



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0131279
(43) 공개일자 2022년09월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7028342
- (22) 출원일자(국제) 2021년01월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년08월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/072610
- (87) 국제공개번호 WO 2021/147837
국제공개일자 2021년07월29일
- (30) 우선권주장
202010069008.9 2020년01월21일 중국(CN)

- (71) 출원인
상하이 헨리우스 바이오테크, 인크.
중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330
상하이 헨리우스 바이오파마슈티칼 컴퍼니 리미티드
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드 넘버 1289 빌딩 1 (빌딩 디)
- (72) 발명자
쑹, 거
중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330
샤오, 후이
중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **항LAG3단일 클론 항체 및 그 제조 방법과 응용**

(57) 요약

본 발명은 항LAG3단일 클론 항체 및 그 용도를 제공한다. 또한 상기 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 분자, 상기 항체를 발현하는 발현 벡터, 숙주 세포, 상기 항체를 함유하는 조성물, 및 항종양, 자가 면역 질환 치료, 감염성 질환 및/또는 항이식 거부 반응 치료를 위한 약물 제조에서의 상기 항체의 용도를 더 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

허, 홍린

중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 캉난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330

쉬, 쉬

중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 캉난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330

장, 웨이-둥

중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 캉난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 중쇄 가변 영역이 갖는 CDR서열과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 경쇄 가변 영역이 갖는 CDR서열과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 것을 특징으로 하는 항LAG3단일 클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항LAG3단일 클론 항체는,

- 1) SEQ ID No: 18로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, SEQ ID No: 19로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, SEQ ID No: 20 또는 21로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR3의 중쇄 상보적 결정 영역;
- 2) SEQ ID No: 22 또는 23으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, SEQ ID No: 24로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, SEQ ID No: 25로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR3의 경쇄 상보적 결정 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항LAG3단일 클론 항체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항LAG3단일 클론 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열을 가지며; 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항LAG3단일 클론 항체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 항LAG3단일 클론 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 14로 표시되는 중쇄 불변 영역으로 이루어지며; 상기 경쇄는 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 16으로 표시되는 경쇄 불변 영역으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항LAG3단일 클론 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항LAG3단일 클론 항체는 항체의 전장 서열이거나, 항LAG3항체를 포함하는 항원 결합 단편이고, 상기 항LAG3항체의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 scFv인 것을 특징으로 하는 항LAG3단일 클론 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 분자에서, 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 3, 7 또는 11로 표시되고, 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID

NO: 5, 9 또는 13으로 표시되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 분자.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 따른 뉴클레오티드 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 발현 벡터는 pHLLX101, pEE14.4, pCHO 1.0 또는 pcDNA3.1 중 하나 또는 다수로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 따른 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 숙주 세포는 COS, CHO, HeLa세포계, SP2/0세포계와 같은 골수 세포계, NS0, sf9, sf21, DH5 α , BL21(DE3) 또는 E.coli TG1, YB2/0 세포계 및 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마 세포 중 하나 또는 다수로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 12

a) 발현 조건 하에서, 제10항 또는 제11항에 따른 숙주 세포를 배양하여, 항LAG3단일 클론 항체를 발현시키는 단계;

b) 단계 a)에서 얻은 항LAG3단일 클론 항체를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항LAG3단일 클론 항체를 제조하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항LAG3단일 클론 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

LAG3분자 차단 약물의 제조, 특히 항종양, 자가 면역 질환 치료, 감염성 질환 및/또는 항이식 거부 반응 치료를 위한 약물 제조에서의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항LAG3단일 클론 항체 또는 제13항에 따른 조성물의 응용.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 항LAG3단일 클론 항체는 단독으로 또는 다른 항종양 약물과 병용되고, 상기 다른 항종양 약물은 항PD-1단일 클론 항체와 같은 항체 약물 또는 파클리탁셀, 5-Fu피리미딘과 같은 소분자 항종양 약물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 응용.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물 의학 분야에 관한 것이고, 구체적으로, 항LAG3단일 클론 항체 및 그 제조 방법과 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD223으로도 지칭되는 림프구 활성화 유전자3(Lymphocyte-activation gene 3, LAG3)은 1990년에 발견되었고,

