



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년12월05일  
 (11) 등록번호 10-1924831  
 (24) 등록일자 2018년11월28일

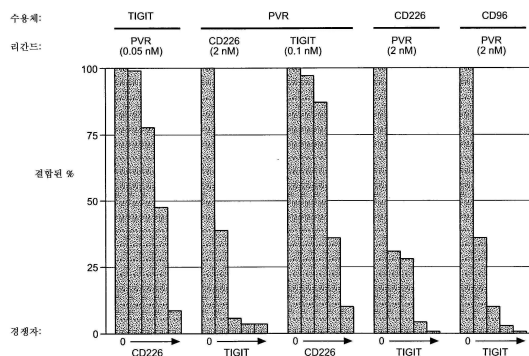
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 G01N 33/564 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
 A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)  
 C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)  
 C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)  
 G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
 G01N 33/564 (2013.01)  
 A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7012359(분할)  
 (22) 출원일자(국제) 2009년04월08일  
 심사청구일자 2018년05월29일  
 (85) 번역문제출일자 2018년04월30일  
 (65) 공개번호 10-2018-0049227  
 (43) 공개일자 2018년05월10일  
 (62) 원출원 특허 10-2016-7036368  
 원출원일자(국제) 2009년04월08일  
 심사청구일자 2017년01월25일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2009/039868  
 (87) 국제공개번호 WO 2009/126688  
 국제공개일자 2009년10월15일  
 (30) 우선권주장  
 61/123,530 2008년04월09일 미국(US)  
 61/194,271 2008년09월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 W02006124667 A2  
 (뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 26 항
- (73) 특허권자  
**제넨테크, 인크.**  
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
**클라크, 힐러리**  
 미국 94131 캘리포니아주 샌 프란시스코 노이 스트리트 1504  
**이튼, 덴**  
 미국 94901 캘리포니아주 샌 라파엘 인버니스 드라이브 45  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**양영준, 이귀동**
- 심사관 : 이민영

**(54) 발명의 명칭 면역 관련 질병의 치료를 위한 신규한 조성물 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 면역 관련 질병의 진단 및 치료를 위한 조성물 및 그러한 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

*C07K 14/4702* (2013.01)  
*C07K 14/70503* (2013.01)  
*C07K 16/18* (2013.01)  
*C07K 16/2803* (2013.01)  
*G01N 33/505* (2013.01)  
*G01N 33/56972* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/34* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)

(72) 발명자

**콘잘레스, 리노, 주니어.**

미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 윌로우 로드  
20 유니트 32

**그로건, 제인, 엘.**

미국 94118 캘리포니아주 샌 프란시스코 12번 예비  
뉴 405

**해크니, 제이슨**

미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 프린스턴 스트  
리트 2020

**하든, 크리스틴, 디.**

미국 94044 캘리포니아주 페시피카 매너 드라이브  
468 디3

**유, 신**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 라이젤 레인  
800

(56) 선행기술조사문헌

JP2006508649 A  
WO2007124283 A2  
WO2003068943 A2  
WO2004024068 A1

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열 23의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 24의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 25의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 26의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 27의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 28의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT(T-세포-Ig 및 ITIM 도메인) 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병을 진단하기 위한 제약 조성물.

**청구항 2**

서열 23의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 24의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 25의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 26의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 27의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 28의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병의 중증도를 평가하기 위한 제약 조성물.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 4**

제1항 또는 제2항에 있어서, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 7**

서열 31의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 32의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 33의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 34의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 35의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 36의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는

는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병을 진단하기 위한 제약 조성물.

**청구항 8**

서열 31의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 32의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 33의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 34의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 35의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 36의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병의 중증도를 평가하기 위한 제약 조성물.

**청구항 9**

제7항 또는 제8항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 10**

제7항 또는 제8항에 있어서, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 11**

제7항 또는 제8항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 13**

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 관련 질병이 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암인 제약 조성물.

**청구항 14**

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 이중접합체 항체, 또는 면역독소인 제약 조성물.

**청구항 15**

서열 23의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 24의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 25의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 26의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 27의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 28의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

면역 관련 질병을 진단하기 위한 제조품.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인

제조품.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 경쇄가 서열 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 20**

서열 31의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 32의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 33의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄, 및

서열 34의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 35의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 36의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는,

면역 관련 질병을 진단하기 위한 제조품.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 22**

제20항에 있어서, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 23**

제20항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 경쇄가 서열 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄가 서열 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 25**

제15항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 관련 질병이 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암인 제조품.

**청구항 26**

제15항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 이중접합체 항체, 또는 면역독소인 제조품.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 면역 관련 질병의 진단 및 치료에 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 면역 관련 및 염증성 질병은 정상 생리상태에서 상해 또는 손상에 대해 반응하고, 상해 또는 손상으로부터 수복을 개시하고, 외래 유기체에 대한 선천성 및 후천성 방어를 준비하기 위해 중요한 상당히 복잡하고, 종종 다중

의 상호연결된 생물학적 경로의 증상 또는 결과이다. 질병 또는 병리상태는 이들 정상 생리학적 경로가 반응의 강도에 직접 관련된 것으로서, 비정상적인 조절 또는 과도한 자극의 결과로서, 자신에 대한 반응으로서, 또는 이들의 조합으로서 추가의 상해 또는 손상을 일으킬 때 일어난다.

[0003] 이들 질병의 발생은 종종 다단계 경로 및 종종 다수의 상이한 생물학적 시스템/경로를 포함하지만, 하나 이상의 이들 경로 내의 중요한 지점에서 개입은 개선 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 치료적 개입은 유해한 과정/경로의 길항 또는 유익한 과정/경로의 자극에 의해 일어날 수 있다.

[0004] 많은 면역 관련 질병이 알려져 있고 광범하게 연구되었다. 그러한 질병은 면역 매개 염증성 질병, 비-면역 매개 염증성 질병, 감염성 질병, 면역결핍 질병, 신생물 등을 포함한다.

[0005] T 림프구 (T 세포)는 포유동물 면역 반응의 중요한 성분이다. T 세포는 구조적 적합 복합체 (MHC) 내의 유전자에 의해 코딩된 자가-분자와 회합된 항원을 인식한다. 항원은 MHC 분자와 함께 항원 제시 세포, 바이러스 감염된 세포, 암 세포, 이식편 등의 표면에서 표시될 수 있다. T 세포계는 숙주 포유동물에게 건강 위협을 제거하는 이들 변경된 세포를 제거한다. T 세포는 헬퍼 T 세포 및 세포독성 T 세포를 포함한다. 헬퍼 T 세포는 항원 제시 세포 상의 항원-MHC 복합체의 인식 후에 광범하게 증식한다. 헬퍼 T 세포는 또한 다양한 시토킨, 즉, 림포킨을 분비하고, 이는 B 세포, 세포독성 T 세포 및 면역 반응에 참여하는 다양한 다른 세포의 활성화에서 중심 역할을 한다. 헬퍼 T 세포의 다른 하위카테고리는 여포상 헬퍼 T 세포 (T<sub>fh</sub>)이다 (검토를 위해 문헌 [Vineusa et al., Nat. Rev. Immunol. 5: 853-865 (2005)] 참조). 그들의 CXC-케모킨 수용체 5의 특징적인 발현에 의해 검출가능하지만 (Schaerli et al., J. Exp. Med. 192: 1553-62 (2000)), 이들 세포는 IL-10 및 가능하게는 IL-21을 생산하는 것으로 밝혀졌다. T<sub>fh</sub> 세포는 배-중심 B 세포에 도움을 제공하고, 특히 B 세포의 생존 및 증식을 돕고, B 세포와 동시배양 동안 항체 생산을 강하게 유도한다. 이들은 또한 면역 관용 유도 (tolerogenesis)에 연루되었다.

[0006] 조절 T 세포 (T<sub>reg</sub>)는 자가-반응성 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 헬퍼 T 세포의 하위세트이고, 종종 만성 염증의 부위, 예를 들어 종양 조직에서 발견된다 (Wang, H.Y. & Wang, R.F., Curr Opin Immunol 19, 217-23 (2007)). T<sub>reg</sub>는 CD25, CTLA4, GITR, 및 뉴로필린-1의 높은 세포 표면 발현에 의해 표현형상으로 규정되고 ([Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F., J Exp Med 192, 295-302 (2000)]; [Sakaguchi, S., et al., J Immunol 155, 1151-64 (1995)]; [Takahashi, T. et al., J Exp Med 192, 303-10 (2000)]; [McHugh, R.S. et al., Immunity 16, 311-23 (2002)]; [Bruder, D. et al., Eur J Immunol 34, 623-30 (2004)]), 전사 인자 FOXP3의 제어 하에 있다 (Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S., Science 299, 1057-61 (2003)). T<sub>reg</sub>는 접촉 의존 기전 및 시토킨 생산을 통해 활성화된 T 세포에 대한 그들의 억제 기능을 수행한다 (Fehervari, Z. & Sakaguchi, Curr Opin Immunol 16, 203-8 (2004)). T<sub>reg</sub>는 또한 수지상 (dendritic) 세포 (DC) 상의 리간드와 직접적 상호작용, 예를 들어 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO)의 유도를 일으키는 DC 상의 B7 분자 CTLA4 상호작용 (Fallarino, F. et al., Nat Immunol 4, 1206-12 (2003)), 및 CD40L 라이게이션 (Serra, P. et al., Immunity 19, 877-89 (2003))에 의해 면역 반응을 조정한다. DC는 자기 또는 비-자기 항원에 대한 면역성 또는 관용을 유도할 수 있는 전문적인 항원-제시 세포이다. DC-확대된 T<sub>reg</sub>는 시험관 내에서 동종 (alloreactivity) 반응을 억제하고 ([Yamazaki, S. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, 2758-63 (2006)]; [Ahn, J.S., Krishnadas, D.K. & Agrawal, Int Immunol 19, 227-37 (2007)]), 입양 방식으로 전달될 때, 적절한 T<sub>reg</sub>는 NOD.scid 마우스에서 당뇨병 (Tarbell, K.V. et al., J Exp Med 199, 1467-77 (2004)) 또는 실험에 의해 유발된 천식 (Lewkowich, I.P. et al. J Exp Med 202, 1549-61 (2005))을 억제하였다. T<sub>reg</sub>와 DC 상의 리간드의 특이적 상호작용은 또한 그들의 억제 기능, 예를 들어 마우스에서 GITR의 진입을 폐기할 수 있고 (Shimizu, J., et al., Nat Immunol 3, 135-42 (2002)), 이것은 DC가 T<sub>reg</sub> 기능을 조정하는 데에서 다원적인 역할을 할 수 있음을 제안한다.

[0007] 분자 CTLA4 및 GITR은 각각 동시-자극/-억제 분자의 CD28-B7 및 TNF-수퍼패밀리 내에 규정된 리간드를 대표한다 (Greenwald, R.J., et al., Annu Rev Immunol 23, 515-48 (2005)). 이들 분자는 T<sub>reg</sub> 상에서 높지만, 또한 활성화된 T 세포 상에서 대개 상향조절된다. T<sub>reg</sub> 세포에서 발현된 새로운 동시-자극 분자를 검색하기 위해, Ig 도메인 및 면역수용체 타이로신-기반 활성화 또는 억제 (ITAM/ITIM) 모티프를 모두 갖는 T 세포에서 특이적으로 발현된 유전자를 확인하기 위해 검색을 수행하였다 (Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005)). 이

들 2가지 계층 범위 생물정보학 검색 전략의 교차를 통해, IgV 도메인, 막횡단 도메인 및 2개의 추정 면역수용체 타이로신 억제성 모티프를 코딩하는 단백질을 갖는 신규한 세포 표면-결합된 단백질이 확인되었다 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 US20040121370 참조). TIGIT로 명명된 단백질 (T-세포-Ig 및 ITIM 도메인)이 T 세포 - 특히 T<sub>reg</sub> 및 기억 세포 하위세트 - 및 NK 세포 상에서 발현되는 것으로 나타났다. 면역 질환, 특히 자가면역 질환을 처리하기 위한 새로운 치료제 및 치료 방법이 필요하다. 본원에서, 본 발명자들은 TIGIT 결합 파트너를 확인하고, T 세포 성숙 및 활성화에 대한 해명된 TIGIT 효과 및 그들의 결합 파트너와 TIGIT 상호작용에 의해 조정되는 면역 질환에 대한 새로운 조성물, 검출 방법 및 치료 방법을 제공한다.

**발명의 내용**

[0008] <본 발명의 개요>

[0009] 본 발명은 인간을 포함한 포유동물에서 면역 관련 질병의 진단 및 치료를 위해 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 특정 종류의 면역 세포의 증식 및 기능의 음성 조절에 관여되는 단백질의 확인에 기초한 것이다. 면역 관련 질병은 면역 반응을 억제 또는 향상시킴으로써 치료될 수 있다. 면역 반응을 향상시키는 분자는 항원에 대한 면역 반응을 자극하거나 강화한다. 면역 반응을 자극하는 분자는 면역 반응의 향상이 유익할 경우에 치료 목적으로 사용될 수 있다. 별법으로, 면역 반응을 억제하는 분자는 항원에 대한 면역 반응을 약화 또는 감소시키고 (예를 들어, 중화 항체), 면역 반응의 약화가 유익할 경우에 (예를 들어, 염증) 치료 목적으로 사용될 수 있다. 본원에서, 본 발명자들은 TIGIT ("T-세포-Ig 및 ITIM 도메인") 단백질이 폴리오바이러스 수용체 (PVR, 또한 CD 155로서 공지됨) 및 새로 규명된 단백질 패밀리의 몇몇 다른 멤버에 특이적으로 결합하고, 이러한 TIGIT-PVR 상호작용이 T 세포 활성화 및 증식을 음성으로 조절함을 입증한다. 따라서, TIGIT 폴리펩티드, 그의 효능제 (agonist) 및 그의 길항제, 및 PVR 폴리펩티드, 그의 효능제 및 그의 길항제는 면역 관련 및 염증성 질병의 치료용 약품 및 의약을 제조하기 위해 유용하다. 본 발명은 또한 면역 관련 및 염증성 질병을 치료하는 방법, 및 면역 관련 및 염증성 질병의 상태를 검출 및 평가하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0010] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 다음 아미노산 중 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다: 인간 TIGIT의 아미노산 위치 67에 대응하는 아미노산 위치의 알라닌, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 74에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 114에 대응하는 아미노산 위치의 프롤린, 및 인간 TIGIT의 아미노산 위치 116에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신. 한 측면에서, 폴리펩티드는 PVR, PVRL1, PVRL2, PVRL3, PVRL4, TIGIT, CD96 또는 CD226이 아니다. 다른 측면에서, 폴리펩티드는 인간 TIGIT의 아미노산 위치 54에 대응하는 아미노산 위치의 발린, 이소류신 및 류신 중에서 선택되는 아미노산, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 55에 대응하는 아미노산 위치의 세린 및 트레오닌 중에서 선택되는 아미노산, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 56에 대응하는 아미노산 위치의 글루타민, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 112에 대응하는 아미노산 위치의 트레오닌, 및 인간 TIGIT의 아미노산 위치 113에 대응하는 아미노산 위치의 페닐알라닌 및 타이로신 중에서 선택되는 아미노산 중의 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 폴리펩티드는

[0011] a. 아미노산 위치 54의 발린 및 이소류신 중에서 선택되는 아미노산 - 아미노산 위치 55의 세린 및 트레오닌 중에서 선택되는 아미노산 - 아미노산 위치 56의 글루타민;

[0012] b. 아미노산 위치 67의 알라닌 - 각각의 아미노산 위치 68-73의 임의의 아미노산 - 아미노산 위치 74의 글라이신; 및

[0013] c. 아미노산 위치 112의 트레오닌 - 아미노산 위치 113의 페닐알라닌 및 타이로신 중에서 선택되는 아미노산 - 아미노산 위치 114의 프롤린 - 아미노산 위치 115의 임의의 아미노산 - 아미노산 위치 116의 글라이신 중에서 선택되는 하나 이상의 구조적 하위모티프를 추가로 포함하고,

[0014] 여기서 아미노산 위치의 넘버링은 인간 TIGIT의 아미노산 위치에 대응하지만, 폴리펩티드 내의 아미노산의 절대적인 넘버링은 다를 수 있다.

[0015] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 시험 폴리펩티드의 아미노산 서열을 TLP 패밀리의 폴리펩티드의 하나 이상의 멤버의 아미노산 서열과 정렬시키고, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 67에 대응하는 아미노산 위치의 알라닌, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 74에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 114에 대응하는 아미노산 위치의 프롤린, 및 인간 TIGIT의 아미노산 위치 116에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신 중의 하나 이상이 시험 폴리펩티드 아미노산 서열 내에 존재하는지 또는 부재하는지를 평가하는 것을 포함하는, 시험 폴리

펩티드가 TLP 패밀리의 폴리펩티드의 멤버인지 결정하는 방법을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 서열 데이터베이스 내에서 그의 아미노산 서열이 인간 TIGIT의 아미노산 위치 67에 대응하는 아미노산 위치의 알라닌, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 74에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신, 인간 TIGIT의 아미노산 위치 114에 대응하는 아미노산 위치의 프롤린, 및 인간 TIGIT의 아미노산 위치 116에 대응하는 아미노산 위치의 글라이신 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 단백질을 확인함으로써 TLP 단백질 패밀리의 하나 이상의 멤버를 확인하는 방법을 제공한다.

[0016] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 TLP 패밀리 멤버의 하나 이상의 보존된 또는 실질적으로 보존된 구역과 특이적으로 상호작용하는 단리된 물질을 제공한다. 한 측면에서, 물질은 TLP 패밀리 멤버의 발현 및/또는 활성의 길항제이다. 다른 측면에서, 길항제는 소분자 억제제, 억제 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앵타머, 억제성 핵산, 및 억제성 폴리펩티드로부터 선택된다. 다른 측면에서, 물질은 TLP 패밀리 멤버의 발현 및/또는 활성의 효능제이다. 다른 측면에서, 효능제는 PVR에 대한 TIGIT 결합 및/또는 PVR에 의해 매개되는 TIGIT 세포내 신호전달을 활성화시키는 효능 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 효능 펩티드, 및 소분자 또는 단백질로부터 선택된다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 추정 TLP 패밀리 멤버 폴리펩티드를 적어도 하나의 상기 물질과 접촉시키고, 추정 TLP 패밀리 멤버에 대한 적어도 하나의 물질의 결합을 결정함으로써, 하나 이상의 TLP 패밀리 멤버를 확인 또는 검출하는 방법을 제공한다.

[0017] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 시험 면역 세포 내의 TIGIT 발현 수준을 평가하고, 이를 공지의 활성화된 또는 정상  $T_{reg}$ , 기억 T 세포, NK 세포, 또는  $T_{FH}$  세포의 TIGIT 발현 수준에 비교함으로써, 또는 시험 면역 세포 내의 TIGIT 발현 수준을 공지의 표준 TIGIT 발현값(들)에 비교함으로써, 시험 면역 세포가 활성화된 또는 정상  $T_{reg}$ , 기억 T 세포, NK 세포, 또는  $T_{FH}$  세포인지 결정하는 방법을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 PVR, PVRL3, 및 PVRL2 중 하나 이상에 대한 TIGIT의 결합을 조절하는 것을 포함하는, 면역계 기능 및/또는 활성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0018] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 23-28에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 HVR을 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 31-36에 제시된 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 HVR을 포함하는 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 경쇄는 서열 21에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 경쇄는 서열 29에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 중쇄는 서열 22에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 중쇄는 서열 30에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 경쇄는 서열 21에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함하고, 항체 중쇄는 서열 22에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 경쇄는 서열 29에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함하고, 항체 중쇄는 서열 30에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 경쇄는 서열 50의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부에 의해 코딩된다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 항-TIGIT 항체 또는 그의 단편을 제공하고, 여기서 항체 중쇄는 서열 51의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 일부에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 이중접합체 항체, 및 면역독소로부터 선택된다.

[0019] 다른 측면에서, 본 발명의 적어도 하나의 HVR은 임의의 서열 23-28에 제시된 HVR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 다른 측면에서, 본 발명의 적어도 하나의 HVR은 임의의 서열 31-36에 제시된 HVR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄는 서열 21에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄는 서열 29에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄는 서열 22에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄는 서열 30에 제



시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 21에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 및 서열 22에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 29에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 및 서열 30에 제시된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0020] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 적어도 하나의 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제를 생체 내에서 또는 시험관 내에서 투여하는 것을 포함하는, CD226-PVR 상호작용 및/또는 CD96-PVR 상호작용을 조절하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, TIGIT, 또는 TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제가 투여되고, CD226-PVR 상호작용 및/또는 CD96-PVR 상호작용이 억제 또는 차단된다. 다른 측면에서, TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제가 투여되고, CD226-PVR 상호작용 및/또는 CD96-PVR 상호작용이 자극된다.

[0021] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 TIGIT 및/또는 PVR 발현 및/또는 활성을 조절함으로써, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 조절함으로써, 면역 세포 기능 및/또는 활성을 조절하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 조절은 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리함으로써, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 자극함으로써, 하나 이상의 면역 세포의 증식, 또는 하나 이상의 면역 세포에 의한 전염증성 시토킨 방출을 감소 또는 억제하는 것이다. 다른 측면에서, 조절은 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제, PVR 발현 및/또는 활성의 길항제로 처리함으로써, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 억제함으로써, 하나 이상의 면역 세포의 증식, 또는 하나 이상의 면역 세포에 의한 전염증성 시토킨 방출을 증가 또는 자극하는 것이다.

[0022] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, PVR 발현 및/또는 활성의 효능제를 투여함으로써, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 자극함으로써, 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제, PVR 발현 및/또는 활성의 길항제를 투여함으로써, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 억제함으로써, 면역 반응을 증가 또는 자극하는 방법을 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 TIGIT 또는 PVR 발현 및/또는 활성을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 조절함으로써, 면역 세포로부터의 시토킨 생산의 종류 및/또는 양을 조절하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 전염증성 시토킨 생산은 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제, PVR 발현 및/또는 활성의 길항제의 투여에 의해, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 억제함으로써 자극되고/되거나 증가된다. 다른 측면에서, 전염증성 시토킨 생산은 TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, PVR 발현 및/또는 활성의 효능제의 투여에 의해, 또는 PVR에 대한 TIGIT 결합에 의해 매개되는 세포내 신호전달을 자극함으로써 억제된다.

[0023] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 면역 세포를 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리하는 것을 포함하는, 하나 이상의 면역 세포에서 ERK 인산화 및/또는 ERK 경로를 통한 세포내 신호전달을 자극하는 방법을 제공한다.

[0024] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병을 진단하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역 관련 질병은 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암으로부터 선택된다. 다른 측면에서, 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고, TIGIT의 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양에 비교하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병의 중증도를 평가하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역 관련 질병은 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암으로부터 선택된다. 다른 측면에서, 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 대상에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 조절하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병을 예방하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역 관련 질병은 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암으로부터 선택된다. 다른 측면에서, 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 대상에서 TIGIT의 발현 및/또는

활성을 조절하는 것을 포함하는, 대상에서 이상 면역 세포 반응에 관련된 면역 관련 질병을 치료하거나 증중도를 완화시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역 관련 질병은 건선, 관절염, 염증성 장 질환 또는 암으로부터 선택된다. 다른 측면에서, 암은 유방암이다.

**도면의 간단한 설명**

[0025]

도 1은 인간, 마우스, 붉은털 원숭이 및 개 TIGIT 단백질 서열의 정렬을 도시한 것이다. 음영은 3 또는 4개의 종에서 동일한 아미노산을 함유하는 위치를 나타낸다. 신호 서열은 대시선으로 표시하고, 면역글로불린 V-세트 도메인은 겹줄로 나타낸다, N-글리코실화 부위는 필수 위치 위에 가는 선으로 표시하고, 막횡단 도메인은 굵은 선으로 표시하고, 추정되는 연장된 ITIM 모티프는 겹대시선으로 나타낸다. 인간 TIGIT는 각각 붉은털 원숭이, 개 및 마우스 서열과 88%, 67%, 및 58% 동일성을 공유한다.

도 2a 및 2b는 지시된 PVR 패밀리 단백질의 IgV 도메인의 단백질 서열의 정렬을 도시한 것이다. 서열들을 가로 질러 유사성을 공유하는 측쇄를 특성에 따라 표시한다. V-프레임 지문 (fingerprint) 잔기 (흑색 원) 및 PVR-관련 지문 잔기 (굵은 선의 상자로 쓴 잔기)를 표시한다. 비교 목적을 위해, 비-PVR 패밀리 멤버로부터의 6개의 IgV 도메인 서열 (수평선 아래에 제시된)을 또한 정렬시킨다.

도 3은 실시예 2에 설명된 바와 같이, 다양한 단백질에 결합하는 TIGIT-Fc (연회색 선) 또는 대조군-Fc 단백질 (흑색 선)의 능력을 평가하기 위한 바이오센서 분석의 결과를 도시한 것이다. 숫자 1-8은 각각 ESAM, OTOR, TEK, TNFRSF10C, IGFBP4, PVR, IL-19 및 TEK를 나타낸다.

도 4a는 실시예 2에 설명된 바와 같이, 고정된 TIGIT-Fc에 대한 다양한 Fc 융합 단백질의 결합을 평가하기 위한 바이오센서 분석의 결과를 도시한 것이다. 도 4ba 내지 4bf는 실시예 2에 설명된 바와 같이, 수용체-발현 CHO 안정한 형질감염체에 대한 비오틴화된 Fc-융합 단백질의 결합을 평가하기 위한 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 5a 및 5b는 실시예 2에 설명된 바와 같이, TIGIT-Fc 및 PVR-발현 CHO 세포 사이의 결합에 대한 Kd를 결정하기 위한 하나의 대표적인 방사성 리간드 결합 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 6은 실시예 2에 설명된 바와 같이, TIGIT, PVR, CD226 및 CD96 사이의 경쟁 결합 연구의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 7은 실시예 2에 설명된 바와 같이, TIGIT 또는 CD226에 대한 PVR 결합을 차단하는 항-PVR 항체의 능력을 평가하는 실험 결과를 보여준다. 도 7a는 10-배 물 과량의 항체 D171의 존재 (점선) 또는 부재 (실선) 하에, CD226 또는 TIGIT를 발현하는 CHO 형질감염체에 대한 비오틴화된 PVR-Fc의 결합을 도시한 것이다. 매칭시킨 이소형 대조군 항체로부터의 결과를 음영 영역으로 나타낸다. 도 7b는 CD226-Fc 또는 TIGIT-Fc를 로딩한 바이오센서에 대한 PVR-Fc (상부선) 또는 버퍼 (저부선)의 결합을 도시한 것이다. 중간선은 PVR-Fc에 노출시키기 전에 항체 D171로 차단된, CD226-Fc 또는 TIGIT-Fc를 예비-로딩한 바이오센서에 대한 PVR-Fc 결합을 나타낸다.

도 8a는 실시예 2(A)에 설명된 바와 같이, 다양한 면역 세포 종류에서 TIGIT 발현 데이터 (좌측 패널) 또는 CD226 발현 데이터 (우측 패널)을 도시한 것이다. 도 8b는 실시예 2(A)에 설명된 바와 같이, T<sub>H</sub> 세포에서 TIGIT 및 ICOS mRNA 발현의 RT-PCR 분석을 도시한 것이다.

도 9a-b는 실시예 3에 설명된 바와 같이, 세포의 표면에서 TIGIT에 결합하는 항-TIGIT 항체 10A7의 능력을 시험하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 9a는 안정한 293-TIGIT 세포주에 대한 항-TIGIT 항체 10A7의 결합 (실선) 및 PVR-Fc의 존재 하에 그 결합의 폐기 (대시선)를 보여준다. 회색 구역은 이소형-매칭시킨 대조군 항체의 결합을 나타낸다. 도 9b는 TIGIT가 G<sub>ITR</sub><sup>+</sup> CD4 T-세포에서 FoxP3과 동시-발현함을 입증하는 FACS 분석의 결과를 보여준다. 제시된 데이터는 2개의 독립 실험을 대표한다.

도 10a-f는 실시예 3에 설명된 바와 같이, mRNA 분석에 의해 또는 세포 표면에서 결합 연구에 의해 TIGIT 발현을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 10aa 내지 10ab는 실시예 2(A)에 설명된 바와 같이, 휴지기 또는 활성화된 (1 또는 2일 동안) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (좌측 패널) 또는 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 세포 (우측 패널) 상에서 TIGIT 및 CD226의 발현을 결정하기 위한 유동 세포측정 실험의 결과를 도시한 것이다. 도 10b는 나이브 (naive) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 세포에서 TIGIT mRNA 수준에 비해, PBMC로부터 채취 외에서 직접 분류된 상이한 종류의 면역 세포에서 TIGIT mRNA의 배수-변화를 나타내는 막대 그래프를 도시한 것이다. 도 10c는 자극되지 않은 세포에 비해,

1 또는 2일 동안 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 분류된  $CD4^+CD45RO^+$ ,  $CD4^+CD45RA^+$  및  $CD4^+CD25^{hi}$   $T_{reg}$  세포, 또는 1일 동안 IL-2로 활성화된 분류된  $CD56^+$  NK 세포 상에서 TIGIT mRNA 수준의 배수 증가를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 도시된 FACS 플롯 (plot)은 하나의 대표적인 실험의 것이고, RT-PCR 값은 3개의 공여체의 평균이다. 도 10d는  $CD25^-$  인간 PBMC 세포는 TIGIT 발현이 결핍됨을 보여주는 FACS 분석의 결과를 보여준다. 도 10e는 소량 또는 다량의  $CD25$ 를 발현하는 인간 PBMC 세포 상에서 TIGIT의 세포 표면 발현을 평가하는 FACS 실험의 결과를 도시한 것이고, TIGIT의 발현이 FOXP3의 발현과 상호관련됨을 보여준다. 도 10f는 24시간 동안 항-CD3 및 항-CD28로 활성화된 분류된  $CD4^+CD25^{hi}$  T 세포에서 TIGIT 발현을 평가하는 FACS 실험의 결과 (좌측 패널) 및 휴지기 또는 활성화된  $CD25^-$  또는  $CD25^{hi}$   $CD4^+$  세포에서 TIGIT mRNA 수준의 상보성 RT-PCR 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 11은 실시예 2(A)에 설명된 바와 같이, 휴지기 또는 활성화된 (1 또는 2일 동안)  $CD25^+$ ,  $CD45RA^+$ ,  $CD45RO^+$  세포에서 TIGIT 또는 CD226 발현의 배수-변화를 보여주는 그래프를 제공한다.

도 12a는 실시예 3에 설명된 바와 같이, T 세포 상에서 TIGIT 발현의 안정성을 평가하기 위한 유동 세포측정 실험의 결과를 도시한 것이다. 도 12b는 실시예 3에 설명된 바와 같이, 다양한 농도의 항-CD3에 노출된 분류된  $TIGIT^+$  및  $TIGIT^-$  세포에서 TIGIT 발현을 평가하기 위한 플레이트-기반 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 13a-c는 실시예 5에 설명된 바와 같이, B 및 T 세포가 결핍되는 scid 마우스에서 IL-10, IL-12p40 및 IL-12p70 생산을 조절하는 TIGIT의 능력을 평가하는 실험 결과를 도시하는 플롯을 보여준다.

도 14는 실시예 2(A)에 설명된 바와 같이, IL-17-생산 대 IL-2-생산 T-헬퍼 세포 상에서 TIGIT 발현을 평가하기 위한 유동 세포측정 실험의 결과를 도시한 것이다. 각각의 패널 내의 데이터는 상이한 공여체로부터의 PBMC를 사용한 실험을 대표한다.

도 15는 실시예 3에 설명된 바와 같이 질병 조직 샘플에서 TIGIT의 발현 수준을 평가하는 mRNA 분석의 결과를 도시한 것이다. 최우측 패널은 류마티스 관절염 율활막 조직으로부터 취한 분류된 세포로부터의 발현 데이터를 제공한다. PVR 및 CD226 발현은 이들 샘플에서 검출가능하지 않았다.

도 16은 정상 샘플에 비해, 콜라겐-유도된 관절염의 마우스 모델로부터 상이한 시점에 취한 조직에서 TIGIT (상부 패널) 또는 CD226 (하부 패널)의 발현을 평가하는 RT-PCR 실험의 결과를 도시한 것이다.

도 17은 실시예 3에 설명된 바와 같이, 천식 및 대조군 붉은털 원숭이로부터의 조직 샘플 내에서 TIGIT, PVR, 및 CD226의 발현 수준을 평가하는 mRNA 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 18a는 정상 또는 암성 세포에서 TIGIT의 발현 수준 (상부 패널) 또는 다양한 유방 종양 샘플에서  $CD4$ 의 발현 (하부 패널)을 평가하는 mRNA 분석의 결과를 도시한 것이다. 도 18b-18d는 실시예 3에 설명된 바와 같이, 다양한 암 샘플에서 TIGIT (도 18b), PVR (도 18c), 및 CD226 (도 18d)의 발현 수준을 평가하는 mRNA 분석의 결과를 도시한 것이다. 각각의 도 18b, 18c, 및 18d에서 하부 패널은 다양한 비율의 종양 세포를 함유하는 암 샘플에서 각각 TIGIT, PVR, 또는 CD226 발현의 수준을 보여준다. 모든 패널 내의 상자는 통계상 유의한 데이터를 나타낸다.

도 19a-d는 실시예 4에 설명된 바와 같이, T 세포 활성화에 대한 TIGIT의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 19a는  $CD14^+$  단핵구, iMDDC 및 MDDC에 대한 PVR 발현을 평가하는 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다. 항-PVR 실험은 음영 없이 도시되고, 이소형-매칭시킨 대조군은 회색으로 도시된다. 도 19b는 T 세포 증식에 대한 TIGIT-Fc의 영향을 평가하는, TNF  $\alpha$ -성숙시킨 DC 및 단리된  $CD4^+$  T 세포를 사용하는 시험관 내 MLR 분석의 결과를 도시한 것이다. 별표로 나타낸 데이터는  $p < 0.001$ 이다. 도 19c는 자가  $CD11c^+$  DC 및 항-TIGIT 항체 10A7 (흑색 막대) 또는 이소형 대조군 (백색 막대)의 존재 하에 가용형 항-CD3으로 활성화된  $CD4^+$  T 세포에서 [ $^3H$ ]-티미딘 혼입 (cpm)에 의한 T 세포 증식 (좌측 패널) 및 ELISA에 의한 IFN- $\gamma$  생산 (우측 패널)을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 단일 별표는  $p < 0.01$ 을 나타내고; 이중 별표는  $p < 0.001$ 을 나타낸다. 도 19d는 100  $\mu g/mL$  TIGIT-Fc (회색 막대) 또는 이소형 대조군 (백색 막대)의 존재 하에 자가  $CD11c^+$  DC 및 가용형 항

-CD3으로 활성화된 나이브 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 세포에서 증식 및 IFN- $\gamma$  생산을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 단일 별표는 p<0.01을 나타내고; 이중 별표는 p<0.001을 나타낸다.

도 20a 및 20b는 실시예 4에 설명된 바와 같이, MLR 분석에서 TIGIT<sup>-</sup> T 세포 증식을 억제하는 분류된 TIGIT<sup>+</sup> T 세포의 능력을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다.

도 21a는 실시예 4에 설명된 바와 같이 항-TIGIT 항체 (10A7)의 존재 및 부재 하에 다른 T 세포 및 APC의 증식에 대한 TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>의 영향을 평가하는 증식 분석의 결과, 및 이들 세포 집단에서 IFN $\gamma$  및 IL-10의 생산을 도시한 것이다. 도 21b는 실시예 4A에 설명된 바와 같이, TIGIT<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>에 비해 나이브 T 세포 증식에 대한 TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>의 영향을 평가하는 증식 분석의 결과를 도시한 것이다.

도 22a-d는 실시예 5에 설명된 바와 같이, 성숙시킨 iMDDC 및 DC에서 시토킨 생산을 조절하는 TIGIT의 능력을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 22aa 내지 22ac는 iMDDC, TNF  $\alpha$ 로 자극된 iMDDC, CD40L로 자극된 iMDDC, LPS로 자극된 iMDDC, 또는 Pam3CSK4로 자극된 iMDDC에서 IL-10 또는 IL-12p40 생산을 측정하는 ELISA 분석의 결과를 보여준다. 제시된 결과는 3회 실험으로부터의 평균이다. 각각의 패널 내의 선은 3개의 상이한 공여체의 각각으로부터 데이터를 나타낸다. 도 22b는 처리된 세포에서 세포 표면 성숙 마커 HLA-DR, CD80, CD83, 및 CD86의 발현을 측정하기 위한 FACS 분석의 결과를 보여준다. 값은 평균 형광 강도 (MFI)로서 표시되고, 제시된 데이터는 3개의 공여체를 대표한다. 도 22c는 TNF  $\alpha$ -성숙시킨 또는 LPS-성숙시킨 MDDC로부터 다른 전염증성 시토킨 생산에 대한 TIGIT 영향을 측정하는 실험으로부터의 데이터를 보여준다. 제시된 데이터는 3회 실험을 대표한다. IL-6, IL12p70, 및 IL-18 수준은 실시예 5에 설명된 바와 같이, 루미넥스 (LUMINEX) 분석에 의해 결정하였다. 도 22d는 실시예 5에 설명된 바와 같이, TIGIT.Fc 또는 이소형-매칭시킨 대조군에 반응하여 iMDDC 내의 TGF $\beta$  분비의 상대적인 양을 나타내는 그래프를 보여준다.

도 23a-c는 실시예 6에 설명된 바와 같이, PVR에 의한 하류 신호전달의 활성화에 대한 TIGIT 처리의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 23a는 TIGIT 또는 대조군으로 처리한 PVR의 타이로신 인산화 상태의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 도 23b는 iMDDC를 TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, 또는 대조군으로 처리 시에 ERK 이량체화 상태의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 도 23c는 TIGIT-처리된 대 대조군 처리된 iMDDC에서 활성 대 총  $\beta$ -카테닌의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.

도 24a-b는 실시예 6에 설명된 바와 같이, TNF  $\alpha$ -성숙시킨 MDDC에서 IL-12p40 생산의 TIGIT-유도된 감소에 대한 다양한 하류 신호전달 분자의 차단 효과의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 24a는 IL-12p40 생산의 TIGIT-Fc 또는 TIGIT-Fc-DANA-유도된 감소에 대한 MAPK 키나제 억제제의 영향을 시험하는 실험 결과의 그래프를 보여준다. 도 24b는 TNF  $\alpha$ -성숙시킨 MDDC로부터 IL-12p40 생산의 TIGIT-매개된 감소에 대한 항-TIGIT 항체 (10A7), 항-IL-10 항체, 또는 항-CD32 항체의 영향을 평가하는 실험 결과의 그래프를 보여준다.

도 25a-b는 실시예 7에 설명된 바와 같이, T 세포 활성화에 대한 TIGIT-Fc 처리의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. TIGIT-Fc 또는 대조군 항체로 처리한 iMDDC 또는 TNF  $\alpha$ /CD40L-성숙시킨 MDDC 배양액에서/에 의해 유도된 T 세포 증식 (도 25a) 또는 IL-2 생산 (도 25b)의 양을 평가하는 실험 데이터의 그래프.

도 26은 실시예 7에 설명된 바와 같이, 활성화된 인간 MDDC에서 ILT의 발현에 대한 TIGIT-Fc 처리의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다.

도 27a-h는 실시예 7에 설명된 바와 같이, 마우스에서 지연형 과민성 반응에 대한 TIGIT 처리의 영향을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 27a는 항-두드러기쑥 항체, TIGIT-Fc, 또는 CTLA4로 처리한 야생형 또는 IL-10 녹아웃 (knockout) 마우스로부터 귀 부기 데이터를 나타내는 그래프를 보여준다. 도 27b는 KLH 재자극에 대한 TIGIT-Fc-, CTLA4-Fc-, 또는 대조군 처리 마우스로부터 비장 세포의 증식 반응을 나타내는 데이터를 보여준다. 데이터는 반응 $\pm$ 표준 편차로서 보여준다 (n=3/군; 시험관 내 회수 (recall) 분석은 삼중 웰에서 수행하였다). 도 27c는 TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, 또는 항-TIGIT 항체 10A7로 처리한 야생형 마우스로부터 귀 부기 데이터를 나타내는 그래프를 보여준다. 도 27d 및 27e는 KLH 재자극에 대해 야생형 (도 27d) 또는 IL-10 녹아웃 (도 27e) TIGIT-Fc-처리된 마우스로부터 비장 세포의 증식 반응을 나타내는 그래프를 도시한 것이다. 도 27f 및 27g는 2일 동안 KLH로 재활성화시킨 야생형 (도 27f) 또는 IL-10 녹아웃 (도 27g) TIGIT-Fc-처리된 마우스로부터 단리된 비장세포로부터 배양 상등액 내의 IL-2 또는 IFN- $\gamma$  수준을 나타내는 그래프를 도시한 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ s.d.로서 제시된다 (n=3/군; 시험관 내 회수를 삼중 웰에서 수행하였다). 별표는 p<0.001

을 나타낸다. 도 27h는 qRT-PCR에 의해 결정할 때 (n=8) TIGIT-Fc 및 이소형 대조군-처리된 야생형 또는 IL-10-결핍 마우스의 CD11c<sup>+</sup> 비장세포로부터 IL-10 (좌측 패널), IL-12/23p40 (중앙 패널), 및 IL-12p35 (우측 패널)의 상대적인 mRNA 수준을 보여주는 그래프를 도시한 것이다. WT CD11c<sup>-</sup> 결핍된 비장세포로부터 IL-10 mRNA 수준을 대조군으로서 또한 결정하였다. 데이터는 면역화시키지 않은 마우스로부터 상응하는 mRNA 수준에 상대적인 임의의 mRNA 수준을 나타낸다. 별표는 p<0.05를 나타낸다.

도 28a-28e는 실시예 4(B)에 설명된 바와 같이, TIGIT-특이적 siRNA에 의한 TIGIT 발현의 녹다운 (knock-down)의 효과를 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 28a는 TIGIT 녹다운 효율 대 대조군 siRNA의 qRT-PCR 분석의 결과를 보여준다. CTLA4 mRNA 수준을 비-표적 대조군으로서 결정하였다. 도 28b는 siRNA<sub>대조군</sub> 및 siRNA<sub>TIGIT</sub>-처리된 세포에서 표면 TIGIT 발현의 FACS 분석을 보여준다 (표 7에 요약됨). 도 28c 및 28d는 siRNA<sub>대조군</sub> 또는 siRNA<sub>TIGIT</sub> (도 27c) 또는 항-TIGIT 항체 10A7 (도 27d)의 존재 하에 플레이트-결합된 항-CD3 단독으로 또는 항-CD28과 함께 활성화된 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 인간 T 세포의 세포 증식의 FACS 분석의 결과를 보여준다. 도 28e는 2일 배양 후에 도 28c의 분석에 사용된 세포로부터 시토킨 생산의 분석 결과를 도시한 것이다. 제시된 데이터는 4개의 개별 공여체 및 실험을 대표한다.

도 29a-29e는 다양한 세포 종류에서 및 다양한 처리 시에 CD226의 발현을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 29a는 항-CD226을 사용하여 휴지기 및 항-CD3 및 항-CD28 활성화된 (제1일 및 제2일) 분류된 나이브 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 세포 (상단 패널) 또는 기억 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 세포 (저변 패널) 상에서 CD226의 표면 발현을 보여주는 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다. 도 29b는 자극되지 않은 세포에 비해 1 또는 2일 동안 항-CD3 + 항-CD28로 활성화된 분류된 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포, 및 1일 동안 IL-2 + IL-15로 활성화된 분류된 CD56<sup>+</sup> NK 세포 상에서 mRNA 수준의 배수-증가를 보여주는 그래프를 제공한다. 도 29c는 나이브 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 세포에 비해 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub>, NK 및 CD11c<sup>+</sup> DC 세포의 집단의 표지자로서, qRT-PCR에 의해 결정될 때 PBMC로부터 생체 외에서 직접 분류된 세포 상의 다양한 세포 마커의 상대적인 mRNA 수준을 보여준다. 제시된 데이터는 3개의 공여체로부터 데이터의 평균을 나타낸다. 도 29d는 항-CD4, 항-CD25, 및 항-CD226으로 염색된 총 인간 PBMC의 집단으로부터 취한 게이팅된 CD4<sup>+</sup> 세포 상에서 CD226 및 CD25의 동시-발현을 결정하기 위한 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다. 도시된 플롯은 2개의 공여체로부터 하나의 대표적인 것이다. 도 29e는 PBMC로부터 단리된 활성화된 및 휴지기 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> 세포 내의 TIGIT 및 CD226 mRNA 수준을 도시하는 그래프이다. mRNA 수준은 휴지기 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 세포에 비해 배수-변화로서 표시되고, 2개의 공여체로부터 데이터의 평균이다.

도 30a-c는 실시예 8에 설명된 바와 같이, TIGIT-결핍 마우스에서 면역 세포 기능성을 평가하는 실험 결과를 도시한 것이다. 도 30a는 야생형 항원-제시 세포의 부재 (좌측 패널) 또는 존재 (중앙 패널) 하에 TIGIT-결핍 (TIGIT.KO) T 세포 대 야생형 T 세포의 증식을 비교하는 그래프를 보여준다. 우측 패널은 TIGIT.KO 항원-제시 세포의 존재 하에 TIGIT.KO T 세포 대 야생형 T 세포의 증식을 비교하는 그래프를 보여준다. 도 30b는 TIGIT.KO 대 야생형 T 세포에서 IFN $\gamma$  및 IL-4 수준을 평가하는 FACS 분석의 결과를 도시한 것이다. 도 30c는 TIGIT.KO 또는 야생형 T 세포의 상등액 내에서 표시된 시토킨의 측정된 수준을 보여주는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0026] TIGIT는 면역 기능의 추정 조절제로서 이전에 확인되었다 (예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 US20040121370 참조). 본원에서, 본 발명자들은 TIGIT가 폴리오마이리우스 수용체 (NECL5 또는 CD155로도 알려진 PVR), PVR-유사 단백질 1-4 (PVRL1-4), CD96, 및 CD226을 포함하는 면역 관련 단백질의 새로 설명된 패밀리의 멤버임을 입증한다. 본 발명자들은 그의 멤버가 면역 조절 및 기능에서 일정 역할을 하는 상기 새로운 패밀리의 보존된 구조적 요소를 제공하고, 추가의 패밀리 멤버를 확인하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명자들은 TIGIT가 PVR에 강력하게 결합하고, PVRL3 (넥틴-3 또는 CD113으로도 알려짐) 및 PVRL2 (넥틴-2 또는 CD112로도 알려짐)에는 보다 낮은 Kd로 결합함을 밝혀내었다. PVR은 수지상 세포 (DC), 및 FDC, 섬유모세포, 내피 세포, 및 일부 종양 세포 상에서 고도로 발현되는 세포 표면 수용체이다 ([Sakisaka, T. & Takai, Y., Curr Opin Cell Biol 16, 513-21 (2004)]; [Fuchs, A. & Colonna, M., Semin Cancer Biol 16, 359-66

(2006)). 본 발명자들은 mRNA 및 FACS 분석에 의해, TIGIT가 다양한 활성화된 T 세포, 특히 조절 T 세포 (T<sub>reg</sub>), 기억 T 세포, NK 세포, 및 여포상 T 헬퍼 세포 (T<sub>fh</sub>) 상에서 우세하게 발현됨을 밝혀내었다. 본원에서 설명되는 연구는 TIGIT와 DC 상의 PVR의 상호작용을 입증하고, 상기 결합 상호작용이 DC 기능, 특히 시토킨 생산을 조절함을 보여준다. TIGIT-결합된 인간 DC는 높은 수준의 IL-10 및 보다 적은 전-염증성 시토킨 (예를 들어 IL-12p40 및 IL-12p70)을 분비하였다. 미성숙 T 세포에 대한 TIGIT 결합 (TIGIT 융합 구성체를 사용하여 평가된)은 T 세포 활성화 및 증식을 억제하였다. 주목할 만한 사실은, 상기 억제가 ERK 억제제의 존재 하에 역전되었고, 이것은 ERK 활성화가 DC 활성을 조절하는 TIGIT의 기능에서 중요한 단계일 수 있음을 나타낸다는 것이다. 본 발명자들은 본원에서 TIGIT<sup>+</sup> T 세포가 면역 세포의 혼합 집단에 존재할 때 다른 TIGIT<sup>-</sup> T 세포뿐만 아니라 항원 제시 세포의 증식을 억제함을, 그리고 차단 항-TIGIT 항체를 혼합물에 포함시키면 관찰된 억제가 크게 감소하기 때문에 TIGIT 자체가 상기 억제 효과를 책임짐을 밝혀내었다.

[0028] TIGIT는 본원에서 밝혀진 바와 같이, 정상 대조 조직에 비해 관절염, 건선, 염증성 장 질환, 및 유방암 조직에서 발현이 증가한다. 본 발명자들은 또한 TIGIT 융합 단백질이 시험관 내에서의 인간 T 세포 반응 및 지연형 과민성 생체 내 분석에서의 쥐 T 세포 활성화를 억제함을 보여줌으로써 면역 반응을 조절하는 TIGIT의 능력을 직접 입증한다. TIGIT는 성숙 DC를 유의하게, 미성숙 DC를 보다 작은 정도로 변형시키고, 이것은 DC가 완전 활성화된 항원-제시 세포가 되면, TIGIT-PVR 상호작용이 조절 면역 반응의 미세조정에 중요할 수 있음을 시사한다. 본원에서 제시된 실험은 TIGIT가 DC에서 IL-10의 유도를 통한 억제 피드백 루프를 통해 T 세포 활성화를 억제하는 기전을 시사한다. 따라서, 본 발명은 시토킨의 특정 하위세트 또는 면역 세포의 특정 하위세트를 조절함으로써 면역 기능을 조절하는 신규 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 상기 측면 및 다른 측면은 이하에서 보다 상세하게 설명된다.

[0029] I. 정의

[0030] 용어 "TIGIT 폴리펩티드", "TIGIT 단백질" 및 "TIGIT"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 본원에서 설명되는 특정 폴리펩티드 서열을 의미한다. 본원에서 설명되는 TIGIT 폴리펩티드는 다양한 공급원, 예를 들어 인간 조직 또는 비인간 유기체로부터의 조직으로부터 단리되거나, 재조합 또는 합성 방법으로 제조될 수 있다. 하나의 실시태양에서, TIGIT 폴리펩티드는 임의의 서열 1-4에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. "TIGIT 폴리펩티드"를 나타내는 본원 명세서 내의 모든 개시내용은 각각의 폴리펩티드를 개별적으로 및 공동으로 지칭하는 것이다. 예를 들어, 그의 정제, 유도, 그에 대한 항체의 형성, 투여, 그를 함유하는 조성물, 그를 사용한 질병의 치료 등은 본 발명의 각각의 폴리펩티드에 대해 개별적으로 관련되는 것이다. 또한, 용어 "TIGIT 폴리펩티드", "TIGIT 단백질", 또는 "TIGIT"는 본원에 개시되거나 당업계에 공지된 TIGIT 폴리펩티드의 변이체를 포함한다.

[0031] "천연 서열 TIGIT 폴리펩티드"는 자연에서 유래하는 대응하는 TIGIT 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 상기 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드는 자연에서 단리될 수 있거나 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "천연 서열 TIGIT 폴리펩티드"는 구체적으로 특정 TIGIT 폴리펩티드의 천연 발생 말단 절단된 (truncated) 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포의 도메인 서열), 폴리펩티드의 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 선택적으로 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 상이한 실시태양에서, 본원에 개시된 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드는 성숙 또는 전장 아미노산 서열을 포함하는 전장 천연 서열 폴리펩티드이다. 그러나, 첨부 도면에 개시된 TIGIT 폴리펩티드는 도면에 아미노산 위치 1로서 본원에서 지정된 메티오닌 잔기로 시작하지만, 도면에서 아미노산 위치 1의 상류 또는 하류에 위치한 다른 메티오닌 잔기가 TIGIT 폴리펩티드에 대한 출발 아미노산 잔기로서 사용할 수 있음이 생각될 수 있고, 또한 가능하다.

[0032] TIGIT 폴리펩티드 "세포의 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 존재하지 않는 TIGIT 폴리펩티드의 형태를 의미한다. 통상적으로, TIGIT 폴리펩티드 ECD는 1% 미만의 상기 막횡단 및/또는 세포질 도메인을 가질 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 상기 도메인을 가질 것이다. 본 발명의 TIGIT 폴리펩티드에 대해 확인된 임의의 막횡단 도메인은 소수성 도메인의 종류를 확인하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인됨이 이해될 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계는 상이할 수 있지만, 본원에서 초기에 확인된 도메인의 어느 한 말단 상의 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크다. 따라서, 임의로 TIGIT 폴리펩티드의 세포의 도메인은 막횡단 도메인/세포의 도메인 경계의 어느 한 측면에 약 5개 이하의 아미노산을 함유할 수 있고, 관련 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 상기 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 핵산이 본 발명에서 고려된다. 하나의 실시태양에서, TIGIT ECD는 서열 1에 제시된 인간 TIGIT 단백질의 아미노산 1-139를 포함한다.

[0033] 본원에 개시된 다양한 TIGIT 폴리펩티드의 "신호 펩티드"의 대략적인 위치는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 서열 1에 제시된 인간 TIGIT 폴리펩티드의 신호 서열은 아미노산 1-15에 걸치는 것으로 예측된다 (예를 들어, 미국 특허 공개 US20040121370 참조). 그러나, 신호 펩티드의 C-말단 경계는 상이할 수 있지만, 본원에서 초기에 확인된 신호 펩티드 C-말단 경계의 어느 한 측면 상의 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크고, 여기서 신호 펩티드의 C-말단 경계는 아미노산 서열 요소의 종류를 확인하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인될 수 있음이 이해될 것이다 (예를 들어, 문헌 [Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997)] 및 [von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)]). 또한, 일부 경우에, 분비된 폴리펩티드로부터 신호 서열의 절단이 완전히 균일하지는 않고, 따라서 2 이상의 분비되는 종류가 생성됨이 이해된다. 신호 펩티드가 본원에서 확인된 신호 펩티드의 C-말단 경계의 어느 한 측면 상의 약 5개 이하의 아미노산 내에서 절단된 상기 성숙 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에서 고려된다.

[0034] "TIGIT 폴리펩티드 변이체"는 본원에 개시된 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결여된 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 TIGIT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 전장 TIGIT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는, 상기 정의되거나 아래에서 정의되는 바와 같은 활성 TIGIT 폴리펩티드를 의미한다. 상기 TIGIT 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 전장 천연 아미노산 서열의 N- 또는 C-말단에서 부가 또는 결실된 TIGIT 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, TIGIT 폴리펩티드 변이체는 본원에 개시된 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결여된 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 TIGIT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 전장 TIGIT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 82%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 83%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 84%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 86%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 87%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 88%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 89%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 91%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 92%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 93%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 94%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 96%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 97%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 98%의 아미노산 서열 동일성 및 별법으로 적어도 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 통상적으로, TIGIT 변이체 폴리펩티드의 길이는 적어도 약 10개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 20개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 30개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 40개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 50개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 60개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 70개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 80개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 90개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 100개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 150개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 200개의 아미노산, 별법으로 적어도 약 300개의 아미노산 또는 이보다 많은 아미노산이다.

