 HCVR

<400> 88

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

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

50 55 60

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 89

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38H8 HCVR

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 90

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 38H9 HCVR

<400> 90

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50

55

60

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

 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 91

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39H1 HCVR

<400> 91

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

1 5 10 15

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

100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 93

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39H3 HCVR

<400> 93

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

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

<210> 94

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39H4 HCVR

<400> 94

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

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

<210> 95

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 39H5 HCVR

<400> 95

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

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

85 90 95
 Val Gly Phe Lys Phe Gly Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 96

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151H2 HCVR

<400> 96

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

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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
 Ala Gly Asp Ser Pro Asp Gly Arg Cys Pro Pro Leu Gly Gln Gly Leu
 100 105 110
 Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 97

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151H4 HCVR

<400> 97

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

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

Gly Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 98

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 151H7 HCVR

<400> 98

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

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

<213> Artificial sequence

<220><223> 151H9 HCVR

<400> 100

His 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 Val Ala Ser Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg

20 25 30

Pro Tyr Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 101

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Fc region of human IgG4 heavy chain (S228P/F234A/L235A/K447A)

<400> 101

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

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

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

 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Ala
 225
 <210> 102
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708TIGITHC
 <400> 102
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 104

<211> 583

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-151-11511708N

<400> 104

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 530 535 540

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 565 570 575

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 580

<210> 105
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708-151-21511708C
 <400> 105

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ala Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

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

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

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

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

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-151-31511708N

<400> 106

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

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

Pro Tyr Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 35 40 45

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

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

Phe Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ala Gly Asp Ser Pro Asp Gly Arg Cys Pro Pro Leu Gly Gln
 100 105 110

Gly Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175

Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Arg Thr Leu Ala
 180 185 190

Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220

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

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

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 340 345 350

<210> 107

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-151-41511708C

<400> 107

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 530 535 540

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 565 570 575

Lys

<210> 109

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-30H2

<400> 109

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 Gly Asp
 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Glu Gly

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 290 295 300

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 305 310 315 320

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 325 330 335

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 340 345 350

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 355 360 365

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 370 375 380

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 385 390 395 400

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 515 520 525

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

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 405 410 415

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 420 425 430

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 435 440 445

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 450 455 460

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 485 490 495

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 500 505 510

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 515 520 525

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 530 535 540

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 545 550 555 560

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 565 570 575

<210> 111

<211> 583

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-151H7

<400> 111

His 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 Val Ala Ser Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 275 280 285
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 290 295 300
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 325 330 335
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 340 345 350
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 355 360 365
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 370 375 380
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 405 410 415
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 420 425 430
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 435 440 445
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 450 455 460
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 465 470 475 480
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 485 490 495
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 500 505 510
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

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

<220><223> 1708-IgG1 (1708IgG1) HC

<400> 113

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Thr Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60

Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

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

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-151-IgG1 (1708-151IgG1)

<400> 114

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Tyr Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys

145 150 155 160

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln

165 170 175

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

180 185 190

Thr Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr Arg Val Thr Met Thr

195 200 205

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 465 470 475 480

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 485 490 495

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 500 505 510

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 515 520 525

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 530 535 540

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 545 550 555 560

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 565 570 575

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580 585

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 HCDR1

<400> 115

Asp Tyr His Met Tyr

1 5

<210> 116

<

211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 HCDR2

<400> 116

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

1 5 10 15

Gly

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 HCDR3

<400> 117

Gln Ser Ser Tyr Asp Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 LCDR1

<400> 118

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala

1 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 LCDR2

<400> 119

Trp Ala Ser Ala Arg His Thr

1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1707 LCDR3

<400> 120

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 HCDR1

<400> 121

Asn Tyr Trp Met His

1 5

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 HCDR2

<400> 122

Arg Ile Asp Pro Asp Ser Thr Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Thr

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 HCDR3

<400> 123

Glu Gly Ala Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 LCDR1

<400> 124

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 LCDR2

<400> 125

Asn Ala Arg Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708 LCDR3

<400> 126

Gln Tyr His Ser Gly Ser Pro Leu Pro

1 5

<210> 127

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 HCDR1

<400> 127

Asp Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 HCDR2

<400> 128

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

1 5 10 15

Gly

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 HCDR3

<400> 129

Gly Gly Pro Ser Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 LCDR1

<400> 130

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 LCDR2

<400> 131

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1709 HCDR3

<400> 132

Gln Gln Tyr Thr Leu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 HCDR1

<400> 133

Asn Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 HCDR2

<400> 134

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

1 5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 HCDR3

<400> 135

Glu Gly Gly Phe Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 LCDR1

<400> 136

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 LCDR2

<400> 137

Asn Ala Lys Thr Phe Ala Glu

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1710 LCDR3

<400> 138

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Leu Pro

1 5

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 HCDR1

<400> 139

Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 HCDR2

<400> 140

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 141

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 HCDR3

<400> 141

Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Arg Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 LCDR1

<400> 142

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Met Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 LCDR2

<400> 143

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1711 LCDR3

<400> 144

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 145
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708-VH1
 <400> 145

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ala Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 146
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708-VH2
 <400> 146

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 147

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1708-VH3

<400> 147

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Ala Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 148
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708-VL1
 <400> 148
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

<210> 149
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 1708-VL2
 <400> 149
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

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

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

<210> 150

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20 HCDR3

<400> 150

Gly Phe Lys Phe Asp Glu Asp Tyr Cys Ala Pro Asn Asp
 1 5 10

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 30 HCDR3

<400> 151

Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gln Cys Ser Pro Ala Asp

1 5 10

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 152

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 153

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Fc region of human IgG4 heavy chain (S228P/K447A)

<400> 153

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225