면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하며, 활성화된 T세포, NK세포, B세포 및 수지상 세포에서 발현된다. LAG3의 리간드 중 하나는 주요조직 적합 복합체 MHC(major histocompatibility complex) 클래스 II 분자이고, 심지어 MHC II에 대한 LAG3의 친화력은 MHC II에 대한 CD4의 친화력보다 더 강하다. 이 외에, LAG3의 리간드는 LSECtin 및 FGL1 등을 더 포함한다. LAG3의 생물학적 기능은 CTLA-4 및 PD-1과 유사하고, T세포의 세포 증식과 활성화에 대해 음성 조정하는 역할을 한다. 이 외에, LAG3도 Treg세포의 억제 기능에서 작용을 일으킨다.

[0003] 연구에 따르면, LAG3을 억제하여 T세포를 재활성화시킬 수 있으므로, 종양에 대한 살상 효과를 증강시키는 것으로 밝혀졌다. 아울러, LAG3을 억제하면 Treg세포가 면역 반응을 억제하는 기능을 더 감소시킬 수 있으므로, LAG3을 암면역 치료의 타겟으로 하고, LAG3에 결합하는 단일 클론 항체를 이용하여, LAG3이 이의 리간드에 결합하는 것을 차단할 수 있으며, T세포 억제 신호의 생성을 저지하여, T세포의 활성화 및 증식, 및 사이토카인 발현을 촉진하고, 종양 세포에 대한 면역계의 모니터링 활성을 상향 조정하며, 특이적 항종양 면역 반응을 증강시켜 종양 치료 목적을 달성할 수 있다. 현재, 브리스톨 마이어스 스쿼브(Bristol Myers Squibb), 노바티스(Novartis), 머크 샤프 앤 돔(Merck Sharp & Dohme) 등을 비롯한 제약 회사들은 모두 임상시험 단계에 있는 LAG3에 대한 자체의 항체 약물을 개발하고 있다. 브리스톨 마이어스 스쿼브 회사에서 연구 개발한 항LAG3항체 BMS986016(렐라틀리맵(Relatlimab))은 말기 흑색종의 치료에서 현저한 효과를 얻었고, 현재 III기 임상 시험 진행 중에 있다. 이 외에, 항LAG3항체는 항PD-1항체를 비롯한 기타 항체 약물과 병용되고, 관련 임상 시험도 진행 중에 있다.

[0004] 따라서, 독성 부작용이 더 적고, 임상 효능이 더 우수한 암 면역 치료용 신규한 항LAG3단일 클론 항체 연구 개발이 현재 연구 이슈로 떠오르고 있으며, 또한 환자에게 더욱 많은 약물 선택 기회를 제공할 것이다.

발명의 내용

[0005] 본 발명에서 해결하고자 하는 기술적 과제는 신규한 항LAG3단일 클론 항체를 제공함으로써 본 발명을 완성하는 것이다.

[0006] 따라서, 본 발명의 제1 목적은 신규한 항LAG3단일 클론 항체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 제2 목적은 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 분자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 제3 목적은 상기 뉴클레오티드 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 제4 목적은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 제5 목적은 상기 항LAG3단일 클론 항체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 제6 목적은 상기 항LAG3단일 클론 항체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 제7 목적은 약물 제조에서의 상기 항LAG3단일 클론 항체의 응용을 제공하는 것이다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아래와 같은 기술수단을 사용하였다.