[0035] 본원에서 확인된 TIGIT 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 특이적인 TIGIT 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 범위에 포함되는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 값 %는 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성되고, ALIGN-2 프로그램의 완전한 소스 코드 (source code)는 공개적으로 입수가능하다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권국 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디.씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0036] 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 아미노산 서열 A의 제시된 아미노산 서열 B에

대한 아미노산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0037]  $100 \times X/Y$

[0038] 상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 상기 방법을 사용한 아미노산 서열 동일성 % 계산의 예로서, 하기 표 1 및 2는 "비교 단백질"로 지정된 아미노산 서열의 "TIGIT"로 지정된 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 동일성 %를 계산하는 방법을 제시하고, 여기서 "TIGIT"는 목적하는 가설 TIGIT 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내고, "비교 단백질"은 목적하는 "TIGIT" 폴리펩티드가 그에 대해 비교되는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내고, "X", "Y" 및 "Z"는 각각 상이한 가설 아미노산 잔기를 나타낸다.

[0039] <표 1>

[0040] 관심있는 단백질 XXXXXXXXXXXXXXXX (길이 = 15 아미노산)

[0041] 비교 단백질 XXXXXYYYYYYY (길이 = 12 아미노산)

[0042] 아미노산 서열 동일성 % =

[0043] (ALIGN-2에 의해 결정된, 두 폴리펩티드 서열 사이의 동일하게 일치하는 아미노산 잔기의 수)/(관심있는 단백질의 아미노산 잔기의 총수) = 5/15 = 33.3%

[0044] <표 2>

[0045] 관심있는 단백질 XXXXXXXXXX (길이 = 10 아미노산)

[0046] 비교 단백질 XXXXXYYYYZZYZ (길이 = 15 아미노산)

[0047] 아미노산 서열 동일성 % =

[0048] (ALIGN-2에 의해 결정된, 두 폴리펩티드 서열 사이의 동일하게 일치하는 아미노산 잔기의 수)/(관심있는 단백질의 아미노산 잔기의 총수) = 5/10 = 50%

[0049] 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 문단 및 표 1 및 2에서 설명한 바와 같이 얻는다. 그러나, 아미노산 서열 동일성 % 값은 WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 아래에서 설명되는 바와 같이 얻을 수도 있다 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). 대부분의 WU-BLAST-2 검색 파라미터는 디폴트 값으로 제시된다. 디폴트 값으로 설정되지 않은 파라미터, 즉, 조정가능한 파라미터는 다음 값으로 설정된다: 중첩 스펠 (overlap span) = 1, 중첩 분율 = 0.125, 단어 역치 (T) = 11, 및 채점 매트릭스 = BLOSUM62. WU-BLAST-2가 사용될 경우, 아미노산 서열 동일성 % 값은 (a) WU-BLAST-2에 의해 결정된, 천연 TIGIT 폴리펩티드로부터 유도된 서열을 갖는 관심있는 TIGIT 폴리펩티드의 아미노산 서열과 관심있는 비교 아미노산 서열 (즉, TIGIT 변이체 폴리펩티드일 수 있는, 관심있는 TIGIT 폴리펩티드가 그에 대해 비교되는 서열) 사이의 일치하는 동일한 아미노산 잔기의 수를 (b) 관심있는 TIGIT 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수로 나누어 결정된다. 예를 들어, "아미노산 서열 B에 대해 적어도 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 A를 포함하는 폴리펩티드"라는 언급에서, 아미노산 서열 A는 관심있는 비교 아미노산 서열이고, 아미노산 서열 B는 관심있는 TIGIT 폴리펩티드의 아미노산 서열이다.

[0050] 또한, 아미노산 서열 동일성 비율은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2를 사용하여 결정할 수 있다 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). NCBI-BLAST2 서열 비교 프로그램은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>로부터 다운로드하거나 또는 NIH (National Institute of Health, 미국 메릴랜드 주 베테스다)로부터 얻을 수 있다. NCBI-BLAST2는 여러 검색 파라미터를 이용하고, 여기서 모든 검색 파라미터는 예를 들어 다음을 포함하는 디폴트 값으로 설정된다: 비차단 (unmask) = 적용, 가닥 = 전부, 예상된 발생 (expected occurrence) = 10, 최소 저 복잡성 (complexity) 길이 = 15/5, 멀티-패스 (multi-pass) e-값 = 0.01, 멀티-패스에 대한 상수 = 25, 최종 갱형성 정렬을 위한 감소치 (dropoff) = 25 및 채점 매트릭스 = BLOSUM62.



- [0051] NCBI-BLAST2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 제시된 아미노산 서열 B에 대한 제시된 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:
- [0052]  $100 \times X/Y$
- [0053] 상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.
- [0054] "TIGIT 폴리뉴클레오티드" 또는 "TIGIT 뉴클레오티드 서열"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, TIGIT 폴리펩티드를 코딩하는 특이적인 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 또는 DNA와 RNA 둘 모두를 포함할 수 있다. 본원에서 설명되는 TIGIT 폴리뉴클레오티드는 다양한 공급원, 예를 들어 인간 조직 또는 비인간 유기체로부터의 조직으로부터 단리되거나, 재조합 또는 합성 방법으로 제조될 수 있다. "TIGIT 폴리뉴클레오티드"를 나타내는 본원 명세서 내의 모든 개시내용은 각각의 폴리뉴클레오티드를 개별적으로 및 공동으로 지칭하는 것이다. 예를 들어, 그의 제조, 정제, 유도, 투여, 그를 함유하는 조성물, 그를 사용한 질병의 치료 등에 대한 설명은 본 발명의 각각의 폴리뉴클레오티드에 대해 개별적으로 및 집합적으로 관련되는 것이다. 또한, 용어 "TIGIT 폴리뉴클레오티드" 및 "TIGIT 뉴클레오티드 서열"은 본원에 개시된 TIGIT 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포함한다.
- [0055] "천연 서열 TIGIT 폴리뉴클레오티드"는 자연에서 유래하는 대응하는 TIGIT 폴리뉴클레오티드와 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 천연 서열 TIGIT 폴리뉴클레오티드는 자연에서 단리될 수 있거나 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "천연 서열 TIGIT 폴리뉴클레오티드"는 구체적으로 특정 TIGIT 폴리펩티드의 천연 발생 말단 절단된 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 폴리펩티드의 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 선택적으로 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생 대립유전자 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 상이한 실시태양에서, 본원에 개시된 천연 서열 TIGIT 폴리뉴클레오티드는 전장 핵산 서열을 포함하는 성숙 또는 전장 천연 서열 폴리뉴클레오티드이다.
- [0056] "TIGIT 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 "TIGIT 변이체 핵산 서열"은 아래에서 정의되는 바와 같은 활성 TIGIT 폴리펩티드를 코딩하고, 본원에 개시된 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 결여된 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 TIGIT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 전장 TIGIT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 통상적으로, TIGIT 변이체 폴리뉴클레오티드는 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 신호 펩티드가 결여된 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 서열, 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 TIGIT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 전장 TIGIT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편을 코딩하는 핵산 서열과 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 82%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 83%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 84%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 85%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 86%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 87%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 88%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 89%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 90%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 91%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 92%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 93%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 94%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 95%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 96%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 97%의 핵산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 98%의 핵산 서열 동일성 및 별법으로 적어도 약 99%의 핵산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.
- [0057] 통상적으로, TIGIT 변이체 폴리뉴클레오티드의 길이는 적어도 약 30개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 60개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 90개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 120개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 150개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 180개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 210개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 240개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 270개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 300개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 450개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 600개의 뉴클레오티드, 별법으로 적어도 약 900개의 뉴클레오티드, 또는 이보다 많은 뉴클레오티드이다.
- [0058] 본원에서 확인된 TIGIT 코딩 핵산 서열에 대한 "핵산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우

최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭을 도입시킨 후, TIGIT 핵산 서열 내의 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내의 뉴클레오티드의 백분율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 범위에 포함되는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디.씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가 가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0059] 핵산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 핵산 서열 C의 제시된 핵산 서열 D에 대한 핵산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 핵산 서열 D에 대해 특정 핵산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 핵산 서열 C로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0060]  $100 \times W/Z$

[0061] 상기 식에서, W는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 C 및 D의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D의 뉴클레오티드의 총수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않을 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 핵산 서열 동일성 % 계산의 예로서, 하기 표 3 및 4는 "비교 DNA"로 지정된 핵산 서열의 "TIGIT-DNA"로 지정된 핵산 서열에 대한 핵산 서열 동일성 %를 계산하는 방법을 제시하고, 여기서 "TIGIT-DNA"는 목적하는 가설 TIGIT 코딩 핵산 서열을 나타내고, "비교 DNA"는 목적하는 "TIGIT-DNA" 핵산 분자가 그에 대해 비교되는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 나타내고, "N", "L" 및 "V"는 각각 상이한 가설 뉴클레오티드를 나타낸다.

[0062] <표 3>

[0063] 관심있는 DNA NNNNNNNNNNNNNN (길이 = 14 뉴클레오티드)

[0064] 비교 DNA NNNNNLLLLLLLLLL (길이 = 16 뉴클레오티드)

[0065] 핵산 서열 동일성 % =

[0066] (ALIGN-2에 의해 결정된, 두 핵산 서열 사이의 동일하게 일치하는 뉴클레오티드의 수)/(관심있는 DNA의 뉴클레오티드의 총수) = 6/14 = 42.9%

[0067] <표 4>

[0068] 관심있는 DNA NNNNNNNNNNNN (길이 = 12 뉴클레오티드)

[0069] 비교 DNA NNNLLLLV (길이 = 9 뉴클레오티드)

[0070] 핵산 서열 동일성 % =

[0071] (ALIGN-2에 의해 결정된, 두 핵산 서열 사이의 동일하게 일치하는 뉴클레오티드의 수)/(관심있는 DNA의 뉴클레오티드의 총수) = 4/12 = 33.3%

[0072] 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 핵산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 문단 및 표 3 및 4에서 설명한 바와 같이 얻는다. 그러나, 핵산 서열 동일성 % 값은 WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 아래에서 설명되는 바와 같이 얻을 수도 있다 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). 대부분의 WU-BLAST-2 검색 파라미터는 디폴트 값으로 제시된다. 디폴트 값으로 설정되지 않은 파라미터, 즉, 조정가능한 파라미터는 다음 값으로 설정된다: 중첩 스펠 = 1, 중첩 분율 = 0.125, 단어 역치 (T) = 11, 및 채점 매트릭스 = BLOSUM62. WU-BLAST-2가 사용될 경우, 핵산 서열 동일성 % 값은 (a) WU-BLAST-2에 의해 결정된, 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산으로부터 유도된 서열을 갖는 관심있는 TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 핵산 서열과 관심있는 비교 핵산 분자 (즉, 변이체 TIGIT 폴리뉴클레오티드펩티드일 수 있는, 관심있는 TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산 분자가 그에 대해 비교되는 서열) 사이의 일치하는 동일한 뉴클레오티드의 수를 (b) 관심있는 TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 뉴클레오티드의 총수로 나누어 결정된다. 예를 들어, "핵산 서열 B에 대해 적어도 80%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산 서열 A를

포함하는 단리된 핵산 분자"라는 언급에서, 핵산 서열 A는 관심있는 비교 핵산 분자이고, 핵산 서열 B는 관심있는 TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 핵산 서열이다.

[0073] 또한, 핵산 서열 동일성 비율은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2를 사용하여 결정할 수 있다 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). NCBI-BLAST2 서열 비교 프로그램은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 로부터 다운로드하거나 또는 NIH로부터 얻을 수 있다. NCBI-BLAST2는 여러 검색 파라미터를 이용하고, 여기서 모든 검색 파라미터는 예를 들어 다음을 포함하는 디폴트 값으로 설정된다: 비차단 = 적용, 가닥 = 전부, 예상된 발생 = 10, 최소 저 복잡성 길이 = 15/5, 멀티-패스 e-값 = 0.01, 멀티-패스에 대한 상수 = 25, 최종 겹형성 정렬을 위한 감소치 = 25 및 채점 매트릭스 = BLOSUM62.

[0074] 서열 비교를 위해 NCBI-BLAST2가 사용되는 상황에서, 제시된 핵산 서열 C의 제시된 핵산 서열 D에 대한 핵산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 핵산 서열 D에 대해 특정 핵산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 핵산 서열 C로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0075]  $100 \times W/Z$

[0076] 상기 식에서, W는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에 의한 C 및 D의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D의 뉴클레오티드의 총수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않을 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

[0077] 다른 실시태양에서, TIGIT 변이체 폴리뉴클레오티드는 활성 TIGIT 폴리펩티드를 코딩하고, 바람직하게는 엄격한 혼성화 및 세척 조건 하에 본원에 개시된 전장 TIGIT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 핵산 분자이다. TIGIT 변이체 폴리펩티드는 TIGIT 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

[0078] 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 설명하기 위해 사용될 때, "단리된"은 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 일반적으로 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 서열분석기 (spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (2) 쿠마시 블루 (Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티드 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로는, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0079] "단리된" TIGIT 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 천연 공급원에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 환원과 다른 것이다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연 세포에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는, 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는, 폴리펩티드를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.

[0080] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들어, 원핵생물에 적합한 제어 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 (enhancer)를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0081] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 예비 서열 또는 분비 리더용 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현될 경우 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고, 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 위치할 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접함을 의미하고, 분비 리더의 경우 인접하고 리딩 페이스 (reading phase)로 존재한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 상기 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (adaptor) 또는 링커가 통상의 용례에 따라 사용된다.

[0082] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 사용되고, 예를 들어 단일 항-TIGIT 모노클로날 항체 또는 본원에서 설명되

는 임의의 다른 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 (효능제, 길항제 및 중화 항체 포함), 다중 에피토프 특이성을 갖는 항-TIGIT 또는 항체 조성물, 단일쇄 항-TIGIT 또는 다른 항체, 및 항-TIGIT 또는 다른 항체의 단편 (아래 참조)을 구체적으로 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다. 즉, 이 집단을 구성하는 개개의 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다.

[0083] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용접 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 따라 결정된다. 프로브와 혼성화 서열 사이의 요구되는 상동성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성에 대한 추가의 상세한 내용 및 설명에 대해서는 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.

[0084] 본원에서 규정되는 바와 같은 "엄격한 조건" 또는 "고엄격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도, 예를 들어 50°C의 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트의 사용; (2) 혼성화 동안 변성제, 예를 들어 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨 (42°C)의 사용; 또는 (3) 42°C의 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨) 및 50°C의 50% 포름아미드를 사용한 세척, 이어서 55°C의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 구성된 고엄격성 세척과 함께, 42°C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M/시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 (Denhardt) 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용한 철야 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

[0085] "중등 엄격성 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있고, 상기한 것보다 엄격성이 낮은 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 강도 및 %SDS)의 사용을 포함한다. 중등 엄격성 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트, 및 20 mg/ml 변성 진단 처리 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C에서의 철야 인큐베이션, 이어서 약 37-50°C의 1 x SSC를 사용한 필터의 세척을 포함한다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 알 것이다.

[0086] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프 태깅된 (tagged)"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 관심있는 폴리펩티드 (비제한적인 일례로서, TIGIT 폴리펩티드)를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 의미한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 작용할 수 있는 에피토프를 제공하도록 충분한 잔기를 갖지만, 그가 융합되는 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한, 태그 폴리펩티드는 바람직하게는 상기 항체가 다른 에피토프에는 실질적으로 교차 반응하지 않도록 매우 특이적이다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기, 보통 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 약 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

[0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역어드헤신 (immunoadhesin)"은 이중 단백질 ("어드헤신")의 "결합 특이성"을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합한 항체 유사 분자를 나타낸다. 구조적으로, 면역어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의 (즉, "이중"인) 다른 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 일반적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 면역어드헤신 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다.

[0088] 본 발명의 목적을 위해 "활성의" 또는 "활성"은 천연 또는 천연 발생 TIGIT의 생물학적 및/또는 면역학적 활성 (이전 예에서, TIGIT 활성)을 보유하는 폴리펩티드 (비제한적인 일례로서, TIGIT 폴리펩티드)의 형태(들)를 의미하고, "생물학적" 활성은 천연 또는 천연 발생 폴리펩티드가 갖는 항원 에피토프에 대해 작용하는 항체의 생산을 유도하는 능력 이외의 다른, 천연 또는 천연 발생 폴리펩티드에 의해 유발되는 생물학적 기능 (억제성 또는 자극성)을 의미하고, "면역학적" 활성은 천연 또는 천연 발생 폴리펩티드가 갖는 항원 에피토프 (이전 예에서, TIGIT 항원성 에피토프)에 대한 항체의 생산을 유도하는 능력을 의미한다.

- [0089] 용어 "엡타머"는 표적 분자, 예를 들어 폴리펩티드에 결합할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 엡타머는 TIGIT 폴리펩티드, 또는 TIGIT의 발현을 조절하는 신호전달 경로 내의 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 엡타머의 생성 및 치료 용도는 당업계에 잘 확립되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,475,096, 및 노년기 황반변성의 치료를 위한 Macugen® (아이테크 (Eyetech, 미국 뉴욕주))의 치료 효능을 참조한다.
- [0090] 용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화하는 임의의 분자를 포함한다. 유사한 방식으로, 용어 "효능제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 포함한다. 적합한 효능제 또는 길항제 분자는 구체적으로 효능제 또는 길항제 항체 또는 항체 단편, 천연 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 유기 소분자 등을 포함한다. 폴리펩티드의 효능제 또는 길항제를 확인하기 위한 방법은 폴리펩티드를 후보 효능제 또는 길항제 분자와 접촉시키고, 폴리펩티드와 통상적으로 관련되는 하나 이상의 생물학적 활성의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0091] 용어 "TIGIT 길항제" 및 "TIGIT 활성 또는 TIGIT 발현의 길항제"는 상호교환가능하게 사용되고, TIGIT-코딩 핵산의 전사 또는 번역의 감소 또는 TIGIT 폴리펩티드 활성의 억제 또는 차단 또는 둘 모두에 의해 TIGIT의 정상 기능을 저해하는 화합물을 의미한다. TIGIT 길항제의 예는 TIGIT 길항제와 TIGIT의 상호작용이 TIGIT 활성 또는 발현을 감소시키거나 제거되도록 하는, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 간섭 RNA, 촉매 활성의 RNA, RNA-DNA 키메라, TIGIT-특이적 엡타머, 항-TIGIT 항체, 항-TIGIT 항체의 TIGIT-결합 단편, TIGIT-결합 소분자, TIGIT-결합 펩티드, 및 TIGIT에 특이적으로 결합하는 다른 폴리펩티드 (임의로 하나 이상의 추가의 도메인에 융합된 하나 이상의 TIGIT 리간드의 TIGIT-결합 단편을 포함하고, 이로 제한되지 않음)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, TIGIT 길항제는 다른 TIGIT 활성에 영향을 주지 않으면서 하나의 TIGIT 활성을 길항할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 본원의 특정 방법에 사용하기 위한 바람직한 TIGIT 길항제는 예를 들어 임의의 다른 TIGIT 상호작용에 영향을 주지 않거나 최소로 끼치면서 PVR 상호작용, PVRL3 상호작용, 또는 PVRL2 상호작용 중의 하나에 반응하여 TIGIT 활성을 길항하는 TIGIT 길항제이다.
- [0092] 용어 "PVR 길항제" 및 "PVR 활성 또는 PVR 발현의 길항제"는 상호교환가능하게 사용되고, PVR-코딩 핵산의 전사 또는 번역의 감소 또는 PVR 폴리펩티드 활성의 억제 또는 차단 또는 둘 모두에 의해 PVR의 정상 기능을 저해하는 화합물을 의미한다. PVR 길항제의 예는 PVR 길항제와 PVR의 상호작용이 PVR 활성 또는 발현을 감소시키거나 제거되도록 하는, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 간섭 RNA, 촉매 활성의 RNA, RNA-DNA 키메라, PVR-특이적 엡타머, 항-PVR 항체, 항-PVR 항체의 PVR-결합 단편, PVR-결합 소분자, PVR-결합 펩티드, 및 PVR에 특이적으로 결합하는 다른 폴리펩티드 (임의로 하나 이상의 추가의 도메인에 융합된 하나 이상의 PVR 리간드의 PVR-결합 단편을 포함하고, 이로 제한되지 않음)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, PVR 길항제는 다른 PVR 활성에 영향을 주지 않으면서 하나의 PVR 활성을 길항할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 본원의 특정 방법에 사용하기 위한 바람직한 PVR 길항제는 PVR-CD96 및/또는 PVR-CD226 상호작용에 충격을 주지 않으면서 TIGIT 상호작용에 반응하여 PVR 활성을 길항하는 PVR 길항제이다.
- [0093] 용어 "TIGIT 효능제" 및 "TIGIT 활성 또는 TIGIT 발현의 효능제"는 상호교환가능하게 사용되고, TIGIT-코딩 핵산의 전사 또는 번역의 증가 및/또는 TIGIT 폴리펩티드 발현 및/또는 활성을 억제하는 분자의 억제 또는 차단 및/또는 정상 TIGIT 활성의 향상 (TIGIT의 안정성 향상 또는 TIGIT의 하나 이상의 표적 리간드에 대한 결합의 향상을 포함하고, 이로 제한되지 않음)에 의해 TIGIT의 정상 기능을 향상시키거나 자극하는 화합물을 의미한다. TIGIT 효능제는 항체, 항원 결합 단편, 엡타머, 간섭 RNA, 소분자, 펩티드, 안티센스 분자, 및 다른 결합 폴리펩티드로부터 선택될 수 있다. 다른 예에서, TIGIT 효능제는 TIGIT-억제성 분자의 전사 및/또는 번역을 저해하는 엡타머, 간섭 RNA, 또는 안티센스 분자로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 일부 경우에, TIGIT 효능제는 다른 TIGIT 활성에 영향을 주지 않으면서 하나의 TIGIT 활성을 효능화할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 본원의 특정 방법에 사용하기 위한 바람직한 TIGIT 효능제는 예를 들어 임의의 다른 TIGIT 상호작용에 영향을 주지 않거나 최소로 끼치면서 PVR 상호작용, PVRL3 상호작용, 또는 PVRL2 상호작용 중의 하나에 반응하여 TIGIT 활성을 효능화하는 TIGIT 효능제이다.
- [0094] 용어 "PVR 효능제" 및 "PVR 활성 또는 PVR 발현의 효능제"는 상호교환가능하게 사용되고, PVR-코딩 핵산의 전사 또는 번역의 증가 및/또는 PVR 발현 또는 PVR 활성을 억제하는 분자의 억제 또는 차단 및/또는 정상 PVR 활성의 향상 (PVR의 안정성 향상 또는 PVR의 하나 이상의 표적 리간드에 대한 결합의 향상을 포함하고, 이로 제한되지 않음)에 의해 PVR의 정상 기능을 향상시키거나 자극하는 화합물을 의미한다. 예를 들어, PVR 효능제는 항체, 항원 결합 단편, 엡타머, 간섭 RNA, 소분자, 펩티드, 안티센스 분자, 및 다른 결합 폴리펩티드로부터 선택될 수 있다. 다른 예에서, PVR 효능제는 PVR-억제성 분자의 전사 및/또는 번역을 저해하는 엡타머, 간섭 RNA, 또는

안티센스 분자로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 일부 경우에, PVR 효능제는 다른 PVR 활성에 영향을 주지 않으면서 하나의 PVR 활성을 효능화할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 본원의 특정 방법에 사용하기 위한 바람직한 PVR 효능제는 예를 들어 PVR-CD96 또는 PVR-CD226 결합 상호작용에 영향을 주지 않거나 최소로 끼치면서 TIGIT 상호작용에 반응하여 PVR 활성을 효능화하거나 PVR과의 상호작용시에 TIGIT를 흥내내는 PVR 효능제이다.

- [0095] "치료"는 표적 병리 상태 또는 질환을 억제하거나 그의 진행 속도를 느리게 하는 (완화하는) 것을 목적으로 하는 치료 목적의 처치 및 예방 또는 억제 처치를 모두 의미한다. 치료가 필요한 대상은 질환이 이미 발생한 대상 및 질환이 발생하기 쉬운 대상 또는 질환이 억제되어야 하는 대상을 포함한다.
- [0096] "만성" 투여는 급성 방식과 달리 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)를 유지하기 위해 연속적인 방식으로 물질(들)을 투여하는 것을 의미한다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 행해지지는 않지만, 특성상 주기적인 치료이다.
- [0097] 치료를 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0098] 하나 이상의 추가의 치료제와 "조합한" 투여는 동시 (병용) 및 임의의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다.
- [0099] 본원에서 사용될 때, "담체"는 사용되는 용량 및 농도에서 그에 대해 노출되는 세포 또는 포유동물에게 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 pH 완충된 수용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개의 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLURONICS™를 포함한다.
- [0100] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 구역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 ([Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0101] 항체를 파파인으로 소화시키면, "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영한다)이 생성된다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 생성된다.
- [0102] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 구역은 강한 비공유 회합 상태의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인 도메인의 이량체로 이루어진다. 상기 입체형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 CDR은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합할 능력을 갖는다.
- [0103] Fab 단편도 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab 단편은 항체 힌지 구역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 대한 몇 개의 잔기의 부가에 의해 Fab' 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 포함하는 Fab'의 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 그들 사이의 힌지 시스테인을 갖는 한 쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 당업계에 공지되어 있다.
- [0104] 임의의 척추동물 종의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 및 람다로 불리는 2개의 분명하게 상이한 종류 중의 하나로 분류될 수 있다.
- [0105] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다.

[0106] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는, 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 관해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0107] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하고, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) 내의 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 페어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성시키게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 상세하게 기재되어 있다.

[0108] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 저해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질 또는 비단백질 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 포함하고 이로 제한되지 않는 염료 또는 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 제조할 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로는 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0109] 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인" 항체는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 항체이다.

[0110] 용어 "초가변 구역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/이거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 구역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; 즉 VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3이 6개의 HVR의 대부분의 다양성을 보이고, 특히 H3이 항체에 우수한 특이성을 부여할 때 특유한 역할을 수행하는 것으로 생각된다 (예를 들어, 문헌 [Xu et al. Immunity 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)] 참조). 실제로, 중쇄만으로 구성된 천연 발생 카멜리드 (camelid) 항체가 경쇄의 부재 하에 기능을 보이고, 안정하다 (예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)] 및 [Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)] 참조).

[0111] 많은 HVR 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 (Kabat) 상보성 결정 구역 (CDR)은 서열 변동성에 기초하고, 가장 흔히 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 코티아 (Chothia)는 그 대신 구조 루프의 위치를 나타낸다 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 상기 HVR의 잔기를 아래에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0112] HVR은 다음과 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102

(H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

- [0114] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 HVR 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.
- [0115] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서 항체 편집 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 전형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 그 내부의 삽입에 대응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 번호는 항체 서열의 상동성 구역을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.
- [0116] 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 색인 (index)"은 일반적으로 번역글로불린 중쇄 불변 구역 내의 잔기를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 보고된 EU 색인 참조). "카바트에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않으면, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 특허 가출원 60/640,323, EU 넘버링에 대한 도면 참조).
- [0117] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 하나의 실시태양에서, 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노물 또는 심지어 피코물의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 특정 과정을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 설명하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.
- [0118] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제할 수 있다. 본원에서 사용되는 "효능제 항체"는 목적하는 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능적 활성을 부분적으로 또는 완전히 모방하는 항체이다.
- [0119] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성시키기 위해 항체에 직접 또는 간접적으로 접합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체로 검출가능하거나 (예를 들어 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매할 수 있다.
- [0120] "고상"은 본 발명의 항체가 점착될 수 있는 비-수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고상의 예는 부분적으로 또는 전적으로 유리 (예를 들어, 제어된 공극 유리), 다당류 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 형성된 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 문맥에 따라, 고상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있고; 다른 부분에서는 정제 컬럼 (예를 들어, 친화도 크로마토그래피 컬럼)일 수 있다. 또한, 이 용어는 미국 특허 4,275,149에 기재된 것과 같은, 별개 입자의 비연속적 고상을 포함한다.
- [0121] "리포솜"은 약물 (예를 들어, 본원에서 설명되는 폴리펩티드 또는 그에 대한 항체)을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포솜의 성분은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 구조로 배열된다.
- [0122] "소분자"는 본원에서 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 규정된다.
- [0123] 용어 "면역 관련 질병"은 포유동물의 면역계의 성분이 포유동물에서의 이환을 유발하거나 매개하거나 다른 방식



으로 작용하는 질병을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 개입이 질병의 진행에 대한 개선 효과를 갖는 질병이 포함된다. 상기 용어에는 면역 매개 염증성 질병, 비-면역 매개 염증성 질병, 감염성 질병, 면역결핍 질병, 신 생물 등이 포함된다.

[0124] 용어 "T 세포 매개 질병"은 T 세포가 직접 또는 간접적으로 포유동물에서의 이환을 매개하거나 다른 방식으로 작용하는 면역 관련 질병을 의미한다. T 세포 매개 질병은 세포 매개 효과, 림포킨 매개 효과 등, 및 심지어 B 세포가 예를 들어 T 세포에 의해 분비되는 림포킨에 의해 자극될 경우에는 B 세포와 연관된 효과와 관련될 수 있다.

[0125] 그 일부가 면역 또는 T 세포 매개성인, 본 발명에 따라 치료될 수 있는 면역 관련 및 염증성 질병의 예는 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 연소성 만성 관절염, 척추관절병증, 전신 경화증 (피부경화증), 특발성 염증성 근육병증 (피부 근육염, 다발성 근염), 쇼그렌 증후군, 전신 혈관염, 사르코이드증 (sarcoidosis), 자가면역 용혈 빈혈 (면역 범혈구감소증, 발작성 야간혈색소뇨증), 자가면역 저혈소판증 (특발성 혈소판 감소 자색반, 면역-매개 저혈소판증), 갑상선염 (그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 연소성 림프구성 갑상선염, 위축 갑상선염), 당뇨병, 면역 매개 신장병 (사구체신염, 세뇨관 간질성 신장염)), 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환, 예를 들어 다발성 경화증, 특발성 탈수초성 다발신경병증 또는 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증; 간담즙성 질환, 예를 들어 감염성 간염 (A, B, C, D, E형 간염 및 다른 비간진화성 바이러스), 자가면역 만성 활성 간염, 원발성 담관 간경화증, 육아종성 간염, 및 경화성 담관염, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어 궤양성 대장염; 크론병); 글루텐 민감 장병증, 및 휘플 (Whipple) 병, 자가면역 또는 면역 매개 피부병, 예를 들어 수포성 피부 질환, 다형홍반 및 접촉성 피부염, 건선; 알레르기 질환, 예를 들어 천식, 알레르기 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증 및 두드러기, 폐의 면역학적 질병, 예를 들어 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증 및 과민증 폐렴; 이식 관련 질환, 예를 들어 이식 거부 및 이식편 대 숙주 질환을 포함한다. 바이러스 질병, 예를 들어 AIDS (HIV 감염), A, B, C, D 및 E형 간염, 헤르페스 등, 세균 감염, 진균 감염, 원충 감염 및 기생충 감염을 포함하는 감염성 질병은 또한 면역 및/또는 염증성 성분 및/또는 병인을 가질 수 있다.

[0126] 몇몇 피부 질병은 이상 면역 반응 및 자가면역성과 밀접하게 관련된다. 건선과 같은 질병은 피부 물집, 피부 벗겨짐, 부종 및 피부 단백질에 결합하는 자가항체의 존재를 특징으로 한다. 본원에서, 실험은 TIGIT 발현이 정상 피부에 비해 건선성 피부에서 상향조절됨을 결정한다. TIGIT 발현 및/또는 활성의 조절은 건선의 증상 또는 근원적인 원인의 치료에 유용할 수 있다.

[0127] 용어 염증성 장 질환 ("IBD")은 장 (창자)에 염증이 발생되어, 종종 재발성 경련 또는 설사를 일으키는, 원인이 알려지지 않은 일군의 만성 염증성 질환을 설명한다. 미국에서 IBD의 유병률은 100,000명의 인구집단당 약 200 명으로 추정된다. IBD 환자는 2개의 주요 군, 즉, 궤양성 대장염 ("UC")이 있는 군과 크론병 ("CD")이 있는 군으로 나누어질 수 있다.

[0128] UC의 환자에서, 주로 결장 점막을 포함하는 부위에 염증 반응이 존재한다. 염증은 일반적으로 균일하고, 정상 점막이 개재하는 영역이 존재하지 않는 상태로 연속적이다. 표면 점막 세포 및 음와 상피 및 점막하층은 호중구 침윤이 존재하는 염증 반응에 관련된다. 궁극적으로, 상기 상황은 일반적으로 상피 손상 및 상피세포의 손실로 진행되고, 다발성 궤양 형성, 섬유증, 형성이상 및 결장의 종방향 수축을 야기한다. CD는 염증이 장벽의 모든 층을 통해 퍼지고 장간막뿐만 아니라 림프절에 영향을 미치는 점에서 UC와 상이하다. CD는 입에서 항문에 이르기까지 소화관의 임의의 부분에 영향을 줄 수 있다. 이 질병은 종종 불연속적이다. 즉, 장의 심하게 이환된 세그먼트는 명백하게 질병이 없는 영역과 분리된다. CD에서, 장벽도 비후해지고, 이는 폐색을 일으킬 수 있다. 또한, 누관 (fistula) 및 열구가 드물지 않게 발생한다.

[0129] 임상적으로, IBD는 종종 만성적 예측불가능한 경과를 야기하는 다양한 징후라는 특징이 있다. 혈액이 섞인 설사 및 복통은 종종 발열 및 체중 감소를 수반한다. 심한 피로처럼 빈혈은 드물지 않다. 관절통에서 급성 관절염에 이르는 관절 징후 및 간 기능 이상이 통상 IBD와 연관된다. IBD의 환자는 또한 일반적인 집단에 비해 결장 암종의 위험이 증가한다. IBD의 급성 "발병" 동안, 작업 및 다른 정상 활동이 대체로 불가능하고, 종종 환자는 입원하게 된다.

[0130] IBD의 원인은 알려지지 않은 채로 남아있지만, 유전적, 감염 및 면역학적 감수성과 같은 몇몇 인자가 관여된다. IBD는 백인, 특히 유대계 백인에서 훨씬 더 일반적이다. 병태의 만성 염증성 성질로 인해 가능한 감염 원인에 대한 집중적인 탐색이 실시되었다. 급성 염증을 자극하는 물질이 밝혀졌지만, IBD와 연관된 만성 염증을 일으키는 물질은 밝혀지지 않았다. IBD가 자가면역 질병이라는 가설은 관절 관절염과 같은 이전에 언급된 IBD의 장

의 징후, 및 면역 반응을 억제하는 것으로 알려진 부신 글루코코르티코이드, 시클로스포린 및 아자티오프린과 같은 치료제를 사용한 치료에 의한 IBD에 대한 공지의 양성 반응에 의해 지지된다. 또한, GI관은 인체의 임의의 다른 장기보다, 잠재적인 항원성 물질, 예를 들어 식품으로부터의 단백질, 세균 부산물 (LPS) 등에 지속적으로 노출된다.

[0131] 또한, 결장암 위험은 중증 궤양성 대장염 환자에서, 특히 질병이 수년 동안 지속된 경우에 크게 상승한다. 약 20-25%의 IBD 환자는 궁극적으로 대량 출혈, 만성 쇠약 질병, 결장 천공 또는 암의 위험 때문에 결장의 제거를 위한 수술을 필요로 한다. 또한, 수술은 때때로 다른 형태의 의료적 치치가 실패하거나 스테로이드 또는 다른 약물의 부작용이 환자의 건강을 위협하는 경우에 수행된다. 수술은 침습적이고 삶을 크게 바꾸기 때문에, 그렇게 바람직한 치료법이 아니고, 일반적으로 최후 수단으로 사용되는 치료법이다. 상기 질병을 보다 잘 이해하고, 가능하게는 이를 치료하기 위해서, 실험을 통해 TIGIT가 정상 조직에 비해 CD 및 UC 모두에서 상향조절됨이 결정되었다. TIGIT의 발현 및/또는 활성의 상향조절은 하나 이상의 형태의 IBD 치료에 유용한 것을 입증될 수 있다.

[0132] 류마티스 관절염 (RA)은 관절 연골의 손상과 함께 여러 관절의 활막이 주로 관련된 만성 전신성 자가면역 염증성 질환이다. 발병기전은 T 림프구 의존적이고, 류마티스 인자, 자가 IgG에 대한 자가항체의 생성과 관련되어 있으며, 결과적으로 면역 복합체가 형성되어 관절액 및 혈액에 높은 수준으로 존재하게 된다. 관절 내에서 이러한 복합체는 림프구 및 단핵구가 활막으로 현저하게 침윤되도록 한 후에 활막에서 상당한 변화가 일어나도록 유도할 수 있다: 다수의 호중구가 추가되면서 유사한 세포들이 침윤하면 관절 공간/유액이 변화한다. 영향을 받는 조직은 주로 관절이며, 흔히 대칭적인 패턴으로 나타난다. 그러나, 관절외 질환도 2 가지 주요 형태로 발생한다. 한 형태는 진행성 관절 질환이 진행중인 관절외 병변 및 폐섬유증, 혈관염 및 피부 궤양의 전형적 병변의 발생이다. 제2 형태의 관절외 질환은 이후에 때때로 RA 질환 과정의 후기, 때로는 관절 질환이 사라진 후에 발생하는 소위 펠티 (Felty) 증후군이며, 호중구 감소증, 혈소판 감소증 및 비장비대의 존재를 포함한다. 이는 여러 기관에서 혈관염을 수반할 수 있으며, 경색증, 피부 궤양 및 괴저의 형성을 동반한다. 또한, 환자들에서는 흔히 영향을 받은 관절 바로 위쪽의 피하 조직에서 류마티스성 결절이 일어나고, 결절 후기 단계에서는 혼합 염증 세포 침윤물로 둘러싸인 괴사 중심을 갖게 된다. RA에서 발생할 수 있는 다른 증상은 다음을 포함한다: 심막염, 흉막염, 관상 동맥염, 폐섬유증을 동반한 간질성 폐렴, 건성 각결막염 및 류마티스성 결절.

[0133] 연소성 만성 관절염은 흔히 16세 미만에 시작하는 만성 특발성 염증성 질환이다. 이 표현형은 RA와 몇 가지 유사성이 있다. 류마티스성 인자가 양성인 몇몇 환자들은 연소성 류마티스성 관절염으로서 분류된다. 이 질환은 소수관절성, 다관절성 및 전신성의 3 가지 주요 카테고리로 더욱 분류된다. 관절염은 중증일 수 있고 보통 파괴적이며, 관절 강직 및 성장 지연을 초래한다. 다른 증상으로는 만성 전포도막염 및 전신성 아밀로이드증 (amyloidosis)을 포함할 수 있다.

[0134] 용어 "유효량"은 언급된 특정 목적을 달성하는 폴리펩티드 및/또는 효능제/길항제의 농도 또는 양이다. 폴리펩티드 또는 그의 효능제 또는 길항제의 "유효량"은 경험적으로 결정될 수 있다. 또한, "치료 유효량"은 언급된 치료 효과를 달성하기 위해 효과적인 폴리펩티드 및/또는 효능제/길항제이다. 이 양도 경험적으로 결정될 수 있다.

[0135] 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 제한하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  및  $Re^{186}$ ), 화학치료제, 독소, 예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편을 포함한다.

[0136] "화학치료제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료제의 예는 아드리아마이신, 독소루비신, 에피루비신, 5-플루오로우라실, 시토신 아라비노시드 ("Ara-C"), 시클로포스파미드, 티오테과, 부술판, 시톡신, 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁셀, 브리스톨-마이어스 스쿼브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스턴)), 및 독세탁셀 (탁소테레, 롱-쁘랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)), 톡소테레, 메토트렉세이트, 시스플라틴, 멜팔란, 빈블라스틴, 블레오마이신, 에토포시드, 이포스파미드, 미토마이신 C, 미톡산트론, 빈크리스틴, 비노렐빈, 카르보플라틴, 테니포시드, 다우노마이신, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신, 에스페라미신 (미국 특허 4,675,187 참조), 멜팔란 및 다른 관련 질소 머스타드를 포함한다. 또한, 상기 정의에는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 호르몬제, 예를 들어 타목시펜 및 오나프리스톤이 포함된다.

[0137] 본원에서 사용될 때, "성장 억제제"는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 세포, 특히 본원에서 확인된 임의의 유전자를 과다발현하는 암세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에

서 상기 유전자를 과다발현하는 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔 및 토포 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로까지 이어질 수 있다. 추가의 정보는 예를 들어 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p.13]에서 볼 수 있다.

[0138] 용어 "시토킨"은 세포간 매개자로서 다른 세포에 대해 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 관용어이다. 상기 시토킨의 특정 예는 림포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토킨에는 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 전구인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체 형성 호르몬 (LH); 간 성장인자; 섬유모세포 성장인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- $\alpha$  및  $-\beta$ ; 물리관 억제 물질; 마우스 고나도트로핀-회합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관내피 성장인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장인자, 예를 들어 NGF- $\beta$ ; 혈소판-성장인자; 전환 성장인자 (TGF), 예를 들어 TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ ; 인슐린 유사 성장인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- $\alpha$ ,  $-\beta$  및  $-\gamma$ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- $\alpha$  또는 TNF- $\beta$ ; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 시토킨은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양액으로부터의 단백질 및 천연 서열 시토킨의 생물학적 활성 균등물을 포함한다.

[0139] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역어드헤신"은 이중 단백질 ("어드헤신")의 "결합 특이성"을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합한 항체 유사 분자를 나타낸다. 구조적으로, 면역어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의 (즉, "이중"인) 다른 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 일반적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 면역어드헤신 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다.

[0140] 본원에서 사용될 때, 용어 "염증 세포"는 염증 반응을 향상시키는 세포, 예를 들어 단핵 세포, 호산구, 대식세포, 및 다형핵 호중구 (PMN)를 나타낸다.

[0141] **II. 본 발명의 조성물 및 방법**

[0142] TIGIT는 면역 기능의 추정 조절제로서 이전에 확인되었다 (예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 US20040121370 참조). 본원에서, 본 발명자들은 TIGIT가 폴리오바이러스 수용체 (NECL5 또는 CD155로도 알려진 PVR), PVR-유사 단백질 1-4 (PVRL1-4), CD96, 및 CD226을 포함하는 "TIGIT-유사 단백질" (TLP) 패밀리로 불리는 면역 관련 단백질의 새로 설명되는 패밀리의 멤버임을 입증한다. 본 발명자들은 그의 멤버가 면역 조절 및 기능에서 일정 역할을 하는 상기 새로운 TLP 패밀리의 보존된 구조적 요소를 제공하고, 추가의 패밀리 멤버를 확인하는 방법을 제공한다. PVRL1-4 및 PVR은 공통의 도메인 구조 (IgV-IgC-IgV)를 공유하는 반면에, CD226 및 CD96에는 막 인접 IgV 도메인이 결여된다. 상기 8개의 단백질의 세포내 세그먼트는 PVRL 1-3 사이에서 공유되는 아파딘 결합 모티프 외부에서 서로 제한된 유사성만을 보이고; PVRL4는 상기 서열이 결여되지만, 아파딘에 계속 결합하는 것으로 알려져 있다. NECL-1의 관련 IgV 도메인의 결정 구조 (Dong et al., J. Biol. Chem. 281: 10610-17 (2006))를 기초로 할 때, 제1 및 제3 모티프는 각각 B와 C 및 F와 G 베타-가닥 사이의 헤어핀 루프 내에 위치하는 것으로 예측된다. 상기 2개의 루프는 IgV 폴드 (fold)의 한 말단부에서 서로 인접한다. 제2 모티프는 NECL-1에 대한 동종이량체 계면의 일부 형성에 관여되는 C' 및 C" 베타-가닥을 포함한다. 따라서, 이들 서열 모티프는 PVR 패밀리 멤버들 사이에서 관찰된 특이적인 동형 및 이형 상호작용에서 일정 역할을 할 수 있다.

[0143] TLP 패밀리 멤버는 많은 절대적으로 보존된 아미노산, 예를 들어 알라닌<sup>67</sup>, 글라이신<sup>74</sup>, 프롤린<sup>114</sup>, 및 글라이신<sup>116</sup>

을 포함한다. 추가로, TLP 패밀리 멤버는 실질적으로 보존된 (예를 들어, 대부분의 패밀리 멤버에서 발견되지만, 모든 패밀리 멤버에서 발견되는 것은 아닌) 여러 아미노산, 예를 들어 위치 54에서 발린, 이소류신 및 류신 중에서 선택되는 아미노산, 위치 55에서 세린 및 트레오닌 중에서 선택되는 아미노산, 위치 56에서 글루타민, 위치 112에서 트레오닌, 및 위치 113에서 페닐알라닌 및 타이로신 중에서 선택되는 아미노산을 포함한다. 또한, TLP 패밀리의 멤버는 다음과 같은 3개의 구조적 하위모티프를 포함한다: 발린/이소류신<sup>54</sup>-세린/트레오닌<sup>55</sup>-글루타민<sup>56</sup>; 알라닌<sup>67</sup>-X<sup>68-73</sup>-글라이신<sup>74</sup> (여기서, X는 임의의 아미노산임); 트레오닌<sup>112</sup>-페닐알라닌/타이로신<sup>113</sup>-프롤린<sup>114</sup>-X<sup>115</sup>-글라이신<sup>116</sup> (여기서, X는 임의의 아미노산임). 당업자는 상기 사용된 넘버링이 인간 TIGIT 단백질 서열에 대한 것이고, TLP 단백질 패밀리의 상이한 멤버 내의 상기 보존된 잔기 및 모티프의 상대적인 위치가 인간 TIGIT 서열 내의 아미노산의 위치와 동일하지만, 다른 TLP 패밀리 멤버 내의 상기 잔기의 절대적인 넘버링이 상이할 수 있음을 이해할 것이다.

[0144] 면역 조절 및 기능에서 확인된 TLP 패밀리 멤버의 관련을 감안할 때, 상기 단백질 패밀리의 다른 멤버도 면역 조절 및 기능에 관련될 가능성이 있다. 따라서, 본 발명은 단백질의 서열을 하나 이상의 상기 확인된 패밀리 멤버의 서열에 정렬시키고 상기 확인된 절대적으로 보존된 잔기, 상기 확인된 실질적으로 보존된 잔기, 및/또는 상기 확인된 구조적 하위모티프의 제시된 단백질 서열의 존재 또는 부재를 평가함으로써 제시된 단백질이 TLP 패밀리의 멤버인지를 결정하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 그의 아미노산 서열이 상기 확인된 절대적으로 보존된 잔기, 상기 확인된 실질적으로 보존된 잔기, 및/또는 상기 확인된 구조적 하위모티프를 포함하는 단백질에 대해 하나 이상의 서열 데이터베이스를 검색함으로써 TLP 단백질 패밀리의 다른 멤버를 확인하는 방법을 제공한다.

[0145] 본원에서 본 발명자들에 의한 TLP 패밀리의 확인은 TLP 패밀리 멤버의 공통적인 구조적 특징에 의해 TLP 패밀리의 2 이상의 멤버가 유사하게 조절될 수 있다는 가능성을 제시한다. 예를 들어, 각각의 TLP 패밀리 멤버 내의 보존된 및 실질적으로 보존된 아미노산 잔기 및 하위모티프는 각각의 단백질의 하나 이상의 도메인 내의 패밀리 멤버의 유사한 3차원 구조를 유발하고, 이어서 유사한 3차원 구조는 하나 초과 TLP 패밀리 멤버, 또는 심지어 모든 TLP 패밀리 멤버를 동시에 조절하도록 표적화될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 TLP 패밀리 멤버의 상기 보존된 또는 실질적으로 보존된 구역과 특이적으로 상호작용하는 물질 ("TLP-상호효능제")을 제공한다. 상기 물질은 후보 단백질이 TLP-상호효능제와 상호작용하는지를 평가함으로써 TLP 패밀리의 하나 이상의 추가의 멤버를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 후보 단백질과 TLP-상호효능제의 상호작용은 단백질이 또한 TLP 패밀리 멤버일 수 있음을 나타낼 수 있다. TLP-상호효능제는 TLP 활성을 조절할 수 있다. 예를 들어, TLP-상호효능제는 소분자 억제제, 억제 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앵타머, 및 억제성 펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는, TLP 활성의 길항제일 수 있다. 다른 예에서, TLP-상호효능제는 TLP 단백질 활성을 촉진하기 위해 TLP 단백질 구조를 안정화시키는, 효능 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 효능 펩티드, 및 소분자를 포함하고 이로 제한되지 않는 TLP 활성의 효능제일 수 있다. TLP-상호효능제는 다양한 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 본원에 설명되는 스크리닝 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0146] 본 발명자들은 mRNA 및 FACS 분석에 의해 TIGIT가 편도 조직으로부터 단리된 다양한 활성화된 T 세포, 특히 조절 T 세포 (T<sub>reg</sub>), 기억 T 세포, NK 세포, 및 여포상 B 세포 헬퍼 T 세포 (T<sub>fh</sub>) 상에서 우세하게 발현됨을 밝혀내었다. 따라서, 본 발명은 세포의 TIGIT 발현 여부를 기초로 하여 선택된 세포가 T<sub>reg</sub>, 기억 T 세포, NK 세포, 또는 T<sub>fh</sub> 세포인지를 확인하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 당업계에 공지된 및/또는 본원에서 설명되는 임의의 정제 방법을 사용하여 (하나의 비제한적인 예로서, 유동 세포측정에 의해), TIGIT를 발현하지 않는 다른 종류의 면역 세포로부터 T<sub>reg</sub>, 기억 T 세포, NK 세포, 및 T<sub>fh</sub> 세포를 정제하기 위해 TIGIT를 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명자들은 이들 세포 집단에서 TIGIT의 최고 발현이 활성화된 T<sub>reg</sub>에서 발생함을 입증하였다. 따라서, 본 발명은 제시된 세포가 또한 하나 이상의 대조군 샘플에서의 TIGIT 발현 수준에 비교한 그의 TIGIT의 발현 수준을 기초로 하여 활성화된 T<sub>reg</sub>인지를 확인하는 방법을 제공한다 (대조군 샘플은 예시적인 T 세포 하위세트 집단으로부터의 소정의 값일 수 있거나, 또는 대조군 샘플은 공지의 T 세포 하위집단, 예를 들어 활성화된 T<sub>reg</sub>, 비활성화된 T<sub>reg</sub>, 나이브 T 세포, 기억 T 세포, NK 세포, T<sub>fh</sub> 세포, 또는 다른 T 세포 집단으로부터의 다른 샘플일 수 있다). 또한, 하나 이상의 활성화된 또는 비활성화된 대조군 T<sub>reg</sub> 샘플에서의 TIGIT 발현 수준에 비해 또는 공지의 활성화된 또는 비활성화된 T<sub>reg</sub> 세포 집단에서의 소정의 TIGIT 발현값에 비해 그의 TIGIT의 발현 수준을 결정함으로써 제시된 T<sub>reg</sub> 세포가 활성화된 것인지를 결정하는 방법이 제공된다.

추가로, 세포에서 발현되는 TIGIT의 양이 다른 세포로부터 세포를 분리하기 위해 사용될 수 있는, 당업계에 공지된 및/또는 본원에서 설명되는 임의의 정제 방법을 사용하여 (하나의 비제한적인 예로서, 유동 세포측정에 의해) 다른 T 세포로부터 활성화된 T<sub>reg</sub>를 별개로 단리하는 방법을 제공한다.

[0147] 본 발명자들은 본원에서 TIGIT가 PVR에 강력하게 결합하고, PVRL3 (넥틴-3 또는 CD113으로도 알려짐) 및 PVRL2 (넥틴-2 또는 CD112로도 알려짐)에는 보다 낮은 Kd로 결합함을 입증하였다. 본 발명자들에 의해 예시되는 바와 같이, PVR에 대한 TIGIT 결합은 PVR의 2개의 다른 리간드, 즉 CD226 및 CD96에 대한 상호작용을 차단하고, CD226은, TIGIT가 PVR-CD226 상호작용을 억제하는 효과보다 더 작은 정도로 TIGIT-PVR 상호작용을 억제한다. 본 발명자들은 세포 표면-발현된 PVR에 대한 TIGIT 또는 TIGIT 융합 단백질의 결합을 억제하는 항-TIGIT 항체 (예를 들어, 본원에서 설명되는 항-TIGIT 항체 10A7)를 생산하였다. 본 발명자들은 또한 TIGIT에 대해 10A7과는 상이한 에피토프를 갖는 다른 항체, 예를 들어 본원에서 설명되는 항체 1F4를 생산하였다. 주목할 만한 사실은, CD226이 TIGIT를 고도로 발현하는 두 세포 종류, 즉 T<sub>reg</sub> 또는 T<sub>fh</sub>에서 유의하게 발현되지 않는다는 것이다.

[0148] 상기 발견에 의해 지지되는 바와 같이, 본 발명은 TIGIT-PVR 상호작용, TIGIT-PVRL2 상호작용, 및 TIGIT-PVRL3 상호작용의 효능제 및 길항제, 및 상기 효능제 및 길항제를 사용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT-PVR 결합, TIGIT-PVRL2 결합 및 TIGIT-PVRL3 결합을 조절하는 방법을 제공한다. 또한, TIGIT (PVR 결합을 위한 경쟁자) 또는 항-TIGIT 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 투여함으로써 CD226-PVR 상호작용 및/또는 CD96-PVR 상호작용을 조절하는 방법을 제공한다. 본 발명은 효능성 및 길항성의 항-TIGIT 항체 및 그의 단편, 특히 항-TIGIT 항체 10A7 및 1F4 및 항-TIGIT 항체 10A7 및/또는 1F4의 CDR을 포함하는 교대 (alternate) 유형의 항체를 추가로 포함한다.

[0149] 본원에서 설명되는 연구는 TIGIT와 DC 상의 PVR의 상호작용을 입증하고, 상기 결합 상호작용이 DC 기능, 특히 시토킨 생산을 조절함을 보여준다. PVR은 수지상 세포 (DC), 및 FDC, 섬유모세포, 내피 세포, 및 일부 종양 세포 상에서 고도로 발현되는 것으로 알려진 세포 표면 수용체이다 ([Sakisaka, T. & Takai, Y., *Curr Opin Cell Biol* 16, 513-21 (2004)]; [Fuchs, A. & Colonna, M., *Semin Cancer Biol* 16, 359-66 (2006)]). TIGIT-결합된 인간 DC는 높은 수준의 IL-10 및 보다 적은 전-염증성의 다른 시토킨 (예를 들어 IL-12p40, IL-12p70, IL-6, IL-18, 및 IFN $\gamma$ )을 분비하였다. TIGIT는 특정 시토킨, 예를 들어 IL-23의 생산에 대해 어떠한 효과도 갖지 않았다. TIGIT 결합시의 상기 시토킨 편향 (skewing)은 TNF  $\alpha$  또는 CD40/LPS에 의해 자극된 세포에서만 관찰되었고 TLR2- 또는 Pam3CSK4-자극 세포에서는 관찰되지 않았고, 이것은 TIGIT가, 그에 의해 면역계가 DC 기능을 미세조정할 수 있는 수단의 하나임을 시사한다. 미성숙 T 세포에 대한 TIGIT 결합 (TIGIT 융합 구성체를 사용하여 평가된)은 T 세포 활성화 및 증식을 억제하였다. 그러나, TIGIT 처리는 미성숙 단핵구-유래 DC (iMDDC)가 성숙하는 능력에 영향을 주지 않았고, 상기 세포의 성숙을 직접 유도하지 않았다. 주목할 만한 사실은, 상기 억제가 ERK 억제제의 존재 하에 역전되었고, 이것은 ERK 활성화가 DC 활성을 조절하는 TIGIT의 기능에서 중요한 단계일 수 있음을 나타낸다는 것이다. 실제로, 본 발명자들은 TIGIT의 PVR에 대한 결합이 PVR의 인산화 및 pERK 이량체의 증가된 인산화를 야기하지만 pERK 단량체는 그렇지 않음을 입증하였다. 이것은, 예를 들어 p38 세포내 신호전달 경로가 세포의 TIGIT-Fc 처리에 의해 조절되지 않기 때문에 일반화된 효과가 아니었다. 본 발명자들은 본원에서 TIGIT<sup>+</sup> T 세포가 면역 세포의 혼합 집단에 존재할 때 다른 TIGIT<sup>-</sup> T 세포뿐만 아니라 항원 제시 세포의 증식을 억제함을 밝혀내었다. 본 발명자들은 또한 항-TIGIT 항체 또는 항-PVR 항체를 실험에 포함시키면 증식의 관찰된 억제, DC 시토킨 생산의 조절, 및 다른 면역 세포의 증식 억제가 크게 감소하였기 때문에, TIGIT-PVR 상호작용이 상기 관찰된 효과를 매개함을 입증하였다. 전체적으로, 본 발명자들에 의해 본원에서 제시되는 데이터는 TIGIT가 면역 반응을 음성 조절함으로써 면역계 피드백 기전을 제공함을 시사한다.

[0150] 따라서, 본 발명은 TIGIT 또는 PVR 발현 및/또는 활성을 조절함으로써 면역 세포 (예를 들어, DC) 기능을 조절하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 면역 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리함으로써 면역 세포 (예를 들어, DC 또는 항원-제시 세포)의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법이 제공된다. 또한, 면역 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제로 처리함으로써 면역 세포 (예를 들어, DC 또는 항원-제시 세포)의 증식을 증가시키는 방법이 제공된다. 또한, 본 발명은 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제의 투여에 의해 면역 반응을 증가/자극하는 방법을 제공한다. 이와 유사하게, TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제의 투여에 의해 면역 반응을 감소/억제하는 방법을 제공한다.

[0151] 또한, 본 발명에 의해 TIGIT 또는 PVR 발현 및/또는 활성을 조절함으로써 면역 세포 (예를 들어, DC)로부터 시토킨 생산의 종류 및/또는 양을 조절하는 방법이 제공된다. 구체적으로, 본 발명은 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리함으로써 면역 세포, 예를 들어 DC에 의한 IL-10 생산을 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리함으로써 면역 세포, 예를 들어 DC에 의한 전염증성 시토킨 생산 및/또는 방출을 감소시키는 방법이 제공된다. 이와 유사하게, 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제로 처리함으로써 면역 세포, 예를 들어 DC에 의한 IL-10 생산을 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 본 발명은 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제로 처리함으로써 면역 세포, 예를 들어, DC에 의한 전염증성 시토킨 생산 및/또는 방출을 증가시키는 방법을 추가로 제공한다. 또한, 세포를 TIGIT, TIGIT 발현 및/또는 활성의 효능제, 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 효능제로 처리함으로써 하나 이상의 세포에서 ERK 인산화 및/또는 ERK 경로를 통한 세포내 신호전달을 자극하는 방법이 제공된다. 이와 유사하게, 본 발명은 세포를 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제로 처리함으로써 하나 이상의 세포에서 ERK 인산화 및/또는 ERK 경로를 통한 세포내 신호전달을 억제하거나 감소시키는 방법이 제공된다.

[0152] TIGIT는 본원에서 밝혀진 바와 같이, 정상 대조 조직에 비해 관절염, 건선, 염증성 장 질환, 및 유방암 조직에서 발현이 증가한다. 유방암 조직에 대해, 본 발명자들은 TIGIT 발현이 종양 세포 자체와는 상호관련되지 않고, 종양 내의 CD4<sup>+</sup> 면역 세포 침윤물과 상호관련됨을 밝혀내었다. 본 발명자들은 또한 TIGIT 융합 단백질이 시험관 내에서의 인간 T 세포 반응 및 지연형 과민성 생체 내 분석에서의 쥐 T 세포 활성화를 억제함을 보여줌으로써 면역 반응을 조절하는 TIGIT의 능력을 직접 입증한다. 따라서, 본 발명은 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고 이 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터 샘플에서의 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양과 비교함으로써 대상에서 이상 면역 세포 반응을 수반하는 질병/질환을 진단하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 대상으로부터의 샘플에서 TIGIT의 발현 및/또는 활성을 평가하고 이 발현 및/또는 활성을 TIGIT 발현 및/또는 활성의 기준량 또는 정상 대상으로부터 샘플에서의 TIGIT 발현 및/또는 활성의 양과 비교함으로써 대상에서 이상 면역 세포 반응을 수반하는 질병 또는 질환 (즉, 면역 관련 질병)의 중증도를 평가하는 방법을 제공한다. 또한, TIGIT 발현 및/또는 활성을 조절함으로써 이상 면역 세포 반응을 수반하는 질병 또는 질환 (즉, 면역 관련 질병)을 예방하는 방법이 제공된다. 또한, TIGIT 발현 및/또는 활성을 조절함으로써 이상 면역 세포 반응을 수반하는 질병 또는 질환 (즉, 면역 관련 질병)을 치료하거나 그 중증도를 감소시키는 방법이 제공된다. TIGIT 발현 및/또는 활성의 조절은 TIGIT의 음성 조절 활성이 질병 상태에 기여할 때 TIGIT 활성 및/또는 발현을 억제하는 형태 (즉, TIGIT 길항제 또는 PVR 길항제 사용)일 수 있다. 예를 들어, TIGIT 발현 및/또는 활성을 길항하는 것은 DC 증식의 증가 및/또는 DC에 의한 전염증성 시토킨의 생산 증가가 바람직한 경우에 바람직할 수 있다. TIGIT 발현 및/또는 활성의 조절은 TIGIT의 음성 조절 활성이 질병 상태 제어에 바람직한 경우 TIGIT 발현 및/또는 활성의 활성화 또는 증가의 형태 (즉, TIGIT, TIGIT 효능제 또는 PVR 효능제의 투여에 의해)일 수 있다. 예를 들어, TIGIT 발현 및/또는 활성을 효능화하는 것은 DC 증식의 감소 및/또는 DC에 의한 전염증성 시토킨의 방출 감소가 바람직한 경우에 바람직할 수 있다. 본 발명의 상기 측면 및 다른 측면은 아래에서 보다 상세하게 설명된다.

[0153] A. 전장 TIGIT 폴리펩티드

[0154] 본 발명은 본원에서 TIGIT 폴리펩티드로 언급되는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 특히, 상이한 TIGIT 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA가 본원 명세서 및 하기 실시예에서 보다 상세하게 개시되는 바와 같이 확인되고 단리되었다. 당업자는 본 발명이 본 발명의 방법에 유용한 다른 폴리펩티드 (즉, PVR)을 제공하고, TIGIT 폴리펩티드의 생성 방법, 생산, 표지, 번역후 변형, 용도 또는 다른 측면에 관한 본원의 임의의 설명이 다른 비-TIGIT 폴리펩티드에도 적용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0155] B. TIGIT 폴리펩티드 변이체

[0156] 본원에서 설명되는 전장 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드 이외에, TIGIT 변이체를 제조할 수 있음이 고려된다. TIGIT 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변경의 TIGIT 폴리뉴클레오티드 내 도입 및/또는 요구되는 TIGIT 폴리펩티드의 합성에 의해 제조할 수 있다. 당업자는 아미노산 변경이 TIGIT의 번역후 프로세스를 변경할 수 있음을, 예를 들어 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변경하거나 폴리펩티드의 막 고정 특징을 변경할 수 있음을 이해할 것이다.

[0157] 전장 천연 서열 TIGIT 또는 본원에서 설명되는 TIGIT의 다양한 도메인 내의 변이는 예를 들어 임의의 기술 및 예를 들어 미국 특허 5,364,934에 제시된 보존적 및 비-보존적 돌연변이에 대한 가이드라인을 사용하여 발생시킬 수 있다. 변이는 천연 서열 TIGIT에 비해 TIGIT의 아미노산 서열을 변경시키는, TIGIT를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 및/또는 삽입일 수 있다. 임의로, 변이는 TIGIT의 하나 이상의 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 어느 아미노산 잔기가 목적하는 활성화에 불리한 영향을 주지 않으면서 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는지를 결정할 때의 지침은 TIGIT의 서열을 공지 상동성 단백질 분자와 비교하고 높은 상동성 구역에서 이루어지는 아미노산 서열 변경의 수를 최소화함으로써 제시될 수 있다. 아미노산 치환은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교체, 예를 들어 류신을 세린으로의 교체, 즉, 보존적 아미노산 교체의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산에 결실될 수 있다. 허용되는 변이는 서열에 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 체계적으로 만들고, 생성되는 변이체를 전장 또는 성숙 천연 서열에 의해 제시되는 활성화에 대해 시험함으로써 결정할 수 있다.

[0158] 또한, TIGIT 폴리펩티드 단편이 본원에서 제공된다. 상기 단편은 예를 들어 전장 천연 단백질과 비교할 때 N-말단 또는 C-말단에서 말단절단될 수 있거나 내부 잔기가 결여될 수 있다. 특정 단편은 TIGIT 폴리펩티드의 목적하는 생물학적 활성화에 필수적이지 않은 아미노산 잔기가 결여된다.

[0159] TIGIT 단편은 임의의 많은 통상적인 기술에 의해 제조할 수 있다. 목적하는 펩티드 단편은 화학적으로 합성할 수 있다. 다른 방법은 효소에 의한 소화에 의해, 예를 들어 특정 아미노산 잔기에 의해 규정된 부위에서 단백질을 절단하는 것으로 알려진 효소로 단백질을 처리하거나 적합한 제한 효소로 DNA를 소화시킴으로써 TIGIT 단편을 생성하고, 목적하는 단편을 분리하는 것을 수반한다. 또다른 적합한 기술은 목적하는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 분리하고 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭하는 것을 수반한다. DNA 단편의 목적하는 말단을 규정하는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머에 사용된다. 바람직하게는, TIGIT 폴리펩티드 단편은 적어도 하나의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 본원에 개시된 천연 TIGIT 폴리펩티드와 공유한다.

[0160] 특정 실시태양에서, 목적하는 보존적 치환을 표 5에 바람직한 치환의 표제 하에 제시한다. 상기 치환이 생물학적 활성을 변경하면, 하기 표 5에 예시적인 치환으로 명명하거나 아미노산 클래스에 대해 아래에서 상세히 설명되는 보다 실질적인 변화를 도입하고, 생성물을 스크리닝한다.

[0161] <표 5>

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile lys; gln; asn	val lys
Arg (R)	gln; his; lys; arg	gln
Asn (N)		glu
Asp (D)	glu	ser
Cys (C)	ser	asn
Gln (Q)	asn	asp
Glu (E)	asp	ala
Gly (G)	pro; ala	arg
His (H)		
Ile (I)	asn; gln; lys; arg leu; val; met; ala; phe;	leu
Leu (L)	노르류신	ile
Lys (K)	met; ala; phe	arg
Met (M)	arg; gln; asn	leu
Phe (F)	leu; phe; ile	ala
Pro (P)	leu; val; ile; ala; tyr	thr
Ser (S)	ala	ser
Thr (T)	thr	tyr
Trp (W)	ser	phe
Tyr (Y)	tyr; phe	
Val (V)		leu
	trp; phe; thr; ser	
	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	

[0162]

[0163] 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역 내 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 입체형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크성 (bulk)을

유지하는 것에 미치는 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 다음 군으로 분류할 수 있다:

[0164] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0165] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0166] (3) 산성: asp, glu;

[0167] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0168] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

[0169] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0170] 비-보존적 치환은 상기 클래스의 하나의 멤버를 다른 클래스와 교환하는 것을 수반할 것이다. 상기 치환된 잔기는 보존적 치환 부위에 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비-보존된) 부위 내에도 도입될 수 있다.

[0171] 변이는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 올리고뉴클레오티드-매개 (부위 지정) 돌연변이 유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이 유발을 사용하여 달성할 수 있다. 부위 지정 돌연변이 유발 ([Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986)]; [Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]), 카세트 돌연변이 유발 [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], 제한 선택 돌연변이 유발 [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] 또는 다른 공지의 기술을 클로닝된 DNA에 대해 수행하여 변이체 DNA를 생산할 수 있다.

[0172] 인접 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 확인하기 위해 스캐닝 아미노산 분석을 또한 사용할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산에는 비교적 작은 중성 아미노산이 존재한다. 상기 아미노산은 알라닌, 글라이신, 세린, 및 시스테인을 포함한다. 알라닌이 상기 군 중에서 일반적으로 바람직한 스캐닝 아미노산이고, 그 이유는 알라닌이 베타-탄소를 지나서 존재하는 측쇄를 제거하고, 변이체의 주쇄 입체형태를 변경시킬 가능성이 작기 때문이다 [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. 알라닌은 또한 가장 흔한 아미노산이기 때문에 일반적으로 바람직하다. 추가로, 알라닌은 종종 매립된 위치 및 노출된 위치 모두에서 발견된다 ([Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); [Chothia, J. Mol. Biol, 150:1 (1976)]). 알라닌 치환이 적당량의 변이체를 생성하지 않을 경우에, 이소테릭 (isoteric) 아미노산을 사용할 수 있다.

[0173] C. TIGIT의 변형

[0174] TIGIT의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 하나의 종류의 공유 변형은 폴리펩티드의 표적화된 아미노산 잔기를, TIGIT 폴리펩티드의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 2관능성 물질을 사용한 유도체화는 예를 들어 항-TIGIT 항체를 정제하기 위한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 TIGIT 폴리펩티드를 가교결합시키기 위해, 및 그 반대로 가교결합시키기 위해 유용하다. 통상적으로 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산을 갖는 에스테르, 동종2관능성 이미도에스테르, 예를 들어 디숙신이미드 에스테르, 예를 들어 3,3'-디티오비스(숙신이미드프로피오네이트), 2관능성 말레이미드, 예를 들어 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질을 포함한다.

[0175] 다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 대응하는 글루타미 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 라이신의 히드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

[0176] 본 발명의 범위 내에 포함된 TIGIT 폴리펩티드의 다른 종류의 공유 변형은 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴의 변경을 포함한다. "천연 글리코실화 패턴의 변경"은 본원의 목적에서 천연 서열 TIGIT 폴리펩티드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 모이어티 (moiety)의 삭제 (근본적인 글리코실화 부위의 제거에 의해 또는 화학적 및/또는 효소 수단에 의한 글리코실화의 제거에 의해), 및/또는 천연 서열 TIGIT에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 의미하고자 의도된다. 또한, 상기 구문은 존재하는 다양한 탄수화물 모이어티의 특성 및 비율의 변화를 포함하는, 천연 단백질의 글리코실화의 정성적인 변화를 포함한다. 폴리펩티드에



대한 글리코실화 부위의 부가는 아미노산 서열을 변경함으로써 달성할 수 있다. 변경은 예를 들어 천연 서열 폴리펩티드에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가하거나 치환시켜 형성시킬 수 있다 (0-연결된 글리코실화 부위의 경우). 폴리펩티드의 아미노산 서열은 특히 목적하는 아미노산으로 번역될 코돈이 생성되도록 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 기선택된 염기에서 돌연변이시킴으로써, 임의로 DNA 수준에서의 변화를 통해 변경시킬 수 있다.

[0177] 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 폴리펩티드에 글리코시드를 화학적으로 또는 효소에 의해 커플링시키는 것이다. 상기 방법은 예를 들어 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330 및 문헌 [Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem. pp. 259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

[0178] 폴리펩티드 상에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해, 또는 글리코실화의 표적으로 기능하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이에 의한 치환에 의해 달성할 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)] 및 [Edge et al., Anal. Biochem. 118:131 (1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소에 의한 절단은 문헌 [Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987)]에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 달성할 수 있다.

[0179] 폴리펩티드의 다른 종류의 공유 변형은 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로 폴리펩티드를 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 연결시키는 것을 포함한다.

[0180] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 다른 이중성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다.

[0181] 한 실시태양에서, 상기 키메라 분자는 항-태그 항체가 그에 대해 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 관심있는 폴리펩티드의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 관심있는 폴리펩티드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. 그러한 에피토프-태그된 형태의 관심있는 폴리펩티드의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 다른 종류의 친화도 매트릭스를 사용한 친화도 정제에 의해 관심있는 폴리펩티드를 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드와 그들의 각각의 항체는 당업계에 공지되어 있다. 그 예는 폴리-히스티딘 (poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글라이신 (poly-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 에피토프 펩티드 [Martin et al., Science. 255:192-194 (1992)]; α-튜불린 에피토프 펩티드 [Skinner et al., J. Biol. Chem. 266:15163-15166 (1991)]; 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0182] 별도의 실시태양에서, 키메라 분자는 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 구역과 폴리펩티드의 융합체를 포함할 수 있다. 2가 형태의 키메라 분자 (본원에서 "면역어드헤신"으로도 칭함)에 대해, 상기 융합체는 IgG 분자의 Fc 구역에 대한 것일 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 적어도 하나의 가변 구역 대신에 가용성 (막횡단 도메인이 결실된 또는 불활성화된) 형태의 폴리펩티드를 치환한 것을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 면역글로불린 융합체는 힌지, IgG1 분자의 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 구역을 포함한다. 면역글로불린 융합체의 생산에 대해서는 또한 미국 특허 5,428,130 (1995년 6월 27일 등록)을 참조한다.

[0183] D. 폴리펩티드 제조

[0184] 아래에 제시되는 설명은 주로 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포의 배양에 의한 폴리펩티드의 생산에 관한 것이다. 물론, 폴리펩티드를 제조하기 위해 당업계에 공지되어 있는 다른 방법을 사용할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 폴리펩티드 서열, 또는 그의 일부는 고상 기술을 이용한 직접 펩티드 합성 (예를 들어, 문헌 [Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)]; [Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)] 참조)에 의해 생산할 수 있다. 시험관내 단백질 합성은 수동 기술 또는 자동화 기술에 의해 수행할 수 있다. 자동화 합성은 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 펩티드 합성기 (미국 캘리포니아주 포스터 시티)를

제조사의 지시에 따라 사용하여 달성할 수 있다. 폴리펩티드의 다양한 부분들은 별개로 화학적으로 합성하고, 목적하는 전장 폴리펩티드를 생산하기 위해 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합할 수 있다.

[0185] 1. 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 단리

[0186] 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 폴리펩티드 mRNA를 갖고 이를 검출가능한 수준으로 발현하는 것을 생각되는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 폴리펩티드 코딩 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 폴리펩티드-코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 공지의 합성 절차 (예를 들어, 자동화 핵산 합성)에 의해 얻을 수 있다.

[0187] 라이브러리는 목적하는 유전자 또는 그에 의해 코딩되는 단백질을 확인하도록 설계된 프로브 (예를 들어, 폴리펩티드에 대한 항체 또는 적어도 약 20-80개 염기의 올리고뉴클레오티드)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 스크리닝은 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 절차를 사용하여 수행할 수 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 단리하는 별도의 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 ([Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]).

[0188] 아래 실시예는 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술을 설명한다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오티드 서열은 충분한 길이이고 가양성 (false positive)이 최소화되도록 충분히 분명해야 한다. 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 스크리닝되는 라이브러리 내의 DNA에 대한 혼성화시에 검출될 수 있도록 표지된다. 표지하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, <sup>32</sup>P-표지된 ATP와 같은 방사성 표지, 비오틴화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중등 엄격성 및 고 엄격성을 포함한 혼성화 조건은 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 제시되어 있다.

[0189] 상기 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 공공 데이터베이스, 예를 들어 GenBank 또는 다른 사설 서열 데이터베이스에 기탁되고 이로부터 이용가능한 다른 공지의 서열과 비교되고 정렬될 수 있다. 분자의 규정된 영역 내의 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서)은 당업계에 공지되고 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0190] 단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 처음으로 본원에 개시된 추정 아미노산 서열을 사용하고, 필요한 경우에 cDNA로 역전사될 수 없는 mRNA의 전구체 및 처리 중간체를 검출하기 위해 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 통상적인 프라이머 연장 절차를 이용하여, 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다.

[0191] 2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0192] 숙주 세포를 폴리펩티드 생산을 위해 본원에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 또는 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지 내에서 배양한다. 배양 조건, 예를 들어 배지, 온도, pH 등은 과도한 실험을 수행하지 않으면서 당업자가 선택할 수 있다. 일반적으로, 세포 배양액의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실용적 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 찾을 수 있다.

[0193] 진핵 세포 형질감염 및 원핵 세포 형질전환의 방법, 예를 들어 CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub>, 리포솜-매개 및 전기천공은 당업자에게 공지되어 있다. 사용된 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 수행된다. 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리, 또는 전기천공은 일반적으로 원핵생물에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용한 감염은 문헌 [Shaw et al., Gene. 23:315 (1983)] 및 1989년 6월 29일 공개된 WO 89/05859에 기재된 바와 같은 특정 식물 세포의 형질전환을 위해 사용된다. 상기 세포벽이 없는 포유동물 세포에 대해서는, 문헌 [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법을 사용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 측면은 미국 특허 4,399,216에 기재되어 있다. 효모 내로의 형질전환은 일반적으로 문헌 [Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)]의 방법에 따라 수행한다. 그러나, DNA를 세포 내로 도입하기 위한 다른 방법, 예를 들어 핵미세주사, 전기천공, 무손상 세포와 세균 원형질체 융합, 또는 다가양이온, 예를 들어, 폴리브렌, 폴리오르니틴

에 의한 방법도 사용할 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환하기 위한 다양한 기술에 대해서는 문헌 [Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

[0194] 본원에서 벡터 내에서 DNA를 클로닝 또는 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵 세포를 포함한다. 적합한 원핵생물은 진정세균, 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아 (*Enterobacteriaceae*), 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다양한 이. 콜라이 균주, 예를 들어 이. 콜라이 K12 균주 MM294 (ATCC 31,446); 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537); 이. 콜라이 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)가 공개적으로 이용가능하다. 다른 적합한 원핵 숙주 세포는 엔테로박테리아세아, 예를 들어 에스케리치아 (*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터 (*Enterobacter*), 에르위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*) 및 시겔라 (*Shigella*), 및 바실러스 (*Bacillus*), 예를 들어 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 애루기노사 (*P. aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 이들 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다. 균주 W3110은 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 통상적인 숙주 균주이기 때문에 특히 바람직한 하나의 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백 분해 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주에 내인성인 단백질을 코딩하는 유전자에 유전자 돌연변이를 발생시키도록 변형될 수 있고, 상기 숙주의 예는 완전한 유전자형 tonA를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2; 완전한 유전자형 tonA ptr3을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4; 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244); 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 37D6; 비-카나마이신 내성 degP 결실 돌연변이가 존재하는 균주 37D6인 이. 콜라이 W3110 균주 40B4; 및 1990년 8월 7일 등록된 미국 특허 4,946,783에 개시된 돌연변이체 주변 세포질 프로테아제를 갖는 이. 콜라이 균주를 포함한다. 별법으로, 시험관내 클로닝 방법, 예를 들어 PCR 또는 다른 핵산 증합효소 반응이 적합하다.

[0195] 원핵생물에 추가로, 진핵 미생물, 예를 들어 필라멘트형 진균 또는 효모가 폴리펩티드-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)가 흔히 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 숙주는 쉬조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) ([Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]]; 1985년 5월 2일 공개된 EP 139,383); 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주 (미국 특허 4,943,529; [Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)]), 예를 들어, 케이. 락티스 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; [Lourencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]]), 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위커라미 (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로스필라룸 (*K. drosophilaramum*) (ATCC 36,906; [Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)]), 케이. 테르모톨레란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; [Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]]); 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레에시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); 슈바니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 슈바니오마이세스 옥시덴탈리스 (*S. occidentalis*) (1990년 10월 31일 공개된 EP 394,538); 및 필라멘트형 진균, 예를 들어, 뉴로스포라, 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolyopocladium*) (1991년 1월 10일 공개된 WO 91/00357), 및 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (*A. nidulans*) ([Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]]; [Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]]; [Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]]) 및 에이. 니거 (*A. niger*) (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985])를 포함한다. 메탄올 자화 (methylotropic) 효모가 본원에서 적합하고, 한센울라 (*Hansenula*), 칸디다, 클로에케라 (*Kloeckera*), 피키아, 사카로마이세스, 토룰롭시스 (*Torulopsis*) 및 로도토룰라 (*Rhodotorula*)로 구성된 속으로부터 선택된, 메탄올에서 성장할 수 있는 효모를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 효모 클래스의 예시적인 특정 종의 목록은 문헌 [C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)]에 제시되어 있다.

[0196] 글리코실화된 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예

는 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라 (*Drosophila*) S2 및 스포돔테라 (*Spodoptera*) Sf9, 및 식물 세포를 포함한다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 및 COS 세포를 포함한다. 보다 구체적인 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51)을 포함한다. 적절한 숙주 세포의 선택은 당업자에 의해 결정된다.

[0197] 3. 복제가능한 벡터의 선택 및 사용

[0198] 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 내로 삽입될 수 있다. 다양한 벡터는 공개적으로 입수할 수 있다. 벡터는 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자, 또는 파지 형태로 존재할 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 절차에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 하나 이상의 이들 성분을 포함하는 적합한 벡터의 구성에는 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.

[0199] 폴리펩티드는 직접적으로, 및 또한 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드일 수 있는 이중성 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합 방식으로 생산할 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 폴리펩티드-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열안정성 엔테로톡신 II 리더의 군 중에서 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 알파 인자 리더 (사카로마이세스  $\alpha$ -인자 리더 및 미국 특허 5,010,182에 기재된 클루이베로마이세스  $\alpha$ -인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일 공개된 EP 362,179) 또는 1990년 11월 15일 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 단백질의 분비를 지시하기 위해 포유동물 신호 서열, 예를 들어 동일한 또는 관련 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열 및 바이러스 분비 리더를 사용할 수 있다.

[0200] 발현 및 클로닝 벡터는 모두 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제하도록 하는 핵산 서열을 포함한다. 그러한 서열은 다양한 세균, 효모 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점이 대부분의 그람-음성 세균에 대해 적합하고, 2 $\mu$  플라스미드 기점은 효모에 대해 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 대해 유용하다.

[0201] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 선택가능 마커로도 불리는 선택 유전자를 포함할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토포렉세이트, 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실러스에 대한 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

[0202] 포유동물 세포에 적합한 선택가능 마커의 예는 폴리펩티드-코딩 핵산을 흡수하는 능력을 갖는 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예를 들어 DHFR 또는 티미딘 키나제이다. 야생형 DHFR을 사용할 때 적절한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]에 기재된 바와 같이 제조하고 증식시킨, DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주이다. 효모에서 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 ([Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]; [Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)]; [Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]). trp1 유전자는 트립토판 내에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

[0203] 발현 및 클로닝 벡터는 대체로 mRNA 합성을 지시하도록 폴리펩티드-코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 공지되어 있다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 알려져 있다. 원핵생물 숙주와 함께 사용하기 위해 적합한 프로모터는  $\beta$ -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 ([Chang et al., Nature, 275:615 (1978)]; [Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]), 알칼리성 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 ([Goeddel, Nucleic Acids

Res., 8:4057 (1980)]; EP 36,776), 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 프로모터 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]를 포함한다. 세균 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno; S.D.) 서열을 포함할 것이다.

[0204] 효모 숙주와 함께 사용하기 위해 적합한 프로모팅 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 또는 다른 당분해 효소 ([Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)]; [Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]), 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제를 위한 프로모터를 포함한다.

[0205] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 잇점을 갖는 유도가능 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사에 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스와 갈락토스 이용을 담당하는 효소를 위한 프로모터 구역이다. 효모 발현에 사용하기 위해 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다.

[0206] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터 폴리펩티드 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성이라면, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스 (1989년 7월 5일 공개된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 및 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 제어된다.

[0207] 보다 고등한 진핵생물에 의한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서는 그의 전사를 증가시키도록 프로모터에 대해 작용하는, 대체로 약 10 내지 300 bp인 DNA의 시스 작용성 (cis-acting) 요소이다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-페토단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 일반적으로 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서가 사용될 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 쪽의 SV40 인핸서 (bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 조기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 인핸서는 폴리펩티드 코딩 서열의 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5'의 부위에 위치한다.

[0208] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 (nucleated) 세포)에 사용되는 발현 벡터도 전사 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 포함할 것이다. 상기 서열은 진핵 생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 구역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 구역은 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분 내의 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다.

[0209] 재조합 척추동물 세포 배양액에서 관심있는 폴리펩티드의 합성에 적용하기 적합한 또다른 방법, 벡터, 및 숙주 세포는 문헌 [Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)]; [Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)]; EP 117,060; 및 EP 117,058에 기재되어 있다.

[0210] 4. 유전자 증폭/발현의 검출

[0211] 유전자 증폭 및/또는 발현은 예를 들어 본원에 제시된 서열을 기초로 하여, mRNA의 전사를 정량하는 통상적인 서던 블로팅, 노던 블로팅 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205 (1980)], 도트 블로팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 프로브를 사용한 계내 혼성화에 의해 샘플 내에서 직접 측정할 수 있다. 별법으로, DNA 이중체, RNA 이중체, 및 DNA-RNA 하이브리드 이중체 또는 DNA-단백질 이중체를 포함하는 특이적 이중체를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 항체는 다시 표지될 수 있고, 표면 상에서 이중체의 형성시에 이중체에 결합된 항체의 존재를 검출할 수 있도록 이중체가 표면에 결합되어 분석이 수행될 수 있다.

[0212] 별법으로, 유전자 발현은 면역학적 방법, 예를 들어 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학 염색, 및 유전자 생성물의 발현을 직접 정량하기 위해 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 측정할 수 있다. 면역조직화학 염색 및/또는 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조할 수 있다. 편리하게는, 항체는 천연 서열 폴리펩티드에 대해, 또는 본원에 제공된 DNA 서열에 기반한 합성 펩티드에 대해, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 융합되고 특이적 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에

대해 제조할 수 있다.

[0213] 5. 폴리펩티드의 정제

[0214] 관심있는 폴리펩티드의 형태는 배양 배지 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수할 수 있다. 막에 결합되는 경우, 항체는 적합한 세제 용액 (예를 들어 Triton-X 100)을 사용하여 또는 효소에 의한 절단에 의해 막으로부터 방출시킬 수 있다. 폴리펩티드의 발현에 사용되는 세포는 다양한 물리적 또는 화학적 수단, 예를 들어 동결-해동 순환, 초음파 처리, 기계적 파괴, 또는 세포용해제에 의해 파괴할 수 있다.

[0215] 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 다음 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 이온-교환 컬럼 상의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예를 들어 DEAE 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱 (chromatofocusing); SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어, 세파텍스 G-75를 사용한 겔 여과; 오염물, 예를 들어 IgG를 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 컬럼; 및 폴리펩티드의 에피토프-태깅된 형태에 결합하는 금속 킬레이팅 컬럼. 단백질 정제의 다양한 방법을 사용할 수 있고, 상기 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)]; [Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)]에 기재되어 있다. 선택된 정제 단계(들)은 예를 들어 사용된 생산 공정의 특성, 및 생산된 특정 폴리펩티드에 따라 결정될 것이다.

[0216] E. 조직 분포

[0217] 폴리펩티드를 발현하는 조직의 위치는 다양한 인간 조직에서 mRNA 발현의 결정에 의해 확인할 수 있다. 상기 유전자의 위치는 어느 조직이 폴리펩티드의 활성의 자극 및 억제에 의해 영향을 받을 가능성이 가장 높은지에 대한 정보를 제공한다. 또한, 특정 조직 내의 유전자의 위치는 아래에서 논의되는 활성 차단/활성화 분석을 위한 샘플 조직을 제공한다.

[0218] 상기한 바와 같이, 상이한 조직에서 유전자 발현은 본원에서 제공되는 서열을 기초로 하여 mRNA의 전사를 정량화하는 통상적인 서던 블로팅, 노던 블로팅 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205 [1980]), 도트 블로팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 프로브를 사용한 계내 혼성화에 의해 측정할 수 있다. 별법으로, DNA 이중체, RNA 이중체, 및 DNA-RNA 하이브리드 이중체 또는 DNA-단백질 이중체를 포함하여 특이적인 이중체를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다.

[0219] 별법으로, 다양한 조직에서의 유전자 발현은 면역학적 방법, 예를 들어 조직 절편의 면역조직화학 염색 및 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하는 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 측정할 수 있다. 면역조직화학 염색 및/또는 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조할 수 있다. 편리하게는, 항체는 천연 서열의 폴리펩티드에 대항하여 또는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 기초로 한 합성 펩티드에 대항하여 또는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 융합되고 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대항하여 제조할 수 있다. 항체 생성을 위한 일반적인 기술 및 노던 블로팅 및 계내 혼성화를 위한 특수 프로토콜을 아래에서 설명한다.

[0220] F. 항체 결합 연구

[0221] 본 발명의 폴리펩티드의 활성은 조직 세포에 대한 폴리펩티드의 영향을 억제하는 항-폴리펩티드 항체의 능력을 시험하는 항체 결합 연구에 의해 추가로 확인할 수 있다. 예시적인 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적, 및 이중접합체 항체를 포함하고, 그의 제조는 아래에서 설명될 것이다.

[0222] 항체 결합 연구는 임의의 공지의 분석 방법, 예를 들어 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석으로 수행할 수 있다 (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp.147-158).

[0223] 경쟁적 결합 분석은 제한된 양의 항체에 결합하기 위해 시험 샘플 분석물과 경쟁하는 표지된 표준물질의 능력에 의존한다. 시험 샘플 내의 표적 단백질의 양은 항체에 결합하게 되는 표준물질의 양에 반비례한다. 결합하게 되는 표준물질의 양의 결정을 용이하게 하기 위해, 항체는 항체에 결합한 표준물질 및 분석물을 미결합 상태의 표준물질 및 분석물로부터 편리하게 분리할 수 있도록 경쟁 전 또는 후에 불용성인 것이 바람직하다.

[0224] 샌드위치 분석은 각각의 항체가 검출되는 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 결합할 수 있는 두개의 항체의 사용을 포함한다. 샌드위치 분석에서, 시험 샘플 분석물은 고체 지지체 상에 고정화된 제1 항체에 의해 결합된 후, 제2 항체가 분석물에 결합하여 불용성의 3부분 복합체를 형성한다 (예를 들어 미국 특허

4,376,110 참조). 제2 항체 자체는 검출가능한 모이어티로 표지될 수 있거나 (직접 샌드위치 분석), 검출가능한 모이어티로 표지된 항-면역글로불린 항체를 사용하여 측정할 수 있다 (간접 샌드위치 분석). 예를 들어, 한 종류의 샌드위치 분석은 ELISA 분석으로서, 여기서 검출가능한 모이어티는 효소이다.

[0225] 면역조직화학을 위해, 조직 샘플은 신선하거나 동결될 수 있거나, 파라핀에 포매되어, 예를 들어 포르말린과 같은 방부제로 고정시킬 수 있다.

[0226] G. 세포 기반 분석

[0227] 면역 관련 질병에 대한 세포 기반 분석 및 동물 모델이 본원에서 확인된 유전자 및 폴리펩티드와 면역 관련 질병의 발생 및 발병 기전 사이의 관계를 추가로 이해하기 위해 사용될 수 있다.

[0228] 상이한 방법에서, 특정 면역 질병에 관련되는 것으로 알려진 세포 종류의 세포를 본원에서 설명되는 cDNA로 형질감염시키고, 면역 기능을 자극하거나 억제하는 상기 cDNA의 능력을 분석한다. 적합한 종양 세포는 요구되는 유전자로 형질감염되고 면역 기능 활성화에 대해 모니터링될 수 있다. 이어서, 상기 형질감염된 세포주를 사용하여 면역 기능을 억제 또는 자극하는, 예를 들어 T-세포 증식 또는 염증 세포 침윤을 조절하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 항체 조성물의 능력을 시험할 수 있다. 본원에서 확인된 유전자의 코딩 서열로 형질감염된 세포는 면역 관련 질병의 치료를 위한 약물 후보를 확인하기 위해 추가로 사용될 수 있다.

[0229] 또한, 트랜스제닉 동물 (아래에서 설명되는 바와 같은)로부터 유도된 1차 배양액을 본원의 세포 기반 분석에 사용할 수 있지만, 안정한 세포주가 당업계에서 보다 통상적으로 사용된다. 트랜스제닉 동물로부터 연속적인 세포주를 유도하는 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, [Small et al., Mol. Cell. Biol. 5:642-648 [1985]] 참조).

[0230] 하나의 적합한 세포 기반 분석은 혼합 림프구 반응 (MLR)이다 ([Current Protocols in Immunology, unit 3.12; edited by J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.]). 상기 분석에서, 활성화된 T 세포의 증식을 자극 또는 억제하는 시험 화합물의 능력이 분석된다. 반응 (responder) T 세포의 현탁액을 동종이형 (allogeneic) 자극제 (stimulator) 세포와 함께 배양하고, T 세포의 증식을 삼중수소화 티미딘의 흡수에 의해 측정한다. 이 분석은 T 세포 반응성의 일반적인 측정이다. 대부분의 T 세포가 활성화 시에 반응하여 IL-2를 생산하기 때문에, 상기 분석에 반응성의 차이는 반응 세포에 의한 IL-2 생산의 차이를 부분적으로 반영한다. MLR 결과는 표준 림포킨 (IL-2) 검출 분석에 의해 확인될 수 있다 (Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, 3.15, 6.3).

[0231] MLR 분석에서 증식성 T 세포 반응은 분석된 분자의 직접적인 유사분열 촉진 특성에 의한 또는 외부 항원 유도 활성화에 의한 것일 수 있다. 폴리펩티드의 T 세포 자극 활성화에 대한 추가의 확인은 동시자극 분석에 의해 수행할 수 있다. T 세포 활성화는 T-세포 수용체 (TCR)를 통해 매개되는 항원 특이적 신호 및 제2 리간드 결합 상호작용, 예를 들어 B7 (CD80, CD86)/CD28 결합 상호작용을 통해 매개되는 동시자극 신호를 필요로 한다. CD28 가교결합은 활성화된 T 세포에 의한 림포킨 분비를 증가시킨다. T 세포 활성화는 음성 또는 양성 효과를 갖는 리간드의 결합을 통해 음성 및 양성 조절을 모두 갖는다. CD28 및 CTLA-4는 B7에 결합하는 Ig 수퍼패밀리 내의 관련 당단백질이다. B7에 대한 CD28 결합은 T 세포 활성화의 양성 동시자극 효과를 갖고; 반대로, B7에 대한 CTLA-4 결합은 T 세포 실활 효과를 갖는다 ([Chambers, C. A. and Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396], [Schwartz, R. H., Cell (1992) 71: 1065]; [Linsey, P. S. and Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191]; [June, C. H. et al., Immunol. Today (1994).15:321]; [Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405]). 동시자극 분석에서, 폴리펩티드는 T 세포 동시자극 또는 억제 활성화에 대해 분석된다.

[0232] 본 발명에서처럼 화합물을 자극하는 직접적인 용도는 프라이밍된 (primed) T 세포 상에 발현된 리간드 (4-1BBL)에 결합하고 T 세포 활성화 및 성장의 신호를 전달하는 종양 괴사 인자 수용체 패밀리의 멤버인 4-1BB 당단백질을 사용한 실험에서 확인되었다 [Alderson, M. E. et al., J. Immunol. (1994) 24:2219].

[0233] 또한, 화합물을 자극하는 효능제도 실험에 의해 확인되었다. 일례로서, 효능제 항-4-1BB 항체를 사용한 처리에 의한 4-1BB의 활성화는 종양의 제거를 향상시킨다 (Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18: 1). 아래에서 보다 상세하게 설명되는 종양 치료를 위한 면역보조제 요법은 본 발명의 자극 화합물의 용도의 다른 예이다.

[0234] 별법으로, 면역 자극 또는 증강 효과는 혈관 투과성 향상 특성을 갖는 폴리펩티드의 투여에 의해서도 달성될 수 있다. 향상된 혈관 투과성은 면역 세포 (예를 들어, 단핵구, 호산구, PMN)의 국소 침윤에 의해 약화될 수 있는

질환 및 염증에 유익할 것이다.

- [0235] 다른 한편으로, TIGIT 폴리펩티드, 및 T 세포 증식/활성화, 전염증성 시토킨 분비, 및/또는 혈관 투과성의 직접적인 억제제인 본 발명의 다른 화합물은 면역 반응을 억제하기 위해 직접 사용될 수 있다. 이들 화합물은 면역 반응 정도를 감소시키고 과활성, 최적 이상의 (superoptimal), 또는 자가면역 반응을 특징으로 하는 면역 관련 질병을 치료하기 위해 유용하다. 본 발명의 화합물의 상기 용도는 수용체 B7에 대한 CTLA-4 결합이 T 세포를 실패시키는 상기 설명된 실험에 의해 확인되었다. 본 발명의 직접 억제성 화합물은 유사한 방식으로 기능한다. 혈관 투과성을 억제하는 화합물의 사용은 염증을 감소시킬 것으로 예상된다. 그러한 용도는 과도한 염증과 관련된 병태의 치료에 유익할 것이다.
- [0236] 유사하게, TIGIT-억제성 폴리펩티드에 결합하고 상기 TIGIT-억제성 폴리펩티드의 효과를 차단하는 화합물, 예를 들어, 항체는 순 억제 효과를 생성시키고, T 세포 증식/활성화 및/또는 림포킨 분비를 억제하도록 TIGIT를 유리 시킴으로써 T 세포 매개 면역 반응을 억제하기 위해 사용될 수도 있다. 폴리펩티드의 억제 효과를 차단하면, 포유동물의 면역 반응이 억제된다.
- [0237] 별법으로, 불충분한 T 세포 매개 면역 반응 및/또는 염증과 관련된 병태에서, TIGIT 활성 및/또는 발현의 억제 또는 감소 또는 PVR에 결합하고/하거나 이를 통해 신호를 전달하는 TIGIT의 능력의 방해는 치료를 위해 유익할 수 있다. 상기 억제 또는 감소는 TIGIT 발현 및/또는 활성의 길항제 및/또는 PVR 발현 및/또는 활성의 길항제의 투여에 의해 제공될 수 있다.
- [0238] H. 동물 모델
- [0239] 세포 기반 시험관 내 분석의 결과는 생체 내 동물 모델 및 T-세포 기능에 대한 분석을 사용하여 추가로 확인될 수 있다. 다양한 잘 공지된 동물 모델을 사용하여, 면역 관련 질병의 발생 및 발병기전에서 본원에서 확인된 유전자의 역할을 보다 상세하게 이해하고, 천연 폴리펩티드의 항체, 및 다른 길항제, 예를 들어 소분자 길항제를 포함하는 후보 치료제의 효능을 시험할 수 있다. 상기 모델의 생체내 특성을 통해 인간 환자에서 반응을 예측할 수 있다. 면역 관련 질병의 동물 모델은 비-재조합 및 재조합 (트랜스제닉) 동물을 모두 포함한다. 비-재조합 동물 모델은 예를 들어 설치류, 예를 들어, 쥐 모델을 포함한다. 상기 모델은 표준 기술, 예를 들어, 피하 주사, 꼬리 정맥 주사, 비장 이식, 복강내 이식, 신장 피막하 이식 등을 사용하여 동계 (syngeneic) 마우스 내로 세포를 도입함으로써 생성시킬 수 있다.
- [0240] 이식편 대 숙주 질병은 면역적격 (immunocompetent) 세포가 면역억제 또는 관용성 환자 내로 이식될 때 발생한다. 공여 세포는 숙주 항원을 인식하고 반응한다. 반응은 치명적인 중증 염증으로부터 경증의 설사 및 체중 감소까지 상이할 수 있다. 이식편 대 숙주 질병 모델은 MHC 항원 및 작은 이식 항원에 대한 T 세포 반응성의 평가 수단을 제공한다. 적합한 절차가 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, unit 4.3]에 기재되어 있다.
- [0241] 피부 동종이식 거부에 대한 동물 모델은 생체내 조직 파괴를 매개하는 T 세포의 능력을 시험하는 수단 및 이식 거부에서의 그의 역할의 척도이다. 가장 통상적인 허용되는 모델은 쥐 꼬리-피부 이식편을 이용한다. 반복된 실험은 피부 동종이식 거부 항체가 아니라 T 세포, 헬퍼 T 세포 및 킬러-효과기 T 세포에 의해 매개됨을 보여 주었다 (Auchincloss, H. Jr. and Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992). 적합한 절차는 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, unit 4.4]에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 화합물을 시험하기 위해 사용될 수 있는 다른 이식 거부 모델은 문헌 [Tanabe, M. et al., Transplantation (1994) 58:23] 및 [Tinubu, S. A. et al., J. Immunol. (1994) 4330-4338]에 기재된 동종이형 심장 이식 모델이다.
- [0242] 지연형 과민성에 대한 동물 모델은 세포 매개 면역 기능의 분석을 제공한다. 지연형 과민성 반응은 항원의 시험접종 후에 일정 시간 경과 후까지 피크에 도달하지 않는 염증을 특징으로 하는 T 세포 매개 생체 내 면역 반응이다. 또한, 이들 반응은 조직 특이적 자가면역 질병, 예를 들어 다발성 경화증 (MS) 및 실험에 의한 자가면역 뇌척수염 (EAE, MS에 대한 모델)에서도 발생한다. 적합한 절차는 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, unit 4.5]에 상세히 기재되어 있다.
- [0243] EAE는 T 세포 및 단핵 세포 염증 및 중추 신경계에서 후속적인 축삭의 탈수초화를 특징으로 하는 T 세포 매개 자가면역 질병이다. EAE는 일반적으로 인간 MS의 관련 동물 모델로 고려된다 (Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143). 급성 및 재발-완화형 (relapsing-remitting) 모델이 개발되었다. 본 발명의 화합물은 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, units 15.1 and 15.2]에 기재된 프로토콜을 사용하



여 면역 매개 탈수초성 질병에 대한 T 세포 자극 또는 억제 활성화에 대해 시험될 수 있다. 또한, 문헌 [Duncan, I. D. et al., Molec. Med. Today (1997) 554-561]에 설명된 바와 같은, 희소돌기아교세포 또는 슈반 (Schwann) 세포가 중추 신경계 내로 이식된 미엘린 질병 모델을 참고한다.

[0244] 접촉 과민성은 세포 매개 면역 기능에 대한 간단한 지연형 과민성의 생체내 분석이다. 이 절차에서, 지연형 과민반성 반응을 야기하는 외인성 합텐 (hapten)에 대한 피부 노출이 측정 및 정량된다. 접촉 감수성은 초기 감작기 (sensitizing phase) 및 유발기 (elicitation phase)를 수반한다. 유발기는 T 림프구가 이전에 접촉한 바 있는 항원을 만날 때 발생한다. 부종 및 염증이 발생하고, 이 때문에 상기 모델은 인간 알레르기 접촉성 피부염의 우수한 모델이 된다. 적합한 절차는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unit 4.2]에 상세히 기재되어 있다. 또한, 문헌 [Grabbe, S. and Schwarz, T, Immun. Today 19(1): 37-44 (1998)]을 참조한다.

[0245] 관절염에 대한 동물 모델은 콜라겐-유발 관절염이다. 상기 모델은 인간 자가면역 류마티스 관절염의 임상적, 조직학적 및 면역학적 특징을 공유하고, 인간 자가면역 관절염의 허용되는 모델이다. 마우스 및 래트 모델은 윤활막염, 연골의 침식 및 연골하 골을 특징으로 한다. 본 발명의 화합물은 문헌 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, units 15.5]에 기재된 바와 같은 프로토콜을 사용하여 자가면역 관절염에 대한 활성화에 대해 시험될 수 있다. 또한, 문헌 [Issekutz, A. C. et al., Immunology, (1996) 88:569]에 기재되어 있는 CD18 및 VLA-4 인테그린에 대한 모노클로날 항체를 사용하는 모델을 참조한다.

[0246] 콜라겐-유발 관절염 (CIA) 모델은 인간 류마티스 관절염 (RA)에 대한 많은 면역학적 및 병리학적 유사성, 국소화된 주 조직적합성의 병발, 완전한 클래스-II-제한된 T 헬퍼 림프구 활성화, 및 조직학적 병변의 유사성 때문에 인간 관절염에서 활성을 보이는 잠재적인 약물 또는 생물제제를 연구하기 위한 적합한 모델로 여겨진다. RA 환자에서 발견되는 것과 유사한 상기 CIA 모델의 특징은 다음을 포함한다: 연골 및 관절 연부의 뼈의 미란 (방사선 사진에서 볼 수 있는), 증식성 윤활막염, 몸통 골격이 아니라 사지 골격 내의 작은 크기 및 중간 크기의 말초 관절의 대칭적 병발 (Jamieson et al., Invest. Radiol. 20: 324-9 (1985)). 또한, IL-1 및 TN- $\alpha$ 는 RA에서처럼 CIA에 관련되는 것으로 보인다 (Joosten et al., J. Immunol. 163:5049-5055 (1999)). TNF-중화 항체 및 별도로 TNFR:Fc는 상기 모델에서 RA의 증상을 감소시켰다 ([Williams et al., PNAS, 89:9784-9788 (1992)]; [Wooley et al., J. Immunol.151: 6602-6607 (1993)]).

[0247] RA에 대한 상기 모델에서, II형 콜라겐은 소 관절 연골로부터 정제되고 (Miller, Biochemistry 11:4903 (1972)), 면역화된 마우스에 사용된다 (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:2762 (1994)). 관절염의 증상은 홍반 및/또는 사지의 부기 및 조직학적 검사에 의해 결정된 연골 및 뼈의 미란 또는 결함을 포함한다. 이와 같이 널리 사용되는 모델은 예를 들어 문헌 [Holmdahl et al., APMIS 97:575 (1989)] 및 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌, units 15.5], 및 [Issekutz et al., Immunology, 88:569 (1996)], 및 하기 실시예에도 기재되어 있다.

[0248] 동물을 난알부민으로 감작시킨 후, 동물을 에어로졸로 전달된 동일한 단백질로 시험접종하여 항원 유발 기도 과민반응증, 폐 호산구 증가증 및 염증을 유도한 천식 모델이 문헌에 기재되어 있다. 몇몇 동물 모델 (기니아 피그, 래트, 비-인간 영장류)은 에어로졸 항원으로 시험접종시에 인간의 아토피성 천식과 유사한 증상을 보인다. 쥐 모델은 인간 천식의 많은 특징을 갖는다. 천식 치료시의 활성화 및 효능에 대해 본 발명의 화합물을 시험하기에 적합한 과정은 문헌에 기재되어 있다 [Wolyniec, W. W. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., (1998) 18:777 및 이 문헌에서 언급된 참고 문헌].

[0249] 추가로, 본 발명의 화합물은 건선 유사 질병의 동물 모델에서 시험될 수 있다. 증거는 건선에 대한 T 세포 발병기전을 제시한다. 본 발명의 화합물은 마우스가 건선과 유사한 병리조직학적 피부 병변을 보이는, 문헌 [Schon, M. P. et al., Nat. Med., (1997) 3:183]에 기재된 scid/scid 마우스 모델에서 시험될 수 있다. 다른 적합한 모델은 문헌 [Nickoloff, B. J. et al., Am. J. Path., (1995) 146:580]에 기재된 바와 같이 제조된 인간 피부/scid 마우스 키메라이다.

[0250] 재조합 (트랜스제닉) 동물 모델은 트랜스제닉 동물을 생성시키기 위한 표준 기술을 사용하여 본원에서 확인된 유전자의 코딩 부분을 관심있는 동물의 게놈 내로 도입함으로써 조작될 수 있다. 트랜스제닉 조작을 위한 표적으로서 기능할 수 있는 동물은 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그, 양, 염소, 돼지, 및 비-인간 영장류, 예를 들어 개코원숭이, 침팬지 및 원숭이를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 트랜스젠을 상기 동물에 도입하기 위한 당업계에 공지된 기술은 전핵 미세주사 (Hoppe and Wanger, 미국 특허 4,873,191); 생식계열 내로의 레트로바이

러스-매개 유전자 전달 (예를 들어, Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); 배아줄기세포에서 유전자 표적화 (Thompson et al., Cell, 56, 313-321 [1989]); 배아의 전기천공 (Lo, Mol. Cel. Biol., 3, 1803-1814 [1983]); 정자 매개 유전자 전달 (Lavitrano et al., Cell, 57, 717-73 [1989])를 포함한다 검토를 위해, 예를 들어 미국 특허 4,736,866을 참조한다.

[0251] 본 발명의 목적을 위해, 트랜스제닉 동물은 세포의 일부에만 트랜스젠을 보유하는 동물 ("모자이크 동물")을 포함한다. 트랜스젠은 단일 트랜스젠으로서, 또는 콘카타머 (concatamer), 예를 들어 헤드 투 헤드 (head-to-head) 또는 헤드 투 테일 (head-to-tail) 연결체로 통합될 수 있다. 트랜스젠의 특정 세포 종류 내로의 선택적인 도입은 예를 들어 문헌 [Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 6232-636 (1992)]의 기술을 따라 수행할 수도 있다.

[0252] 트랜스제닉 동물에서 트랜스젠의 발현은 표준 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 서던 블로트 분석 또는 PCR 증폭을 사용하여 트랜스젠의 통합을 확인할 수 있다. 이어서, mRNA 발현 수준은 계내 혼성화, 노던 블로트 분석, PCR, 또는 면역세포화학과 같은 기술을 사용하여 분석할 수 있다.

[0253] 동물은 또한 예를 들어 특정 조직 내로의 면역 세포의 침윤을 결정하는 조직학적 조사에 의해 면역 질병 병리학의 징후에 대해 추가로 조사할 수 있다. 또한, 화합물의 T 세포 증식 자극 또는 억제 정도를 결정하기 위해 본 발명의 화합물로 트랜스제닉 동물을 처리하는 차단 실험을 수행할 수 있다. 이들 실험에서, 상기 설명된 바와 같이 제조된 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 차단 항체를 동물에게 투여하고, 면역 기능에 대한 효과를 결정한다.

[0254] 방법으로, 본원에서 확인된 폴리펩티드를 코딩하는 내인성 유전자와 동물의 배아 세포 내로 도입된 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 변경된 게놈 DNA 사이의 상동성 재조합의 결과로 본원에서 확인된 폴리펩티드의 결합 또는 변경 유전자를 갖는 "녹아웃" 동물을 제조할 수 있다. 예를 들어, 특정 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있다. 특정 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA의 일부를 삭제하거나 다른 유전자, 예를 들어 통합을 모니터링하기 위해 사용될 수 있는 선택가능 마커를 코딩하는 유전자로 대체할 수 있다. 일반적으로, 수 킬로베이스의 비변형된 플랭킹 (flanking) DNA (5' 및 3' 모두에)가 벡터에 포함된다 [예를 들어, 상동성 재조합 벡터에 대한 설명은 문헌 (Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987)) 참조]. 상기 벡터는 배아줄기세포주 내로 (예를 들어 전기천공에 의해) 도입되고, 도입된 DNA가 내인성 DNA와 상동성 재조합된 세포를 선택한다 [예를 들어, Li et al., Cell, 69:915 (1992) 참조]. 이어서, 선택된 세포는 동물 (예를 들어, 마우스 또는 래트)의 포배에 주사되어 응집 키메라를 형성한다 [예를 들어, [Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152] 참조]. 이어서, 키메라 배아는 적합한 가임신 (pseudopregnant) 암컷 대리모 동물에 착상되고, 태아는 분만하여 "녹아웃" 동물을 생산할 수 있다. 그의 생식 세포에 상동성 재조합 DNA를 보유하는 자손체는 표준 기술에 의해 확인되어 동물의 모든 세포가 상동성 재조합 DNA를 보유하는 동물을 번식시키기 위해 사용될 수 있다. 녹아웃 동물은 예를 들어 특정 병태에 대해 방어하는 능력 및 폴리펩티드의 부재에 의한 병태 발생에 대해 특성화될 수 있다.