[0014] 본 발명의 제1 양태에 있어서, 항LAG3단일 클론 항체를 제공하였고, 상기 단일 클론 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 중쇄 가변 영역이 갖는 CDR서열과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 경쇄 가변 영역이 갖는 CDR서열과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항LAG3단일 클론 항체는,

[0016] 1) SEQ ID No: 18로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, SEQ ID No: 19로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, SEQ ID No: 20 또는 21로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HCDR3의 중쇄 상보적 결정 영역;

[0017] 2) SEQ ID No: 22 또는 23으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, SEQ ID No: 24로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, SEQ ID No: 25로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR3의 경쇄 상보적 결정 영역을 포함을 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항LAG3단일 클론 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열, 예를 들어, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성의 유도 서열을 가지며; 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상

동성을 갖는 서열, 예를 들어, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성의 유도 서열을 갖는다.

- [0019] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항LAG3단일 클론 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 SEQ ID NO: 2, 6 또는 10으로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열, 예를 들어, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO: 14로 표시되는 중쇄 불변 영역으로 이루어지며; 상기 경쇄는 SEQ ID NO: 4, 8 또는 12로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 서열과 적어도 85%의 상동성을 갖는 서열, 예를 들어, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 16으로 표시되는 경쇄 불변 영역으로 이루어진다.
- [0020] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 4로 표시된다.
- [0021] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 6으로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 8로 표시된다.
- [0022] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10으로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 12로 표시된다.
- [0023] 상기 항LAG3단일 클론 항체는 항체의 전장 서열일 수 있고, 항LAG3항체의 단편일 수도 있으며, 상기 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 scFv 등이다. 바람직하게, 상기 항LAG3항체는 IgG1, IgG2 또는 IgG4형 항체이다.
- [0024] 본 발명은 상기 항LAG3항체의 유도체를 더 제공하고, 상기 유도체는 LAG3항체의 단편, 항체/항체 단편-인자 융합 단백질, 항체/항체 단편-화학적 접합체이며; 상기 항LAG3항체의 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 scFv 등이다.
- [0025] 본 발명에 따른 단일 클론 항체는 하이브리도마 기술, 파지 디스플레이 기술, 단일 림프구 유전자 클로닝 기술 등을 포함하는 본 분야의 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있고, 바람직하게는 하이브리도마 기술에 의해 야생형 또는 유전자 변형 마우스로부터 제조된다.
- [0026] 본 발명의 제2 양태에 있어서, 분리된 뉴클레오티드 분자를 제공하고, 상기 뉴클레오티드 분자는 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩한다.
- [0027] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 3, 7 또는 11로 표시되고, 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 5, 9 또는 13으로 표시된다.
- [0028] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 3으로 표시되고, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 5로 표시된다.
- [0029] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 7로 표시되고, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 9로 표시된다.
- [0030] 바람직하게, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 11로 표시되고, 상기 항LAG3단일 클론 항체를 코딩하는 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 13으로 표시된다.
- [0031] 상기 뉴클레오티드 분자의 제조 방법은 본 분야의 통상적인 제조 방법이고, 바람직하게는 하기 제조 방법을 포함한다. PCR 방법 등과 같은 유전자 클로닝 기술에 의해 상기 단일 클론 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 분자를 얻거나, 인공적인 완전한 서열 합성 방법에 의해 상기 단일 클론 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 분자를 얻는다.
- [0032] 상기 단일 클론 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 치환, 결실, 변경, 삽입 또는 부가를 적절히 도입하여 하나의 폴리뉴클레오티드의 상동체 또는 이의 보존적 변이 서열을 제공할 수 있음을 당업자는 알고 있다. 본 발명에서 폴리뉴클레오티드의 상동체 또는 이의 보존적 변이 서열은 항체 활성을 유지하는 범위 내에서 상기 단일 클론 항체 유전자를 코딩하는 하나 또는 다수의 염기에 대해 치환, 결실 또는 부가를 수행함으로써 얻을 수 있다.

- [0033] 본 발명의 제3 양태에 있어서, 발현 벡터를 제공하고, 상기 발현 벡터는 상기 뉴클레오티드 분자를 함유한다.
- [0034] 상기 발현 벡터는 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열(polyadenylation sequences), 인핸서 서열, 표지 유전자 및/또는 서열, 및 기타 적절한 서열과 같은 적절한 조정 서열을 포함하는 본 분야의 통상적인 발현 벡터를 의미한다. 상기 발현 벡터는 바이러스 또는 플라스미드, 예를 들어 적절한 과지 또는 과지미드일 수 있고, 더 많은 기술적인 세부 사항은 예를 들어 Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 제 2 판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989를 참조 바란다. 핵산 조작에 사용되는 다수의 공지된 기술 및 방법에 대해서 *Current Protocols in Molecular Biology*, 제2 판, Ausubel 등 편자를 참조 바란다. 본 발명에서의 발현 벡터는 본 분야에 널리 공지된 박테리아 플라스미드, 과지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 아데노바이러스, 레트로바이러스와 같은 포유동물 세포 바이러스, 또는 기타 벡터를 지칭한다.
- [0035] 바람직하게, 상기 발현 벡터는 pHLX101, pEE14.4, pCHO 1.0 또는 pcDNA3.1 중 하나 또는 다수로부터 선택된다.
- [0036] 더욱 바람직하게, 상기 발현 벡터는 pcDNA3.1이다.
- [0037] 본 발명의 제4 양태에 있어서, 숙주 세포를 제공하고, 상기 숙주 세포는 상기 발현 벡터를 함유한다.
- [0038] 본 발명에 따른 숙주 세포는 상기 재조합 발현 벡터가 안정적으로 자가 복제할 수 있고, 보유하고 있는 상기 뉴클레오티드가 효과적으로 발현될 수 있도록 충족시킬 수 있는 본 분야의 통상적인 다양한 숙주 세포이면 모두 가능하다. 본 발명에서의 숙주 세포는 박테리아 세포와 같은 원핵 세포; 또는 효모 세포와 같은 하등 진핵 세포; 또는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵 세포일 수 있다.
- [0039] 바람직하게, 상기 숙주 세포는 COS, CHO(중국 햄스터 난소, Chinese Hamster Ovary), HeLa세포계, SP2/0세포계와 같은 골수 세포계, NS0, sf9, sf21, DH5 α, BL21(DE3) 또는 E.coli TG1, YB2/0세포계 등 및 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마 세포 중 하나 또는 다수이다.
- [0040] 더욱 바람직하게, 상기 숙주 세포는 E.coli TG1, BL21세포(단쇄 항체 또는 Fab 항체 발현) 또는 CHO-K1세포(전장 IgG 항체 발현)이다.
- [0041] 발현 벡터를 숙주 세포로 형질전환시켜, 본 발명의 바람직한 재조합 발현 형질전환체를 얻을 수 있다. 여기서, 상기 형질전환 방법은 본 분야의 통상적인 형질전환 방법이고, 바람직하게는 화학적 형질전환 방법, 열 활성화 방법 또는 전기 형질전환 방법이다.
- [0042] 본 발명의 제5 양태에 있어서, 상술한 항LAG3단일 클론 항체를 제조하는 방법을 제공하고,
- [0043] a) 발현 조건 하에서, 상기 숙주 세포를 배양하여, 항LAG3단일 클론 항체를 발현시키는 단계; 및
- [0044] b) 단계 a)에서 얻은 항LAG3단일 클론 항체를 분리 및 정제하는 단계를 포함한다.
- [0045] 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양 방법에 있어서, 상기 항LAG3의 단일 클론의 분리 및 정제 방법은 본 분야의 통상적인 방법이고, 구체적인 조작 방법은 해당 세포 배양 기술 매뉴얼 및 단일 클론 항체 분리 및 정제 기술 매뉴얼을 참조 바란다.