[0255] I. 면역보조제 요법

[0256] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역자극 화합물은 종양 (암)의 치료를 위한 면역보조제 요법에 사용될 수 있다. T 세포가 인간 종양 특이적 항원을 인식한다는 것은 이제 잘 확립된 사실이다. 유전자의 MAGE, BAGE 및 GAGE 패밀리에 의해 코딩되는 종양 항원의 한 군은 모든 성인 정상 조직에서 미발현 상태이지만, 흑색종, 폐 종양, 두경부 종양, 및 방광 암종과 같은 종양에서 유의한 양으로 발현된다 (DeSmet, C. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7149). T 세포의 동시자극은 종양 퇴행 및 항종양 반응을 시험관 내 및 생체 내 모두에서 유도하는 것으로 밝혀졌다 ([Melero, I. et al., Nature Medicine (1997) 3:682]; [Kwon, E. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:8099]; [Lynch, D. H. et al., Nature Medicine (1997) 3:625]; [Finn, O.J. and Lotze, M. T., J. Immunol. (1998) 21:114]). 본원에서 제시되는 데이터는 TIGIT 발현이 유방암 종양에서 면역 세포 침윤과 상호관련됨을 보여준다. 또한, TIGIT는 DC 및 다른 면역 세포의 증식을 억제하고 상기 세포로부터 전염증성 시토킨 생산을 억제하는 것으로 본원에서 입증되었다. 따라서, 종양 면역 침윤 세포에서의 TIGIT 과다발현은 비정상적인 것일 수 있고, 그 이유는 종양에서 감소된 T 세포 활성화는 바람직하지 않기 때문이다. TIGIT 길항제 및/또는 TIGIT-PVR 신호전달 상호작용의 길항제 (즉, PVR 길항제)는 T 세포 증식/활성화 및 종양 항원에 대한 항종양 반응을 자극하기 위해 어쥬번트로서 단독으로 또는 성장 조절제, 세포독성제 또는 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 성장 조절제, 세포독성제, 또는 화학치료제는 공지의 투여 방식을

사용하여 통상적인 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 TIGIT-길항성 및 TIGIT 활성-길항성 화합물에 의한 면역 자극 활성은 성장 조절제, 세포독성제, 또는 화학치료제의 양을 감소시키고, 이에 의해 환자에 대한 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있다.

[0257] J. 약물 후보물질에 대한 스크리닝 분석

[0258] 약물 후보물질에 대한 스크리닝 분석은 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 단편에 결합하거나 이와 복합체를 형성하거나, 또는 코딩되는 폴리펩티드와 다른 세포 단백질의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하기 위해 고안된다. 상기 스크리닝 분석은 화학물질 라이브러리의 고효율 (high-throughput) 스크리닝이 가능하여 소분자 약물 후보물질의 확인에 특히 적합한 분석을 포함할 것이다. 고려되는 소분자는 합성 유기 또는 무기 화합물, 예를 들어 펩티드, 바람직하게는 가용성 펩티드, (폴리)펩티드-면역글로불린 융합체, 및 특히 항체, 예를 들어 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 및 항체 단편, 단일쇄 항체, 항-개별특이형 항체, 및 상기 항체 또는 단편의 키메라 또는 인간화 형태, 및 인간 항체 및 항체 단편 (이로 제한되지 않음)을 포함한다. 분석은 당업계에 잘 특성이 결정된 다양한 방식, 예를 들어 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석 및 세포 기반 분석으로 수행될 수 있다. 모든 분석은 두 성분이 상호작용하기에 충분한 조건 하에서 충분한 시간 동안 약물 후보를 본원에서 확인된 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 접촉시킬 것을 필요로 한다는 점에서 공통적이다.

[0259] 결합 분석에서, 상호작용은 결합이고, 형성된 복합체는 반응 혼합물에서 단리 또는 검출될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 약물 후보는 공유 또는 비-공유 부착에 의해 고정, 예를 들어 미세적정 플레이트 상에 고정된다. 비-공유 부착은 일반적으로 폴리펩티드 용액으로 고체 표면을 코팅하고 건조시킴으로써 달성된다. 별법으로, 폴리펩티드에 특이적인 고정된 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체를 사용하여 폴리펩티드를 고체 표면에 고정시킬 수 있다. 분석은 검출가능한 표지로 표지될 수 있는 비-고정된 성분을 고정된 성분, 예를 들어 고정된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가함으로써 수행된다. 반응이 완료되면, 비-반응된 성분은 예를 들어 세척에 의해 제거되고, 고체 표면 상에 고정된 복합체가 검출된다. 본래 비-고정된 성분이 검출가능한 표지를 보유하는 경우에, 표면에 고정된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 본래 비-고정된 성분이 표지를 보유하지 않을 경우에, 복합체 형성은 예를 들어 고정된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0260] 후보 화합물이 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 특정 단백질과 상호작용을 하지만 결합하지는 않는 경우, 그의 단백질과의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용의 검출을 위해 당업계에 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다. 상기 분석은 전통적인 방법, 예를 들어 가교결합, 동시-면역침전, 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 동시-정제를 포함한다. 또한, 단백질-단백질 상호작용은 문헌 [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)]에 개시된 바와 같이 문헌 [Fields and Song, Nature (London) 340, 245-246 (1989)]; [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)]에 기재된 효모-기반 유전자 시스템을 사용하여 모니터링할 수 있다. 많은 전사 활성제, 예를 들어 효모 GAL4는 2개의 물리적으로 분리된 모듈형 도메인으로 구성되고, 상기 도메인 중의 하나는 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 다른 하나는 전사 활성화 도메인으로 기능한다. 상기 문헌에 기재된 효모 발현 시스템 (일반적으로 "이중 하이브리드 (two-hybrid) 시스템"으로 불림)은 상기 특성을 이용하고, 2개의 하이브리드 단백질을 사용하며, 여기서 한 단백질에서 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합되고, 다른 단백질에서는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합된다. GAL4-활성화된 프로모터의 조절 하에서의 GAL1-lacZ 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 의해 결정된다. 상호작용하는 폴리펩티드를 함유하는 콜로니는  $\beta$ -갈락토시다제에 대한 발색 기질을 사용하여 검출된다. 이중 하이브리드 기술을 사용하여 두 특이적인 단백질 사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하기 위한 완전한 키트 (MATCHMAKER™)는 클론테크 (Clontech)로부터 상업적으로 이용가능하다. 또한, 상기 시스템은 특정 단백질 상호작용에 관련되는 단백질 도메인의 매핑 (mapping) 및 이들 상호작용에 중요한 아미노산 잔기 위치의 정확한 제시로까지 확장될 수 있다.

[0261] 본원에서 확인된 유전자 및 다른 세포내 또는 세포외 성분의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하기 위해서, 두 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 하에서 및 시간 동안 유전자 생성물 및 세포내 또는 세포외 성분을 함유하는 반응 혼합물을 제조한다. 시험 화합물이 결합을 억제하는 능력을 시험하기 위해서, 시험 화합물의 부재 및 존재 하에서 반응을 진행시킨다. 또한, 양성 대조군으로 사용하기 위해 위약을 제3 반응 혼합물에 첨가할 수 있다. 혼합물에 존재하는 시험 화합물과 세포내 또는 세포외 성분 사이의 결합 (복합체 형성)은 상기 설명된 바와 같이 모니터링된다. 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물이 아니라 대조 반응(들)에서 복합체

가 형성되면, 이것은 시험 화합물이 시험 화합물과 그의 반응 파트너의 상호작용을 방해함을 나타낸다.

[0262] K. 면역 관련 질병의 치료를 위한 조성물 및 방법

[0263] 면역 관련 질병의 치료에 유용한 조성물은 면역 기능, 예를 들어, T 세포 증식/활성화, 림포킨 방출, 또는 면역 세포 침윤을 억제 또는 자극하는 단백질, 항체, 유기 소분자, 펩티드, 포스포펩티드, 안티센스 및 리보자임 분자, 삼중 나선 분자 등을 비제한적으로 포함한다.

[0264] 예를 들어, 안티센스 RNA 및 RNA 분자는 표적 mRNA에 혼성화하고 단백질 번역을 억제함으로써 mRNA의 번역을 직접 차단하는 작용을 한다. 안티센스 DNA가 사용될 경우, 번역 개시 부위로부터 유도된 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 예를 들어 표적 유전자 뉴클레오티드 서열의 약 -10 내지 +10 위치가 바람직하다.

[0265] 리보자임은 RNA의 특이적인 절단을 촉매할 수 있는 효소 활성의 RNA 분자이다. 리보자임은 상보성 표적 RNA에 대한 서열 특이적 혼성화, 이어서 뉴클레오티드 내부 분해 (endonucleolytic)에 의한 절단에 의해 작용한다. 잠재적인 RNA 표적 내의 특이적인 리보자임 절단 부위는 공지된 기술로 확인할 수 있다. 추가의 상세한 내용은 예를 들어 문헌 [Rossi, Current Biology 4, 469-471 (1994)] 및 PCT 공개 WO 97/33551 (1997년 9월 18일 공개)을 참고한다.

[0266] 전사 억제를 위해 사용되는 삼중 나선 형성시의 핵산 분자는 단일 가닥이고, 데옥시뉴클레오티드로 구성되어야 한다. 상기 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 일반적으로 이중체의 한 가닥 상에 퓨린 또는 피리미딘의 상당한 크기의 스트레치를 필요로 하는 후스틴 (Hoogsteen) 염기쌍 규칙을 통해 삼중 나선 형성을 촉진하도록 설계된다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 PCT 특허 공개 WO 97/33551를 참고한다.

[0267] 상기 분자는 상기 논의한 임의의 하나 이상의 스크리닝 분석 또는 이들의 조합에 의해 및/또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 스크리닝 기술에 의해 확인할 수 있다.

[0268] L. 항-TIGIT 항체

[0269] 본 발명은 추가로 항-TIGIT 항체를 제공한다. 예시적인 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적, 및 이중접합체 항체를 포함한다. 본 발명이 다른 폴리펩티드에 대한 항체 (즉, 항-PVR 항체)를 또한 제공하고, 항-TIGIT 항체의 생성 방법, 생산, 변형, 용도 또는 다른 측면에 대해 본원에서 구체적으로 제시된 임의의 설명을 다른 비-TIGIT 폴리펩티드에 특이적인 항체에도 적용할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0270] 1. 폴리클로날 항체

[0271] 항-TIGIT 항체는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다. 폴리클로날 항체의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 면역화제 및 필요한 경우 어쥬번트의 1회 이상의 주사에 의해 포유동물에서 생성시킬 수 있다. 일반적으로, 면역화제 및/또는 어쥬번트는 다중 피하 또는 복강내 주사에 의해 포유동물에게 주사될 것이다. 면역화제는 TIGIT 폴리펩티드, 또는 그의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 면역화되는 포유동물에 면역원성인 것으로 알려진 단백질에 면역화제를 접합하는 것이 유용할 수 있다. 상기 면역원성 단백질의 예는 키홀 림펫 (keyhole limpet) 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 및 대두 트립신 억제제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 어쥬번트의 예는 프로인트 (Freund) 완전 어쥬번트 및 MPL-TDM 어쥬번트 (모노포스포릴 리피드 A, 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험을 실시하지 않으면서 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0272] 2. 모노클로날 항체

[0273] 항-TIGIT 항체는 별법으로 모노클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물은 전형적으로 면역화제에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 면역화제로 면역화된다. 별법으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다.

[0274] 면역화제는 일반적으로 TIGIT 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요구될 경우 말초 혈액 림프구 ("PBL")가 사용되거나, 비-인간 포유동물 공급원이 요구될 경우 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 림프구는 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 대체로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설

치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 대체로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적합한 배지에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 모 세포에 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 일반적으로 히포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 ("HAT 배지")를 포함할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제한다.

[0275] 바람직한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 보다 바람직한 불멸화 세포주는 예를 들어 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스)으로부터 얻을 수 있는 쥐 골수종 주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체 생성을 위해 설명된 바 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]).

[0276] 이어서, 하이브리도마 세포를 배양하는 배양 배지를 폴리펩티드에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사 면역 측정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 결정한다. 상기 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)].

[0277] 목적하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회석 과정에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 (Goding, 상기 문헌)으로 성장시킬 수 있다. 상기 목적에 적합한 배지는 예를 들어 돌베코 개질 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 별법으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 복수로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.

[0278] 하위클론에서 분리되는 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 과정, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리 또는 정제될 수 있다.

[0279] 또한, 모노클로날 항체는 미국 특허 4,816,567에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 쉽게 단리되고, 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 서열을 결정한다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로 작용한다. 일단 단리된 DNA는 발현 벡터에 삽입되고, 이 벡터는 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해, 본래 면역글로불린 단백질 생성하지 않는 숙주 세포, 예를 들어 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포를 형질감염시킨다. 또한, DNA는 예를 들어 상동성 쥐 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 4,816,567; Morrison et al., 상기 문헌), 비-면역글로불린 폴리펩티드의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유결합시킴으로써 변형시킬 수 있다. 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드가 본 발명의 항체의 불변 도메인을 대신하거나, 본 발명의 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인을 대신하여 키메라 2가 항체를 생성시킬 수 있다.

[0280] 항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체의 제조 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 면역글로불린 경쇄 및 변형 중쇄의 재조합 발현을 수반한다. 중쇄는 중쇄 가교결합을 방지하기 위해서 일반적으로 Fc 구역의 임의의 지점에서 말단 절단된다. 별법으로, 관련 시스템인 잔기는 다른 아미노산 잔기로 대체되거나 결실되어 가교결합을 방지한다.

[0281] 1가 항체를 제조하기 위해 시험관내 방법도 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하기 위한 항체의 소화는 당업계에 공지된 일상적인 기술을 사용하여 달성할 수 있다.

[0282] 3. 인간 및 인간화 항체

[0283] 본 발명의 항-TIGIT 항체는 추가로 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비-인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 인간화 형태는 비-인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬, 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수여자의 상보성 결정 구역 (CDR)의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여 항체)을 포함

한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 구역은 비인간 면역글로불린의 CDR 구역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 구역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 FR 구역에 대응한다. 인간화 항체는 또한 적어도 일부의 면역글로불린 불변 구역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 일부의 대응 구역을 포함하는 것이 최적일 것이다 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature. 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]).

[0284] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 그 내부에 비-인간으로부터 유도된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 것이다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "도입 (import)" 잔기로서 종종 언급되고, 일반적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 윈터 (Winter) 등의 방법 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 대응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0285] 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다 ([Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]). 또한, 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 문헌 [Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법을 이용할 수 있다. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 로커스를 내인성 면역글로불린 유전자 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물, 예를 들어 마우스 내로 도입함으로써 생성시킬 수 있다. 시험 접종 시에, 인간 항체 생산이 관찰되고, 이것은 유전자 재배열, 회합 및 항체 레파토리를 포함하여 모든 면에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 상기 방법은 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 및 [Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature. 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature. 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-51 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnology. 14: 826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)]).

[0286] 또한, 항체는 상기 설명된 바와 같이 공지의 선택 및/또는 돌연변이 유발 방법을 사용하여 친화도를 성숙시킬 수 있다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 그로부터 성숙 항체가 제조되는 출발 항체 (일반적으로 쥐, 인간화 또는 인간)보다 5배, 보다 바람직하게는 10배, 훨씬 더 바람직하게는 20 또는 30배 더 큰 친화도를 갖는다.

[0287] 4. 이중특이적 항체

[0288] 이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다. 본 발명에서, 결합 특이성 중 하나는 TIGIT에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원, 바람직하게는 세포-표면 단백질 또는 수용체 또는 수용체 하위단위에 대한 것이다.

[0289] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 제조법 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 [Millstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (쿼드로마 (quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하는데, 이 중에서 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 정확한 분자의 정제는 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행된다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0290] 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 바람직하게는 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 구역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 구역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 필요한 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이중특이적 항체를 생성하는

추가 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0291] WO 96/27011에 기재된 다른 방법에 따르면, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 비율을 최대화하도록 처리될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 구역의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예, 타이로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치 않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키기 위한 기전을 제공한다.

[0292] 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)로서 제조될 수 있다. 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결기를 이용하여 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]에서는 무순상 항체가 단백질 분해 방식으로 절단되어 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비소산나트륨의 존재 하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 머캡토에틸아민으로 환원시켜 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로서 사용할 수 있다.

[0293] Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')<sub>2</sub> 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 따로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관 내에서 유도 화학 커플링 반응시켰다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0294] 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 구역에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 재산화되어 항체 이중이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용할 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 다른 기전을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인은 다른 단편의 상보성 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인과 페어링하고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 ([Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조).

[0295] 2가 초과 항체가 고려된다. 하나의 비제한적인 예로서, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)).

[0296] 예시적인 이중특이적 항체는 본원에 설명되는 TIGIT 폴리펩티드의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 별법으로, 항-TIGIT 아암 (arm)은 세포성 방어 기전을 특정 TIGIT 폴리펩티드를 발현하는 세포에 집중하도록, 백혈구 상의 촉발 분자, 예를 들어 T-세포 수용체 분자 (예를 들어 CD2, CD3, CD28, 또는 B7), 또는 IgG의 Fc 수용체 (FcγR), 예를 들어 FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)에 결합하는 아암과 조합될 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 특정 TIGIT 폴리펩티드를 발현하는 세포에 편재시키기 위해 사용할 수 있다. 이들 항체는 TIGIT-결합 아암, 및 세포 독성제 또는 방사성 핵종 킬레이터, 예를 들어 EOTUBE, DPTA, DOTA, 또는 TETA에 결합하는 아암을 갖는다. 관심있는 다른 이중특이적 항체는 TIGIT 폴리펩티드에 결합하고, 조직 인자 (TF)에도 결합한다.

[0297] 5. 이중접합체 항체

- [0298] 또한, 이중접합체 항체가 본 발명의 범위 내에 있다. 이중접합체 항체는 2개의 공유연결된 항체로 이루어진다. 그러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 대해 표적화시키기 위해 [미국 특허 4,676,980], 및 HIV 감염의 치료를 위해 [WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP 03089] 제안되었다. 항체는 가교결합체를 수반하는 것을 포함한, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관 내에서 제조할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 면역독소는 디술피드 교환 반응을 이용하여, 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트와 예를 들어 미국 특허 4,676,980에 개시된 것을 포함한다.
- [0299] 6. 효과기 기능 조작
- [0300] 예를 들어, 항체의 암 치료 효과를 향상시키도록 효과기 기능에 관하여 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스템인 잔기(들)이 Fc 구역 내에 도입되어, 상기 구역 내에서 사슬내 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다 ([Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)] 참조). 향상된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체도 또한 문헌 [Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이중 2관능성 가교결합기를 사용하여 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 구역을 갖는 항체는 조작될 수 있고, 그에 의해 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다 ([Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)] 참조).
- [0301] 7. 면역접합체
- [0302] 본 발명은 또한 세포독성제, 예를 들어 화학치료제, 독소 (예를 들어, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.
- [0303] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예를 들어 화학치료제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체", 또는 "ADC"로서 언급됨)를 제공한다.
- [0304] 면역접합체는 암의 치료에서 세포독성제, 즉 세포를 사멸시키거나 성장 또는 증식을 억제하는 약물의 국소 전달을 위해 사용되었다 ([Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549]; [Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146]; [Payne, G. (2003) i 3:207-212]; [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172]; US 특허 4,975,278). 면역접합체는 종양으로의 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 이들 비접합된 약물 물질의 전신 투여는 제거하고자 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 ([Baldwin et al., Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05 (1986)]; [Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera et al. (eds), pp. 475-506]). 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 모두가 이들 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토티렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland et al., (1986) 상기 문헌). 항체-독소 접합체에 사용되는 독소는 세균 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 겔다나마이신 ([Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 ([Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함한 기전에 의한 세포독성 효과에 영향을 줄 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성이 작은 경향이 있다.
- [0305] 제발린 (ZEVALIN®) (이브리투모맵 티옥세탄, 비오젠 (Biogen)/이덱 (Idex))은 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 작용하는 쥐 IgG1 카파 모노클로



날 항체 및 <sup>111</sup>In 또는 <sup>90</sup>Y 방사성 동위원소로 이루어진 항체-방사성 동위원소 접합체이다 ([Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발된 은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 마이로타그 (MYLOTARG™) (갬투주맵 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스 (Wyeth Pharmaceuticals)) (칼리케아미신에 연결된 huCD33 항체로 이루어진 항체-약물 접합체)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 ([Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). 칸투주맵 메르탄신 (이뮤노젠, 인크. (Immunogen, Inc.)) (디술피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체-약물 접합체)은 CanAg를 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 및 기타 암의 치료를 위해 개발되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜 (Millennium Pharm.), 비지엘 바이올로지스 (BZL Biologics), 이뮤노젠, 인크.) (메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체-약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 오리스타틴 펩티드, 오리스타틴 E (AE) 및 모노메틸오리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)은 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 Lewis Y에 특이적임) 및 cAC10 (혈액 악성종양 상의 CD30에 특이적임)에 접합되었고 (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784), 치료제로서 개발되고 있다.

[0306] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 항체 및 화학치료제 또는 다른 독소를 포함한다. 면역접합체의 생성에 유용한 화학치료제는 본원에서 설명된다 (예를 들어, 상기와 같이). 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaire officinalis*) 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조). 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 다양한 방사성 핵종이 이용가능하다. 그 예는 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, 및 <sup>186</sup>Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2기능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로 피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science. 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0307] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 오로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.

[0308] a. **메이탄신 및 메이탄시노이드**

[0309] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다. 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다 (미국 특허 3,896,111). 이어서, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0310] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 또는 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디술피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체-약물 접합체에서 매

력적인 약물 모이어티이다.

- [0311] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 포함되는 미국 특허 5,208,020; 5,416,064; 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 높은 세포독성을 보이는 것으로 밝혀졌고, 생체 내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 보였다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 쥐 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 쥐 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 설명하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당  $3 \times 10^5$  HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관 내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 보였다.
- [0312] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다 (예를 들어, 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함되는 미국 특허 5,208,020 참조). 1개의 항체 분자에 접합된 평균 3 내지 4개의 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증대시키는 효능을 나타내지만, 심지어 하나의 독소/항체 분자도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증대시킬 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 기술에 의해 합성되거나 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 5,208,020, 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예를 들어 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.
- [0313] 예를 들어 그 개시 내용이 본원에 분명하게 참고로 포함되는 미국 특허 5,208,020 또는 EP 0 425 235 B1; 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 및 미국 특허 출원 10/960,602 (2004년 10월 8일 출원)에 개시된 것을 포함하는, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 많은 연결기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 미국 특허 출원 10/960,602 (2004년 10월 8일 출원)에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다. 연결기는 상기 확인된 특허에 개시된 바와 같은 디술피드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기, 또는 에스테라제 불안정기를 포함하고, 디술피드 및 티오에테르기가 바람직하다. 추가의 연결기를 본원에 기재하고 예시한다.
- [0314] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 2기능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미달-3-(2-피리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미달-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미달 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디술피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미달-3-(2-피리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]), 및 N-숙신이미달-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.
- [0315] 링커는 연결 종류에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성할 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.
- [0316] **b. 오리스타틴 및 돌라스타틴**
- [0317] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 예를 들어 오리스타틴 (미국 특허 5635483; 5780588)에 접합된 항체를 포함한다. 돌라스타틴 및 오리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 [Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584], 항암 (미국 특허 5663149) 및 항진균 활성 [Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents

Chemother. 42:2961-2965]을 갖는 것으로 나타났다. 돌라스타틴 또는 오리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0318] 예시적인 오리스타틴 실시태양은 그 개시내용의 전문이 분명하게 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 10/983,340 (2004년 11월 5일 출원; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")에 개시된, N-말단 연결된 모노메틸오리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF 포함한다.

[0319] 일반적으로, 펩티드-기반 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 잘 알려져 있는 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조할 수 있다. 오리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 US 5635483; US 5780588; 문헌 [Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725]; 및 [Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863]의 방법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784]; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 미국 특허 출원 10/983,340 (2004년 11월 5일 출원) (예를 들어, 링커, 및 링커에 접합된 모노메틸 발린 화합물, 예를 들어 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)을 참고한다.

[0320] c. 칼리케아미신

[0321] 다른 실시태양에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단을 만들 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체의 제조에 대해서는, 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 컴퍼니 (American Cyanamid Company))을 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는  $\gamma$ 1I,  $\alpha$ 2I,  $\alpha$ 3I, N-아세틸- $\gamma$ 1I, PSAG 및  $\Theta$ 1I를 포함하고 이로 제한되지 않는다 ([Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]; 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 다른 항-종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 모두 세포내 작용 부위를 갖고, 형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 물질의 세포 내 흡수는 그들의 세포독성 효과를 크게 향상시킨다.

[0322] d. 다른 세포독성체

[0323] 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양 물질은 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 물질의 패밀리, 및 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 포함한다.

[0324] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르다이 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0325] 본 발명은 항체와 뉴클레오티드 분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0326] 종양의 선택적인 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$ , 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어  $Tc^{99m}$  또는  $I^{123}$ 을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 (spin) 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0327] 방사성 표지 또는 다른 표지를 공지된 방식으로 접합체 내에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하는 화학적 아미노

산 합성에 의해 합성할 수 있다. Tc<sup>99m</sup> 또는 I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> 및 In<sup>111</sup>과 같은 표지가 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 라이신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 요오도젠 (IODOGEN) 방법 (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0328] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2기능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 툴루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science. 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단 가능 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광 불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰-함유 링커 ([Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0329] 화합물은 상업적으로 이용가능한 (예를 들어 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드)로부터; [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 페이지 467-498 참조) 다음 가교결합제 시약을 사용하여 제조된 ADC를 명백히 고려하고 이로 제한되지 않는다: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트).

[0330] e. **항체 약물 접합체의 제조**

[0331] 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)을 통해 항체당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵기와 반응시키는 방법. ADC를 제조하기 위한 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0332] <화학식 I>

[0333] Ab-(L-D)<sub>p</sub>

[0334] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 추가의 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부가 본원에 설명되어 있다. 또한, 그 개시내용의 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 10/983,340 (2004년 11월 5일 출원; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")을 참조한다.

[0335] 일부 실시태양에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글라이신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글라이신-글라이신-글라이신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양 관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택성 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

- [0336] 항체 상의 친핵기는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 라이신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체는 글리코실화된다)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원 가능한 사슬간 디설피드, 즉 시스테인 다리를 갖는다. 항체를 환원제, 예를 들어 DTT (디티오트레이톨)로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 다리는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵기를 형성할 것이다. 아민을 티올로 전환시키는, 라이신과 2-이미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)의 반응을 통해 추가의 친핵기를 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편) 내로 도입될 수 있다.
- [0337] 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵 치환체와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위한 항체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 펄로오데이트 산화 시약으로 산화시켜 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 슈프 (Schiff) 염기 기는 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소화붕소 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시태양에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-펄로오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (Hermanson, Bioconjugate Techniques). 다른 실시태양에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-펄로오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 ([Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 상기 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵기와 반응할 수 있다.
- [0338] 유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵기는 (i) 활성 에스테르, 예를 들어, NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어, 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0339] 별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. DNA의 길이는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 구역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 구역을 포함할 수 있다.
- [0340] 또다른 실시태양에서, 항체를 중앙 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.
- [0341] 8. 면역리포솜
- [0342] 본원에 개시된 항체는 또한 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 ([Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)]; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.
- [0343] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합할 수 있다. 화학치료제 (예를 들어 독소루비신)는 임의로 리포솜 내에 함유된다 ([Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)] 참조).
- [0344] M. 제약 조성물
- [0345] 본 발명의 활성 분자 (예를 들어, TIGIT 폴리펩티드, 항-TIGIT 항체, 각각의 변이체, TIGIT 효능제, TIGIT 길항

제, PVR 효능제 및 PVR 길항제) 및 상기 개시된 스크리닝 분석에 의해 확인된 다른 분자는 제약 조성물의 형태로 면역 관련 질병의 치료를 위해 투여될 수 있다.

[0346] 본 발명의 활성 분자, 예를 들어 폴리펩티드 또는 항체의 치료 제제는 요구되는 정도의 순도를 갖는 활성 분자를 선택적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 보관을 위해 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 투여 대상에게 비독성이고, 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레졸시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀 및 m-크레졸); 낮은 분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0347] 본원에 개시된 스크리닝 분석에 의해 확인된 화합물은 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 유사한 방식으로 제제화될 수 있다.

[0348] 활성 분자를 세포 내로 전달하기 위해 리포펙션 (lipofection) 또는 리포솜이 또한 사용될 수 있다. 항체 단편이 사용되는 경우에, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 구역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 상기 펩티드는 화학적으로 합성하고/하거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)] 참조).

[0349] 본원의 제제는 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 2 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 조성물은 세포독성제, 시토킨 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 상기 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.

[0350] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달계 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀전에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0351] 생체내 투여를 위해 사용되는 제제는 일반적으로 멸균처리된다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0352] 활성 성분의 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미세구) 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 봉입된 항체가 장기간 동안 신체에서 유지될 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성 및 가능하게는 면역원성의 변경을 야기할 수 있다. 관련 기전에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 기전이 티오-디설피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

[0353] N. 치료 방법

- [0354] 본 발명의 폴리펩티드, 항체 및 다른 활성 화합물은 상이한 면역 관련 질병 및 병태, 예를 들어 T 세포 매개 질병, 예를 들어 염증 세포의 조직 내로의 침윤, T-세포 증식의 자극, T-세포 증식의 억제, 시토킨 생산의 증가 또는 감소, 및/또는 혈관 투과성의 증가 또는 감소 또는 그의 억제를 특징으로 하는 질병의 치료에 사용될 수 있음이 고려된다. T 세포 증식 및 시토킨 생산의 조절에서 TIGIT의 역할에 대해 본원에서 개시된 내용에 비추어, TIGIT 발현 및/또는 활성의 조절은 이들 질병의 예방 및/또는 치료에 효과적일 수 있다.
- [0355] 본 발명의 폴리펩티드, 항체 및 다른 화합물에 따라 치료될 수 있는 예시적인 병태 또는 질환은 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 연소성 만성 관절염, 골관절염, 척추관절병증, 전신 경화증 (피부경화증), 특발성 염증성 근육병증 (피부 근육염, 다발성 근염), 쇼그렌 증후군, 전신 혈관염, 사르코이드증, 자가면역 용혈 빈혈 (면역 범혈구감소증, 발작성 야간혈색소뇨증), 자가면역 저혈소판증 (특발성 혈소판 감소 자색반, 면역-매개 저혈소판증), 갑상선염 (그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 연소성 림프구성 갑상선염, 위축 갑상선염), 당뇨병, 면역 매개 신장병 (사구체신염, 세뇨관 간질성 신장염), 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환, 예를 들어 다발성 경화증, 특발성 탈수초성 다발신경병증 또는 길랑-바레 증후군, 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증; 간담즙성 질환, 예를 들어 감염성 간염 (A, B, C, D, E형 간염 및 다른 비간친화성 바이러스), 자가면역 만성 활성 간염, 원발성 담관 간경화증, 육아종성 간염, 및 경화성 담관염, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어 궤양성 대장염; 크론병); 글루텐 민감 장병증, 및 휘플병, 자가면역 또는 면역 매개 피부병, 예를 들어 수포성 피부 질환, 다형홍반 및 접촉성 피부염, 건선; 알레르기 질환, 예를 들어 천식, 알레르기 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증 및 두드러기, 폐의 면역학적 질병, 예를 들어 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증 및 과민증 폐렴; 이식 관련 질환, 예를 들어 이식 거부 및 이식편 대 숙주 질환을 포함한다.
- [0356] 전신 홍반 루푸스에서, 질환의 주요 매개인자는 자가 단백질/조직에 대한 자가반응성 항체의 생성 및 그 이후의 면역-매개 염증의 발생이다. 항체는 직접 또는 간접적으로 조직 손상을 매개한다. T 림프구가 직접 조직 손상에 관련된다고 밝혀지지 않았지만, T 림프구는 자가반응성 항체의 발생에 필요하다. 따라서, 질병의 발생은 T 림프구 의존적이다. 신장, 폐, 근육격계, 피부점막, 눈, 중추신경계, 심혈관계, 위장관, 골수 및 혈액 등의 여러 장기 및 계가 임상적으로 영향을 받는다.
- [0357] 류마티스 관절염 (RA)은 관절 연골의 손상과 함께 여러 관절의 활막이 주로 관련된 만성 전신성 자가면역 염증성 질환이다. 발병기전은 T 림프구 의존적이고, 류마티스 인자, 자가 IgG에 대한 자가항체의 생성과 관련되어 있으며, 결과적으로 면역 복합체가 형성되어 관절액 및 혈액에 높은 수준으로 존재하게 된다. 관절 내에서 이러한 복합체는 림프구 및 단백구가 활막으로 현저하게 침윤되도록 한 후에 활막에서 상당한 변화가 일어나도록 유도할 수 있다: 다수의 호중구가 추가되면서 유사한 세포들이 침윤하면 관절 공간/유액이 변화한다. 영향을 받는 조직은 주로 관절이며, 흔히 대칭적인 패턴으로 나타난다. 그러나, 관절외 질환도 2 가지 주요 형태로 발생한다. 한 형태는 진행성 관절 질환이 진행중인 관절외 병변 및 폐섬유증, 혈관염 및 피부 궤양의 전형적 병변의 발생이다. 제2 형태의 관절외 질환은 이후에 때때로 RA 질환 과정의 후기, 때로는 관절 질환이 사라진 후에 발생하는 소위 펠티 (Felty) 증후군이며, 호중구 감소증, 혈소판 감소증 및 비장비대의 존재를 포함한다. 이는 여러 기관에서 혈관염을 수반할 수 있으며, 경색증, 피부 궤양 및 괴저의 형성을 동반한다. 또한, 환자들에서는 흔히 영향을 받은 관절 바로 위쪽의 피하 조직에서 류마티스성 결절이 일어나고, 결절 후기 단계에서는 혼합 염증 세포 침윤물로 둘러싸인 피사 중심을 갖게 된다. RA에서 발생할 수 있는 다른 증상은 다음을 포함한다: 심막염, 흉막염, 관상 동맥염, 폐섬유증을 동반한 간질성 폐렴, 건성 각결막염 및 류마티스성 결절.
- [0358] 연소성 만성 관절염은 흔히 16세 미만에 시작하는 만성 특발성 염증성 질환이다. 이 표현형은 RA와 몇 가지 유사성이 있다. 류마티스성 인자가 양성인 몇몇 환자들은 연소성 류마티스성 관절염으로서 분류된다. 이 질환은 소수관절성, 다관절성 및 전신성의 3 가지 주요 카테고리로 더욱 분류된다. 관절염은 중증일 수 있고 보통 파괴적이며, 관절 강직 및 성장 지연을 초래한다. 다른 증상으로는 만성 전포도막염 및 전신성 아밀로이드증 (amyloidosis)을 포함할 수 있다. 척추관절병증은 HLA-B27 유전자 생성물의 발현과 몇몇 공통적인 임상적 특징 및 공통된 관련성을 갖는 질환군이다. 이 질환은 다음을 포함한다: 강직성 척추염, 라이터 증후군 (반응성 관절염), 염증성 장질환과 관련된 관절염, 건선과 관련된 척추염, 연소성 척추관절병증 및 비분화 척추관절병증. 구별되는 특징으로는 척추염이 있거나 없는 천장골염; 염증성 비대칭 관절염; HLA-B27과의 관련성 (클래스 I MHC의 HLA-B 로커스의 혈청학적으로 규정된 대립유전자); 안구 염증, 및 다른 류마티스 질환과 관련된 자가항체의 부재가 포함된다. 질환 유도에 중요한, 가장 많이 관련된 세포는 CD8<sup>+</sup> T 림프구이고, 이 세포는 클래스 I MHC 분자가 제시하는 항원을 표적으로 한다. CD8<sup>+</sup> T 세포는 클래스 I MHC 대립유전자 HLA-B27에 대해서 MHC 클래스 I 분자에 의해 발현된 외래 펩티드인 것처럼 반응할 수 있다. HLA-B27의 에피토프는 세균 또는 다른 미생

물의 항원성 에피토프를 모방할 수 있어서 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응을 유도할 수 있음이 가설로 되어 있다. 본원에서 제시되는 바와 같이, TIGIT는 CD8<sup>+</sup> T 세포에서 발현되고, 상기 세포에서 TIGIT 발현 및/또는 활성의 조절은 상기 질병의 증상을 조절하고/하거나 상기 질병을 예방할 수 있다.

- [0359] 전신 경화증 (피부경화증)의 병인은 알려져 있지 않다. 이 질환의 특징은 피부 경화이고, 이는 활성 염증 과정에 의해 유도되기 쉽다. 피부경화증은 국소적 또는 전신적일 수 있고, 혈관 병변은 공통적이고, 미소혈관계에서의 내피세포 손상이 전신성 경화증의 발생의 주요한 초기 사건이며, 혈관 손상은 면역-매개될 수 있다. 피부 병변에서의 단핵세포 침윤물 존재 및 다수의 환자에서의 항-핵 항체의 존재로 면역학적 근거가 제시된다. ICAM-1은 흔히 피부 병변에 있는 섬유모세포의 세포 표면상에서 상향조절되며, 이것은 이들 세포와 T 세포와의 상호작용이 질환의 발병기전에서 역할을 수행할 수 있음을 시사한다. 기타의 관련 기관은 다음을 포함한다: 위장관 (비정상적인 연동운동/운동성을 초래하는 섬유증 및 평활근 위축); 신장 (소구상동맥 및 소엽간동맥에 영향을 주어 결과적으로 신장 피질 혈류를 감소시키는 동심성 내피하층의 내막 증식은 단백뇨, 질소혈증 및 고혈압을 초래함); 골격근 (위축, 간질성 섬유증, 염증); 폐 (간질성 폐렴 및 간질성 섬유증); 및 심장 (수축 밴드 괴사, 반흔형성/섬유증).
- [0360] 피부근육염, 다발성 근염 등을 비롯한 특발성 염증성 근육병증은 근육 약화를 유발하는 병인 불명의 만성 근육염증성 질환이다. 근육 손상/염증은 흔히 대칭적이며 진행적이다. 자가항체는 대부분의 형태와 연관이 있다. 이러한 근염-특이적 자가항체는 단백질 합성에 관여하는 성분, 단백질 및 RNA에 대항하여 이들의 기능을 억제한다.
- [0361] 쇼그렌 증후군은 면역-매개 염증성 및 후속의 눈물샘 및 침샘의 기능적 파괴에서 비롯된다. 상기 질환은 염증성 결합 조직 질환과 관련되거나 그와 동반될 수 있다. 이 질환은 Ro 및 La 항원 (둘 다 작은 RNA-단백질 복합체임)에 대한 자가항체 생성과 관련되어 있다. 병변은 담관 간경화증, 말초 또는 감각 신경병증 및 축지성 자반병을 비롯한 다른 증상 또는 관련 질환과 함께 건성 각결막염, 구강건조증을 유발한다.
- [0362] 전신성 혈관염은 1차 병변이 염증, 및 이환된 혈관에 의해 공급되는 조직의 허혈/괴사/퇴행 및 일부 경우에서 결과적으로 말단 기관 기능부전을 초래하는 후속의 혈관 손상인 질환이다. 또한, 혈관염은 류마티스 관절염, 전신성 경화증 등의 다른 면역 염증 매개성 질환, 특히 면역 복합체 형성과도 관련된 질환의 2차 병변 또는 후유증으로서 발생할 수 있다. 원발성 전신성 혈관염 군에 속하는 질환으로는 전신성 괴사성 혈관염: 결절성 다발 동맥염, 알레르기성 혈관염 및 육아종증, 다발성 맥관염; 베게너 육아종증; 림프종양 육아종증; 및 거대세포 동맥염이 포함된다. 그 밖의 혈관염으로는 피부점막 림프절 증후군 (MLNS 또는 가와사키병), 단리성 CNS 혈관염, 베체트병, 폐색성 혈전맥관염 (뷔르거 (Buerger) 병) 및 피부 괴사성 정맥염이 포함된다. 열거된 혈관염 유형 중 대부분의 발병기전은 주로 혈관벽에서의 면역글로불린 복합체의 침착 및 후속적인 ADCC, 보체 활성화, 또는 둘 다를 통한 염증 반응의 유도에서 비롯된 것으로 여겨진다.
- [0363] 사르코이드증은 체내의 거의 모든 조직에서의 상피양 육아종의 존재를 특징으로 하는 병인 불명의 병태이며, 폐가 관련된다는 점이 가장 공통적이다. 발병기전에는 질환 부위에서 활성화된 대식세포 및 림프양 세포의 존재가, 이들 세포 유형에 의해 방출된 국소적 및 전신적 활성 생성물의 방출로부터 야기되는 후속의 만성 후유증과 함께 포함된다.
- [0364] 자가면역 용혈성 빈혈, 면역성 범혈구감소증 및 발작성 야간혈색소뇨증을 비롯한 자가면역 용혈성 빈혈은 적혈구 (일부 경우에는 혈소판을 비롯한 다른 혈구) 표면에 발현된 항원과 반응하는 항체가 생성되어 야기된 결과이며, 보체 매개 용해 및/또는 ADCC/Fc-수용체 매개 기전을 통해 이러한 항체-코팅 세포를 제거한 결과이다.
- [0365] 다른 임상 환경에서의 혈소판 감소성 자반병 및 면역-매개 혈소판 감소증을 비롯한 자가면역 혈소판 감소증에서, 혈소판 파괴/제거는 혈소판에 부착된 항체 또는 보체 및 후속적인 보체 용해, ADCC 또는 Fc-수용체 매개 기전에 의한 제거의 결과로서 발생한다.
- [0366] 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 연소성 림프구성 갑상선염 및 위축성 갑상선염을 비롯한 갑상선염은 갑상선에 존재하고 흔히 갑상선에 특이적인 단백질과 반응하는 항체를 생성하는, 갑상선 항원에 대한 자가면역 반응의 결과이다. 자발적 모델 (래트 (BUF 및 BB 래트) 및 닭 (비만 닭 품종)); 유도가능한 모델 (티로글로불린, 갑상선 미소체 항원 (갑상선 과옥시다제)을 이용한 동물의 면역화)을 비롯한 실험 모델이 존재한다.
- [0367] I형 당뇨병 또는 인슐린-의존성 당뇨병은 췌장섬 β 세포의 자가면역 파괴이며, 이러한 파괴는 자가항체 및 자가반응성 T 세포에 의해 매개된다. 또한, 인슐린 또는 인슐린 수용체에 대한 항체는 인슐린 비반응성의 표현형



을 생성할 수 있다.

- [0368] 사구체신염 및 세노관 간질성 신장염을 비롯한 면역 매개 신장병은 직접적으로 신장 항원에 대한 자가반응성 항체 또는 T세포의 생성 결과이거나 또는 간접적으로 신장에서 다른 비-신장 항원에 대해 반응성인 항체 및/또는 면역 복합체 침착의 결과로서, 신장 조직에 대한 항체 또는 T 림프구 매개된 손상의 결과이다. 그러므로, 면역 복합체의 형성을 초래하는 다른 면역-매개 질환은 또한 간접적인 후유증으로 면역-매개 신장병을 유도할 수 있다. 직접 및 간접 면역 기전 모두가 신장 조직에서 병변 발생을 생성/유도하는 염증 반응을 초래하여 결과적으로 장기 기능 손상 및 일부 경우에서 신부전으로의 진행을 초래하게 된다. 체액성 및 세포성 면역 기전 모두가 병변의 발병기전에 관련될 수 있다.
- [0369] 다발성 경화증; 특발성 탈수초성 다발성 신경염 또는 길랑-바레 증후군; 및 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경염을 비롯한 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질병은 자가면역 기초를 갖고, 희소돌기아교세포 또는 미엘린에 직접 발생된 손상의 결과로서 신경의 탈수초를 유발하는 것으로 여겨진다. MS에서 질환 유도 및 진행은 T 림프구에 의존적임을 나타내는 증거가 존재한다. 다발성 경화증은 T 림프구 의존성이며 재발-완화형 과정 또는 만성 진행성 과정을 갖는 탈수초 질환이다. 병인은 알려져 있지 않으나, 바이러스 감염, 유전적 소인, 환경 및 자가면역 모두가 기여한다. 병변은 주로 T 림프구 매개된, 소교세포 및 침윤성 대식세포의 침윤물을 함유하고, CD4+T 림프구가 병변에서 우세한 세포 유형이다. 희소돌기아교세포의 세포 사멸 및 후속적인 탈수초 기전은 알려져 있지 않으나, T 림프구에 의해 발생하는 것으로 보인다.
- [0370] 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증 및 과민성 폐렴을 비롯한 염증성 및 섬유성 폐 질환은 조절장애성 면역 염증 반응을 포함할 수 있다. 이러한 반응의 억제제는 치료상 이로운 것이다.
- [0371] 수포성 피부 질환, 다형성 홍반 및 접촉성 피부염을 비롯한 자가면역 또는 면역 매개 피부 질환은 자가항체에 의해 매개되며, 이의 발생은 T 림프구 의존성이다.
- [0372] 건선은 T 림프구 매개 염증성 질환이다. 병변은 T 림프구, 대식세포 및 항원 프로세싱 세포 및 특정 호중구의 침윤물을 함유한다.
- [0373] 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식물 과민증 및 두드러기를 비롯한 알레르기성 질환은 T 림프구 의존성이다. 이들 질환은 주로 T 림프구 유도성 염증, IgE 매개 염증 또는 이 둘 모두의 조합에 의해 매개된다.
- [0374] 이식 거부 및 이식편 대 숙주 질병 (GVHD)을 비롯한 이식 관련 질환은 T 림프구 의존성이며, T 림프구 기능을 억제하면 개선된다.
- [0375] 면역 및/또는 염증 반응의 개입이 이로운 다른 질환으로는 바이러스 감염 (AIDS, A, B, C, D, E형 간염 및 헤르페스를 포함하고 이로 제한되지 않음), 세균 감염, 진균 감염, 및 원생동물 감염 및 기생충 감염 (MLR을 자극하는 분자 (또는 유도체/효능제)는 감염성 물질에 대한 면역 반응을 강화시키기 위해 치료적으로 이용될 수 있음), 면역 결핍 질환 (MLR을 자극하는 분자/유도체/효능제는 유전적, 후천적, (HIV 감염에서와 같은) 감염 유도, 또는 의원성 (즉, 화학치료로 인한) 면역결핍의 병태에 대한 면역 반응을 강화시키기 위해 치료적으로 이용될 수 있음), 및 신생물을 포함하고 이로 제한되지 않는 감염성 질환이다.
- [0376] 일부 인간 암 환자에서 신생 세포 상의 항원에 대한 항체 및/또는 T 림프구 반응이 발생함이 입증되었다. 또한, 신생물 동물 모델에서 면역 반응의 향상은 특정 신생물의 거부 또는 퇴행을 초래할 수 있음이 밝혀졌다. MLR에서 T 림프구 반응을 향상시키는 분자는 신생물에 대한 면역 반응의 향상시에 생체 내에서 유용성을 갖는다. MLR에서 T 림프구 증식성 반응을 향상시키는 분자 (또는 효능 방식으로 동일한 수용체에 영향을 준 소분자 효능제 또는 항체)는 암 치료를 위해 치료 목적으로 사용될 수 있다. 또한, MLR에서 림프구 반응을 억제하는 분자 (즉, TIGIT)는 신생물에 대한 면역 반응을 억제하기 위해 신생물 형성 동안 생체 내에서 기능한다; 상기 분자는 신생 세포 자체에 의해 발현될 수 있거나 또는 그 발현이 다른 세포 내의 신생물에 의해 유도될 수 있다. 그러한 억제성 분자의 길항작용 (항체, 소분자 길항제 또는 다른 수단을 사용한)은 면역 매개 종양 거부를 향상시킨다.
- [0377] 추가로, 전염증성 특성이 있는 분자의 억제는 재관류 손상; 뇌졸중; 심근경색; 죽상경화증; 급성 폐 손상; 출혈 쇼크; 화상; 패혈증/패혈 쇼크; 급성 세노관 괴사; 자궁내막증; 퇴행성 관절 질병 및 체장염에서 치료상 유리할 수 있다.
- [0378] 본 발명의 화합물, 예를 들어, 폴리펩티드, 소분자 또는 항체는 포유동물, 바람직하게는 인간에게 공지의 방법에 따라, 예를 들어 볼러스로서 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입에 의한 정맥내 투여, 근내, 복강내,

뇌척수내, 피하, 관절내, 윤활막내, 경막내, 구강, 국소, 또는 흡입 (비내, 폐내) 경로에 의해 투여된다. 폴리펩티드 및 항체의 정맥내, 피하 또는 흡입 투여가 가장 통상적으로 사용된다.

[0379] 다른 치료 요법인 면역보조제 요법에서, 항암제의 상기 투여가 본 발명의 단백질, 항체 또는 화합물의 투여와 조합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 면역보조제로 치료되는 환자에게는 또한 항암제 (화학치료제)를 투여하거나 또는 방사선 요법을 실시할 수 있다. 상기 화학치료제의 제조 및 투여 계획은 제조자의 지시에 따라 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 또한, 상기 화학치료제의 제조 및 투여 계획은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다. 화학치료제는 면역보조제의 투여 전에 또는 후에 투여될 수 있거나 또는 그와 동시에 투여될 수 있다. 추가로, 항-에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜 또는 항-프로게스테론, 예를 들어오나프리스톤 (EP 616812 참조)이 그 분자에 대해 공지된 투여량으로 투여될 수 있다.

[0380] 또한, CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, 또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 결합하는 항체를 포함하고 이로 제한되지 않는, 다른 면역 질병 연관 또는 종양 연관 항원에 대한 항체를 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 본원에 개시된 동일한 또는 2개 이상의 상이한 항원에 결합하는 2개 이상의 항체를 환자에게 병용 투여할 수 있다. 때때로, 하나 이상의 시토킨을 환자에게 투여하는 것도 유의할 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, TIGIT 폴리펩티드는 성장 억제제와 병용 투여될 수 있다. 예를 들어, 성장 억제제를 먼저 투여한 후, TIGIT 폴리펩티드를 투여할 수 있다. 그러나, 동시 투여 또는 순차적 투여도 고려된다. 성장 억제제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 양이고, 성장 억제제 및 예를 들어 TIGIT 폴리펩티드의 조합 작용 (상승 효과)에 의해 감소될 수 있다.

[0381] 면역 관련 질병의 치료 또는 중증도 완화를 위해, 본 발명의 화합물의 적절한 투여량은 상기 규정된 바와 같은 치료하고자 하는 질병의 종류, 질환의 중증도 및 과정, 물질이 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기시행된 요법, 환자의 임상 병력 및 화합물에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 화합물은 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 기간에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다.

[0382] 예를 들어, 질병의 종류 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속적 주입에 의해서든 상관없이, 약 1 µg/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 내지 20 mg/kg)의 폴리펩티드 또는 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 전형적인 1일 투여량 범위는 상기 언급된 요인에 따라 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 병태에 따라서 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우에, 치료는 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 그러나, 다른 투여 용법도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링한다.

[0383] O. 제품

[0384] 본 발명의 또다른 실시태양에서, 상기 언급된 질환의 진단 또는 치료에 유용한 물질을 함유하는 (예를 들어, TIGIT 분자, TIGIT 효능제, TIGIT 길항제, PVR 효능제, 또는 PVR 길항제를 포함하는) 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 사용설명서를 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 및 시험관이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 병태의 진단 또는 치료에 효과적인 조성물이 존재하고, 멸균 주입구를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개가 있는 정맥내 용액 봉지 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 활성 물질은 대체로 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체이다. 용기 상에 존재하거나 용기에 부착된 사용설명서 또는 라벨은 조성물이 선택된 병태의 진단 또는 치료에 사용됨을 나타낸다. 제품은 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들면, 기타 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 사용설명서가 있는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0385] P. 면역 관련 질병의 진단 및 예후

[0386] 세포 표면 단백질, 예를 들어 특정 면역 관련 질병에서 과다발현되는 단백질 (즉, TIGIT)은 약물 후보물질 또는 질병 치료를 위한 우수한 조절 표적이다. 면역 관련 질병 상태에서 증폭되는 유전자에 의해 코딩되는 분비된 단백질과 함께 상기 단백질은 이들 질병의 진단 및 예후에서 추가의 용도가 존재한다. 예를 들어, 류마티스 관절염 또는 다른 면역 관련 질병에서 증폭되는 유전자의 단백질 생성물에 대해 작용하는 항체는 진단제 또는 예후판단제 (prognostic)로서 사용될 수 있다.

[0387] 예를 들어, 항체 단편을 포함하여 항체는 증폭된 또는 과다발현된 유전자에 의해 코딩되는 단백질 ("마커 유전

자 생성물")의 발현을 정성적으로 또는 정량적으로 검출하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 바람직하게는 검출 가능한, 예를 들어 형광 표지가 부착되고, 결합은 광학현미경, 유동 세포측정, 형광측정, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 모니터링될 수 있다. 상기 기술은 과다발현된 유전자가 세포 표면 단백질을 코딩하는 경우에 특히 적합하다. 그러한 결합 분석은 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 수행한다.

[0388] 마커 유전자 생성물에 대한 항체 결합의 계내 검출은 예를 들어 면역형광 또는 면역전자현미경에 의해 수행될 수 있다. 이를 위해, 조직학적 시료를 환자로부터 제거하고, 표지된 항체는 바람직하게는 항체를 생물학적 샘플 상에 배치함으로써 시료에 적용된다. 또한, 상기 절차를 사용하여, 검사되는 조직 내의 마커 유전자 생성물의 분포를 결정할 수 있다. 매우 다양한 조직학적 방법이 계내 검출을 위해 쉽게 이용될 수 있음을 당업자는 분명하게 알 것이다. 다른 기술, 예를 들어 형광-보조된 세포 분류 (FACS)도 당업계에 공지되어 있다.

[0389] 다음 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되지 않는다.

[0390] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 특허 공개 및 참조 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0391] **실시예**

[0392] **실시예 1: TIGIT의 추가의 특성결정**

[0393] 세포의 Ig 도메인, 타입 1 막횡단 구역, 및 세포내 면역수용체 타이로신-기반 활성화 또는 억제 (ITAM/ITIM) 모티프(들)로 이루어지는 도메인 구조 ([Abbas, A.R. et al. *Genes Immun* 6, 319-31 (2005)]; [Burshtyn, D.N. et al., *J Biol Chem* 272, 13066-72 (1997)]; [Kashiwada, M. et al., *J Immunol* 167, 6382-7 (2001)])를 갖는 TIGIT는 면역 세포에 의해 특이적으로 발현되는 유전자를 표적화하는 게놈 범위 검색 전략에서 이전에 확인되었다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 US20040121370 참조). 인간 TIGIT, 및 마우스 (Genbank에 제출됨), 붉은털 원숭이 (Genbank 기탁 번호 XP\_001107698) 및 개 (Genbank 기탁 번호 XP\_545108)로부터의 상동체의 서열을 도 1에 제시한다. 면역 기능에서 TIGIT의 역할을 추가로 설명하기 위해, TIGIT Ig 도메인을 폴리오바이러스 수용체 (PVR) 단백질 및 PVR-유사 단백질 1-4 (PVRL1-4)의 N-말단 IgV 도메인, 및 CD96 및 CD226의 N-말단 IgV 도메인 (도 2a-2b 참조)에 유사한 것으로서 확인한 상동성 검색을 수행하였다. 이들 단백질의 정렬은 정규 IgV 도메인을 규정하는 고도로 보존된 잔기가 TIGIT에서 보존됨을 보여주었고, 8개의 단백질이 Ig 패밀리의 관련 하위세트를 포함할 수 있음을 추가로 제안하였다. 보존된 V-프레임 잔기는 V-프레임 폴드를 확립하기 위해 중요한 것으로 보였다 (Wiesmann, C. & de Vos, A.M. *Cell Mol Life Sci* 58, 748-59 (2001)). 3개의 하위모티프 ( $V/I^{54}-S/T^{55}-Q^{56}$ ), ( $A^{67}-X(6)-G^{74}$ ) 및 ( $T^{112}-F/Y^{113}-P^{114}-X-G^{116}$ )를 포함하는, 4개의 절대적으로 보존된 잔기 ( $A^{67}$ ,  $G^{74}$ ,  $P^{114}$ , 및  $G^{116}$ ) 및 5개의 보존된 잔기 ( $V/I/L^{54}$ ,  $S/T^{55}$ ,  $Q^{56}$ ,  $T^{112}$  및  $F/Y^{113}$ )를 포함한 8개의 단백질 사이에서 보존되는 많은 잔기가 V-프레임 폴드 부근에서 확인되었다. TIGIT의 경우에, 이들 하위모티프는 종들 사이에서 보존되는 것으로 보이고 (도 1 참조), 다른 현재 설명되는 IgV 도메인 함유 단백질 내에 존재하지 않는다. 이들 보존된 잔기는 PVR, PVR-유사 단백질 1-4, CD96, CD226, 및 TIGIT를 포함하는 PVR-유사 단백질의 클래스를 규정할 수 있다.

[0394] PVRL1-4 및 PVR은 공통의 도메인 구조 (IgV-IgC-IgV)를 공유하는 반면에, CD226 및 CD96에는 막 인접 IgV 도메인이 결여된다. TIGIT는 단일 IgV 도메인으로 구성되는 패밀리의 가장 경제적인 패밀리아이다. 상기 8개의 단백질의 세포내 세그먼트는 PVRL1-3 사이에 공유된 아파딘 결합 모티프 외부에서 서로 제한된 유사성만을 보인다. NECL-1의 관련 IgV 도메인의 결정 구조 (Dong, X. et al., *J. Biol. Chem.* 281: 10610-7 (2006))에 기초할 때, 제1 및 제3 모티프는 각각 B와 C 및 F와 G 베타-가닥 사이의 헤어핀 루프 내에 위치하는 것으로 예측된다. 상기 2개의 루프는 IgV 폴드의 한 말단부에서 서로 인접한다. 제2 모티프는 NECL-1에 대한 동종이량체 계면의 일부 형성에 관여되는 C' 및 C" 베타 가닥을 포함한다. 따라서, TIGIT/PVR 패밀리 내의 관찰된 서열 모티프는 PVR 패밀리 멤버들 사이에서 관찰된 특이적인 동형 및 이형 상호작용에서 일정 역할을 할 수 있다. PVR은 넥틴-유사 단백질로서 이전에 특성결정되었지만, 상기 서열 분석은 대신에 PVR 패밀리 멤버로 간주되어야 하는 것을 제안하고, 여기서, 특정 넥틴 (즉, PVRL1-4)은 PVR 패밀리의 가지로서 분류된다.

[0395] **실시예 2: PVR 리간드의 확인**

[0396] TIGIT에 대한 잠재적인 결합 파트너는 고정된 TIGIT에 결합된 단백질을 찾기 위해 분비된 단백질의 큰 라이브러리를 스크리닝함으로써 확인하였다. 간단히 설명하면, TIGIT의 Fc 융합체 (TIGIT-Fc)는 인간 TIGIT의 아미노산 1-138을 벡터 내로 인간 IgG1의 Fc 구역 바로 앞에 클로닝함으로써 제작하였다 (TIGIT-Fc). Fc γR 결합이 폐지

된 TIGIT-Fc의 별도의 버전은 표준 부위 지정 돌연변이 유발 기술을 이용하여 TIGIT-Fc의 Fc 테일 내로 D256A 및 N297A에서 2개의 돌연변이를 도입함으로써 또한 제작하였다 (TIGIT-Fc-DANA). 생성되는 융합 단백질을 CHO 세포 내에서 일시적으로 발현시키고, 표준 친화도 크로마토그래피 기술을 이용하여 그로부터 정제하였다. 헥사 히스티딘 또는 Fc 태그에 융합된 개별 분비된 단백질의 라이브리리를 Octet 시스템 (포르테바이오 (ForteBio)) 을 이용하여 TIGIT-Fc에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 단백질을 HBS-P (10 mM Hepes, pH 7.4; 0.15M NaCl; 0.005% Surfactant P20) 내에서 결합에 대해 시험하였다. TIGIT-Fc 또는 대조군 Fc 융합 단백질을 항-인간 Fc 바이오센서 상으로 포화까지 로딩하였다. 바이오센서를 버퍼 내에서 세척하고 (30초), 5 µg/mL 단백질을 함유하는 웰 내에 3분 동안 넣고, 다시 30초 동안 세척하였다. 센서를 재로딩하고, 2회의 결합 사이클마다 세척하였다. 결합은 0.2 nm을 초과하는 반응 수준의 증가로서 표시되고, 특이성은 대조군 Fc 융합 단백질에의 비교에 의해 결정하였다. TIGIT에 결합한 단일 단백질이 분석된 1000개 초과 단백질에서 확인되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, 항-인간 Fc 바이오센서 상에 고정된 TIGIT-Fc 융합 단백질은 PVR-Fc 융합 단백질과 특이적으로 상호작용한다. 상기 상호작용의 특이성은 라이브리리 내의 임의의 다른 단백질과 TIGIT의 특이적 상호작용의 결핍에 의해, 및 추가로 다른 Ig 도메인-함유 단백질로 로딩된 바이오센서는 PVR에 대한 반응을 유도하지 않았다는 사실에 의해 지지되었다.

[0397] PVR, PVRL1-4, CD96 및 CD226은 서로 상호작용한다는 것이 이전에 알려졌으므로 ([He, Y. et al., J Virol 77, 4827-35 (2003)]; [Sato-Horikawa, K. et al., J Biol Chem 275, 10291-9 (2000)]; [Bottino, C. et al. J Exp Med 198, 557-67 (2003)]; [Fuchs, A. et al., J Immunol 172, 3994-8 (2004)]; [Reymond, N. et al., J Exp Med 199, 1331-41 (2004)]), TIGIT와 각각의 이들 단백질과의 상호작용은 상기 설명된 바이오센서 시스템을 이용하여 평가하였다. TIGIT-Fc에 대해 상기 설명된 바와 같이 시험할 각각의 단백질에 대한 Fc 융합 단백질을 제작하고 정제하였다. 구체적으로, PVR-유사 단백질 1 (PVRL1)의 아미노산 1-343, PVR-유사 단백질 2 (PVRL2)의 아미노산 1-360, PVR-유사 단백질 3 (PVRL3)의 아미노산 1-411, PVR-유사 단백질 4 (PVRL4)의 아미노산 1-349, CD226의 아미노산 1-259, 또는 CD96의 아미노산 1-500을 인간 IgG1의 Fc 구역 바로 앞에 융합시켰다. 생성되는 Fc 융합 단백질을 TIGIT-Fc에 대한 결합에 대해 시험하였다. PVR-Fc, PVRL3-Fc 및 PVRL2-Fc는 TIGIT-Fc에 결합한 반면, CD226-Fc, CD96-Fc, PVRL1-Fc, 및 PVRL4-Fc는 TIGIT-Fc에 결합하지 않았다 (도 4a). 3개의 관찰된 결합물질 중에서, PVR-Fc가 TIGIT-Fc에 대한 가장 큰 결합을 보였고, 그 다음은 PVRL3-Fc이고, TIGIT-Fc에 대한 3개의 결합 중 최소량은 PVRL2-Fc에서 관찰되었다.

[0398] TIGIT를 발현하는 CHO 세포에 대한 상기 제작된 PVR 패밀리 멤버 Fc 융합체의 결합을 평가하기 위해 FACS 분석을 또한 수행하였다. Fc 융합 단백질을 PBS 내의 NHS-PEO4-비오틴 (피어스)을 사용하여 아민 커플링을 통해 비오틴화하였다. 비오틴-리간드의 결합은 피코에리트린-접합된 스트렙타비딘 (칼태그 (Caltag))을 사용하여 검출하였다. gD 태그에 대한 마우스 모노클로날 항체 (제넨테크 (Genentech))를 AlexaFluor 647 (인비트로젠 (Invitrogen))에 접합시켰다. 항체를 표준 기술을 이용하여 적절한 형광 표지에 접합시켰다. 세포를 제조자의 지시에 따라 염색하였다. 염색 전에, 세포를 적절한 혈청 또는 정제된 IgG로 차단하였다. 획득은 FACSCalibur (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences)) 상에서 수행하고, JoFlo 소프트웨어 (트리 스타, 인크. (Tree Star, Inc.))를 이용하여 분석하였다. 전방 및 측방 산란기로 생활가능 세포를 게이팅하였다. 결과를 도 4ba 내지 4bf에 제시하고, 이는 인공 바이오센서 분석에서 관찰된 결합 패턴이 세포 표면에서 보다 생리학적 환경에서 관찰된 것과 동일하였음을 보여준다.

[0399] PVR-TIGIT, PVRL2-TIGIT 및 PVRL3-TIGIT 결합 상호작용의 강도를 결정하기 위해, 이들 단백질로 안정하게 형질감염된 CHO 세포를 사용하여 직접적 방사성 리간드 결합 분석을 수행하였다. CHO 세포 표면 발현을 위해, TIGIT, PVR, PVRL2, PVRL3, CD226 및 CD96 전장 DNA를 벡터 내로 gD 신호 서열 (MGTAARLGAVILFVVIVGLHGVRG (서열 19)) 및 gD 태그 (KYALADASLKMADPNRFRGKDLPLV (서열 20)) 바로 뒤에 클로닝하였다. 플라스미드를 Lipofectamine LTX (인비트로젠)를 사용하여 CHO 세포 내로 형질감염시켰다. gD-태깅된 단백질의 발현은 Alexa-647 항-gD 접합체를 사용하는 유동 세포측정에 의해 입증하였다. 안정하게 형질감염된 세포주를 사용 전에 순도에 대해 FACS에 의해 2회 분류하였다. 상기 설명된 바와 같이 제작된 Fc-융합 단백질을 Iodogen 방법을 이용하여 요오드화하였다 (<sup>125</sup>I). 결합 연구를 0.1-3 nM 요오드화 리간드를 사용하여 안정한 형질감염체 상에서 삼중으로 수행하였다. 요오드화 단백질을 비표지된 경쟁자 단백질의 연속 희석액 (25 pM - 5 µM)의 존재 하에 4시간 동안 4°C에서 1x10<sup>5</sup> - 2x10<sup>5</sup> 세포와 함께 인큐베이팅하였다. 세포 현탁액을 니트로셀룰로스 막 (밀리포어 (Millipore)) 상으로 수거하고, 광범하게 세척하였다. 건조된 필터를 계수하고, 결합 친화도 (Kd)를 결정하기 위해 NewLigand 1.05 소프트웨어 (제넨테크)를 이용하여 스캐차드 분석을 수행하였다.

[0400] 도 5a 및 5b는 PVR-발현 CHO 세포에 대한 방사성 표지된 TIGIT-Fc 단백질의 결합을 보여준다. 4회 실험에 대한 TIGIT-Fc-PVR 상호작용에 대한 평균 Kd는 3.15 nM이었다. 표 6은 모든 분석의 결과를 표 형식으로 보여준다.

[0401] <표 6>

PVR 패밀리 단백질의 세포 결합. 수용체는 CHO 세포 상에서 발현되었고, 모든 리간드는 -Fc 구성체였다. MFI는 수용체-양성 세포 상에 게이팅한 후 비오틴화된 Fc-리간드를 사용하여 유동 세포측정에 의해 결정하였다. 결합 친화도 (Kd)는 경쟁적 방사성 리간드 결합 분석에 의해 결정하였다. Kd는 (nM)로 표시하고, (\*)로 표시한 경우를 제외하고는 적어도 3회의 독립 분석으로부터의 평균값이다.

수용체	리간드										
	PVR		TIGIT		PVRL2		PVRL3		CD226		CD96
	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI	Kd	MFI
PVR	-	-	+++	1.02	-	-	+++	70.8	+++	114*	+++
TIGIT	++++	3.15	-	-	++	&	+++	38.9	-	-	-
PVRL2	-	-	-	-	-	-	++	14-30	-	-	-
PVRL3	++	-	++	-	+++	3-13	-	-	-	-	-
CD226	+++	119	-	-	+	&	-	-	-	-	-
CD96	+++	37.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++++ MFI>5000

+++ MFI=1000-4999

++ MFI=100-999

+ MFI<100

- 결합 없음

& 특이적 결합, 그러나 Kd는 해명되지 않음

\* 2개 분석의 평균

[0402]

[0403] TIGIT와 PVR의 상호작용은 최고 친화도 (Kd = 1-3 nM)를 나타낸 한편, PVRL3에 대한 TIGIT 결합의 친화도는 약 10-30배 더 낮았다 (Kd = 38.9 nM) (표 6 참조). 방사성 리간드 분석에서 불량한 곡선 피팅 때문에, PVRL2-TIGIT 상호작용에 대한 결합 상수는 결정될 수 없었지만, 그럼에도 불구하고 특이적 결합이 관찰되었고, CHO-TIGIT에 대한 PVRL2-Fc의 보통의 결합을 보여주는 상기 설명된 FACS 데이터와 일치하였고, PVRL2 및 TIGIT 사이의 결합이 저-친화도 상호작용이라는 발견을 추가로 강화하였다. 요오드화 Fc 용합 단백질 (리간드)은 표시된 농도에서 수용체-발현 CHO 세포에 결합하였고, CD226-Fc (CHO-TIGIT에 대해 8 μM; CHO-PVR에 대해 5 μM), TIGIT-Fc (CHO-PVR에 대해 2 μM; CHO-CD226 및 CHO-CD96에 대해 6 μM)의 10배 연속 희석액과 경쟁하였다. 비-특이적 결합을 2000배 과량의 비표지 (cold) 리간드를 사용하여 결정하고, 총 결합으로부터 공제하였다. 경쟁 연구는 TIGIT가 그의 다른 공동-수용체 CD226 및 CD96에 대한 PVR의 상호작용을 효과적으로 차단한 한편, CD226은 TIGIT-PVR 상호작용의 덜 효과적인 억제제임을 보여주었다 (도 6). 상기 데이터는 PVR-CD226 상호작용 (약 115 nM, 문헌 [Tahara-Hanaoka, S. et al. Int Immunol 16, 533-8 (2004)])에 따라)에 비해 PVR-TIGIT 상호작용 (1-3 nM)의 보다 높은 관찰된 친화도와 일치하였다. CD96을 사용한 직접적인 경쟁 연구는 이 단백질의 낮은 발현 때문에 가능하지 않았지만, TIGIT는 CD96-발현 CHO 세포에 대한 PVR 결합을 완전히 억제하였다. 앞서의 경쟁 연구에서는 TIGIT, CD226, 및 CD96이 PVR 상에 공통적인 결합 부위 또는 겹치는 결합 부위를 공유함을 입증하였다. 상기 발견은 PVR의 N-말단 IgV 도메인에 결합하는 항-PVR 항체 D171이 PVR에 대한 TIGIT 및 CD226의 결합을 차단한다는 관찰에 의해 추가로 지지되었다 (도 7).

[0404] **실시예 3: TIGIT 및 PVR의 발현**

[0405] (A) 휴지기 및 활성화된 면역 세포 상에서 TIGIT 및 PVR의 발현

[0406] 면역 세포에 대한 TIGIT 및 PVR의 상대적인 분포 및 발현을 정상 면역 기능에서 이들 2개의 분자의 역할의 표시자로서 평가하고, 생체 내에서 PVR과 상호작용하는 것으로 이전에 알려지고 실시예 2에 제시된 분자인 CD226의 발현에 비교하였다. 보다 초기의 연구에서는 TIGIT의 발현이 다수의 면역 세포 종류 및 조직의 어레이를 가로질러 T 및 NK 세포에 특이적이었음을 보여주었다 (Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005)). 다양한 면역 세포 및 조직에서 생체 외에서 및 활성화 후에 TIGIT의 발현의 추가의 분석을 수행하였다. 도 8a 및 8b에 도시된 바와 같이, TIGIT는 조절 T 세포 (T<sub>reg</sub>)에서 가장 강하게 발현되고, 또한 인간 편도 조직으로부터 T<sub>h</sub> 세포 및 NK 세포에서 고도로 발현된다. TIGIT는 자극되지 않은 NK 세포에서, 활성화된 및 휴지기 기억 T 세포에서, CD8<sup>+</sup> T 세포에서, 및 Th2 및 Th1 세포에서 더 적은 정도로 발현된다. 상기 데이터는 TIGIT가 단리된 휴지기 CD4<sup>+</sup> T 세포에 비해 항-CD3/ICAM-1 및 항-CD3/항-CD28에 의해 활성화된 단리된 CD4<sup>+</sup> T 세포에서 유의하게 과다발현되는 것으로 나타난 미국 특허 공개 US20040121370에 제시된 데이터와 상호관련된다. 이와 반대로,

PVR은 내피 세포, 섬유모세포, 파골세포, 여포상 수지상 세포, 수지상 세포, 및 중앙 세포에서 발현되는 것으로 보고되었다 ([Sakisaka, T. & Takai, Y., *Curr Opin Cell Biol* 16, 513-21 (2004)]; [Fuchs, A. & Colonna, M., *Semin Cancer Biol* 16, 359-66 (2006)]). 상기 데이터는 TIGIT가 면역 반응을 억제할 수 있는 조절 시토 킨을 생산하는 T 세포와 연관됨을 강조한다.

[0407] 실시예 2에 설명된 것과 동일한 방법을 이용하여 상보적인 유동 세포측정 분석을 또한 수행하였다. 인간 TIGIT 에 교차반응하고 PVR과 TIGIT 상호작용을 차단하는 햄스터 항-쥐 TIGIT 항체 (10A7)를 사용하여 인간 생체의 T 세포를 활성화 후에 표면 TIGIT 발현에 대해 검사하였다 (도 9 참조). 표준 기술을 이용하여 햄스터를 쥐 TIGIT-Fc 융합 단백질질을 면역화시키고 그로부터 햄스터-항-마우스 항체를 수득함으로써 항-TIGIT 항체를 생성하였다. 2가지 항체, 즉 10A7 및 1F4가 또한 인간 TIGIT에 특이적으로 결합하고 (데이터를 제시하지 않음), 추가의 실험을 위해 사용하였다. 특히, TIGIT에 대한 1F4 결합이 TIGIT를 발현하는 293 세포의 표면 상에서 TIGIT 에 대한 10A7 결합을 차단하지 않는다 (데이터를 제시하지 않음)는 사실에 의해 증명되는 바와 같이, 10A7 및 1F4는 인간 TIGIT 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 10A7 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열을 표준 기술을 이용하여 결정하였다. 상기 항체의 경쇄 서열은

DIVMTQSPSSLAIVSPGKVTMTCKSSQSLYYSYGVKENLLAWYQQKPGQS  
PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGD  
GTKLEIKR (서열 21)

이고, 상기 항체의 중쇄 서열은

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSG  
IVFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKS EDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQ

[0409] GTLVTVSS (서열 22) 이고, 여기서 각각의 사슬의 상보성 결정 구역 (CDR)은 굵은 문자로 나타낸다. 따라서, 10A7 경쇄의 CDR1은 서열 KSSQSLYYSYGVKENLLA (서열 23)을 갖고, 10A7 경쇄의 CDR2는 서열 ASIRFT (서열 24)를 갖고, 10A7 경쇄의 CDR3은 서열 QQGINNPLT (서열 25)이다. 10A7 중쇄의 CDR1은 서열 GFTFSSFTMH (서열 26)을 갖고, 10A7 중쇄의 CDR2는 서열 FIRSGSIVFYADAVRG (서열 27)을 갖고, 10A7 중쇄의 CDR3은 서열 RPLGHNTFDS (서열 28)을 갖는다.

[0410] 1F4 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열은 5' RACE를 사용하여 결정하였다 (예를 들어, [Ozawa et al., *BioTechniques* 40(4): 469-478 (2006)] 참조). 상기 항체의 경쇄 서열은:

DVVLTQTPLSLVSFGDQVVISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISN  
RFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK  
(서열 29)

이고, 상기 항체의 중쇄 서열은:

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNG  
GTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWG  
QGTSVTVSS (서열 30)

[0412] 이고, 여기서 각각의 사슬의 상보성 결정 구역 (CDR)은 굵은 문자로 나타낸다. 따라서, 1F4 경쇄의 CDR1은 서열 RSSQSLVNSYGN TFLS (서열 31)을 갖고, 1F4 경쇄의 CDR2는 서열 GISNRFS (서열 32)를 갖고, 1F4 경쇄의 CDR3은 서열 LQGTHQPPT (서열 33)을 갖는다. 1F4 중쇄의 CDR1은 서열 GYSFTGHLMN (서열 34)를 갖고, 1F4 중쇄의 CDR2는 서열 LIIPYNGGTSYNQKFKG (서열 35)를 갖고, 1F4 중쇄의 CDR3은 서열 GLRGFYAMDY (서열 36)을 갖는다. RACE 서열결정 방법에 사용된 프라이머는 다음과 같았다: RT-PCR 유전자-특이적 프라이머:

- (i) 중쇄: IgGRace4: TTTYTTGTCCACCKTGGTGCTGC (서열 37);  
 IgGRace2: CTGGACAGGGATCCAGAGTTCC (서열 38);  
 IgGRace7: CARGTCAMDGTCCTGACTGRCTCAG (서열 39);  
 IgGRace1: GAARTARCCCTTGACCAGGC (서열 64);
- (ii) 경쇄: KapRace3: GTAGAAGTTGTTCAAGAAG (서열 40);  
 KapRace2: GAGGCACCTCCAGATGTAAAC (서열 41);  
 KapRace7: CTGCTCACTGGATGGTGGGAAG (서열 42);  
 KapRace1: GAAGATGGATACAGTTGGTGC (서열 43); 및  
 5' RACE 테일 PCR 프라이머:  
 ODC2: GATTCAAATCTCAATTATATAATCCGAATATGTTTACCGGCTCGCTCATGGACCC  
 CCCCCCCCDN (서열 44);  
 ODC3: GAATTCcccccccccccc (서열 45);  
 ODC4: CTCATGGACcccccccccccc (서열 46);  
 ODC5: AAATATAATACcccccccccccc (서열 47);  
 ADC5: AAATATAATACcccccccc (서열 48), 및  
 ADC5X: CTCATGGACcccccccc (서열 49).

[0413]

[0414] 1F4 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 다음과 같은 것으로 결정되었고:

GATGTTGTGTTGACTCAAACCTCACTCTCCCTGTCTGTCAGCTTTGGAGATCAAGT  
 TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGTAAACAGTTATGGGAACACCTTTT  
 TGTCTTGGTACCTGCACAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTTTGGGATT  
 TCCAACAGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGTTCAGGGACA  
 GATTTCACTCAAGATCAGCACAATAAAGCCTGAGGACTTGGGAATGTATTACT  
 GCTTACAAGGTACGCATCAGCCTCCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGGT  
 GAAA (서열 50)

[0415]

드 서열은 다음과 같은 것으로 결정되었다:

, 1F4 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAACCTCAATG  
 AAGATATCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCCATCTTATGAACTGGG  
 TGAAGCAGAGCCATGGAAGAACCCTTGAGTGGATTGGACTTATTATTCCTTACAA  
 TGGTGGTACAAGCTATAACCAGAAGTCAAGGGCAAGCCACATTGACTGTAGA  
 CAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACTTCTGATGACTCT  
 GCAGTCTATTCTGTTCAAGAGGCTTAGGGCTTCTATGCTATGGACTACTGGG  
 GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCA (서열 51).

[0416]

[0417]

인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 버퍼 코트 (buffy coat)로부터 Ficoll-Paque Plus (아머삼 바이오사이언스즈 (Amersham Biosciences)) 상에서 원심분리에 의해 분리하였다. 표시된 세포의 하위세트를 상응하는 MACS 키트 (밀테나이 (Miltenyi))를 사용하여 정제하였다. 분류된 세포의 순도는 유동 세포측정에 의해 입증하였고, 자기 세포 분류에 의해 정제된 세포에 대해 93% 초과로부터 유동 세포측정에 의해 정제된 세포에 대해 98% 초과까지였다. 모든 세포를 염색 전에 10-20%의 적절한 혈청 또는 정제된 IgG로 차단하였다. 분류된 세포 집단 내의 관심있는 단백질의 mRNA 수준을 평가하기 위해 정량적 PCR 분석을 수행하였다. 분류된 세포의 총 RNA를 RNeasy 키트 (퀴아젠 (Qiagen))를 사용하여 분리하고, DNase I (퀴아젠)을 사용하여 소화시켰다. 총 세포성 RNA를 역전사시키고, 7500 서열 검출 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 실시간 TaqMan™ PCR에 의해 삼중으로 분석하였다. 임의 발현 단위는 자극되지 않은 세포를 초과하는 배수-발현으로서 제공된다. TIGIT를 검출하기 위해 사용된 전방향 및 역방향 프라이머는 각각 TGCCAGGTTCCAGATTCCA (서열 52) 및 ACGATGACTGCTGTGCAGATG (서열 53)이고, 사용된 TIGIT 프로브 서열은 AGCCATGGCCGCGACGCT (서열 54)이었다.

[0418]

CD4<sup>+</sup> T 세포를 PBMC로부터 분리하고, 항-CD3 및 항-CD8로 활성화시켰다. 세포 표면-발현된 TIGIT는 자극되지 않은 나이브 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 세포에서 검출가능하지 않은 반면, 자극되지 않은 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 세포는 낮지만 검출가능한 발현이 있었다 (도 10aa 내지 10ab). 도 10aa 내지 10ab에 도시된 바와 같이, TIGIT 발현은 CD4 T 세포의

RA<sup>+</sup> 대 RO<sup>+</sup> 하위세트에서 CD226 발현과 유의하게 상이하였다. PBMC로부터 생체 외에서 직접 분류된 면역 세포 집단 내의 mRNA의 분석에서는 나이브 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 세포 내의 TIGIT 발현에 비해 연구된 다른 세포 종류에서보다 T<sub>reg</sub>, RO, 및 NK 세포에서 TIGIT의 보다 큰 발현을 보여주었다 (도 10b). 항-CD3 및 CD28로 활성화시킨 후, 세포 표면-발현된 TIGIT는 도 10aa 내지 10ab에 도시된 바와 같이 나이브 및 기억 T 세포 집단 모두에서 상향조절되었다. CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 기억 세포는 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 나이브 세포에 비해 활성화 후 24 및 48시간에 유의하게 더 높은 수준의 발현이 있었다 (도 10aa 내지 10ab). CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 기억 세포는 제0일보다 제1일에 5.3배 더 많은 TIGIT mRNA를 발현한 반면, 나이브 세포에서는 제0일에 비해 TIGIT 발현이 단지 1.4배 증가하였다 (도 10c). 제6일에 TIGIT 발현은 검출가능하지 않았다.

[0419] T 세포 상의 TIGIT 발현의 안정성을 또한 평가하였다. 간단히 설명하면, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 세포를 단리하고, 1일 동안 항-CD3/항-CD28로 활성화시켰다. 세포를 CD4<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup> 집단에 대해 FACS에 의해 유동 분류하였다. 분류 후 5일 동안 휴지시킨 후, 세포를 3일까지 항-CD3/항-CD28로 재자극하고, 세포 표면 TIGIT 발현을 FACS에 의해 결정하였다. 별도의 실험에서, 분류된 TIGIT<sup>+</sup> 세포 및 CD4<sup>+</sup> 세포를 100 μl 부피의 상이한 농도의 항-CD3 (0-0.8 μg/mL)이 코팅된 96-웰 플레이트 상에 2 x 10<sup>5</sup> 세포/웰의 밀도로 플레이팅하고, 4일 동안 표준 조건 하에 배양하였다. <sup>3</sup>H-티미딘을 최종 18시간의 인큐베이션 동안 첨가한 후, 세척하였다. 4일의 끝에, 세포를 가용화시키고, 각각의 샘플과 연관된 방사성을 섬광 계수에 의해 측정하였다. 도 12a 및 12b에 도시된 바와 같이, TIGIT 발현이 TIGIT<sup>+</sup> 세포 및 TIGIT<sup>-</sup> 세포 모두에서 유도되었고, 이는 TIGIT<sup>-</sup> 세포가 특정 상황 하에 TIGIT를 발현할 수 있고 TIGIT<sup>+</sup> 세포가 고정된 세포 집단이 아님을 나타낸다.

[0420] 효과기 기억 세포 상에서 보다 높은 수준의 TIGIT 발현을 감안하여, T 세포 하위세트 내의 발현을 더욱 분석하였다. 활성화된 효과기/기억 T 세포 상에서 발현된 동시-자극 또는 동시-억제 분자가 유도된 T<sub>reg</sub> 상에서 종종 발현된다는 사실을 감안하여, T<sub>reg</sub>에서 TIGIT 발현을 평가하였다. T<sub>reg</sub>는 표현형상으로 CD25<sup>hi</sup> 세포로서 규정되고, 전사 인자 FoxP3을 발현하는 것으로 알려져 있다 (Fontenot, J.D. et al., Immunity 22, 329-41 (2005)). 마우스에서, 전사 인자 FoxP3은 T<sub>reg</sub> 집단을 동시-규정하기 위해 사용된다 (Linsley, P.S. et al., Science 257, 792-5 (1992)). 그러나, 모든 활성화된 인간 T 세포가 FoxP3을 발현하기 때문에 (Ziegler SF., Eur J Immunol. 37(1):21-3 (2007)), 상기 연관성은 인간 T 세포에서 유지되지 않는다. 생체 외에서 새로 단리된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> 세포는 TIGIT를 발현한 반면, CD25<sup>-</sup> 세포는 TIGIT의 세포 표면 발현에 대해 음성이었다 (도 R(D)). TIGIT<sup>+</sup> T 세포는 또한 FoxP3 및 GITR을 동시-발현하였다 (도 9 및 10e). 분류된 CD25<sup>+</sup> 세포를 활성화시키면 TIGIT 단백질 발현이 상향조절되었고 (도 10f), mRNA 수준이 6.5-배수 증가하였다 (도 10c 및 10f). TIGIT mRNA의 배수-증가는 T<sub>reg</sub> 및 기억 T 세포에서 동등하였다.

[0421] 공여 PBMC로부터 생체 외에서 직접 분류된 면역 세포로부터 mRNA 수준을 비교하면, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 및 NK 세포는 각각 유의한 TIGIT 발현을 가졌고, 여기서 T<sub>reg</sub>가 최고 발현을 나타냄을 보여주었다 (도 10c). TIGIT 발현은 휴지기 또는 활성화된 B 세포 또는 단핵구에서 관찰되지 않았다 (도 10c 및 데이터를 제시하지 않음). 특히, CD226 (PVR에 대한 또다른 공동-수용체)은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub> 세포에서 상향조절되지 않았고, 이는 TIGIT 대 CD226의 분기하는 조절 역할을 제안한다 (도 11).

[0422] 다른 실험에서, 인간 편도 T (T<sub>TH</sub>) 세포 상의 TIGIT 발현을 상기 설명된 바와 같이 표준 프로토콜에 따라 유동 세포측정을 이용하여 검사하되, 단, FoxP3을 포함한 분석에 대해서는, 세포를 상기 프로토콜에 따라 항체로 염색한 후, 세포를 고정 및 투과화하고, 항-FoxP3 또는 대조군 IgG로 염색하였다. TIGIT 발현은 T<sub>TH</sub> 세포에서 전형적으로 관찰되는 마커인, T 세포에서 CXCR5 및 ICOS의 고수준 동시-발현과 상호관련되었다 (도 8a). 이와 반대로, 이들 세포에서 CD226 (DNAM) 발현은 낮거나 비존재하였다 (도 8a). 고수준의 TIGIT 발현이 CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> IL-17-생산 Th 세포에서 또한 관찰되었다 (도 14). 종합하면, TIGIT는 휴지기 및 활성화된 T 조절 세포, 인간 편도 T<sub>th</sub> 세포, IL17-생산 헬퍼 T 세포, 휴지기 및 활성화된 효과기/기억 T 헬퍼 세포



(CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 세포) 및 NK 세포에 의해 발현되는 것으로 나타났고, 이들 세포의 활성화 시에 추가로 상향조절될 수 있다. CD8<sup>+</sup> 세포는 또한 TIGIT를 발현하고, 상기 발현은 세포 활성화 시에 단지 약간 상향조절된다. CD226은 본원에 제시되고, CD8<sup>+</sup> T 세포에 의해, CD45RA<sup>+</sup> T 세포, 비만 세포, 혈소판, 천연 킬러 (NK) 세포, 활성화된 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T 세포, 및 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 세포 상에서 발현되는 것으로 당업계에서 공지되어 있다. TIGIT는 T<sub>reg</sub> 및 T<sub>H</sub>, 및 휴지기 효과기/기억 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 세포에서 특이적으로 발현되는 반면; CD226은 이들 세포에서 발현되지 않는다.

[0423] (B) 인간 질병에서 TIGIT 및 PVR의 발현

[0424] TIGIT가 면역 세포의 선택된 집단에서 고도로 발현되는 것이 결정되면, 이어서 TIGIT, PVR 및 CD226의 발현 수준을 건선, 염증성 장 질환, 관절염, 천식 및 암을 포함한 상이한 면역 관련 질병 상태로부터의 조직에서 평가하였다. 마이크로어레이-기반 시스템을 연구를 위해 사용하였고, 적절한 마이크로어레이 프로토콜의 설명은 문헌, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 US20080038264에서 찾을 수 있다. 도 15에 도시된 바와 같이, TIGIT의 유의한 발현이 염증이 생기지 않은 조직에 비해 염증이 생긴 인간 윤활막 조직에서 관찰되었고, 류마티스 관절염 조직의 경우에 특히 현저하였다. 염증이 생긴 관절염 조직 샘플 내에서, TIGIT 발현은 대식세포 또는 섬유모세포와 반대로 주로 T 세포와 상호관련된다 (도 15, 우측 패널 참조). 상기 데이터는 TIGIT mRNA 수준의 RT-PCR 분석에 의해 쥐 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 모델에서 더욱 확인되었다 (도 16 참조). 본원에서 사용된 CIA 모델에서, DBA-1J 마우스를 제0일 및 제21일에 100 μl의 완전 프로인트 어쥬번트 (CFA) 내의 100 μg 소 콜라겐 II형으로 피부 내로 면역화시켰다. RNA를 제28, 30 및 40일에 뒷다리의 관절로부터 추출하고, 상기 설명된 바와 같이 TIGIT 및 CD226 발현에 대해 평가하였다. 도 16에 보이는 바와 같이, 증가된 TIGIT 발현이 제40일에 관찰된 한편, CD226 발현은 제40일에 유의하게 하향조절되었다.

[0425] 정상 조직에 비해 TIGIT의 발현의 보다 적은 증가가 건선 조직 샘플 및 염증성 장 질환 조직 샘플에서 관찰되었다. 붉은털 원숭이의 천식 조직 샘플에서 유사한 분석에서는 TIGIT 발현이 정상 대조 조직에 비해 이환된 조직에서 유의하게 상승됨을 보여주었다 (도 17). 유방암 샘플은 또한 정상 유방 조직에 비해 TIGIT의 크게 증가된 발현을 보여주었고, 여기서 상이한 종류의 유방암 조직에서 상이한 양이었다. 도 18b의 상부 패널에 도시된 바와 같이, TIGIT의 최대 발현은 최저 비율의 종양 세포를 갖는 종양 샘플에서 관찰되고, 이는 TIGIT 발현이 종양 세포 자체보다는 종양에 침윤하는 다른 세포와 상호관련됨을 제안한다. 도 18a의 하부 패널은 CD4<sup>+</sup> 세포가 낮은 비율의 종양 세포를 갖는 종양 샘플에서 증가됨을 나타낸다. T<sub>reg</sub> 및 다른 T 세포 하위세트 상에서 TIGIT의 발현에 관한 본원에 제시된 데이터를 감안할 때, 최저 비율의 종양 세포를 갖는 유방 종양 샘플에서 관찰된 높은 수준의 TIGIT 발현은 TIGIT가 면역 세포 종양 침윤물, 가장 가능하게는 T<sub>reg</sub> 침윤물에 의해 발현됨을 제안한다. TIGIT 발현과 유방암 샘플 내의 T 세포의 상호관련성은 TIGIT가 종양 조절에서 일정 역할을 할 수 있음을 제안한다. 예를 들어, 종양은 TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>를 동원/활성화시킴으로써 숙주의 면역 반응을 회피할 수 있다.

[0426] **실시예 4: T-세포 활성화에서 TIGIT의 역할**

[0427] 상기 제시된 T<sub>reg</sub> 및 기억 T 세포에 의한 TIGIT의 고수준의 발현, 및 수지상 세포 상의 PVR의 공지의 발현 (Pende, D. et al., Blood 107, 2030-6 (2006))을 감안하여, TIGIT가 DC 기능을 조정하고 T 세포 활성화를 일으킬 가능성을 조사하였다.

[0428] (A) T 세포 증식을 조절하는데 있어서 TIGIT의 기능

[0429] TNF α로 성숙시킨 단핵구-유래 인간 DC를 사용하여, 혼합 림프구 반응 (MLR) 증식 분석에서 TIGIT-Fc의 영향을 평가하였다. 간단히 설명하면, 인간 총 PBMC (밀테나이 바이오테크 (Miltenyi Biotec))의 음성 선택에 의해 단핵구를 분리하였다. 단핵구 (3 x 10<sup>5</sup> 세포/ml)를 인간 재조합 IL-4 (125 ng/mL, 알앤디 바이오시스템즈 (R&D Biosystems)) 및 인간 재조합 GM-CSF (50 ng/mL, 알앤디 바이오시스템즈)를 보충한, 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 완전 RPMI 1640 배지 내에서 가슴 분위기 내에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 5일 동안 인큐베이션함으로써, 미성숙 단핵구-유래 DC (iMDDC)를 생성하였다. GM-CSF 및 IL-4를 제2일 및 제4일에 신선한 완전 RPMI 1640 배지와 함께 다시 첨가하였다. 5일의 배양 후에, 90% 초과인 세포가 FACS 분석에 의해 입증할 때 미성숙 DC 표현형 (CD14<sup>-</sup>, MHC 클래스 II<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> 및 CD83<sup>low</sup>)을 보였다. 이들 미성숙 DC를 본원에서 LPS,

CD40L, TNF  $\alpha$ , Pam3CSK4 및 TSLP, 및 그들의 성숙을 유도하기 위해 표시된 융합 단백질을 사용한 처리를 위해 사용하였다. MDDC 및 세포주의 표현형 분석을 면역형광에 의해 수행하였다. 세포 표면 염색을 위해 사용된 모노클로날 항체는 PE-표지된 항-CD83, FITC-HLA-DR, PE-항-CD86, 및 FITC-항-CD80을 포함하였다. 모든 인큐베이션은 융합체/항체의 Fc 부분을 통한 결합을 방지하기 위해 10% 인간 AB 혈청의 존재 하에 수행하였다. 표시된 분자를 10  $\mu$ M의 MEK1 억제제 (PD98059), 1  $\mu$ g/mL 항-IL-10 항체, 10  $\mu$ g/ml 항-CD32 항체 또는 10  $\mu$ g/ml 항-TIGIT 항체와 함께 예비인큐베이션 후, TNF  $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/mL)로 자극함으로써 억제제 연구를 수행하였다. 용매 DMSO 또는 인간 IgG를 대조군으로서 사용하였다. 세포 배양 상등액을 16시간 후에 수집하고, ELISA에 의해 IL-12 p40의 생산에 대해 분석하였다.

[0430] T 세포 증식 및 활성화에 대한 차단 항-TIGIT 항체 10A7의 효과를 평가하였다. 항-CD3-활성화된 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 세포를 10A7와 함께 인큐베이션할 때 어떠한 효과도 관찰되지 않았다. T 세포를 자가 CD11c<sup>+</sup> DC와 함께 항-CD3과 함께 배양할 때, T 세포 증식은 2배 증가하였고 (p<0.01), IFN  $\gamma$  생산은 4배 증가하였다 (p<0.001) (도 19c). T 세포 활성화의 이러한 약화는 총 PBMC에서 더 적은 정도로 관찰되었다. 이와 반대로, TIGIT-Fc는 CD11c<sup>+</sup> DC의 존재 하에 T 세포 활성화 (p<0.01) 및 IFN  $\gamma$  생산 (p<0.001)을 유의하게 억제하였다 (도 19d). 총 PBMC를 항-CD3으로 활성화시킬 때, TIGIT-Fc는 선행 실험에서 관찰된 것보다 더 가벼운 효과가 있었고, 이는 세포 상에 존재하는 PVR의 양이 활성화에 중요할 수 있음을 제안한다. TIGIT가 그러한 세포에 결합하지 않으므로, 예상된 바와 같이 T 세포 단독에서는 효과가 관찰되지 않았다. 항-TIGIT 항체 처리는 또한 APC의 존재 하에서만 T 세포 증식의 T<sub>reg</sub> 억제를 차단하는 것으로 밝혀졌다. TIGIT-Fc는 트랜스웰 (transwell) 분석에서 CD11c<sup>+</sup> 세포 기능을 조절하고 나이브 T 세포 증식을 억제하는 것으로 추가로 밝혀졌고, 이는 세포 거동 및 증식의 관찰된 변형은 특이적인 TIGIT 결합으로 인한 것임을 나타낸다. 함께 살펴보면, 이들 데이터는 TIGIT가 APC 상의 리간드, 가장 가능하게는 PVR과의 상호작용을 통해 T 세포 활성화를 조절함을 제안하였다.

[0431] iMDDC 및 TNF  $\alpha$ -성숙시킨 MDDC는 표면 PVR을 발현하였고, 여기서 MDDC가 iMDDC보다 더 높은 수준의 PVR을 발현한다 (도 19a). TNF  $\alpha$ -성숙시킨 MDDC는 또한 자극되지 않은 iMDDC에 비해 T 세포의 증식을 증가시켰다 (도 19b). MLR 분석에서, TIGIT-Fc의 첨가는 증식의 보통이지만 유의한 감소를 일으킨 한편, TNF  $\alpha$  성숙시킨 MDDC에 첨가된 TIGIT-Fc는 증식을 기준선 수준으로 감소시켰다. 증식의 TIGIT-유도된 억제는 항-TIGIT 항체 10A7 또는 항-PVR 항체 TX21의 추가의 포함 시에 방지되었다. 제3일에 측정된 분비된 IL-10 수준은 이소형 대조군을 함유하는 것보다 TIGIT-Fc를 함유하는 배양액 내에서 유의하게 더 높았다 (각각 45 $\pm$ 5 pg/mL 대 29 $\pm$ 8 pg/mL, p=0.04). 항-TIGIT 항체 또는 항-PVR 항체의 포함은 또한 분비된 IL-10의 TIGIT-Fc-유도된 증가를 차단하였다 (데이터를 제시하지 않음). IFN  $\gamma$  수준은 TIGIT-Fc 처리에 의해 감소되었다 (데이터를 제시하지 않음). 함께 살펴보면, 상기 데이터는 TIGIT가 T 세포 활성화를 조절함을 제안하였다.

[0432] 공동배양액 내에서 TIGIT<sup>-</sup> T 세포 증식에 대한 TIGIT<sup>+</sup> T 세포의 영향을 검사하기 위해, 추가의 MLR 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고 5일 동안 활성화시켰다. 제6일에, 세포를 항-CD3/항-CD28로 밤새 재자극하고, FACS에 의해 TIGIT<sup>+</sup> 세포를 TIGIT<sup>-</sup> 세포로부터 따로 분류하였다. TIGIT<sup>-</sup> 세포를 CFSE 표지하고, 배양액 내에 동일한 수의 TIGIT<sup>+</sup> 세포를 갖거나 갖지 않는 제2 공여체로부터 단리된 CD11c<sup>+</sup> 세포와 10:1의 비로 혼합하였다. 시토킨 생산 (IFN  $\gamma$  또는 IL-17)의 루미넥스 분석을 위해 배양 상등액을 제7일에 수집하였다. 세포 증식을 FACS에 의해 분석하였고, 제8일에 CFSE<sup>+</sup> 살아있는 세포에 대해 게이팅하였다. 결과를 도 20a 및 20b에 제시한다. 도 20a에 제시된 바와 같이, TIGIT<sup>+</sup> T 세포는 TIGIT<sup>-</sup> T 세포보다 더 낮은 수준의 IFN  $\gamma$  및 IL-17을 발현하였다. TIGIT<sup>+</sup> T 세포를 TIGIT<sup>-</sup> T 세포와 혼합할 때, 생성되는 배양액은 이들 2가지 시토킨의 생산이 유의하게 더 낮았고, 이는 TIGIT<sup>+</sup> T 세포가 이들 2가지 시토킨의 TIGIT<sup>-</sup> T 세포 생산을 억제함을 나타낸다. TIGIT<sup>+</sup> 세포는 또한 TIGIT<sup>-</sup> T 세포의 증식을 억제하였다 (도 20b). 이는 TIGIT<sup>+</sup> 세포가 실제 조절 세포이고, 억제성 시토킨의 분비를 통해 직접적으로 또는 항원-제시 세포 상의 PVR의 진입을 통해 간접적으로 그들의 반응을 억제시키도록 CD4<sup>+</sup> 세포에 작용할 수 있다는 생각을 추가로 지지한다.

[0433] CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub> 세포는 TIGIT를 특히 고도로 발현한다는 실시예 3(A)의 관찰에 기초하여, 다른 면역 세포의 증식

을 억제하는 T<sub>reg</sub> T 세포 하위세트의 능력을 검사하기 위해 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub> 세포를 제조자의 지시에 따라 MACS 키트 (밀테나이이)를 사용하여 버피 코트로부터 분리하였다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 세포를 또한 분석에 사용할 효과기 T 세포로서 준비하였다. MACS CD3 마이크로비드 (밀테나이이)를 사용하여 앞서 T 세포를 고갈시킨 PBMC에 방사선조사함으로써, 항원-제시 세포 (APC) 집단을 표준 방법에 의해 분리하였다. 분리된 T<sub>reg</sub>, 효과기 T 세포 및 APC를 1:4:4 비로 함께 혼합하고, 0.5 µg/ml 가용형 항-CD3와 함께 인큐베이션하였다. 세포 혼합물을 10 µg/mL의 항-TIGIT 항체 10A7 또는 대조 IgG로 코팅된 웰 내로 플레이팅하고, 4 일 동안 최종 18시간의 인큐베이션 동안 첨가된 [<sup>3</sup>H]-티미딘과 함께 배양하였다. 각각의 웰로부터 세포를 가용화시키고, 각각의 세포 샘플 내의 방사성의 양을 정량하였다. 표시된 % 증식 값은 T<sub>reg</sub> 세포의 부재 하에 효과기 세포에서 관찰된 방사성의 양에 비해 계산하였다. 결과를 도 21a에 제시한다. 대조 IgG로 코팅된 웰에서, 약 55% 세포 증식을 관찰하였고, 이는 TIGIT<sup>+</sup> T 세포가 TIGIT<sup>-</sup> T 세포의 증식을 억제하였다는 상기 실험적인 발견과 일치하였다. 웰 내에 항-TIGIT 항체를 포함시키면 관찰된 증식을 유의하게 증가시켰고, 이는 TIGIT가 억제 효과를 매개한다는 것을 확인한다. 상기 증거는 TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>가 면역 세포 증식 및 기능의 음성 조절자로서 작용할 수 있음을 추가로 제안한다. 실제로, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> TIGIT<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>를 분리하고 나이브 T 세포 증식을 억제하는 그들의 능력에 대해 따로 검사할 때, TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>가 TIGIT<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>보다 나이브 T 세포 증식을 억제하는데 있어서 더 강력한 것으로 밝혀졌다. 간단히 설명하면, TIGIT<sup>+</sup> 및 TIGIT<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>를 FACS에 의해 분리하였다. CD11c<sup>+</sup> 세포를 CD11c-PE (비디 바이오사이언시즈) 및 항-PE 마이크로비드 (MACS)를 사용하여 양성으로 선택하였다. 나이브 T 세포를 U자형 96 웰 플레이트 상에 4 x 10<sup>5</sup>의 밀도로 2 x 10<sup>5</sup> T<sub>reg</sub> 및 0.8x10<sup>5</sup> CD11c<sup>+</sup> 항원 제시 세포와 함께 플레이팅하였다. 도 21b에 도시된 바와 같이, TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>는 TIGIT<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>보다 나이브 T 세포 증식을 억제하는데 있어서 거의 2배 더 강력하였고, 이는 TIGIT<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>가 면역 세포 증식 및 기능의 음성 조절자로서 작용할 수 있다는 발견을 추가로 지지한다.

[0434] **(B) TIGIT의 녹다운**

[0435] 위에서 제작된 gD-태깅된 TIGIT를 발현하는 안정한 세포주 (293-TIGIT 세포)를 사용하여, 이들 세포가 외인성 PVR, 가교결합된 항-TIGIT 모노클로날 항체 10A7과 상호작용 또는 과바나듐산염 (pervanadate) 처리 시에 TIGIT의 인산화를 보이지 않음을 발견하였다. 추가로, 이들 세포의 10A7 처리는 TCR 신호전달에 대해 유의한 효과를 나타내지 않았다. 이들 데이터는 제작된 세포에서 발현된 TIGIT 내의 ITIM 모티프가 기능적이지 않거나, 또는 안정한 세포주가 TIGIT 활성화에 필수적인 하나 이상의 성분이 결여되었음을 제안하였다.

[0436] TIGIT에 대한 세포-고유 기능을 추가로 해명하기 위해, 억제성 RNA (RNAi) 연구를 수행하였다. On-Targetplus 유전자-특이적 siRNA 및 음성 대조군 siRNA를 다마콘 알엔에이아이 테크놀로지 (Dharmacon RNAi Technology)로부터 입수하였다. 인간 CD45RO<sup>+</sup> T 세포를 MACS<sup>TM</sup> 키트 (밀테나이이 바이오테크)를 사용하여 버피 코트로부터 정제하고, CFSE로 표지하였다. siRNA (siRNA<sub>대조군</sub> 또는 siRNA<sub>TIGIT</sub>)를 제조자의 지시에 따라 Nucleofector<sup>TM</sup> 기술 (Amaxxa)를 이용하여 이들 세포 내로 형질감염시켰다. 24시간 후에, 형질감염된 세포를 플레이트-결합된 항-CD3 (5 µg/mL) 단독으로 또는 2 µg/mL 가용형 항-CD28과 함께 활성화시켰다. 일부 세포를 정량적 RT-PCR (qRT-PCR) 또는 FACS 분석을 위해 활성화 후 제2일 또는 제5일에 수집하였다. T 세포 증식은 상기 설명된 바와 같이 제5일에 FACS에 의해 결정하였다. qRT-PCR은 실시예 3(A)에서 상기 설명된 바와 같이 수행하고, 각각의 샘플 내의 RPL-19 mRNA 수준을 내부 대조군으로서 사용하였다. TIGIT 프라이머는 상기 제시되고; 인간 CTLA4 및 CD226 프라이머 및 프로브는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 입수하였다. 쥐 IL-12 및 IL-10의 상이한 증을 검출하기 위해 사용된 프라이머 및 프로브 서열은 다음과 같았다:

mIL-12p40: 전방향 프라이머: 5'- ACATCTACCGAAGTCCAATGCA-3' (서열 55);  
 역방향 프라이머: 5'- GGAATTGTAATAGCGATCCTGAGC-3' (서열 56);  
 프로브: 5'- TGCACGCAGACATTCCCCGCCT-3' (서열 57);  
 mIL-12p35: 전방향 프라이머: 5'- TCTGAATCATAATGGCGAGACT-3' (서열 58);  
 역방향 프라이머: 5'- TCACTCTGTAAGGGTCTGCTTCT-3' (서열 59);  
 프로브: 5'- TGCGCCAGAAACCTCCTGTGG-3' (서열 60);  
 mIL-10: 전방향 프라이머: 5'- TGAGTTTCAGAGCTCCTAAGAGAGT-3' (서열 61);  
 역방향 프라이머: 5'- AAAGGATCTCCCTGGTTTCTC-3' (서열 62);  
 프로브: 5'- TCCCAAGACCCATGAGTTTCTTACA-3' (서열 63).

[0437]

[0438]

TIGIT에 대해 특이적인 RNAi를 사용하여, 정상적으로는 높은 수준의 TIGIT를 발현하는 1차 인간 CD45RO<sup>+</sup> T 세포에서 TIGIT 발현을 특이적으로 녹다운시켰다 (도 10aa 내지 10ab). 상기 방법을 이용하는 TIGIT 녹다운의 효능을 qRT-PCR 및 FACS 분석에 의해 평가하였다 (도 28a, 28b 및 표 7). 처리 제2일째에, TIGIT 전사가 스크램블된 (scrambled) siRNA<sub>대조군</sub>에 비해 siRNA<sub>TIGIT</sub> 처리에 의해 >90% 감소한 반면, CTLA4 mRNA (대조군 단백질)은 처리에 의해 변하지 않았다. TIGIT mRNA의 감소는 T 세포의 25% 내지 <2%의 평균으로 세포 표면 TIGIT의 감소를 일으켰다 (도 28b). 제5일에, 이들 동일한 세포 내의 TIGIT 발현은 대조군 세포에서의 발현에 비해 70% 감소하였다 (도 28a 및 28b, 및 표 7). TIGIT의 녹다운은 항-CD3 (최적 미만 또는 최적 농도에서) 또는 항-CD3 + 항-CD28에 반응하여 T 세포 증식에 대해 유의한 효과를 미치지 않았다 (도 28c). 유사하게, TIGIT의 녹다운은 또한 시토킨 IL-2, IL-4, IL-10, 또는 IFN- $\gamma$ 의 생산에 관찰된 영향을 미치지 않았다 (도 28e). 또한, 세포를 항-TIGIT 항체 10A7로 처리하면 상기 설명된 바와 동일한 조건 하에 TIGIT를 발현하는 T 세포의 활성화에 대한 영향이 관찰되지 않았다 (도 28d).

[0439]

<표 7>

**TIGIT RNAi 녹다운 효율**

C <sub>T</sub> *	siRNA <sub>대조군</sub>		siRNA <sub>TIGIT</sub>	
	제2일	제5일	제2일	제5일
<b>TIGIT mRNA</b>	23.3 ± 0.1	24.0 ± 0.0	31.2 ± 0.6	29.8 ± 0.1
<b>CTLA4 mRNA</b>	27.2 ± 0.4	24.3 ± 0.3	27.6 ± 0.3	23.8 ± 0.3

\* C<sub>T</sub> 값은 TIGIT 또는 CTLA4에 대해 C<sub>T</sub> 값 ± 표준 편차로서 주어진다.

[0440]

[0441]

**실시예 5: 시토킨 생산에 대한 TIGIT의 효과**

[0442]

TIGIT가 T 세포 성숙에 대한 상기 설명된 일반적 효과 이외에 다른 DC에 대한 직접적 효과를 갖는지 결정하기 위해, TIGIT-Fc의 존재 및 부재 하에 DC 성숙 및 기능을 평가하였다. 혼합형 T 세포 집단에서 IFN $\gamma$  및 IL-17 생산을 조절하는 TIGIT의 능력에 관한 실시예 4의 결과는 TIGIT-Fc로 처리된 DC에 의한 시토킨 생산의 추가의 연구가 수행되어야 함을 제안하였다. 처리되지 않은 T 세포를 음성 선택 (CD4 T 세포 단리 키트, 밀테나이 바이오테크)에 의해 >95%의 순도로 정제하였다. 세포를 표준 영양 보충제를 함유한 완전 RPMI 1640 배지 내에 재현탁시켰다. 동종이형 T 세포 (2 x 10<sup>5</sup>)를 iMDDC 및 MDDC의 부재 (배지 단독) 또는 존재 하에 표시된 비로 96-웰 U자형 마이크로플레이트 (닝크 (Nunc)) 내에서 웰당 200  $\mu$ l의 배지 내에서 배양하였다. 세포를 72시간 동안 배양한 후, 1  $\mu$ Ci (0.037 MBq)의 [<sup>3</sup>H]티미딘 (아머삼)을 18시간 펄싱하였다. 세포를 세포 수거기를 사용하여 Unifilter-96 플레이트 GF/C로 옮기고, [<sup>3</sup>H]티미딘 혼입을 섬광액 내에서 섬광 계수기 (캔버라 팩카드 엘티디. (Canberra Packard Ltd.))를 사용하여 측정하였다. 모든 결정은 삼중으로 수행하였다. iMDDC에 의한 시토킨 생산을 배양의 제5일에 수집한 상등액에서 분석하고, -80°C에서 저장하였다. TIGIT-Fc 또는 TIGIT-Fc-DANA의 존재 또는 부재 하에 동일한 MDDC를 표시된 자극의 존재 또는 부재 하에 24시간 동안 성숙시켰다. 자극 48시간 후에, 상등액을 수집하고 -80°C에서 저장하였다. 시토킨 농도를 제조자의 지시에 따라 ELISA (알앤디 바이오시스템즈)에 의해, 또는 제조자의 지시에 따라 루미넥스 100 기기 (루미넥스)에 의해 검출하면서 LINCoplex 항체-고정된 비드 (링코 리서치 (LINCO Research))를 사용함으로써 측정하였다.

[0443]

TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, 또는 CD226-Fc를 TNF $\alpha$  또는 가용형 CD40L을 사용한 성숙 동안 iMDDC에 첨가할 때,

IL-12/23p40 생산 및 IL-12p70 생산이 이소형-매칭시킨 대조군을 사용한 처리에 비해 iMDDC에 대등한 수준으로 유의하게 감소하였다 (각각 p=0.007 및 p=0.03) (도 22aa 내지 22ac). 반대로, 분비된 IL-10은 이소형-매칭시킨 대조군을 사용한 처리에 비해 TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, 또는 CD226-Fc 처리에 의해 증가하였다 (각각 p=0.027 및 p=0.18) (도 22aa 내지 22ac). TGFβ 분비는 또한 TIGIT-Fc 처리에 반응하여 iMDDC에서 증가하였다 (도 22d 참조). 그러나, CD80, CD86, CD83 및 HLA-DR은 이소형 대조군 배양액에서 동등하게 상향조절되므로, TIGIT-Fc는 MDDC로 성숙하는 iMDDC의 능력을 영향을 미치지 않았다 (도 22b). 특히, TIGIT-PVR 상호작용은 DC 성숙을 직접 유도하지 않았다.

[0444] TLR-매개된 DC 성숙 경로에 대한 TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA 및 CD226-Fc의 영향을 또한 검사하였다. 3개의 Fc 단백질로 각각 처리하면 LPS로부터 IL-10 생산의 더 적지만 유사한 강건한 증가 (TLR4-성숙시킨 MDDC) (p<0.01), IL-12/23p40의 감소 (p=0.07 내지 0.18) 및 IL-12p70 생산의 유의한 감소 (모든 용합 단백질에 대해 p<0.05)를 보이고 (도 22aa 내지 22ac 참조), TLR2 성숙 경로에 영향을 미치지 않았다. DC의 TIGIT 처리에 의한 이러한 IL-10 및 IL-12p40 생산의 조절은 TIGIT-Fc가 GM-CSF 및 IL-4를 사용한 분화 동안 단핵구에 첨가되었는지 또는 성숙기 동안에만 첨가되었는지 유사하였다 (데이터를 제시하지 않음). 성숙하지 않는 iMDDC 내의 IL-10 및 IL-12p40 생산에 대한 TIGIT-Fc의 영향은 보통이지만, iMDDC 내의 이들 시토킨의 관찰된 수준이 낮으므로, 통계상 유의한 효과는 검출하기 어려울 수 있다 (도 22b). 특히, CD226은 이들 분석에서 TIGIT에 유사하게 기능하였고, 이는 MDDC에서 PVR에 대한 역할을 지지한다. CD226이 ITAM 모티프를 갖고 TCR 신호를 향상시키는 작용을 할 수 있다는 사실을 고려하면 (Dalhardon et al. J. Immunol. 175: 1558-1565 (2005)), T 세포의 상이한 하위세트 상의 TIGIT 및/또는 CD226의 발현의 정도는 생체 내에서 국소 염증 반응의 차별적인 조절에 기여할 수 있다 (도 10, 도 29).

[0445] TIGIT-Fc로 처리된 DC에 의한 다른 전염증성 시토킨의 생산 수준을 또한 결정하였다. IL-6 및 IL-18 생산은 모두 모든 성숙된 MDDC 집단에서 TIGIT-Fc 처리에 의해 유의하게 감소하였다. IL-12p40은 IL-12p70 및 IL-23 모두의 공지된 하위단위이고, 따라서 TIGIT-Fc-처리된 MDDC 배양액에서 이들 두 시토킨의 생산 수준을 측정하였다. 대조군 배양액에 비해, TIGIT-Fc 처리는 TNFα 또는 CD40L로 성숙시킨 MDDC에 의한 IL-12p70 생산을 유의하게 감소시켰다 (도 22c). IL-23 수준은 비교적 낮고, 분석 조건 하에 가까스로 검출가능하였다. TIGIT-Fc는 모든 성숙된 MDDC 조건 하에 IL-6 및 IL-18 모두를 감소시켰지만, 공여체 가변성 때문에 관찰된 감소는 통계상 유의하지 않았다.

[0446] TIGIT-Fc의 관찰된 효과가 PVR의 가교결합을 필요로 하는지 평가하기 위해, FcγR 결합이 완전한 폐기된 TIGIT-Fc의 Fc-돌연변이된 버전 (TIGIT-Fc-DANA, 실시예 1에 설명됨)을 사용하였다. 도 22aa 내지 22ac에 도시된 바와 같이, TIGIT-Fc 및 TIGIT-Fc-DANA는 둘 모두 IL-12p40을 동등하고 유의하게 억제하고, TNFα로 성숙시킨 DC로부터 IL-10 생산을 향상시켰다. 상기 결과는 TIGIT 용합 단백질에 의한 시토킨 편향은 Fc-매개 가교결합에 의존적이지 않았음을 나타낸다.

[0447] DC로부터 시토킨 생산 패턴을 변형시키는 TIGIT의 능력은 모든 시험관 내 성숙 조건 하에 관찰되지 않았다. 효과는 TNFα, 가용형 CD40L 및 LPS (TLR4)-유도된 성숙 경로에서 가장 현저한 반면, TLR2-매개된 성숙은 영향을 받지 않은 상태로 유지되었다. LPS 및 Pam3CSK4는 ERK 및 p38을 다양한 정도로 활성화시키는 것으로 나타났고: LPS는 주로 p38을 활성화시키고, Pam3CSK4 처리는 높은 ERK 키나제 활성을 일으킨다. 따라서, Pam3CSK4-성숙시킨 DC의 TIGIT-Fc 처리가 거의 효과를 보이지 않았음은 놀랍지 않다 (도 22aa 내지 22ac 참조). ERK/p38 경로를 조절하는 이들 및 다른 자극, 예를 들어 TNFα 및 CD40L의 차별적인 능력은 MDDC 기능의 성과를 결정하는데 중요하다. DC는 T<sub>reg</sub>를 확대하는 것으로 입증되었을 뿐만 아니라, DC는 또한 T<sub>reg</sub> 관용성을 파괴하고, IL-2 생산 및 활성화를 유도할 수 있다 (Fehervari, Z. & Sakaguchi, S., Curr Opin Immunol 16, 203-8 (2004)). 다른 것을 제외하고 일부 성숙 조건 하에 DC를 변형시키는 TIGIT의 능력은 TIGIT 조절이 그에 의해 T<sub>reg</sub> 및 활성화된 T 세포가 DC 기능을 미세-조정할 수 있는 하나의 방법임을 제안한다.

[0448] B 및 T 세포가 결여되지만 대식세포 및 수지상 세포를 갖는 마우스 모델 (scid 마우스)에서 TIGIT 기능의 연구를 또한 수행하였다. 간단히 설명하면, CB17/SCID 마우스 (6-8주령)를 200 μg의 TIGIT.Fc, TIGIT.DANA, 또는 대조군 항-두드러기쭉 항체로 정맥 내로 1회 처리하였다. 항-CD40 모노클로날 항체 또는 이소형 대조군 (200 μg/마우스)을 6시간 후에 투여하였다. ELISA 분석에 의해 IL-10, MCP-1, IL-12p40 및 IL-12p70의 수준을 분석하기 위해, 혈청을 16시간 후에 수집하였다. scid 마우스에서 TIGIT-Fc 또는 TIGIT-Fc-DANA의 투여는 IL-10 및 IL-12p40 생산을 자극하고, IL-12p70 생산을 감소시켰다 (도 13a-c). 상기 발견은 상기 시험관 내 데이터와 일치하였고, TIGIT가 그의 시토킨 조절 효과를 발휘하기 위해 B 또는 T 세포를 필요로 하지 않음을 제안한다.

[0449] 선행 실시예로부터, TIGIT의 발현은 T 세포 및 NK 세포에 제한되었고, 여기서 최고 발현은 T<sub>reg</sub>에서 발견되었다. PVR에 대한 저친화도 리간드인 CD226은 활성화된 T 세포 상의 발현에도 불구하고 T<sub>reg</sub> 상에서 발현되지 않는다 ([Abbas, A.R. et al., Genes Immun 6, 319-31 (2005)]; [Dardalhon, V. et al., J Immunol 175, 1558-65 (2005)]). 생체 내에서 TIGIT 및 CD226의 균형이 결정되어 유지되어야 하지만, PVR에 대한 TIGIT의 보다 높은 친화도는 둘 모두 동시-발현될 때 TIGIT가 주된 역할을 하는 것으로 제안한다. 함께 살펴보면, 활성화된 T 세포 및 T<sub>reg</sub> 상에서 TIGIT의 높은 발현, 및 IL-10을 유도하고 성숙 DC로부터 전염증성 시토킨 방출을 억제하는 PVR과 TIGIT의 상호작용은 TIGIT가 면역 반응을 하향-조절하는 피드백 (feedback) 기전을 제공함을 제안한다.

[0450] **실시예 6: PVR 신호전달에 대한 TIGIT의 영향**

[0451] MAPK 신호전달 경로는 IL-10 경로를 조절하는데 중요하므로 (Xia, C.Q. & Kao, K.J., Scand J Immunol 58, 23-32 (2003)), MAPK 경로의 몇몇 멤버의 활성을 TIGIT-처리된 MDCC에서 평가하였다. CHO-PVR을 3시간 동안 혈청-고갈시킨 후, 15분 동안 37°C에서 50 µg/mL TIGIT-Fc로 처리하거나 처리하지 않았다. 세포를 균질화시키고, 막 단백질을 형질막 추출 키트 (바이오비전 (BioVision))를 사용하여 추출하고, 비-환원 조건 하에 나트륨 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)로 처리한 후, 니트로셀룰로스 막 (바이오라드 (BioRad))으로 옮겼다. 막을 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 내의 5% BSA로 차단시킨 후, 항-포스포타이로신-HRP (비디 바이오사이언스)로 프로빙하고, 복원 (restore) 버퍼 (피어스)로 스트리핑 (stripping)하고, 항-PVR 염소 폴리클로날 항체 (알앤디 시스템즈)로 재-프로빙하였다. 제5일에 iMDCC를 10 µg/mL TIGIT-Fc 또는 대조군 인간 IgG로 표시된 기간 동안 37°C에서 처리하였다. 총 세포 용해물을 RIPA 버퍼 내에 제조하고, 환원 조건 하에 SDS-PAGE로 처리하고, Immobilon 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막 (PVDF, 밀리포어)에 옮겼다. 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 내의 1% BSA로 차단시킨 후, 화학발광 단백질 검출하였다. 재프로빙을 위해, 막을 스트리핑 버퍼 (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7), 100 mM β-머캅토에탄올, 2% SDS) 내에서 30분 동안 50°C에서 때때로 교반하면서 인큐베이팅하였다. 항-포스포타이로신에 특이적인 폴리클로날 항체 (업스테이트 (Upstate)), 항-포스포-p38MAPK (셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology)), 및 모노클로날 항-포스포-p44/42 MAPK (셀 시그널링 테크놀로지)를 사용하여, 포스포타이로신, 인광체-p38MAPK, 및 인광체-ERK의 검출을 수행하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군으로서, 블롯을 ERK (셀 시그널링 테크놀로지), p38MAPK (셀 시그널링 테크놀로지) 또는 β-액틴 (네오마커스 (NeoMarkers)), β-카테닌 (비디 파밍엔 (BD Pharmingen)) 또는 활성 β-카테닌 (업스테이트)에 대한 폴리클로날 항혈청으로 재-프로빙하였다.

[0452] 도 23a에 제시된 데이터는 TIGIT에 결합 시에 PVR이 인산화됨을 입증한다 (이소형-매칭시킨 대조군 대 TIGIT-처리된 세포에서 관찰된 희미한 인산화된 타이로신 밴드를 비교하지만, 도면의 하부 부분에서 동등하게 어두운 밴드에 의해 지시되는 바와 같이 PVR의 총량은 일정하게 남았다). 이는 TIGIT 결합이 PVR에 의해 매개되는 신호 전달 기능을 개시함을 제안하였다. pERK 이량체 (91 KD)의 증가된 인산화가 TIGIT-Fc 및 TIGIT-Fc-DANA-처리된 iMDCC에서 관찰되었지만, 단량체 (42KD)의 증가된 인산화는 관찰되지 않았다 (도 23b). 이와 반대로, p38 활성화는 영향을 받지 않았다 (도 23b). 최근의 보고서에서는 E-카드헤린의 자극 및 활성 β-카테닌의 유도가 귀골수-유래된 DC를 생체 내에서 면역 반응을 억제할 수 있는 관용유도성 DC로 성숙시켰음을 제안하였다 (Jiang, A. et al., Immunity 27, 610-24 (2007)). 여기서, 인간 MDCC를 TIGIT-Fc로 처리할 때, 활성 형태의 β-카테닌 경로가 유도되었고, 이소형 매칭시킨 대조군에서는 효과가 관찰되지 않았다 (도 23c).

[0453] 이들 결과는 TIGIT가 PVR과 그의 상호작용을 통해 ERK 활성화 및 따라서 MDCC에 의한 시토킨 생산을 조절함을 제안하였다. 상기 관찰을 확인하기 위해, ERK 키나제 특이적 억제제를 TIGIT-Fc와 함께 MDCC 배양액에 첨가하였고, 이들 배양액으로부터 분비형 IL-12의 수준을 결정하였다. IL-12p40 생산의 TIGIT-Fc-매개된 하향-조절은 ERK 억제제의 존재 하에 역전되었다 (도 24a). 중화 항-IL-10 항체를 배양액에 포함시킬 때 유사한 효과가 관찰되었다 (도 24b 참조). MDCC로부터 TIGIT-조절된 시토킨 생산은 또한 항-TIGIT 항체 10A7 또는 차단 항-PVR 항체에 의해 차단되었다 (도 24b). 함께 살펴보면, 이들 결과는 TIGIT-PVR 라이게이션이 ERK 키나제 활성화에 영향을 미치고, 다른 생산된 시토킨에 비해 DC 내의 IL-10/IL-12 시토킨 생산비를 증가시킨다는 것을 나타냈다.

[0454] **실시예 7: T-세포 활성화에 대한 TIGIT-조절된 MDCC의 영향**

[0455] DC 시토킨 생산에 대한 TIGIT의 영향이 기능적 결과를 갖는지 결정하기 위해, T 세포 증식 및 시토킨 생산에 대한 MDCC의 TIGIT 조절의 영향을 평가하기 위해 실험을 수행하였다. TIGIT-Fc-처리된 MDCC (TNF α 또는 sCD40L로 성숙시킨)를 상기 설명된 바와 같이 MLR 반응에서 T 세포와 함께 배양하였고, T 세포에 대한 효과를 모니터

링하였다. TIGIT-변형된 DC를 함유하는 배양액을 대조군 DC와 비교할 때, T 세포 증식은 평균 50% 억제되었다 ( $p < 0.05$ ) (도 25a). 추가로, 배양액 내의 IL-2 수준은 2배 감소되었다 ( $p < 0.01$ ) (도 25b). 상기 데이터는 실험 실시예에 설명된 바와 같이, TIGIT로 처리된 DC에서 IL-12의 감소 및 IL-10 생산의 증가와 상호관련된다. 종합하면, TIGIT-변형된 MDDC는 T 세포를 억제하였고, 이는 일단 DC가 완전히 성숙된 후에 TIGIT가 DC 기능적 능력을 조절할 수 있음을 제안한다. 특히, TIGIT-Fc를 MDDC-T 세포 배양액에 첨가하면 T 세포의 증식을 억제하였고, 이는 TIGIT-Fc가 DC를 변형시키기 위해 DC 성숙의 개시 시에 존재할 필요가 없음을 나타낸다.

[0456] 활성화된 인간 MDDC에서 다른 세포-표면 분자의 발현에 대한 TIGIT 처리의 영향을 또한 조사하였다. DC 상에서 특정 면역글로불린-유사 전사체 (ILT) 수용체의 발현은 이들 세포의 활성화에 반응하여 조절되는 것으로 알려져 있다 ([Velten et al., Eur. J. Immunol. 34: 2800-2811 (2004)]; [Ju et al., Gene 331: 159-164 (2004)]). 예를 들어, ILT2 및 ILT3 수용체의 발현은 CpG-DNA-활성화된 DC에서 하향-조절되고, ILT2, ILT3, ILT4 및 ILT5의 발현은 IL-10-유도된 DC에서 상향-조절된다. TIGIT가 DC에서 IL-10 생산을 자극한다는 사실을 감안하여, 활성화된 DC에서 ILT 발현에 대한 TIGIT의 영향을 검사하였다. iMDDC를 상기 설명된 바와 같이 단리하였다. iMDDC의 특정 집단을 TNF 또는 CD40L로 활성화시키고, 또한 TIGIT-Fc 또는 이소형-매칭시킨 대조군으로 처리하였다. 처리된 세포를 면역글로불린-유사 전사체 2, 3 또는 5 (ILT2, ILT3 또는 ILT5)의 발현에 기초하여 FACS에 의해 분류하였다. 도 26에 도시된 바와 같이, iMDDC의 활성화는 ILT2, ILT3 및 ILT5 발현을 하향조절한다. 이와 반대로, 활성화 및 TIGIT-Fc를 사용한 동시 처리는 활성화되지만 TIGIT-Fc로 처리되지 않은 iMDDC에서 보이는 하향-조절에 비해 ILT2, ILT3 및 ILT5 발현의 하향-조절을 감소시켰다. 상기 관찰된 효과는 DC에서 IL-10 생산을 자극하는 TIGIT의 능력에 기인할 수 있고; IL-10-발현 DC는 관용유도성이고 보다 높은 수준의 ILT를 발현하는 것으로 알려져 있다. 그러나, ILT2, 3 및 5와 같은 ILT의 하향-조절은 또한 TIGIT의 직접적 영향일 수 있고, 그에 의해 TIGIT가 관용을 유도하는 또다른 방법을 제공한다.

[0457] T 세포 활성화에 대한 TIGIT 처리의 관찰된 시험관 내 효과가 생체 내 환경에 반영될 수 있는지를 결정하기 위해, TIGIT-Fc 처리의 효과를 지연형 과민성 (DTH) 반응에서 T 세포 반응의 잘 입증된 억제제인 CTLA4-Fc (Linsley, P.S. et al., Science 257, 792-5 (1992))의 효과에 비교하였다. 간단히 설명하면, 8-10주령의 C57BL/6 마우스를 100  $\mu$ l CFA (디프코 래보라토리스 (Difco Laboratories)) 내의 100  $\mu$ g 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) (시그마 (Sigma))으로 꼬리 기부에서 피하 면역화시켰다. 하나의 코호트의 동물 (n=10)을 제1, 4 및 6일에 100  $\mu$ g의 쥐 TIGIT-Fc, TIGIT-Fc-DANA, CTLA-4-Fc 또는 음성 이소형 대조군 항-두드러기쭉 IgG2a로 복강내 주사에 의해 처리하였다. 제6일에, 우측 및 좌측 귀 두께를 측정하였다. 이어서, 우측 귀에 25  $\mu$ l 염수를 주사하고, 좌측 귀에 25  $\mu$ l 염수 내의 30  $\mu$ g KLH를 시험접종하였다. 제7일에, 우측 및 좌측 귀 두께를 다시 측정하고, 제7일과 제6일의 귀 두께의 차이를 귀 부기로서 정의하였다. 염수만을 주사한 귀에서 귀 부기는 각각의 처리군에 대해 0.02 mm 미만이었다. 귀 부기 측정 후에, 마우스를 안락사시키고 비장을 수거하였다. 단일 세포 현탁액을 제조하고, 96-웰 평저 플레이트 내에  $1 \times 10^6$  세포/ml (200  $\mu$ l/웰)의 밀도에서 10% FBS, 2 mM 글루타민, 페니실린 (100 U/ml) 및 스트렙토마이신 (100  $\mu$ g/ml)을 함유하는 DMEM 내에서 배양하였다. 세포를 배지 단독 또는 다양한 농도의 KLH의 존재 하에 배양하였다. T 세포 활성화에 대한 양성 대조군으로서, 세포를 5  $\mu$ g/ml 항-CD3 (비디 바이오사이언시즈)로 예비코팅한 웰 상에서 2  $\mu$ g/ml 가용형 항-CD28 (비디 바이오사이언시즈)과 함께 배양하였다. 증식 분석을 위해, 1  $\mu$ Ci [ $^3$ H]티미딘 (피킨 엘머 (Perkin Elmer))을 각각의 웰에 50  $\mu$ l 부피에서 4일 배양의 마지막 18시간 동안 첨가하고, 세포를 수거하고, [ $^3$ H]티미딘의 혼입을 액체 섬광 계수에 의해 측정하였다.

[0458] 대조 처리군에 비해 TIGIT-Fc 및 CTLA4-Fc-처리된 마우스에서 유의하게 더 낮은 귀 부기가 측정되었고, 효력은 두 처리군에 대해 유사하였다 (두 군 모두에 대해  $p < 0.0001$ ) (도 27a). TIGIT-Fc 및 CTLA4-Fc 사이에서 통계적 차이는 없었다 ( $p = 0.07$ ). 유의하게, IL-10 결핍 마우스에서, TIGIT-Fc는 CTLA4-Fc를 사용한 DTH의 억제에도 불구하고 DTH 반응에 대해 효과가 없었고 ( $p = 0.004$ ), 이는 TIGIT-PVR 기능에서 IL-10의 역할을 지지한다. TIGIT-Fc-DANA는 DTH의 억제에서 그의 효과가 TIGIT-Fc와 유사하였고, 이는 TIGIT-Fc가 PVR의 Fc-매개된 가교 결합을 필요로 하지 않았음을 입증한다. 항-TIGIT는 DTH에 대해 효과가 없었다 (도 27c). 처리된 마우스에서 KLH에 대한 시험관 내 회수 반응을 결정하기 위해 분석을 수행하였고, 이는 증식, IL-2 및 IFN  $\gamma$  시토킨 생산이 TIGIT-Fc-처리된 야생형에서 유의하게 감소되지만, IL-10-결핍 마우스에서는 그렇지 않음을 입증하였다 (도 27d-g).

[0459] CD11c<sup>+</sup> DC를 연구 종결 (제7일) 시에 DTH 마우스에서 비장으로부터 단리하고, DC 증식 및 시토킨 프로필에 대한 TIGIT-Fc의 영향을 상기 설명된 바와 같이 qRT-PCR에 의해 평가하였다. TIGIT-Fc 및 CTLA4-Fc-처리된 동물로

부터 단리된 비장 T 세포는 이소형-처리된 대조 동물에 비해 회수 분석에서 KLH에 반응하여 증식하지 않았다 (두 처리군 모두에 대해  $p < 0.001$ ) (도 27b). 상기 결과는 TIGIT가 T-세포 프라이밍 및 T-세포 추진된 면역 반응의 효과기 기간 동안 모두 중요할 수 있음을 나타낸다. MDDC 연구로부터 위에서 입수한 시험관 내 데이터와 유사하게, TIGIT-Fc-처리된 마우스로부터 단리된 CD11c<sup>+</sup> 세포는 IL-10 mRNA가 증가하고 ( $p < 0.05$ ), IL-12/23p40 및 IL-12p35 mRNA가 감소하였지만, 이들 후자의 측정치는 통계적 유의성에 도달하지 않았다 (각각  $p = 0.07$  및  $0.08$ ) (도 27h). 그러나, TIGIT-Fc 처리는 IL-10 KO 마우스로부터 유래된 CD11c<sup>+</sup> 세포에서 IL-12p40/p35 전사에 대해 근소한 효과만을 가졌고, 이는 IL-12p40/p35 mRNA 수준의 TIGIT-매개된 하향-조절이 특이적이고, IL-10의 TIGIT-매개된 상향조절이 상기 모델에서 전염증성 시토킨 IL-12의 하향-조절을 위해 요구됨을 나타낸다.

[0460] **실시예 8: TIGIT 결핍 마우스**

[0461] TIGIT 녹아웃 마우스를 표준 기술을 이용하여 생성하였다. 이들 마우스에서 기능적 TIGIT 유전자의 부재를 확인하기 위해, 총 T 세포를 녹아웃 또는 야생형 마우스의 비장으로부터 단리하고, 후속적으로 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 함께 3일 동안 인큐베이팅하였다. RNeasy 키트 (키아젠)를 사용하여 세포로부터 총 RNA를 단리하고, TIGIT mRNA를 측정하기 위해 실시간 RT-PCR로 처리하였다. CD96 mRNA 수준을 또한 대조군으로서 평가하였다. 연구의 결과는 녹아웃 마우스에서 TIGIT 발현이 결핍됨을 입증하였다.

[0462] 장간막 림프절로부터 면역 세포 집단을 실시예 3A에 설명된 바와 같이 FACS 분석을 사용하여, 야생형 마우스에 비해 9일령의 TIGIT 녹아웃 마우스에서 검사하였다. TIGIT 녹아웃 마우스는 야생형 마우스에 비해 증가된 수의 기억 CD4<sup>+</sup> T 세포, mDC, pDC, 단핵구, CD11c<sup>+</sup> PVR<sup>hi</sup> T 세포 및 총 B 세포를 나타냈다. 나이브 및 성숙 CD4<sup>+</sup> 세포의 집단은 녹아웃 및 야생형 마우스 사이에서 유사하였다. 녹아웃 마우스는 또한 야생형 마우스에 비해 비장에서 MZB (B220<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>), NKT (DX5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 또는 DX5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), 및 기억 CD8<sup>+</sup> T 세포 수가 증가한 것으로 밝혀졌다. 이러한 기억 CD8<sup>+</sup> T 세포의 증가된 수준은 녹아웃 마우스에서 장간막 림프절 및 파이어판 (Peyer's patch) 세포에서 또한 관찰되었다. 녹아웃 마우스의 장간막 림프절에서 관찰된 pDC 및 단핵구 세포 수의 증가가 이들 마우스의 비장 및 파이어판에서 또한 관찰되었지만, 야생형 마우스에 비한 수준 차이는 장간막 림프절에서보다 덜 현저하였다.

[0463] TIGIT 결핍 마우스로부터 단리된 T 세포의 활성을 또한 조사하였다. 간단히 설명하면, 총 비장세포를 9일령의 TIGIT-결핍 마우스 및 야생형 동배세포로부터 단리하였다. 각각의 종류의 마우스로부터 10<sup>6</sup> 세포를 펄저 96-웰 플레이트 상에 접종하고, 플레이트-결합된 항-CD3 (10 µg/mL) + 항-CD28 (2 µg/mL)로 자극하였다. 제2일에, 상등액을 수집하고, 시토킨 생산을 루미넥스에 의해 분석하였다. 세포를 수집하고, FACS로 처리하여 세포내 IFN $\gamma$  및 IL-4의 존재에 의해 분류하였다. 세포 증식을 실시예 3A에 설명된 바와 같이 <sup>3</sup>H-티미딘 혼입에 의해 측정하였다. MLR 분석을 일반적으로 실시예 4A에 설명된 방법에 따라 수행하였다. 구체적으로, CD4<sup>+</sup> T 세포를 TIGIT-결핍 마우스 또는 야생형 동배세포의 비장으로부터 음성 단리 (MACS)에 의해 단리하였다. T-세포-고갈된 Balb/C 비장세포를 3000 rad에서 방사선 조사하고, 항원 제시 세포로서 사용하였다. 2 x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T 세포를 1 µg/mL 가용형 항-CD3 (T 세포만)으로 자극하거나, 동종이형 항원 제시 세포와 1:2 비로 혼합하였다. 증식은 실시예 3A에 설명된 바와 같이, 제3일에 <sup>3</sup>H-티미딘 혼입에 의해 측정하였다. 제2 실험에서, MLR 분석을 동일하게 수행하였지만, CD4<sup>+</sup> T 세포는 Balb/c 마우스로부터 단리하고, 항원 제시 세포는 TIGIT-결핍 마우스 또는 야생형 마우스로부터 제조하였다.

[0464] TIGIT-결핍 마우스 T 세포는 표준 증식 분석에서 야생형 마우스로부터의 T 세포와 유사하게 증식하였다 (도 30a, 좌측 패널). 그러나, 항원 제시 세포의 존재 하에, TIGIT-결핍 T 세포는 야생형 T 세포에 비해 증식이 증가하였다 (도 30a, 중간 패널). 특히, TIGIT-결핍 마우스 비장으로부터 항원-제시 세포는 야생형 T 세포의 증식을, 야생형 마우스로부터 취한 항원 제시 세포와 동일한 정도로 자극하였다 (도 30a, 우측 패널). 함께 살펴보면, 상기 데이터는 T 세포가 항원-제시 세포보다는 이들 T 세포 상에서 발현된 TIGIT를 포함한 기전에 의해 증식이 하향조절됨을 제안하고, T 세포 반응의 하향-조절에서 TIGIT의 활성을 추가로 확인한다. 보다 큰 비율의 TIGIT-결핍 마우스 T 세포가 야생형 마우스 T 세포보다 더 높은 세포내 IFN $\gamma$  수준을 가졌다 (도 30b). TIGIT-결핍 및 야생형 T 세포로부터 상등액의 시토킨 생산 분석에서는 IFN $\gamma$  및 TNF $\alpha$  생산/분비가 야생형 T 세포에 비해 TIGIT-결핍 T 세포에서 증가한 한편, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-12p70 수준은 2가지 세포 집단



사이에서 일관적으로 남았음을 보여주었다.

도면

도면1

인간  
복은열 원숭이  
계  
마우스

MRWCLLIIWAQGLRQAPLAS-GMMTGTIEFTGNTSAPKGGSLILQCHLSS	49	사람 1
MRWCLLEIWAQGLRQAPLAS-GMMTGTIEFTGNTSAPKGGSVILQCHLSS		사람 2
MQWYLLIWAQGLQAPLPTSGAVSGRIIMTWGNISAKEGGCVTLQCHLSS		사람 3
MHGWLLEIWAQGLIQAFLATGATAGTIDTKRNISAFEGGSVILQCHLSS		사람 4
TTAQVTQVNWEGQDDQ-LLAICNADLGMHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSL	98	사람 1
TNAQVTQVNWEGQDDHSLLAIRNAELGMHISYPAFKDRVAPGPGGLGLTLQSL		사람 2
TTANVTQVNWEGKODQ-LLAIVHHTDGLGMHISYPAFKDRVAPGPNLGLTLQSL		사람 3
DTAEVTOVDWKRQDDQ-LLAIXSVDLGMHIVASVPSDRVVPGPSLGLTFQSL		사람 4
TVNDTGEYFCQIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHDGARRFOIPLLGAMAA	148	사람 1
TMNDTGEYFCYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFOIPLLGAMAM		사람 2
TRNDTGEYFCYHTYPDGILYRGTFTFLEVLQSSVAERSAFAFOIPLLGAMAS		사람 3
TMNDTGEYFCYHTYPTGILYKGRIFLRYQESSVAQFQT--APLQGLTMAA		사람 4
TLVVICQAVIIVVVALTRKKKKAJRIHSVLEGDLRKRSAQGEEMSPSAPSPG	198	사람 1
MLVVICLAVIIVVVALARKKKSLRIHSVLEGLQKRKSTGQEEQIPSAFSPG		사람 2
VLAVICVAVILGGLWTRKKKCRRVHCGESSGLRTMTYEQEESPCILSSTG		사람 3
VLGILICLMTGVTVLARKK-SIRMHSIIESSGLGRTEAPRQEWNLRSLSSPG		사람 4
SCVQAEPAPAGLGGEQRGEDCAELHDYFNVLSTYRSLGNSFTFTTG	244	사람 1
SCVQAEPAPAGLGGEQRGDDCAELHDYFNVLSTYRSLGNSCSFTFTTG		사람 2
RAIQVEMVPLVGLYTEQRADDYAEPHDYFNVLSTYRSLGNSFLAETG		사람 3
SPVQTEQAPAGPCGEGQAEDDYADPQEFYFNVLSTYRSLSPFAVSKTGG		사람 4

도면2a

TIQT	18	L	A	S	G	M	M	T	G	T	E	T	T	G	N	I	S	A	E	-	K	G	S	S	I	I	L	O	C	H	I	S	S	T	-	T	A	Q	V	T	Q	V	N	W	E	Q	Q					
PVR	22	P	P	P	G	T	G	D	V	V	V	V	V	Q	A	P	T	Q	V	E	G	E	-	L	G	D	S	V	T	L	P	C	Y	L	Q	V	P	N	M	E	V	T	H	V	S	Q	L	T	W	A	R	H
CD96	18	F	V	K	G	V	M	E	K	T	V	T	V	E	N	V	Y	A	T	-	L	G	S	D	V	N	L	T	C	Q	T	V	G	-	-	F	P	V	Q	M	W	S	K	V								
PVRL2	27	L	E	T	G	A	Q	D	V	R	V	Q	V	L	P	E	V	E	G	Q	-	L	G	G	T	V	E	L	P	C	H	L	P	-	V	P	G	L	I	S	L	V	T	W	Q	R	P					
PVRL1	24	F	L	P	G	V	H	S	Q	V	N	D	S	M	Y	G	F	-	I	G	T	D	V	V	L	H	C	S	F	A	N	P	-	L	P	S	V	K	I	T	Q	V	T	W	Q	K	S					
PVRL3	51	R	L	C	G	A	L	A	G	P	I	V	E	P	H	V	T	A	V	-	W	G	K	N	V	S	L	K	C	L	I	E	V	N	-	E	T	I	T	Q	I	S	W	E	K	I						
PVRL4	25	F	T	G	R	C	P	A	G	E	L	G	T	S	D	V	T	V	-	L	G	Q	D	A	K	L	P	C	F	Y	R	G	D	-	S	G	E	Q	V	G	Q	V	A	M	A	R	V					
CD226	10	L	I	H	V	Y	R	A	L	C	E	E	V	L	W	H	T	S	V	P	-	F	A	E	N	M	S	L	E	C	V	Y	P	S	M	G	-	-	I	L	T	Q	V	E	W	F	K	I				
VSI62	18	C	L	S	G	L	A	V	E	V	K	V	P	T	E	P	E	L	S	T	P	-	L	G	K	T	A	E	L	T	C	T	Y	S	T	S	-	-	V	G	D	S	F	A	L	E	W	S	E	V		
IGSF11	16	T	G	V	A	L	A	S	L	E	V	S	E	S	P	G	S	I	Q	V	A	-	R	G	Q	T	A	V	L	P	C	F	T	T	S	-	A	A	L	I	N	L	N	V	I	W	M	V	T			
TREML1	11	L	G	L	E	G	Q	G	I	V	G	S	L	P	E	V	L	Q	A	B	-	V	G	S	S	I	L	W	Q	C	H	R	L	Q	-	-	D	V	K	A	Q	K	V	M	C	R	F					
PSG5	26	N	F	W	N	L	P	I	T	A	Q	V	T	E	A	L	P	K	V	S	E	L	K	D	V	L	L	V	H	N	L	P	Q	-	-	N	L	A	G	Y	I	W	Y	K	G							
SCN1B	16	S	A	C	G	G	C	V	E	V	D	S	T	E	A	V	Y	G	M	-	T	F	K	I	L	C	H	S	C	K	R	S	E	-	-	T	N	A	E	T	F	T	E	W	T	F	R					
B7-H4	27	T	G	F	C	I	S	G	R	H	S	I	T	V	T	T	V	A	S	A	G	N	I	G	E	D	G	I	Q	S	C	T	F	E	P	D	-	-	I	K	L	S	D	I	V	I	Q	W	L	E		
A - X(6) - G																																																				
TIQT	63	D	-	Q	-	-	-	L	L	A	T	C	N	A	D	L	G	W	H	I	S	P	-	S	F	K	D	R	V	A	P	-	G	P	Q	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PVR	70	G	E	S	G	-	-	S	M	A	V	R	H	Q	T	Q	G	P	S	Y	S	E	-	-	S	K	R	L	E	F	V	A	R	L	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CD96	62	T	N	K	I	D	-	-	L	I	A	V	T	H	P	Q	Y	G	F	Y	C	A	Y	R	C	E	S	I	V	T	F	E	T	P	E	N	G	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PVRL2	74	D	A	P	A	N	H	-	Q	N	V	A	A	F	R	P	K	M	G	P	S	F	P	S	P	K	R	E	S	E	R	L	S	F	S	A	K	Q	S	T	G	D	T	E	A	E	L	Q	D			
PVRL1	71	T	N	G	S	K	-	-	Q	N	V	A	I	I	N	P	S	M	G	V	S	L	A	P	-	Y	R	E	R	V	E	F	L	R	P	S	F	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PVRL3	95	H	G	S	S	-	-	Q	T	V	A	V	H	H	P	Q	Y	F	S	V	Q	G	-	E	Y	Q	G	R	V	L	E	R	N	Y	S	L	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PVRL4	71	D	A	G	E	G	A	-	Q	E	L	A	L	H	S	K	Y	G	L	H	V	S	P	-	A	Y	E	G	R	V	E	D	P	P	P	R	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD226	54	G	T	Q	Q	D	-	-	S	I	A	I	F	S	P	T	H	G	M	V	I	R	K	P	-	Y	A	E	R	V	Y	F	L	N	S	T	M	A	S	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

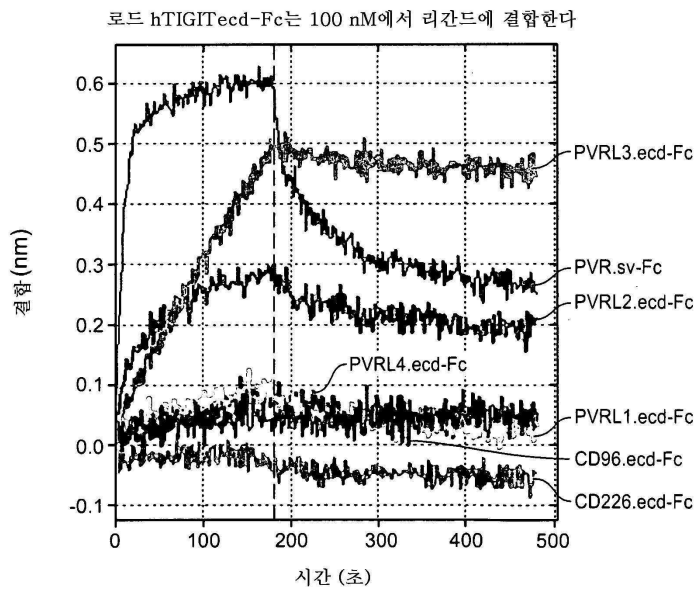
도 2a  
도 2b

도 2

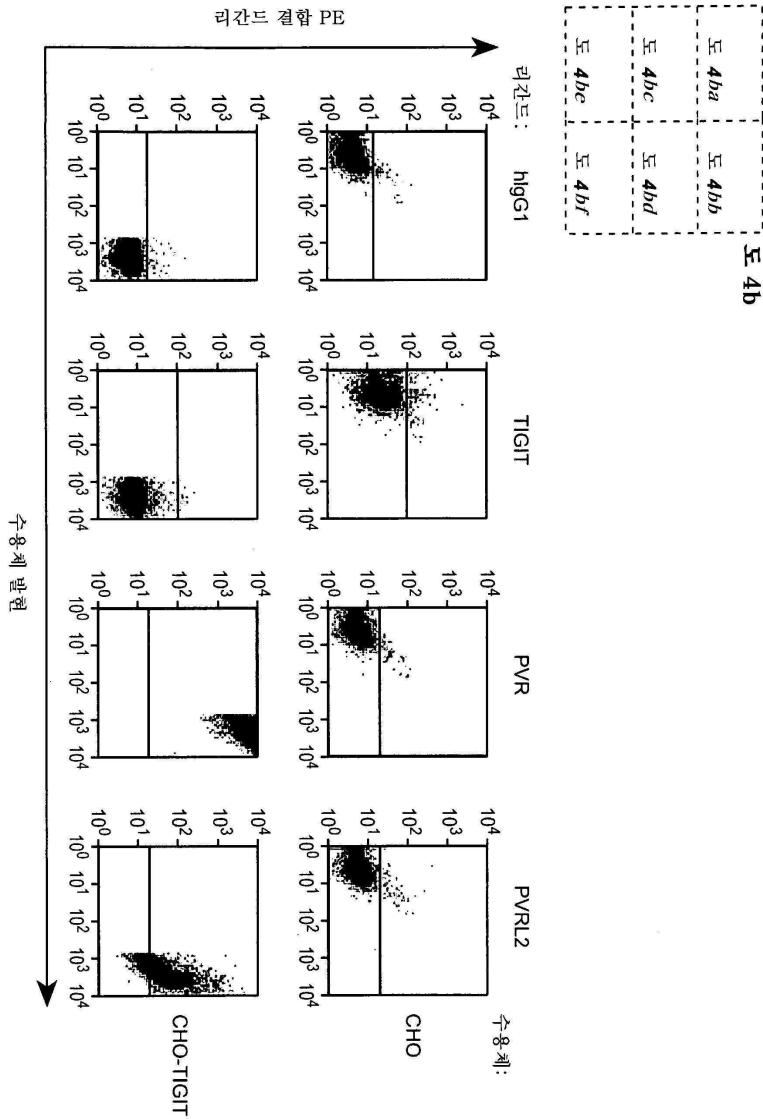
VII - ST - Q



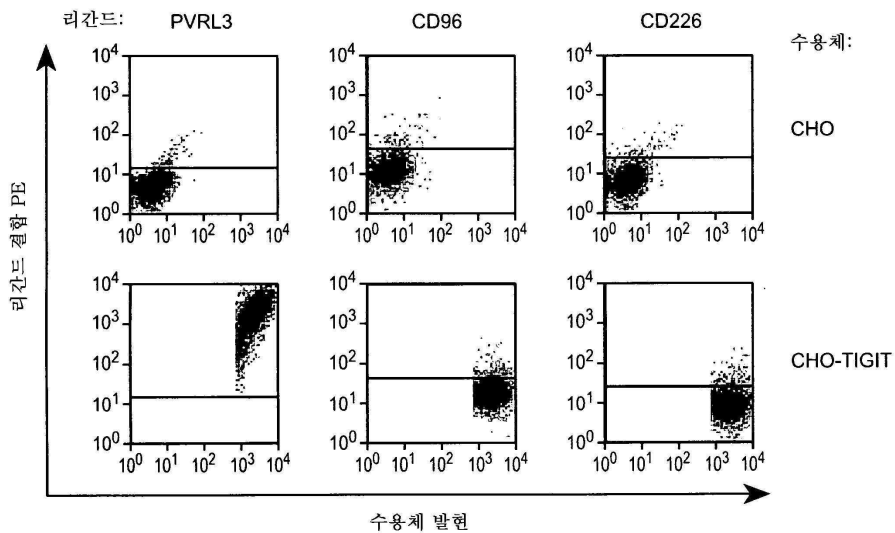
도면4a



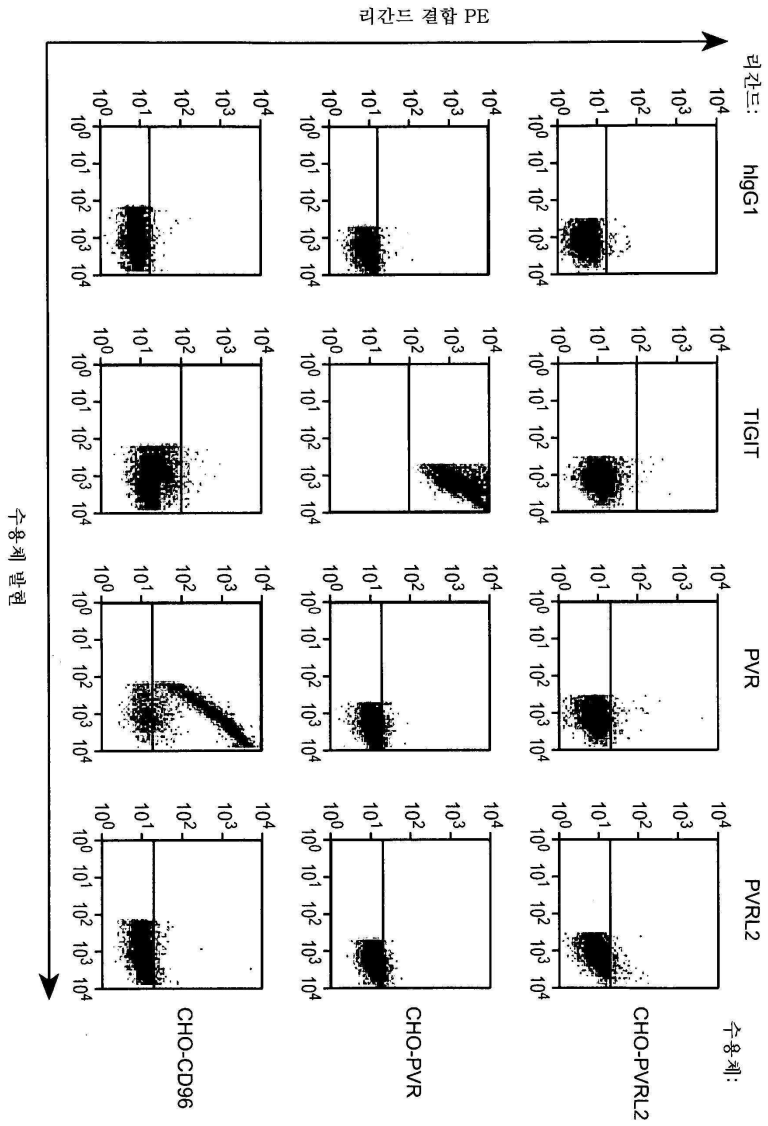
도면4ba



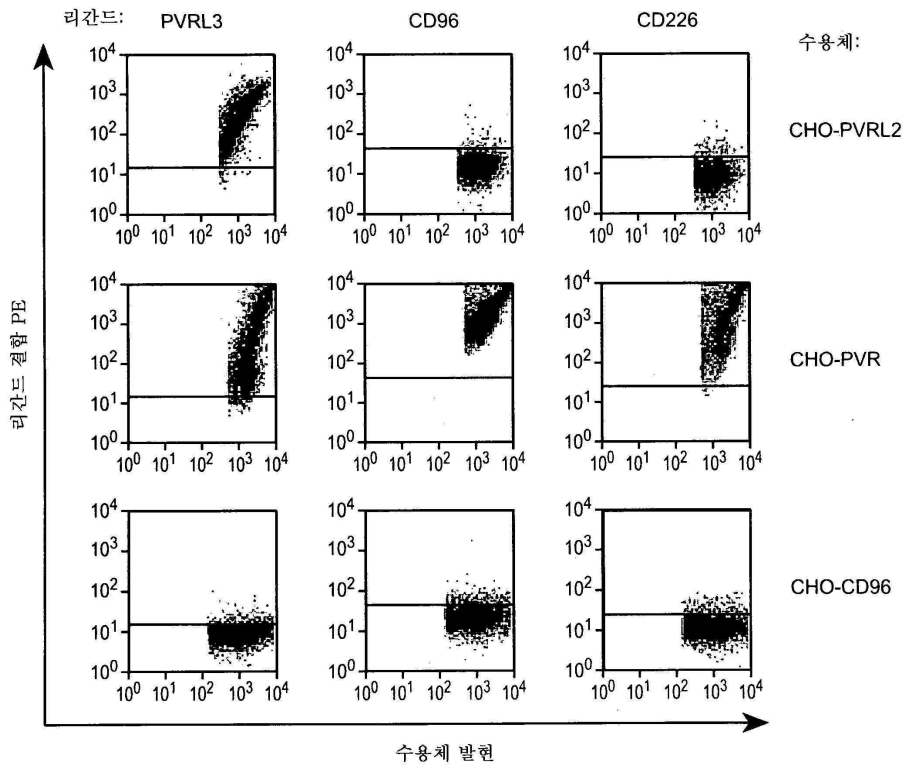
도면4bb



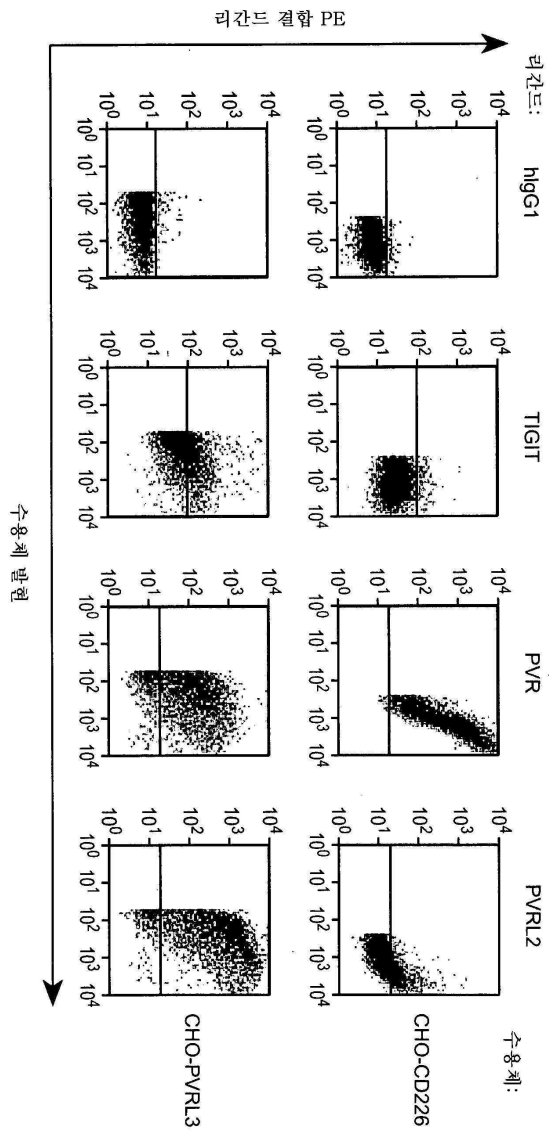
도면4bc



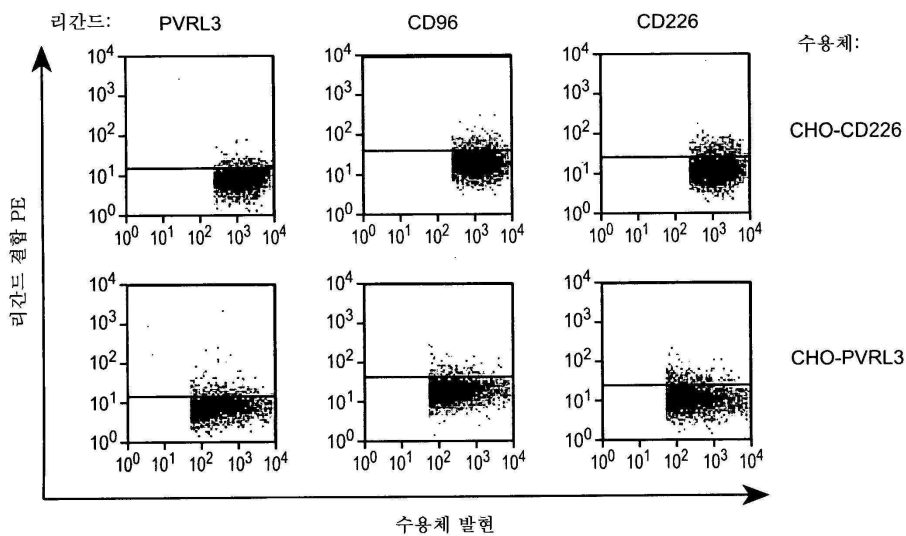
도면4bd



도면4be

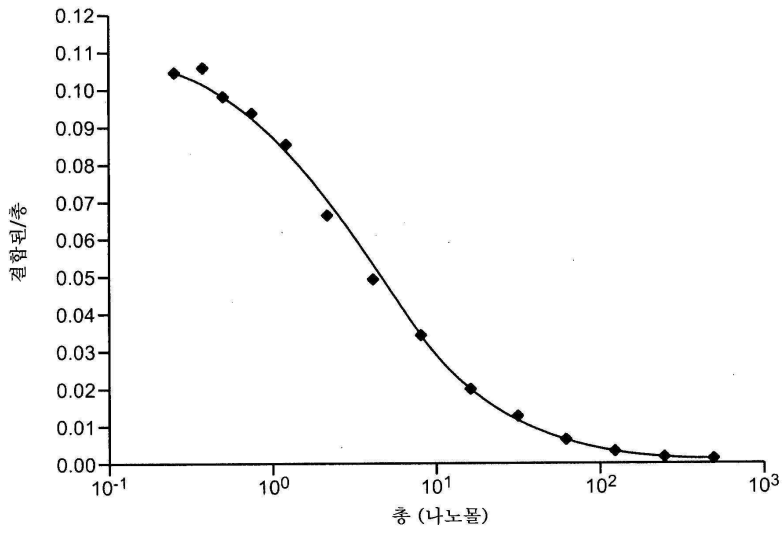


도면4bf

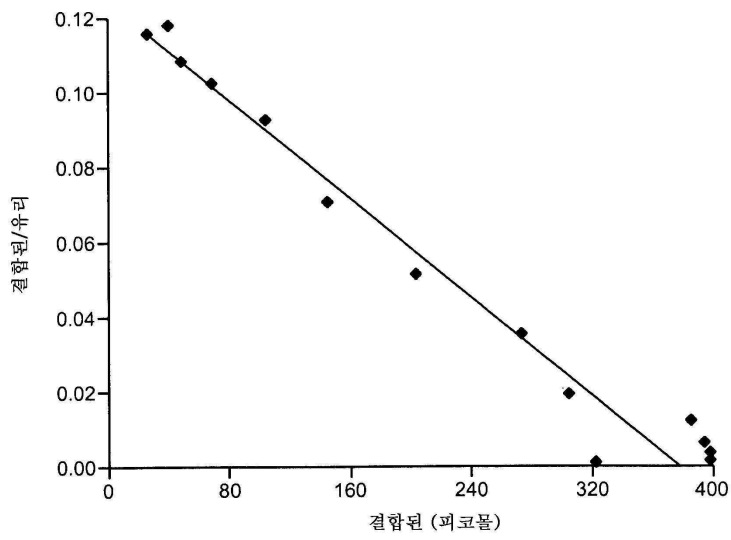




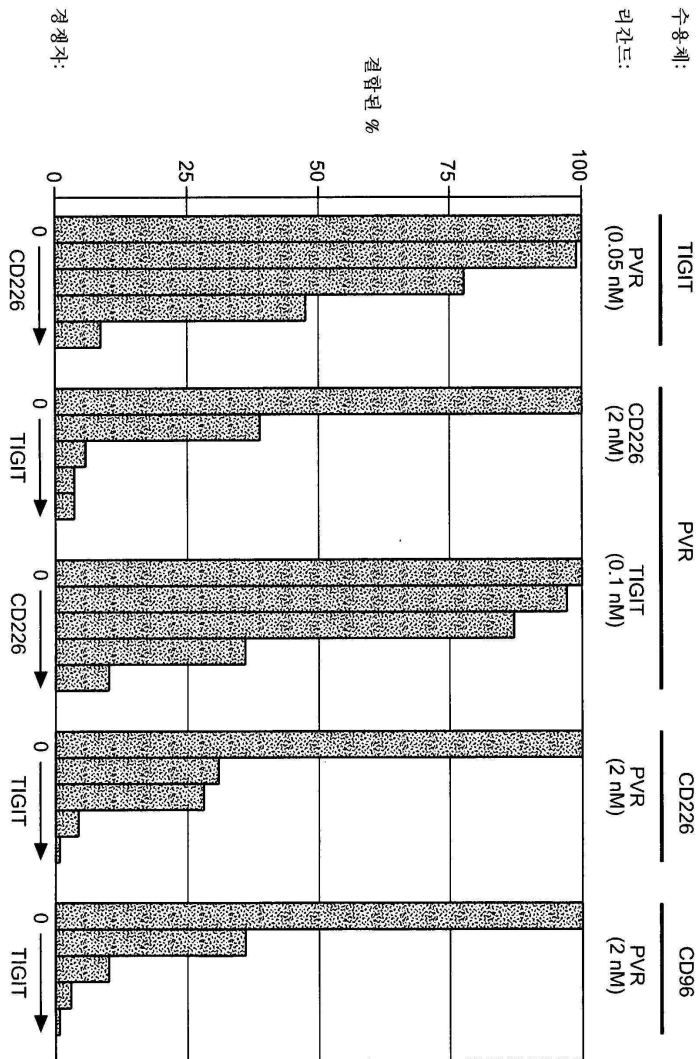
도면5a



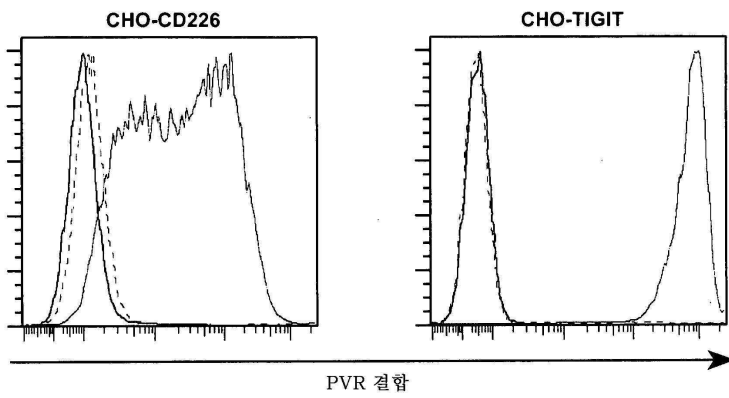
도면5b



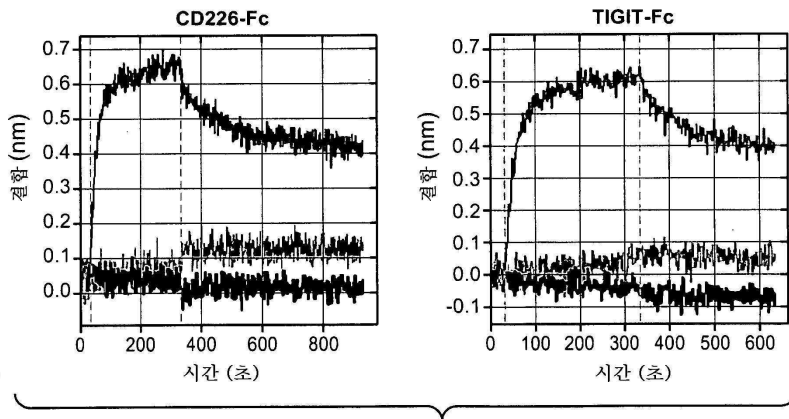
도면6



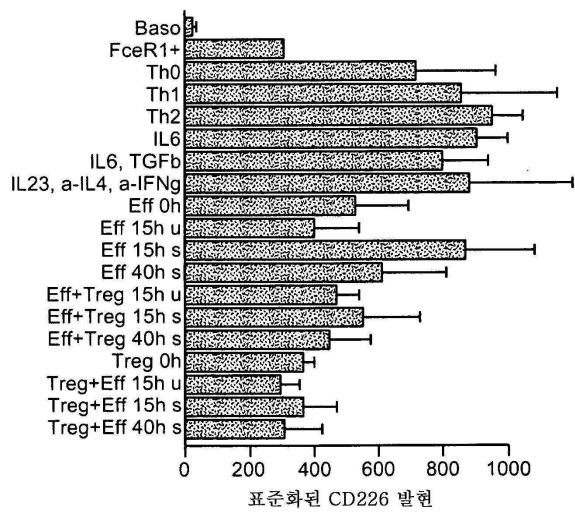
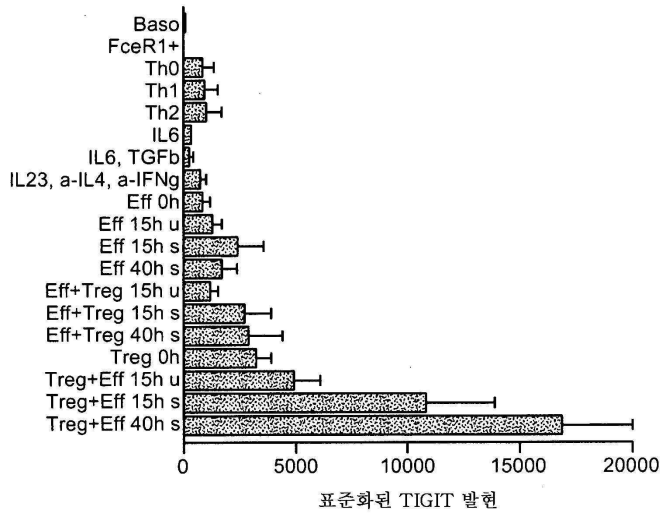
도면7a



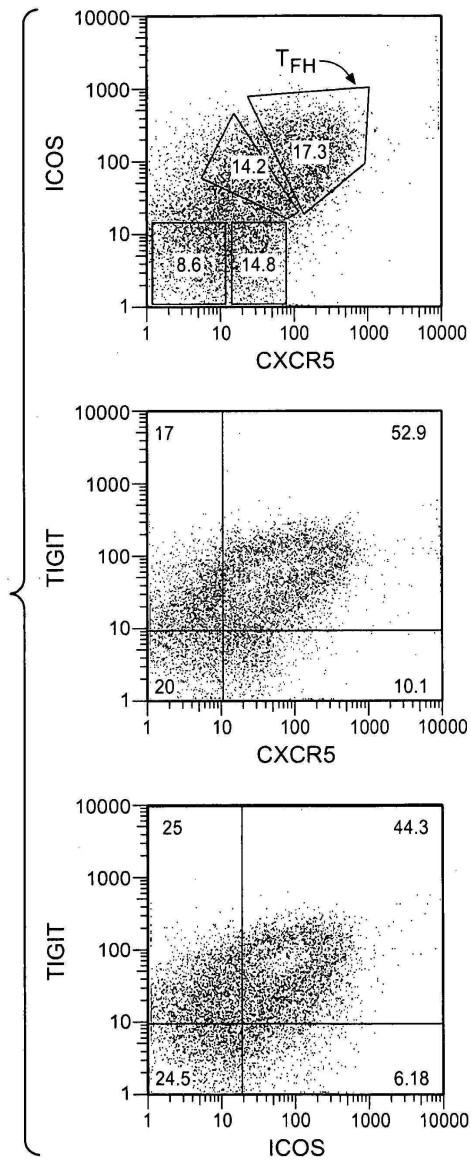
도면7b



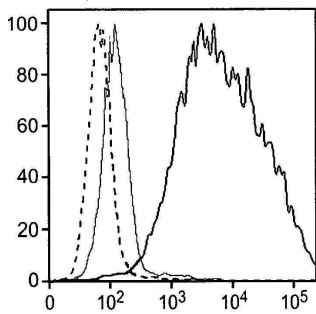
도면8a



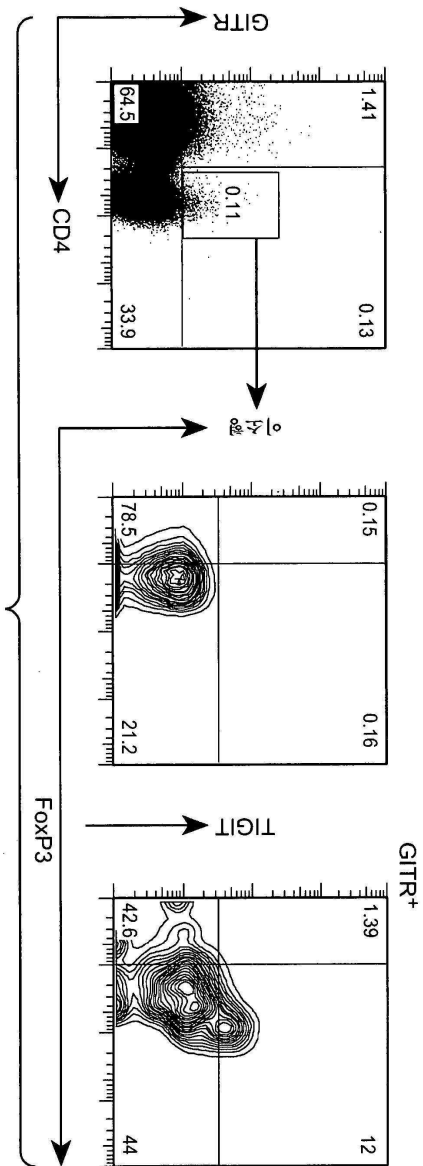
도면8b



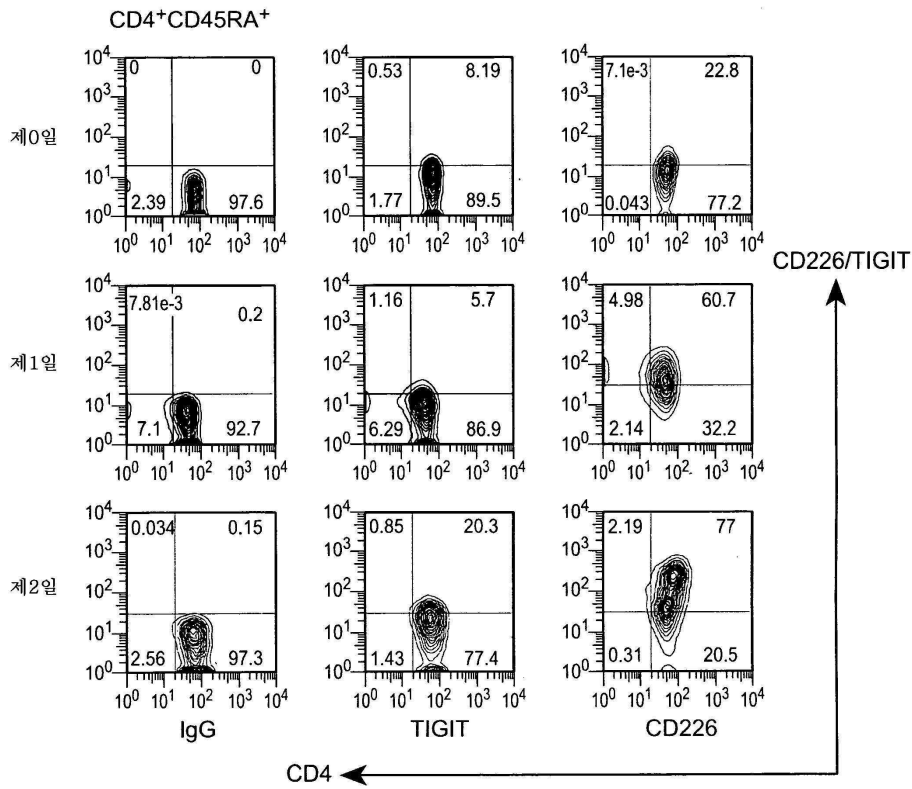
도면9a



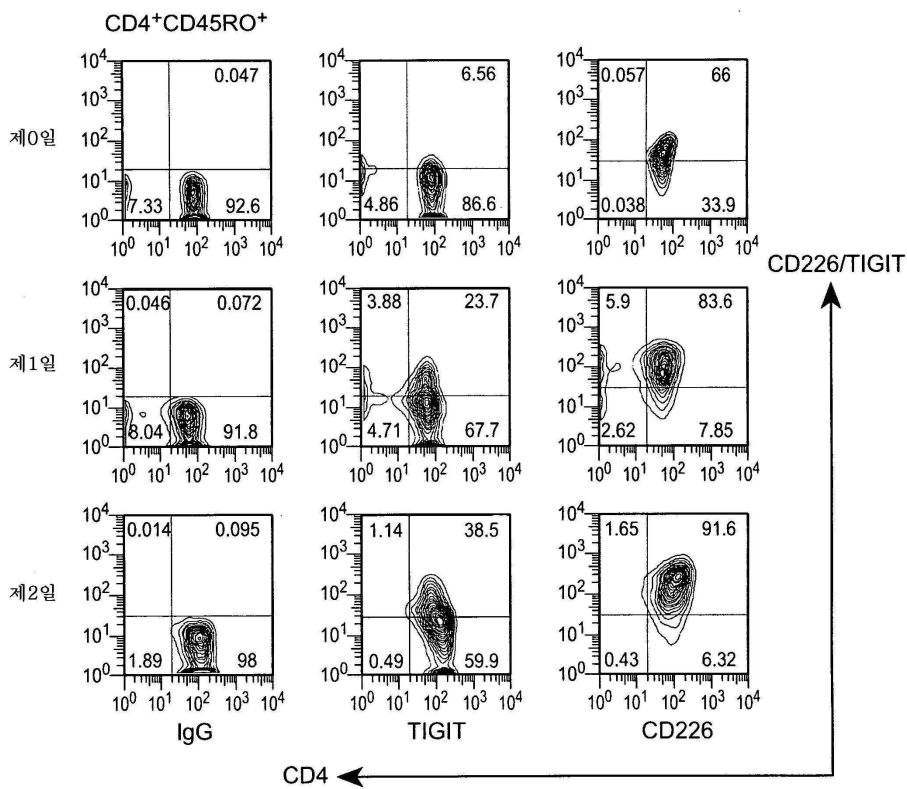
도면9b



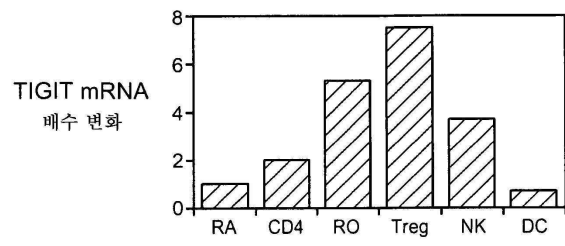
도면10aa



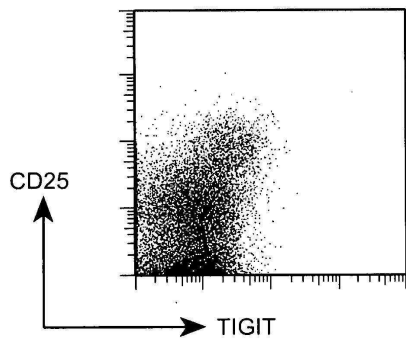
도면10ab



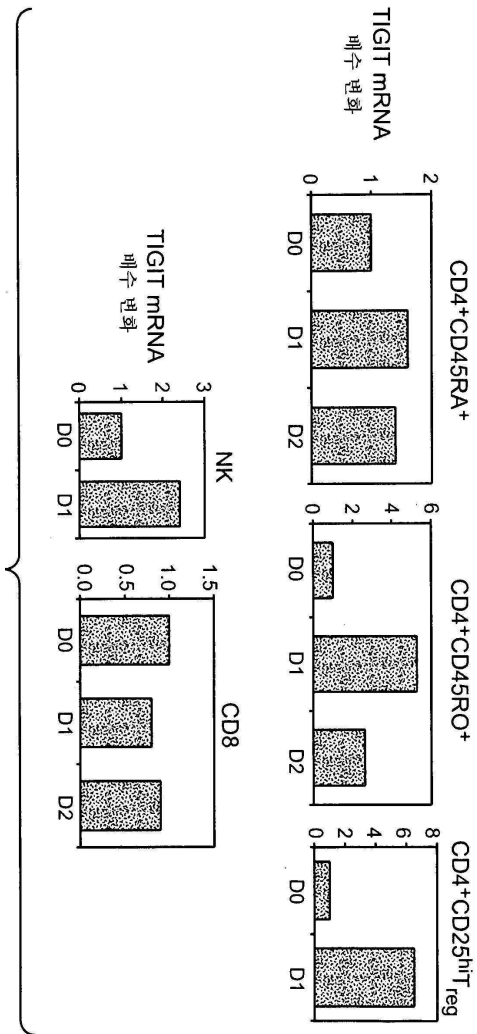
도면10b



도면10d

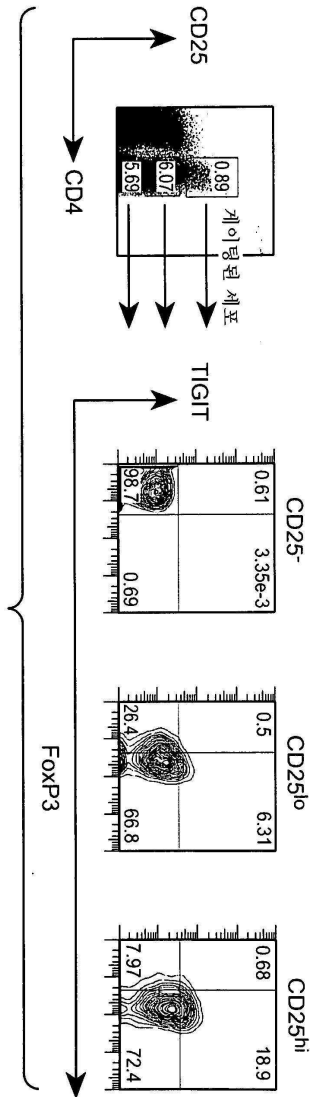


도면10c

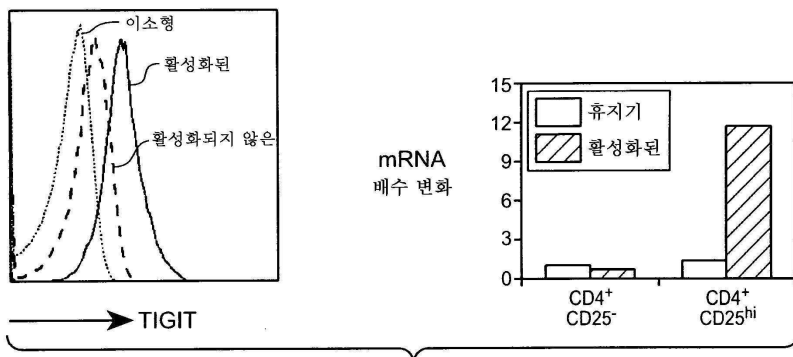




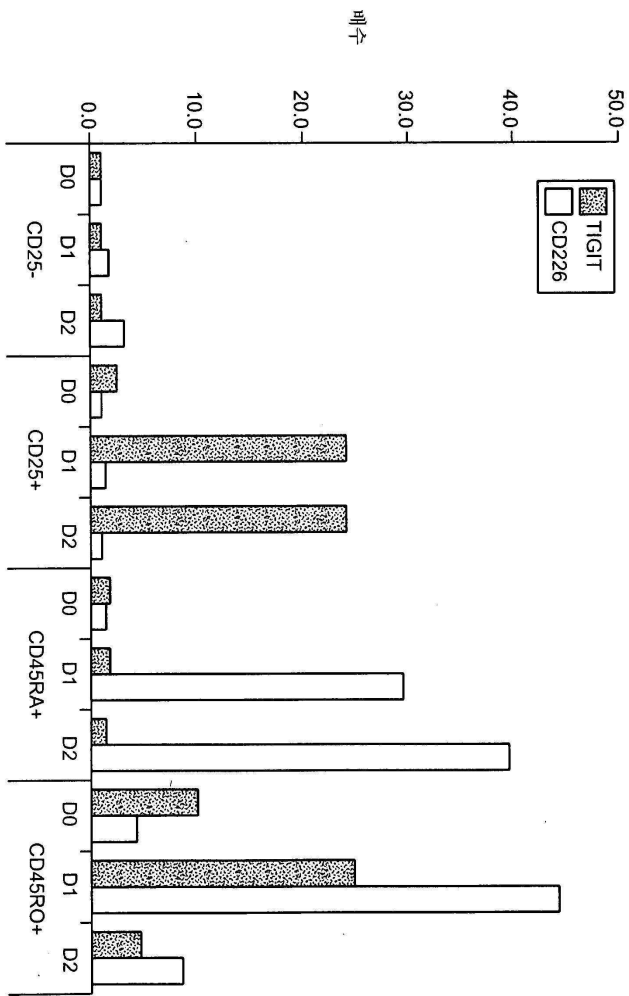
도면10e



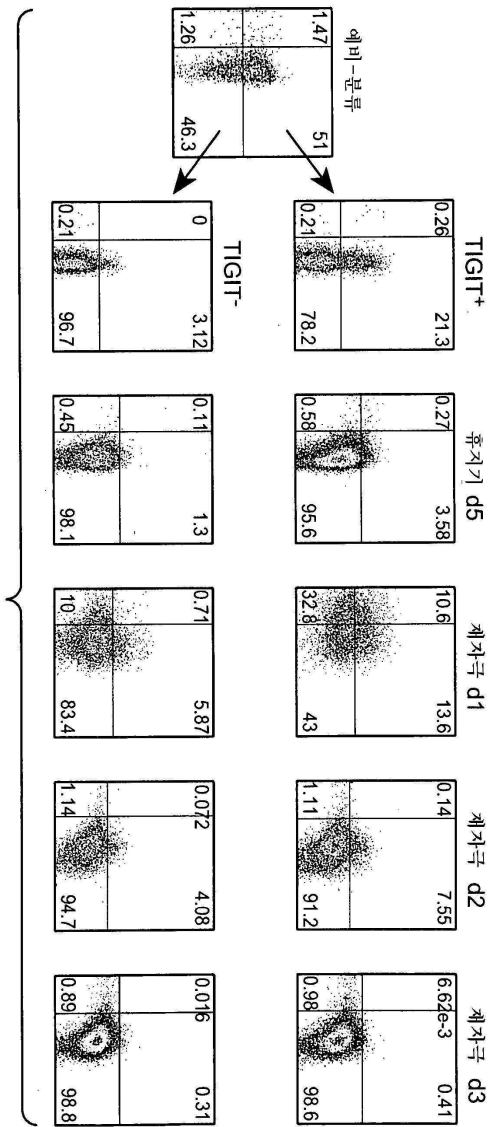
도면10f



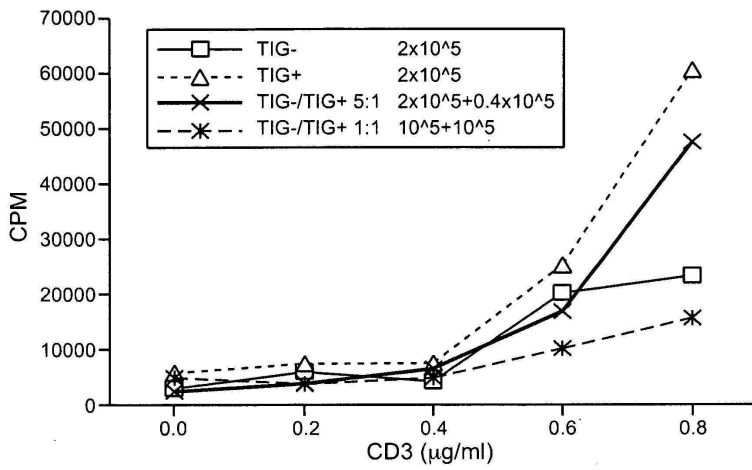
도면11



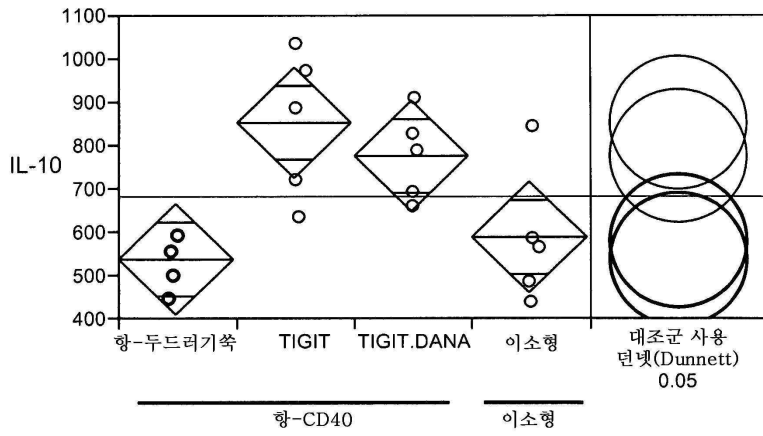
도면12a



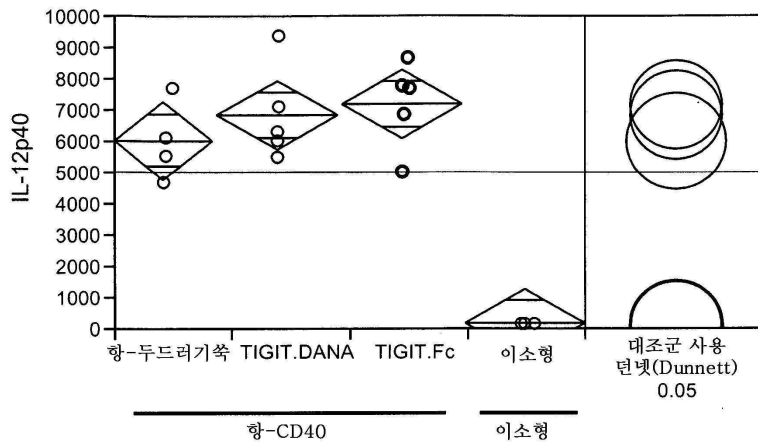
도면12b



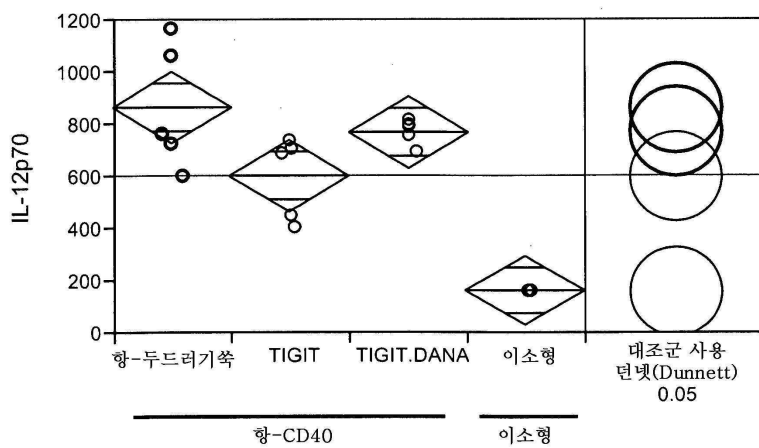
도면13a



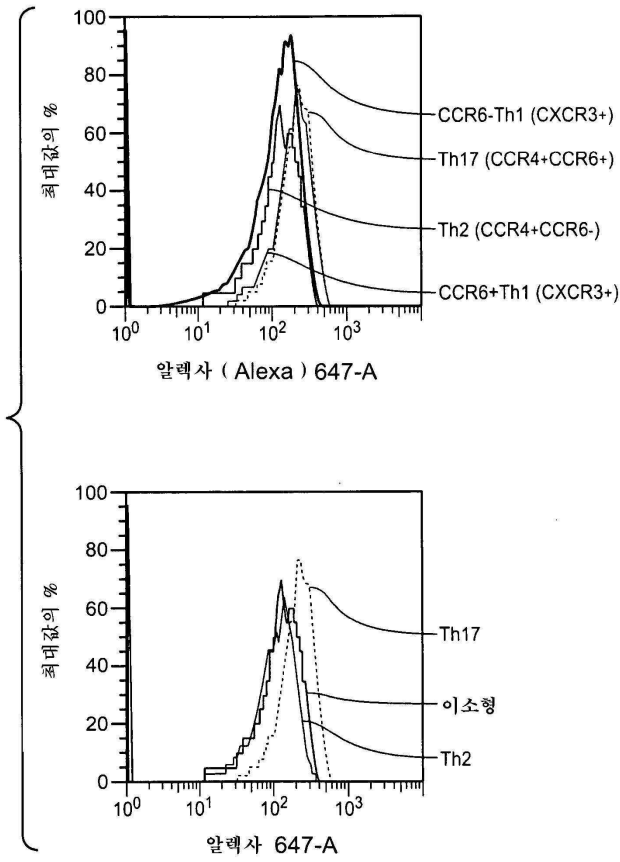
도면13b



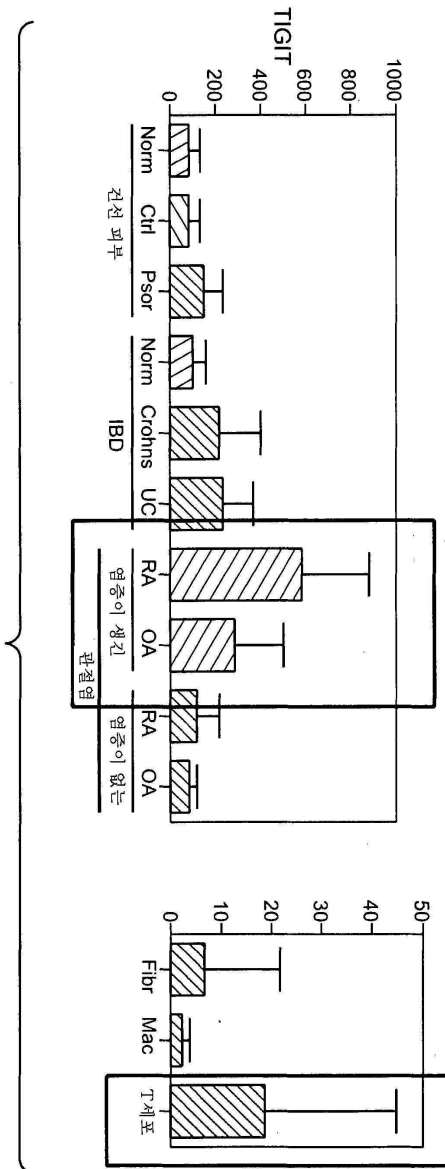
도면13c



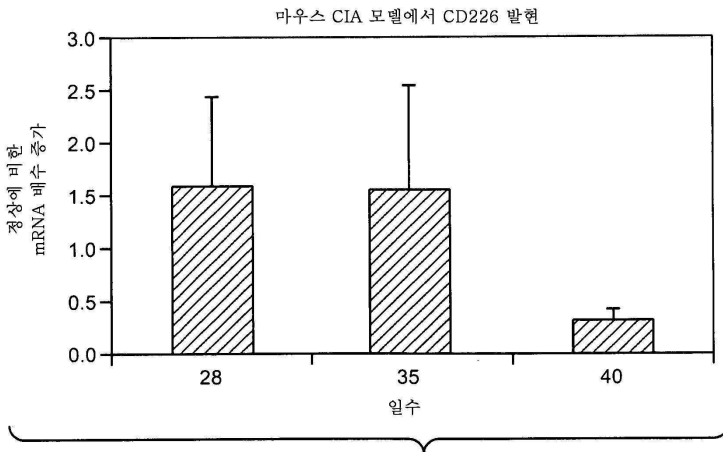
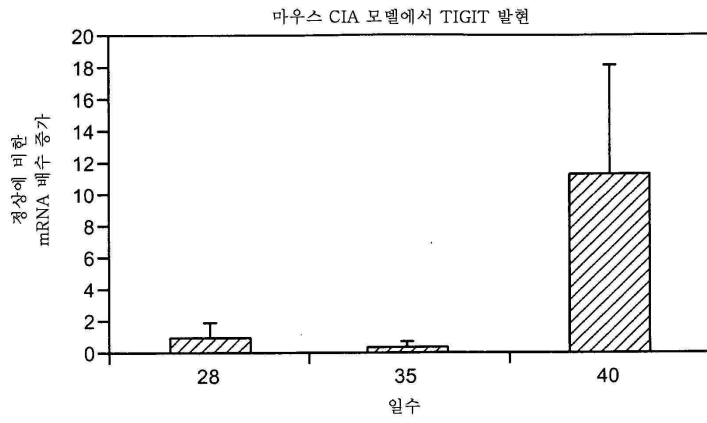
도면14



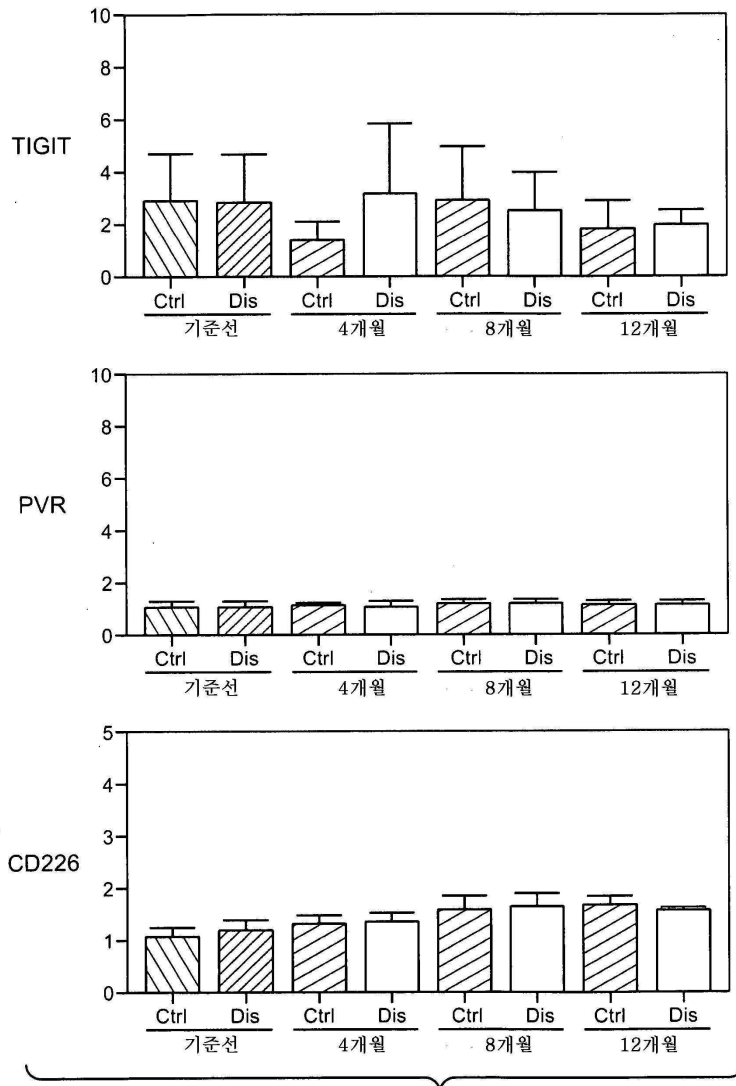
도면15



도면16

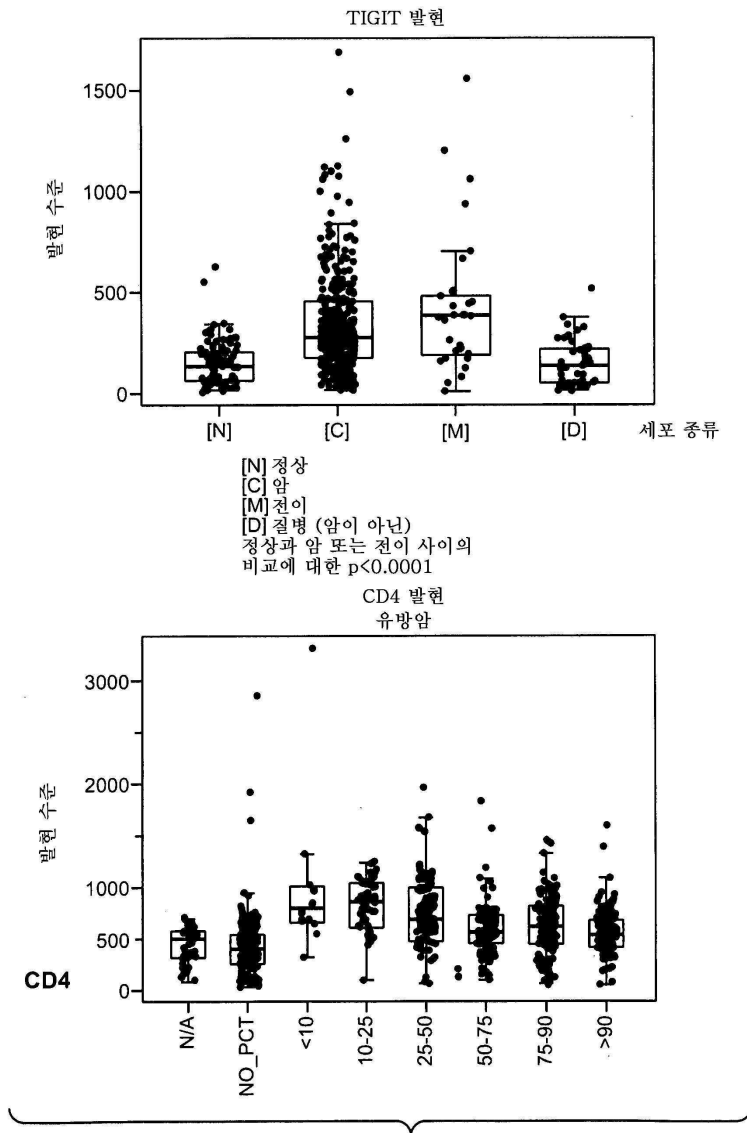


도면17

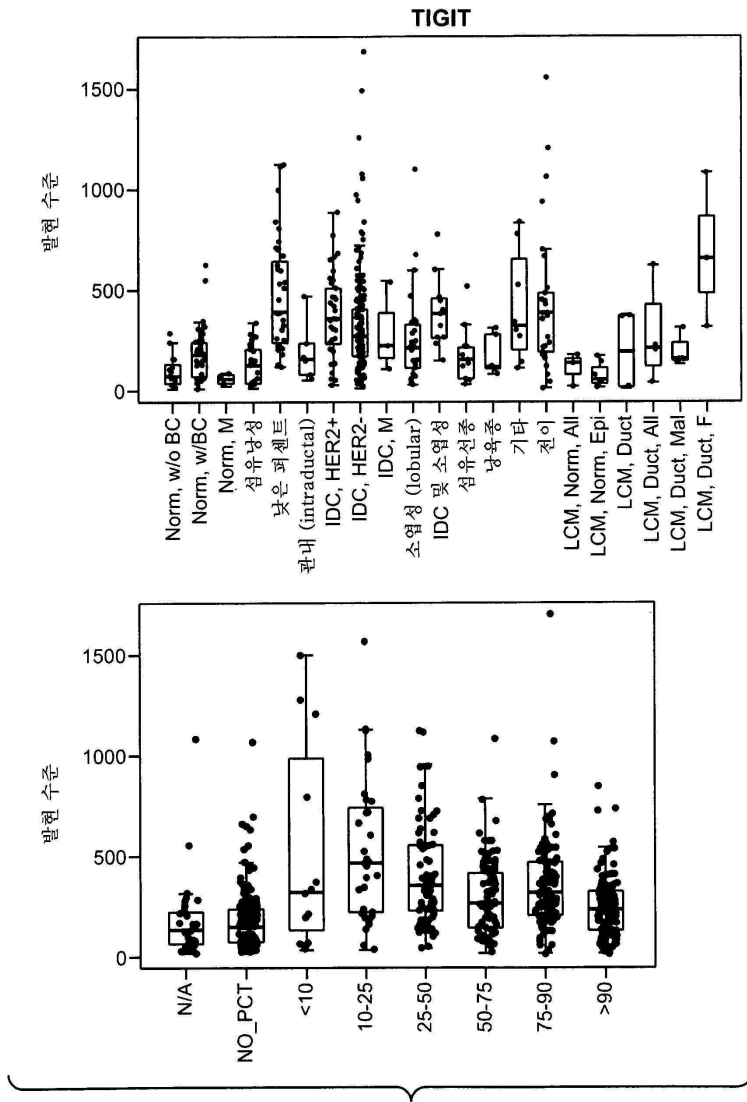




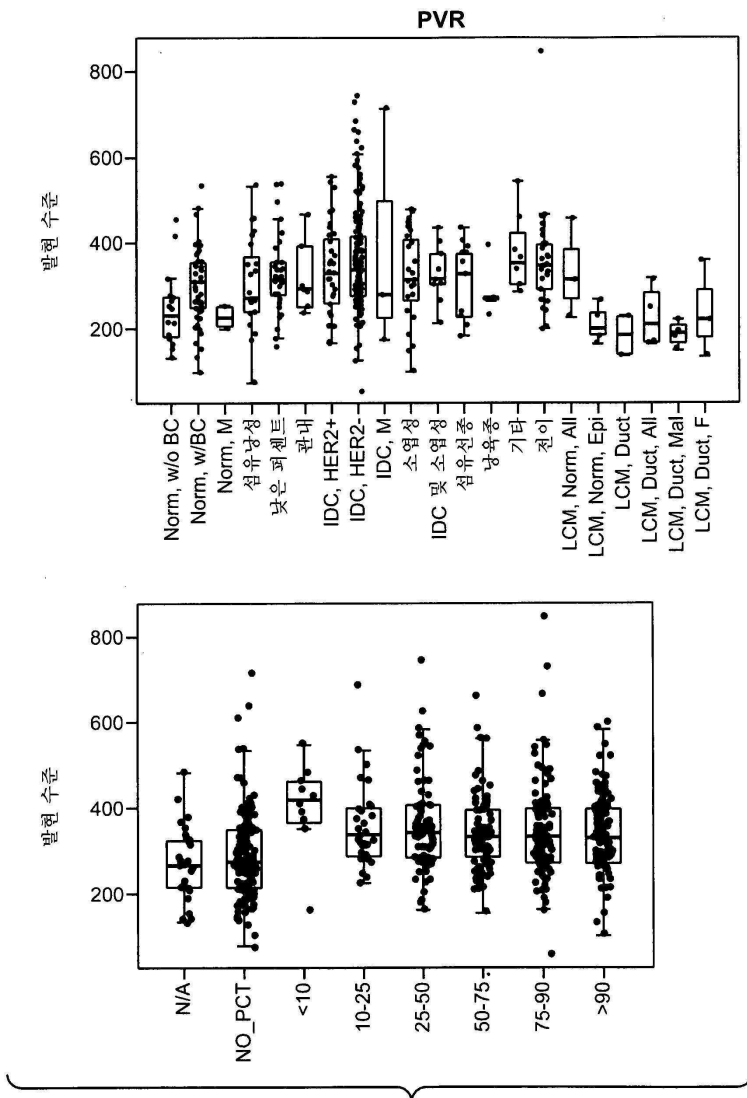
도면18a



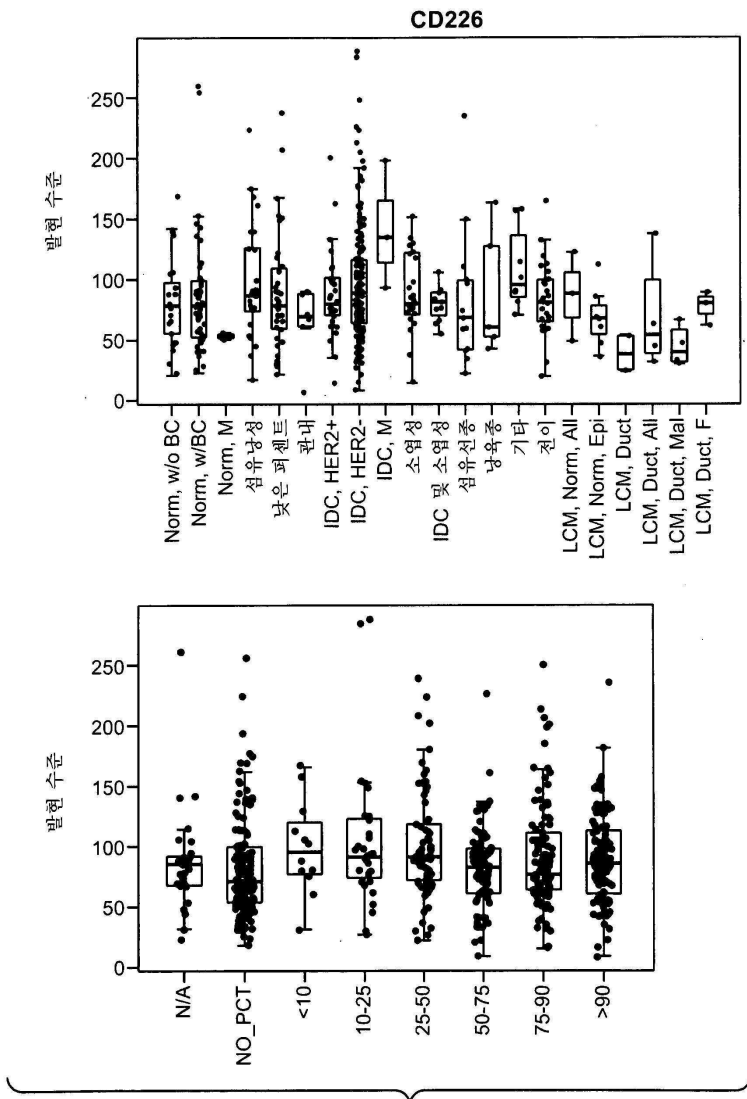
도면18b



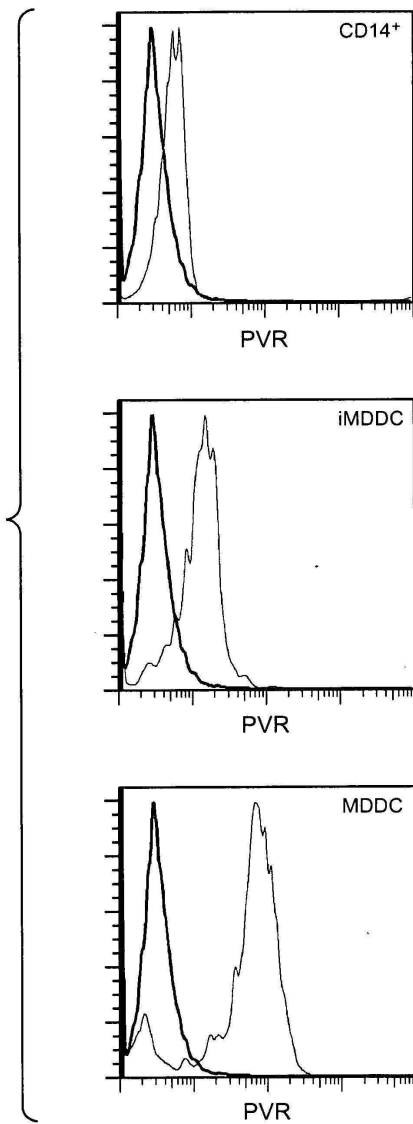
도면18c



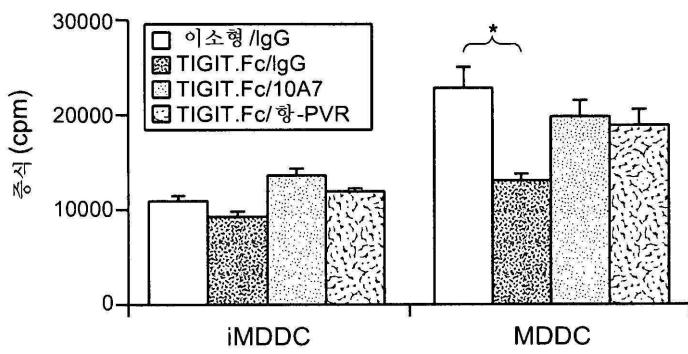
도면18d



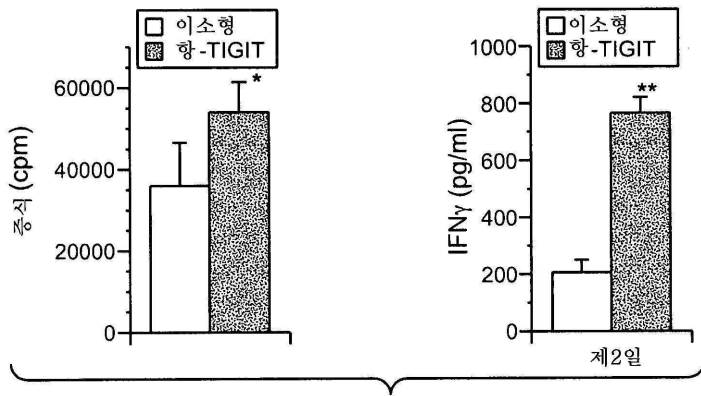
도면19a



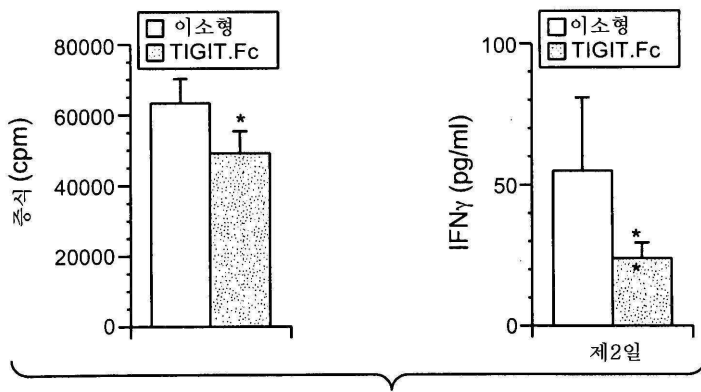
도면19b



도면19c

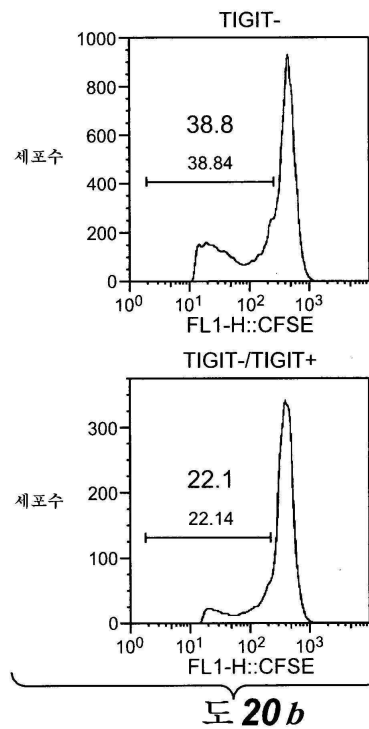
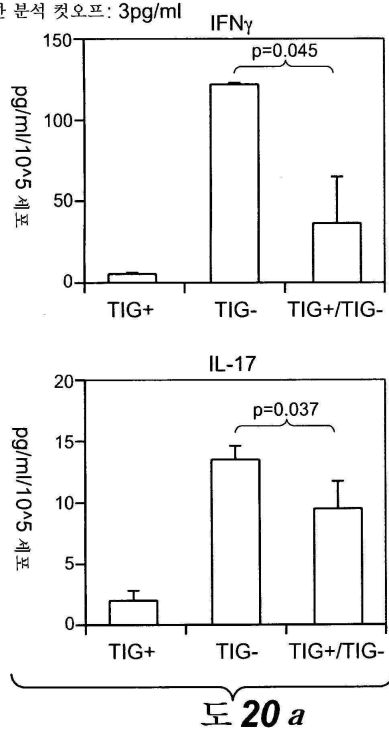


도면19d

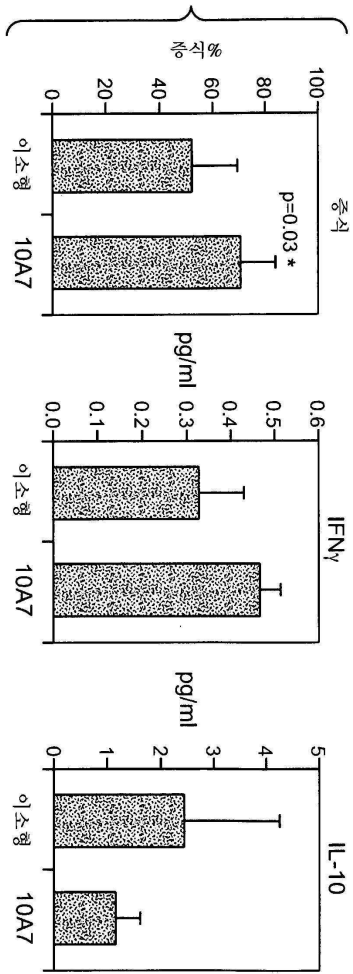


도면20

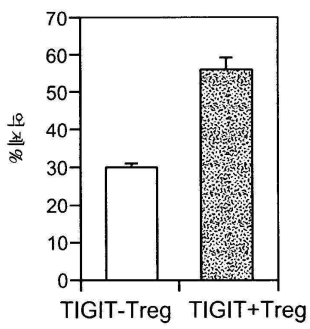
둘 모두에 대한 분석 컷오프: 3pg/ml



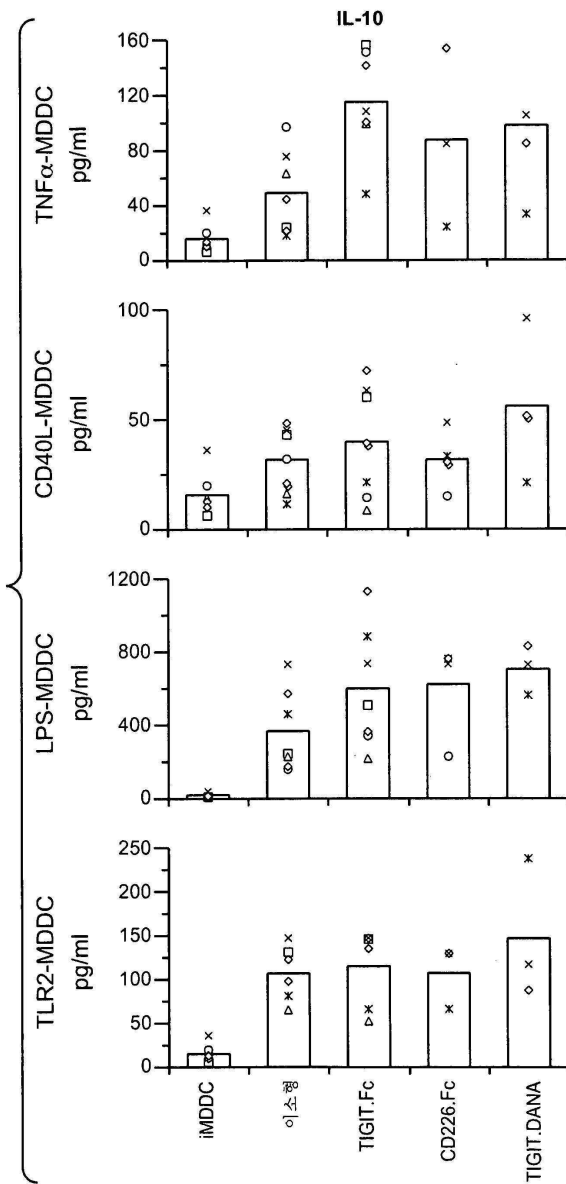
도면21a



도면21b

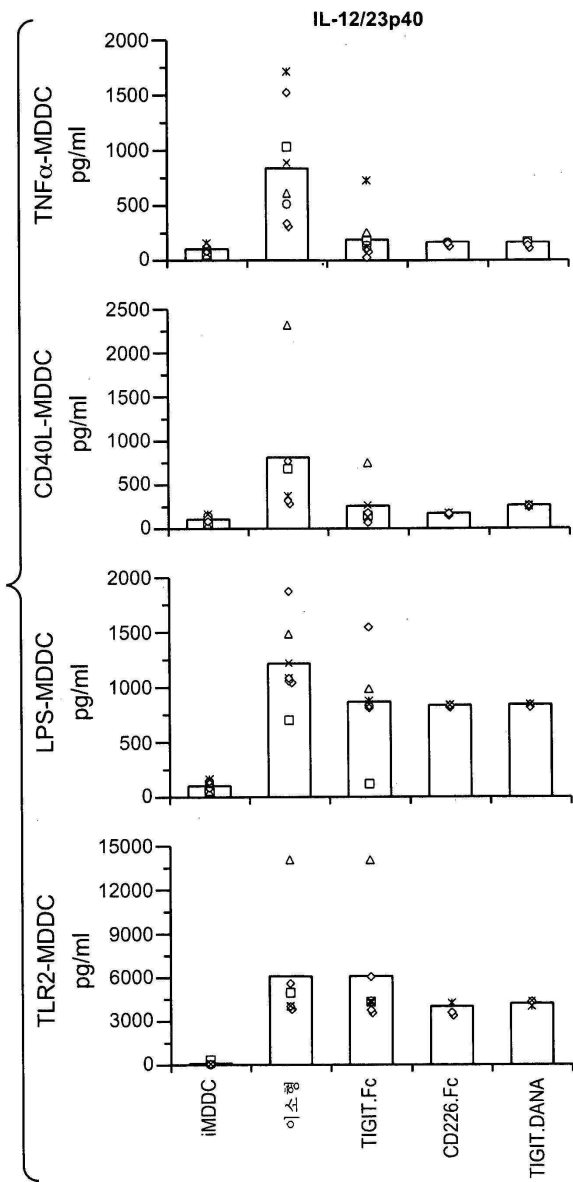


도면22aa

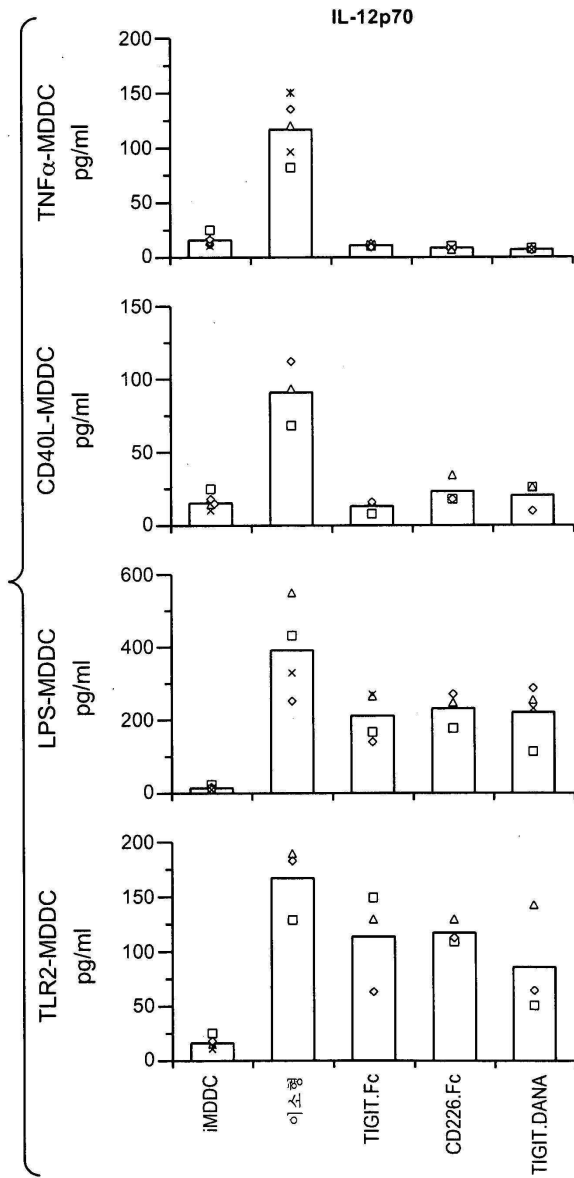




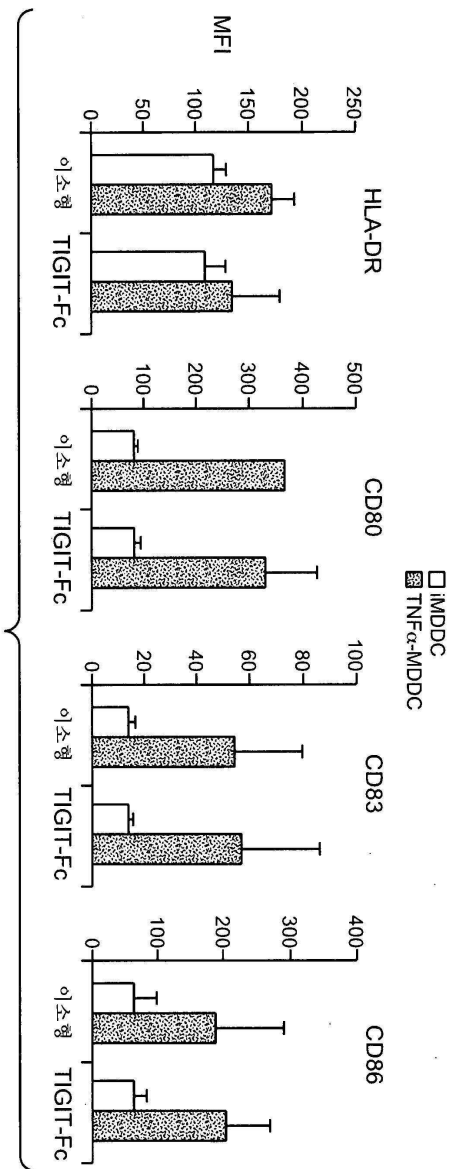
도면22ab



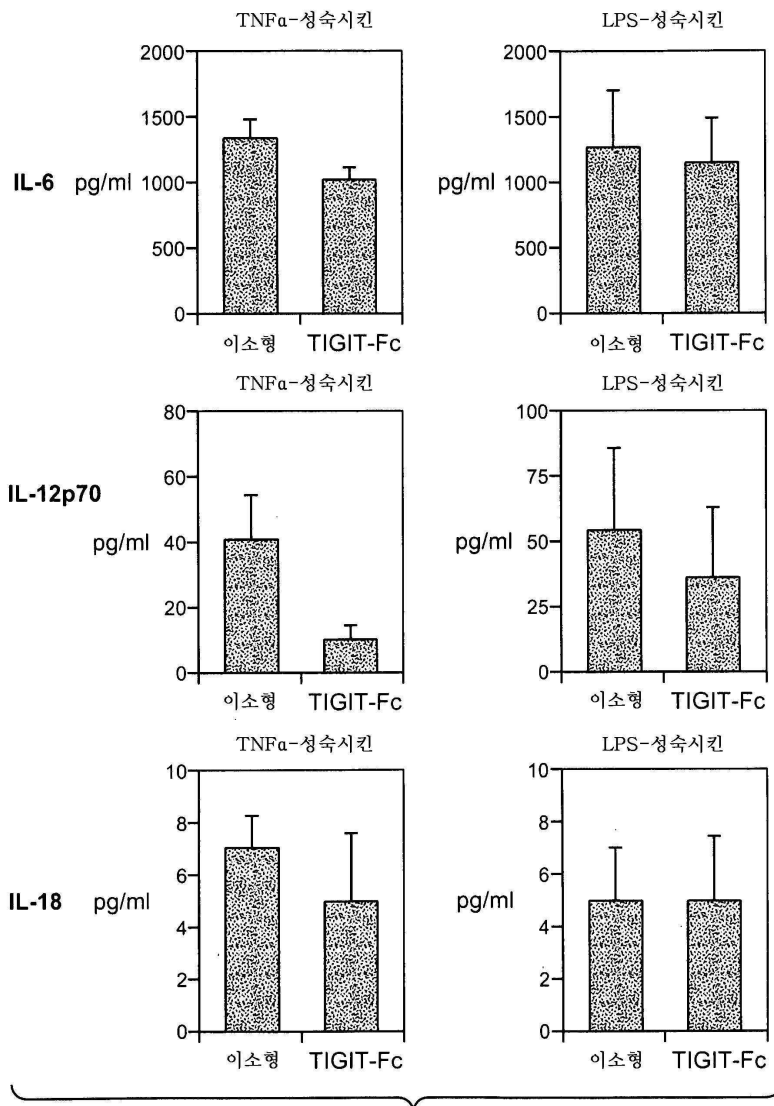
도면22ac



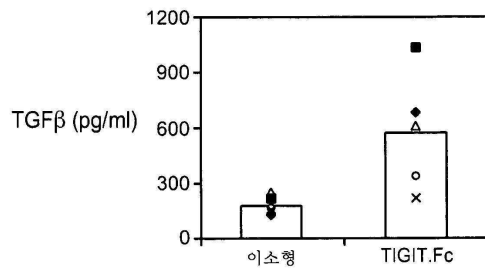
도면22b



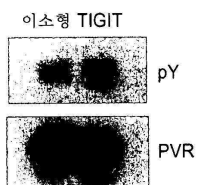
도면22c



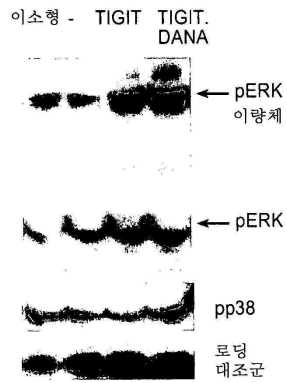
도면22d



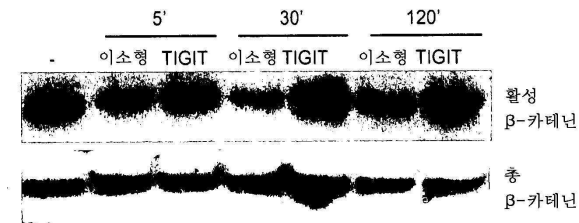
도면23a



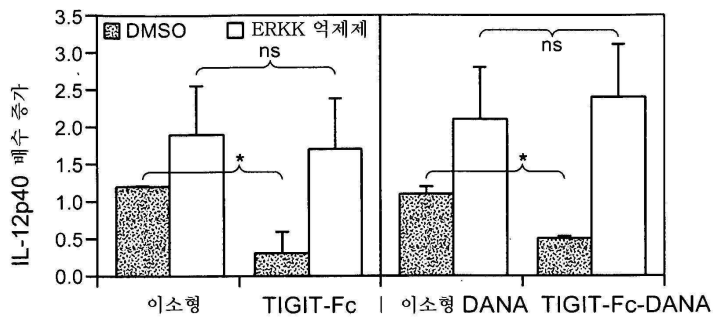
도면23b



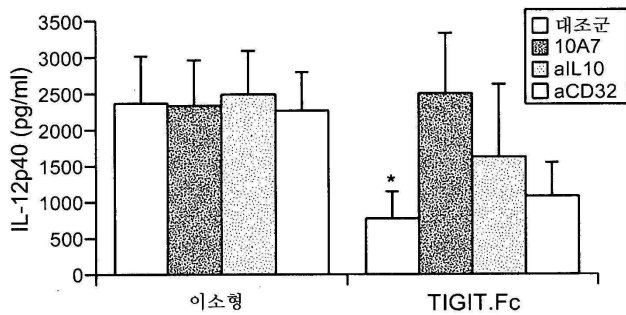
도면23c



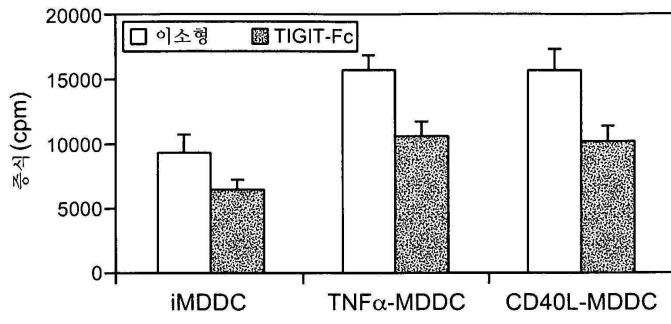
도면24a



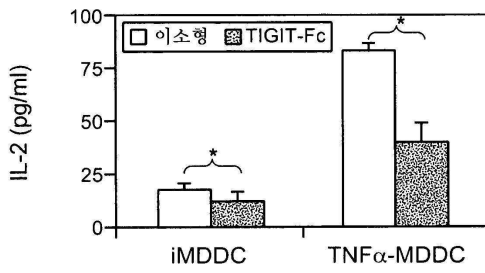
도면24b



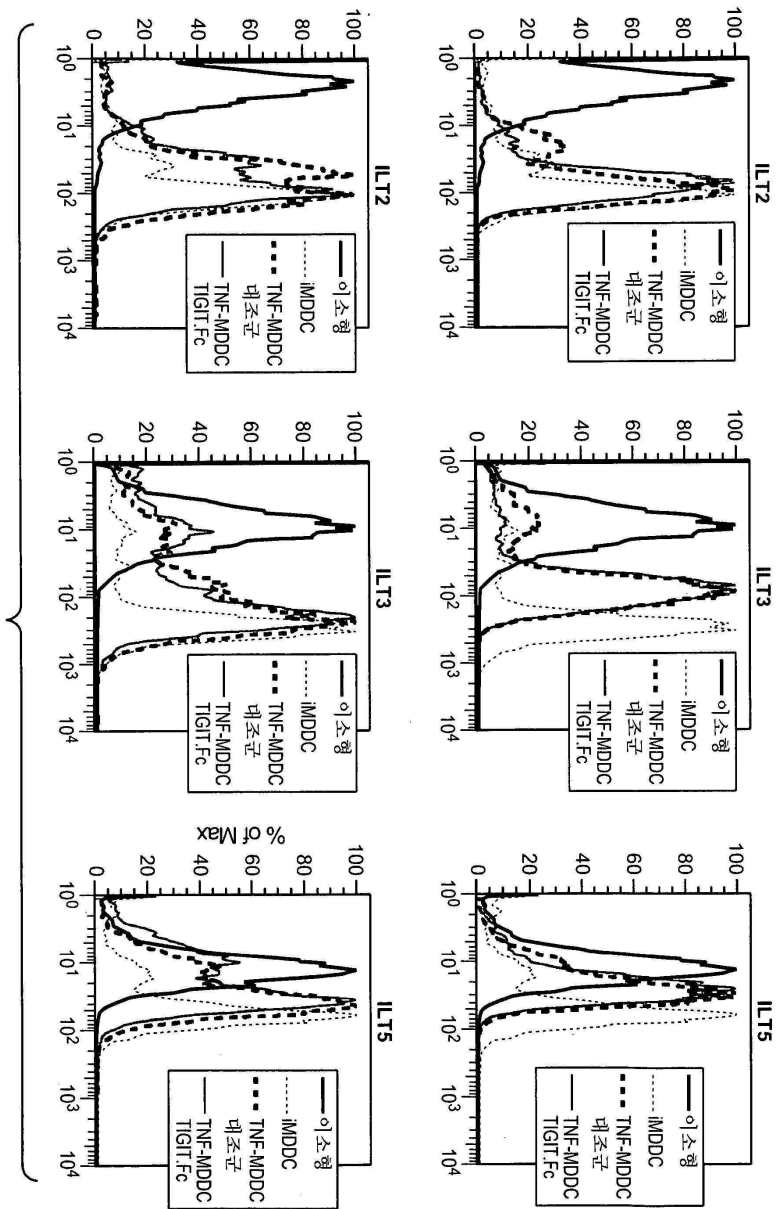
도면25a



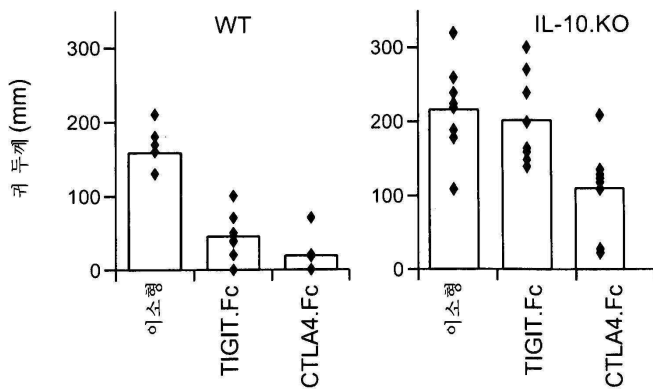
도면25b



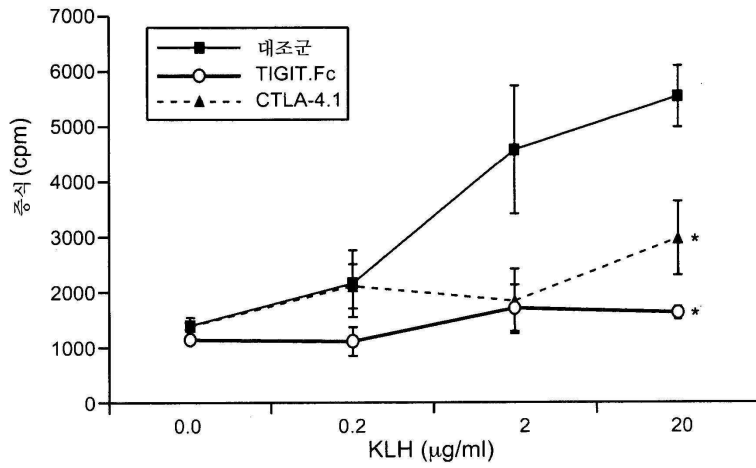
도면26



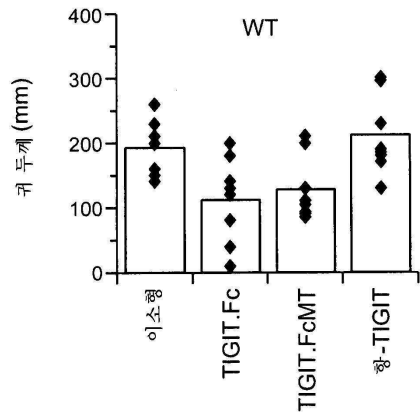
도면27a



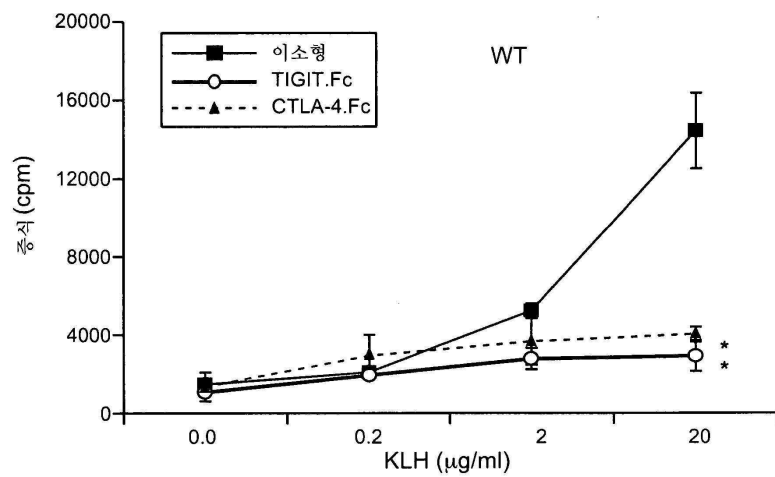
도면27b



도면27c

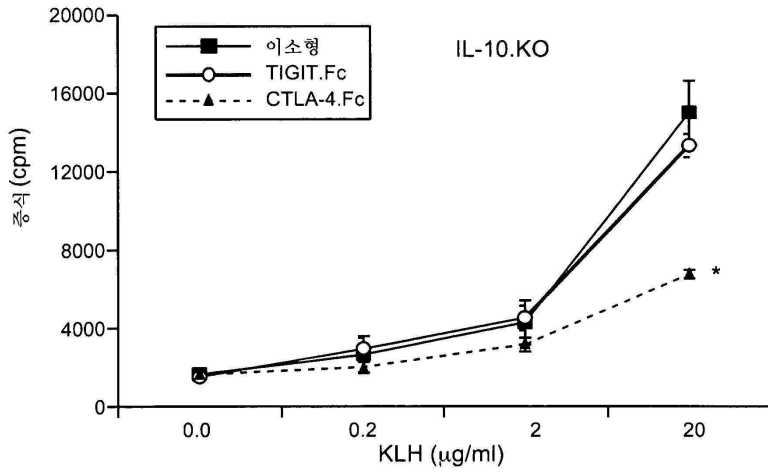


도면27d

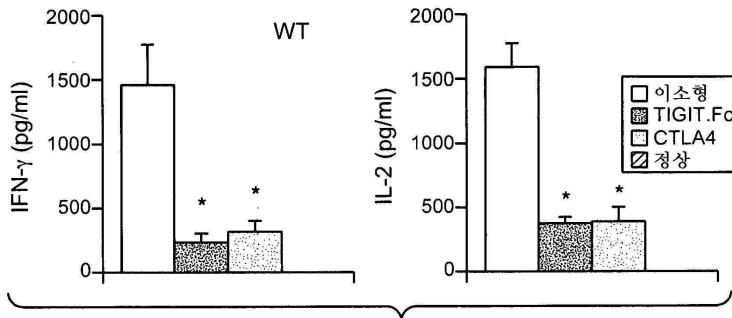




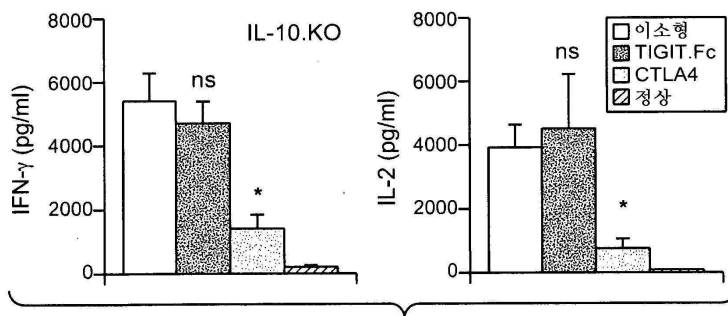
도면27e



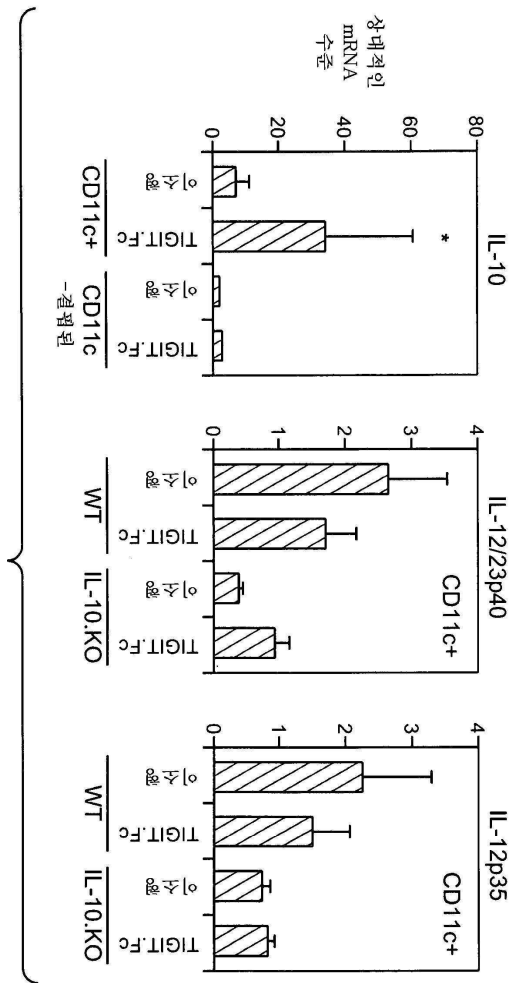
도면27f



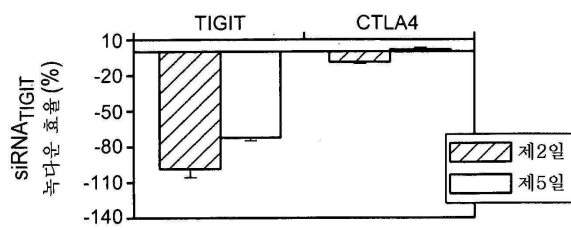
도면27g



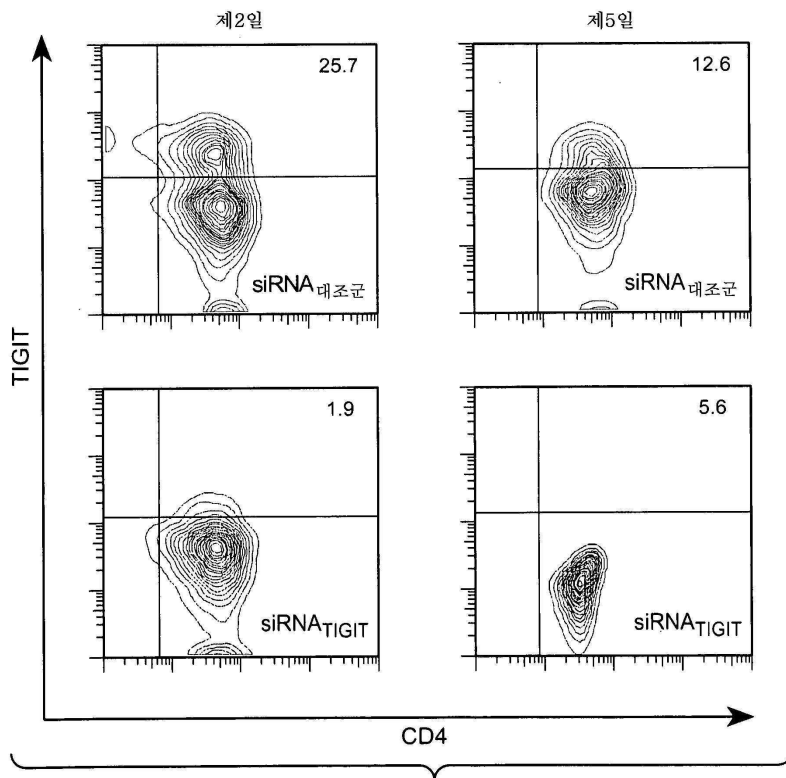
도면27h



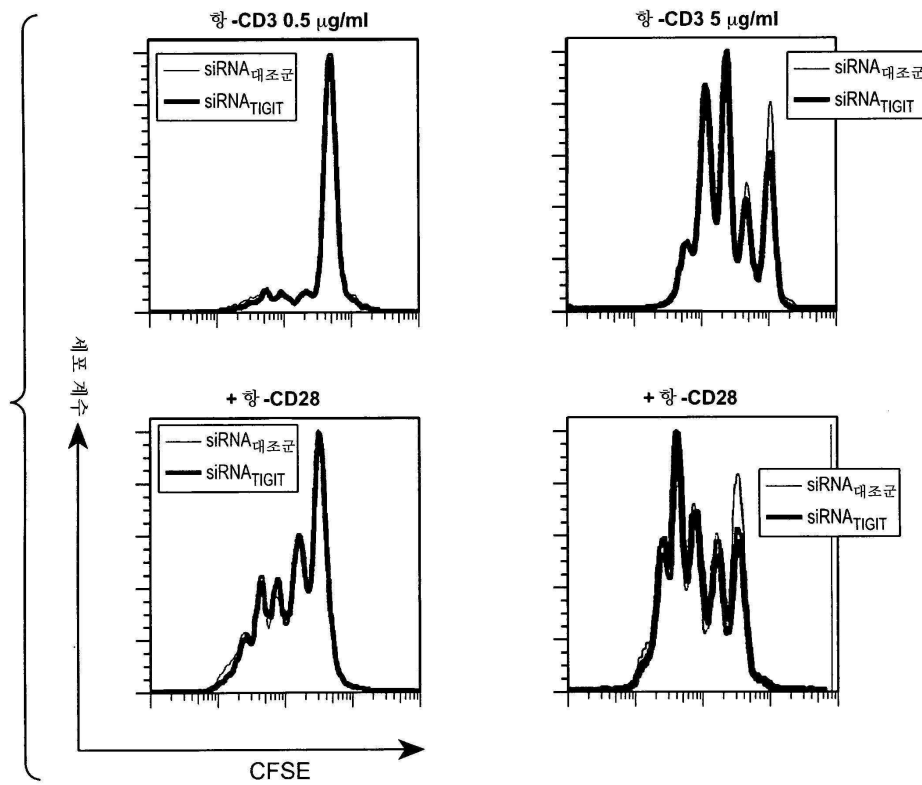
도면28a



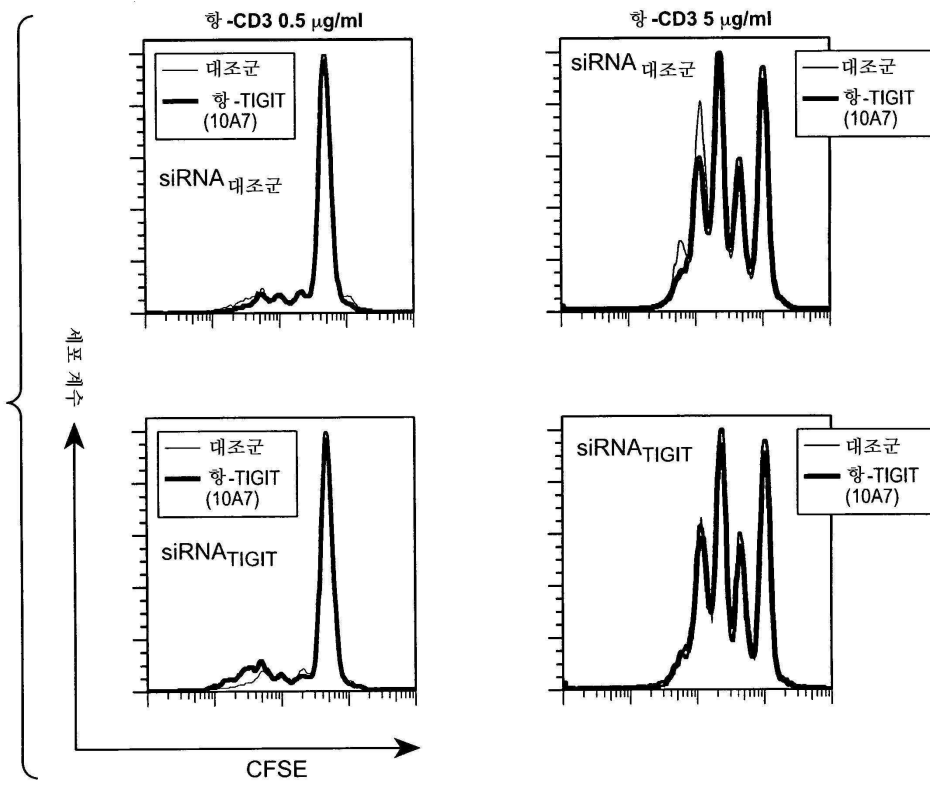
도면28b



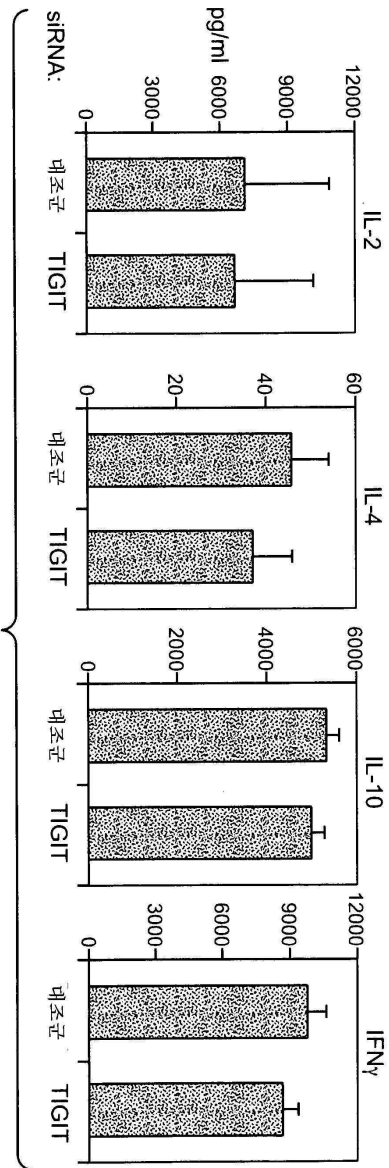
도면28c



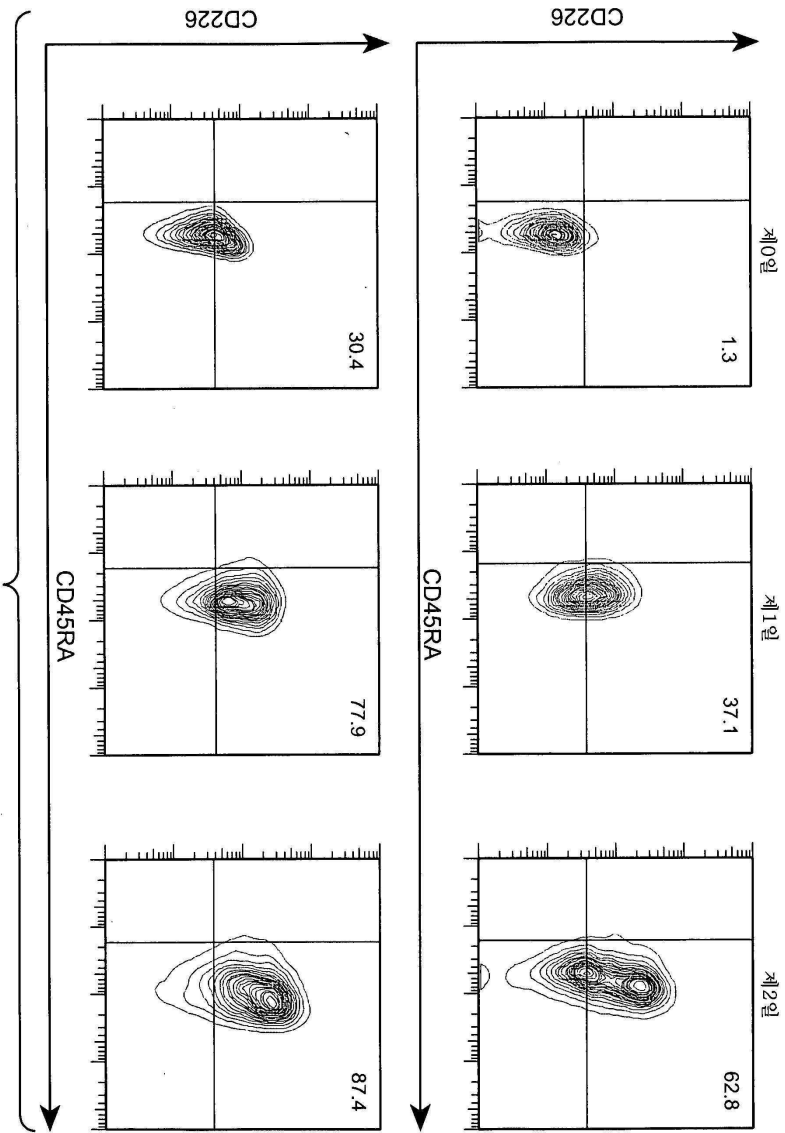
도면28d



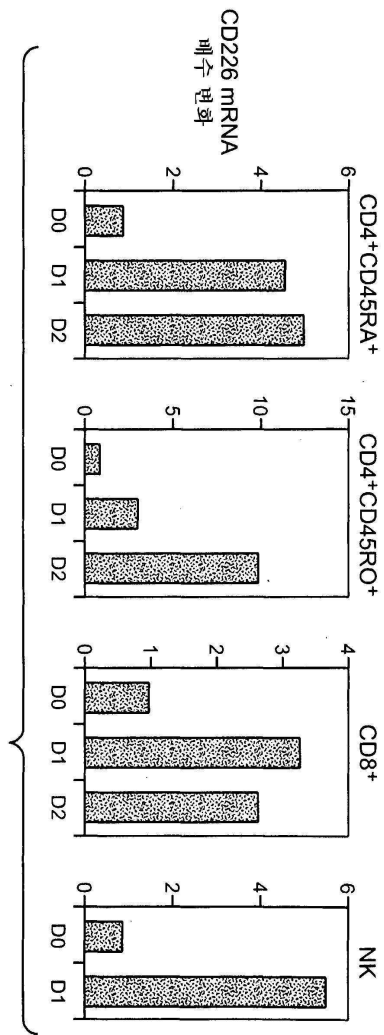
도면28e



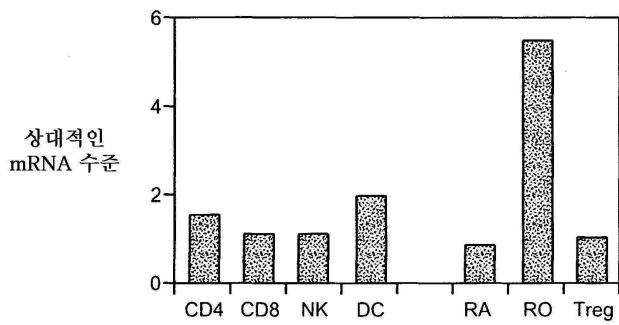
도면29a



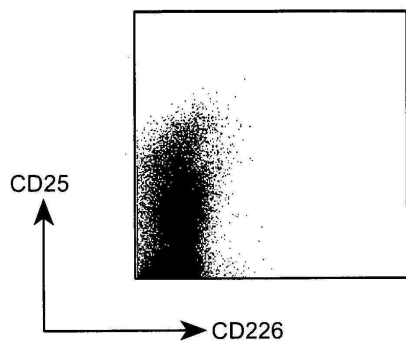
도면29b



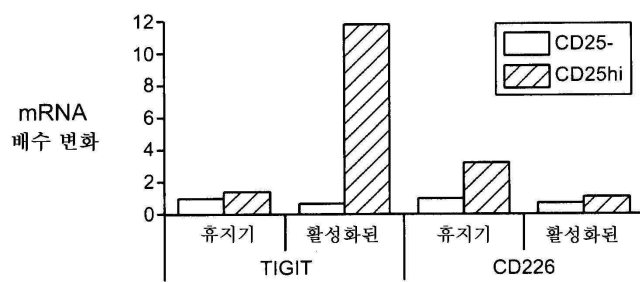
도면29c



도면29d

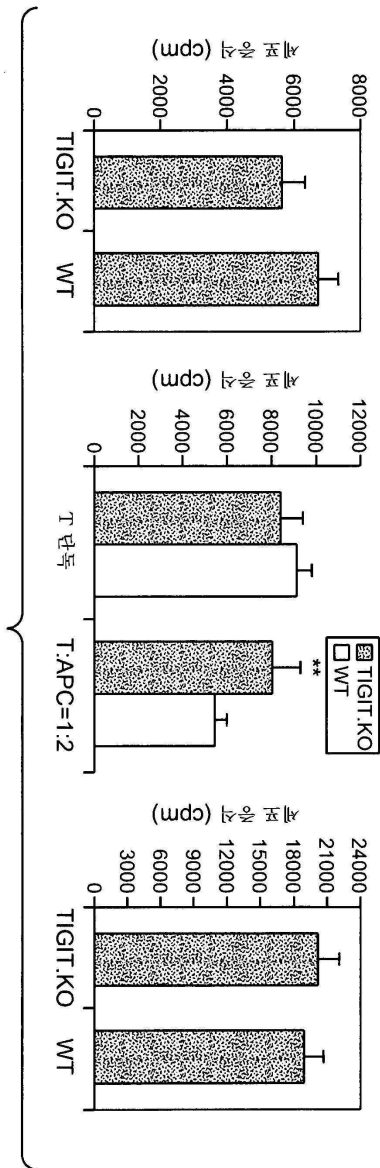


도면29e

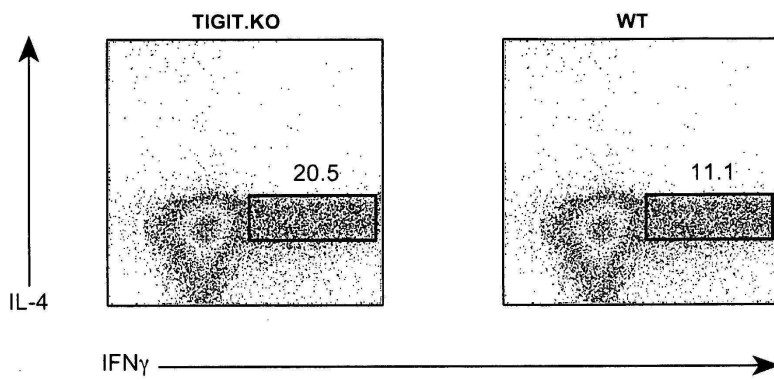




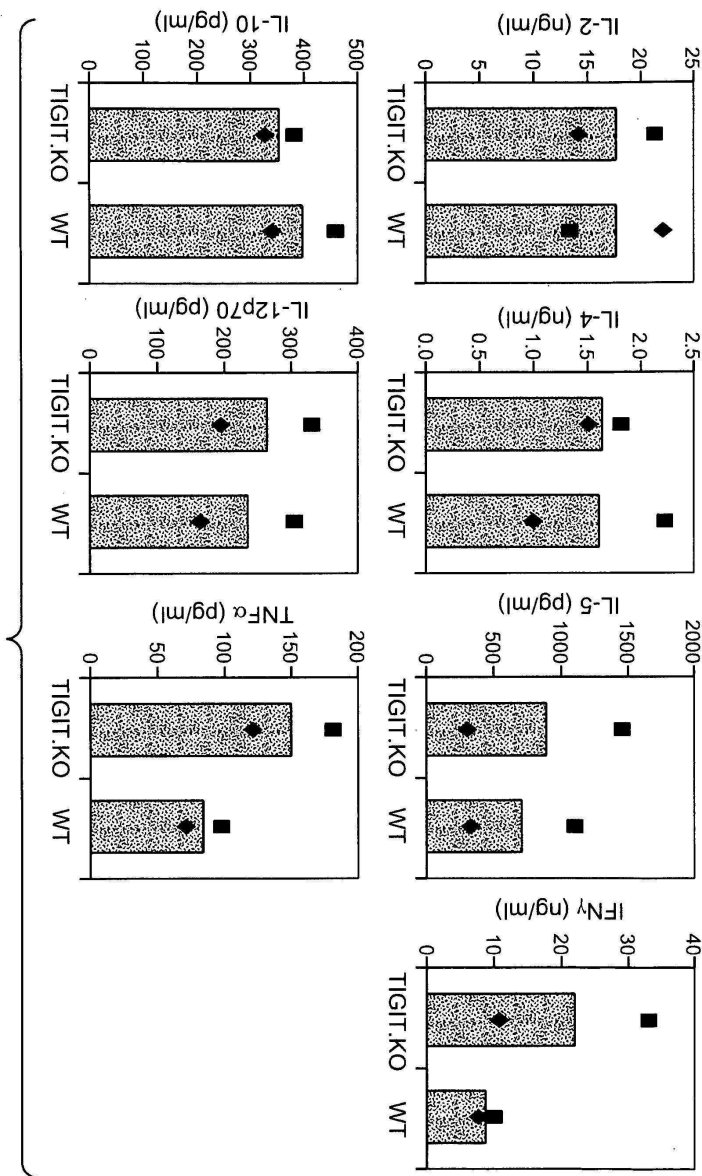
도면30a



도면30b



도면30c



서열목록

<110> Clark, Hilary

Eaton, Dan

Gonzalez, Lino Jr.

Grogan, Jane

Hackney, Jason A.

Harden, Kristin

Yu, Xin

<120> NOVEL COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF IMMUNE RELATED DISEASES

<130> P4185R1

<141> 2009-04-08

<150> US 61/194,271

<151> 2008-09-26

<150> US 61/123,530

<151> 2008-04-09

<160> 64

<210> 1

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln  
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr  
 20 25 30

Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys  
 35 40 45

His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu  
 50 55 60

Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp  
 65 70 75

His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly  
 80 85 90

Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu  
 95 100 105

Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly  
 110 115 120

Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly  
 125 130 135

Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu  
 140 145 150

Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg



Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Arg  
 110 115 120  
 Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His  
 125 130 135  
 Ser Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Met Met  
 140 145 150  
 Leu Val Val Ile Cys Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Leu Ala  
 155 160 165

Arg Lys Lys Lys Ser Leu Arg Ile His Ser Val Glu Ser Gly Leu  
 170 175 180  
 Gln Arg Lys Ser Thr Gly Gln Glu Glu Gln Ile Pro Ser Ala Pro  
 185 190 195  
 Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly  
 200 205 210  
 Leu Cys Gly Glu Gln Gln Gly Asp Asp Cys Ala Glu Leu His Asp  
 215 220 225  
 Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Cys Ser Phe  
 230 235 240

Phe Thr Glu Thr Gly  
 245

<210> 3

<211> 245

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 3

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

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



Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Phe Leu Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr Ile Asp Thr  
 20 25 30  
 Lys Arg Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln  
 35 40 45  
 Cys His Phe Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asp Trp  
 50 55 60  
 Lys Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu Gly  
 65 70 75  
 Trp His Val Ala Ser Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro  
 80 85 90  
 Ser Leu Gly Leu Thr Phe Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly  
 95 100 105  
 Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys  
 110 115 120  
 Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln Glu Ser Ser Val Ala Gln Phe  
 125 130 135  
 Gln Thr Ala Pro Leu Gly Gly Thr Met Ala Ala Val Leu Gly Leu  
 140 145 150  
 Ile Cys Leu Met Val Thr Gly Val Thr Val Leu Ala Arg Lys Lys  
 155 160 165  
 Ser Ile Arg Met His Ser Ile Glu Ser Gly Leu Gly Arg Thr Glu  
 170 175 180  
 Ala Glu Pro Gln Glu Trp Asn Leu Arg Ser Leu Ser Ser Pro Gly  
 185 190 195  
 Ser Pro Val Gln Thr Gln Thr Ala Pro Ala Gly Pro Cys Gly Glu  
 200 205 210  
 Gln Ala Glu Asp Asp Tyr Ala Asp Pro Gln Glu Tyr Phe Asn Val  
 215 220 225  
 Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Ser Phe Ile Ala Val Ser Lys Thr  
 230 235 240

Gly

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 5

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

<210> 6

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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



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

<210> 7

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

95 100 105  
 Tyr Pro Glu Gly Ile Gln Thr Lys Ile Tyr Asn Leu Leu Ile Gln  
 110 115 120  
 Thr His Val Thr Ala Asp Glu Trp Asn Ser Asn  
 125 130

<210> 8

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Glu Thr Gly Ala Gln Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu  
 20 25 30  
 Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln  
 35 40 45  
 Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln Asn Val Ala Ala Phe His  
 50 55 60  
 Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro Lys Pro Gly Ser Glu  
 65 70 75  
 Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr Gly Gln Asp Thr  
 80 85 90  
 Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His Gly Leu Thr  
 95 100 105  
 Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr Phe Pro  
 110 115 120  
 Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala Lys  
 125 130 135  
 Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys  
 140

<210> 9

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Pro Gly Val His Ser Gln Val Val Gln Val Asn Asp Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val Leu His Cys Ser Phe  
                          20                    25                    30  
 Ala Asn Pro Leu Pro Ser Val Lys Ile Thr Gln Val Thr Trp Gln  
                                  35                    40                    45  
 Lys Ser Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile Tyr Asn Pro  
                                  50                    55                    60  
 Ser Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg Val Glu  
                                  65                    70                    75  
 Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser Arg  
                                  80                    85                    90  
 Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr  
                                  95                    100                    105  
  
 Phe Pro Thr Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met  
                                  110                    115                    120  
 Ala Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln  
                                  125                    130

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

110 115 120  
 Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro  
 125 130  
 <210> 12  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 Leu Leu His Val Tyr Arg Ala Leu Cys Glu Glu Val Leu Trp His  
 1 5 10 15  
  
 Thr Ser Val Pro Phe Ala Glu Asn Met Ser Leu Glu Cys Val Tyr  
 20 25 30  
 Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val Glu Trp Phe Lys Ile Gly  
 35 40 45  
 Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser Pro Thr His Gly Met  
 50 55 60  
 Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr Phe Leu Asn Ser  
 65 70 75  
 Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg Asn Ala Ser  
  
 80 85 90  
 Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro  
 95 100 105  
 Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp Ser  
 110 115 120  
 Phe Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn  
 125

<210> 13

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1	5	10	15
Leu Ser Thr Pro	Leu Gly Lys Thr	Ala Glu Leu Thr	Cys Thr Tyr
	20	25	30
Ser Thr Ser Val	Gly Asp Ser Phe	Ala Leu Glu Trp	Ser Phe Val
	35	40	45
Gln Pro Gly Lys	Pro Ile Ser Glu	Ser His Pro Ile	Leu Tyr Phe
	50	55	60
Thr Asn Gly His	Leu Tyr Pro Thr	Gly Ser Lys Ser	Lys Arg Val
	65	70	75
Ser Leu Leu Gln	Asn Pro Pro Thr	Val Gly Val Ala	Thr Leu Lys
	80	85	90
Leu Thr Asp Val	His Pro Ser Asp	Thr Gly Thr Tyr	Leu Cys Gln
	95	100	105
Val Asn Asn Pro	Pro Asp Phe Tyr	Thr Asn Gly Leu	Gly Leu Ile
	110	115	120
Asn Leu Thr Val	Leu Val Pro Pro	Ser Asn Pro	
	125	130	

<210> 14

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

Gln

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Gly Leu Glu Gly Gln Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr  
 20 25 30  
 Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu  
 35 40 45  
 Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser Ser Ala Val Asp Arg Arg  
 50 55 60  
 Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr Asp Leu Gly Gly Gly  
 65 70 75  
 Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu Glu Asp Ala Gly  
 80 85 90  
 Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro Gln Ile Leu  
 95 100 105  
 His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu Glu  
 110 115

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asn Phe Trp Asn Leu Pro Ile Thr Ala Gln Val Thr Ile Glu Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Pro Pro Lys Val Ser Glu Gly Lys Asp Val Leu Leu Leu Val  
                          20                    25                    30  
 His Asn Leu Pro Gln Asn Leu Ala Gly Tyr Ile Trp Tyr Lys Gly  
                          35                    40                    45  
 Gln Leu Met Asp Leu Tyr His Tyr Ile Thr Ser Tyr Val Val Asp  
    50                    55                    60  
 Gly Gln Ile Asn Ile Tyr Gly Pro Ala Tyr Thr Gly Arg Glu Thr  
                          65                    70                    75  
 Val Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Arg Glu  
                          80                    85                    90  
 Asp Ala Gly Ser Tyr Thr Leu His Ile Ile Lys Arg Gly Asp Arg  
                          95                    100                    105  
 Thr Arg Gly Val Thr Gly Tyr Phe Thr Phe Asn Leu Tyr Leu Lys  
                          110                    115                    120

Leu Pro Lys Pro

<210> 17

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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



Gln Lys Gly Thr Glu Glu Phe Val Lys Ile Leu Arg Tyr Glu Asn

50 55 60

Glu Val Leu Gln Leu Glu Glu Asp Glu Arg Phe Glu Gly Arg Val

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Cys His Val Tyr Arg Leu Leu Phe Phe Glu Asn Tyr Glu His Asn

110 115 120

Thr Ser Val Val Lys Lys Ile His Ile Glu Val Val Asp Lys Gly

125 130 135

Glu

<210> 18

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr

1 5 10 15

Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Gln Ser Cys

20 25 30

Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp

35 40 45

Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly

50 55 60

Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr

65 70 75

Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg

80 85 90

Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr

95 100 105

Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys

110 115 120

Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn

125 130

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 19

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val

1 5 10 15

Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly

20 25

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 20

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn

1 5 10 15

Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu

20 25

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 21

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

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

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

<210> 22

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 22

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

80 85 90  
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Pro Leu Gly His Asn Thr  
 95 100 105  
 Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 23

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Val Lys Glu Asn Leu  
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 24

Ala Ser Ile Arg Phe Thr  
 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 25

Gln Gln Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr  
 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Thr Met His

5 10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 27

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

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 28

Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser

5 10

<210> 29

<211>

112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 29

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

1 5 10 15

Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val

20 25 30

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

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 30

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

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 31

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Ser

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 32

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser  
 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 33

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr  
 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized





ctggacaggg atccagagtt cc 22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 39

cargtcamdg tcaactgrctc ag 22

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 40

gtagaagttg ttcaagaag 19

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 41

gaggcacctc cagatgttaa c 21

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

> 42

ctgctcactg gatggtggga ag 22

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 43

gaagatggat acagttggtg c 21

<210> 44

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 44

gattcaaadc tcaattatat aatccgaata tgttaccgg ctgctcatg 50

gacccccccc ccccdn 66

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 45

gaattcccc cccccccc 19

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 46

ctcatggacc ccccccccc 20

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 47

aaatataata ccccccccc cccc 24

<210> 48

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 48

aaatataata cccccc 17

<210> 49

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 49

ctcatggacc ccccc 15

<210> 50

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 50

gatgttgtgt tgactcaaac tccactctcc ctgtctgtca gctttggaga 50  
 tcaagtttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgta aacagttatg 100  
 ggaacacctt tttgtcttgg tacctgcaca agcctggcca gtctccacag 150  
 ctctcatct ttgggatttc caacagattt tctgggtgc cagacaggtt 200  
 cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actcaagatc agcacaataa 250  
 agcctgagga ctgggaatg tattactgct tacaaggtac gcatcagcct 300

cccacgttcg gtctctggac caagctggag gtgaaa 336

<210> 51

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 51

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggaacttc 50  
 aatgaagata tctgcaagg cttctggtta ctcatcact ggccatctta 100

tgaactgggt gaagcagagc catggaaaga accttgagtg gattggactt 150  
attattcctt acaatgggtg tacaagctat aaccagaagt tcaagggcaa 200  
ggccacattg actgtagaca agtcatccag cacagcctac atggagctcc 250  
tcagtctgac tictgatgac tctgcagtct atttctgttc aagaggcctt 300

aggggcttct atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt 350  
ctcctca 357

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 52

tgccaggttc cagattcca 19

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 53

acgatgactg ctgtgcagat g 21

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 54

agccatggcc gcgacgct 18

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 55

acatctaccg aagtccaatg ca 22

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 56

ggaattgtaa tagcgatcct gacg 24

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 57

tgcacgcaga cattcccgcc t 21

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 58

tctgaatcat aatggcgaga ct 22

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 59

tcactctgta aggtctgct tct 23

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 60

tgccgagaa acctcctgtg g 21

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 61

tgagttcaga gctcctaaga gagt 24

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 62

aaaggatctc cctggtttct c 21

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 63

tccaagacc catgagtttc ttcaca 26

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 64

gaartarccc ttgaccaggc 20