- [0046] 본 발명에 사용된 숙주 세포는 모두 선행 기술의 것이고, 상업적 경로를 통해 직접 획득할 수 있으며, 배양에 사용된 배지도 다양한 통상적인 배지이고, 당업자는 경험에 따라 적합한 배지를 선택하여, 숙주 세포 성장에 적합한 조건 하에서 배양시킬 수 있다. 숙주 세포가 적절한 세포 밀도로 성장된 후, 적합한 방법(예를 들어, 온도 전환 또는 화학적 유도)으로 선택한 프로모터를 유도하고, 세포를 일정 기간 동안 더 배양한다. 상기 방법에서의 재조합 폴리펩티드는 세포 내 또는 세포막에서 발현되거나, 세포 외로 분비될 수 있다. 필요한 경우, 물리적, 화학적 및 기타 특성을 활용하는 다양한 분리 방법으로 재조합된 단백질을 분리 및 정제할 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법의 예로, 통상적인 재생 처리, 단백질 침전제 처리(염석 방법), 원심분리, 삼투현상에 의한 세균 파괴, 울트라처리(ultratreatment), 초원심분리, 분자체 크로마토그래피(겔 여과), 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 및 기타 액체크로마토그래피 기술, 및 이러한 방법의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명은 단일 클론 배양된 세포주에서 목적 항체의 유전자 서열을 스크리닝 획득하여, 진핵 발현 벡터를 구축하고, 발현 후 항체의 활성을 재구성하여, 항LAG3단일 클론 항체를 얻는다.
- [0048] 본 발명의 제6 양태에 있어서, 상기 항LAG3단일 클론 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0049] 본 발명의 단일 클론 항체는 본 분야에 공지된 임의의 방식에 의해 약물 조성물로 조제되어 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 상기 단일 클론 항체를 활성 성분으로 하고, 하나 또는 다수의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 충전제, 결합제 및 다른 부형제를 추가하되, 이는 투여방식 및 설계된 조제량에 의해 결정되는 형태이다. 당업자에게 공지된 치료학적으로 불활성인 무기 또는 유기 담체에는 락토스, 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 활석, 식물성 오일, 왁스, 지방, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 폴리비닐 화합물, 물, 자당, 에탄올, 글리세린과 같은 다양한 방부제, 윤활제, 분산제, 착향제를 포함한다(하지만 이에 제한되지 않는다). 보습제, 항산화제, 감미제, 착색제, 안정제, 염, 완충액 등도 추가될 수 있고, 이러한 물질은 필요에 따라 배합의 안정성을 돕거나 활성 또는 이의 생체이용률 향상에 도움이 되거나 경구 복용 시 허용 가능한 식감 또는 냄새를 생성하기 위한 것이며, 이러한 조성물에는 억제제가 원래의 화합물 자체의 형태로 사용될 수 있거나, 또는 선택적으로 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태를 사용할 수 있고, 본 발명의 단일 클론 항체는 단독 투여, 또는 다양한 조합으로 투여, 및 다른 치료제와 함께 결합되는 형태로 투여될 수 있다. 이렇게 조제된 조성물은 필요에 따라 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방식을 선택하여 억제제를 투여할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 제공하는 항LAG3단일 클론 항체는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 약물제제 조성물을 구성하여 더욱 안정적으로 치료 효과를 발휘할 수 있고, 이러한 제제는 본 발명에 따른 항LAG3단일 클론 항체의 아미노산 코어 서열의 형태 완전성을 보장할 수 있는 동시에, 단백질의 다관능기를 분해(응집, 탈아미노화 또는 산화를 포함하나, 이에 제한되지 않음)로부터 보호할 수 있다. 일반적인 경우, 액체 제제의 경우, 일반적으로 2°C -8°C의 조건 하에서 최소 1년 동안 안정을 유지할 수 있고, 동결 건조 제제의 경우, 30°C에서 최소 6개월 동안 안정을 유지한다. 상기 항LAG3단일 클론 항체 제제는 제약 분야에서 통상적으로 사용되는 현탁, 수침, 동결 건조 등 제제될 수 있고, 바람직하게는 수침 또는 동결 건조 제제이다.
- [0051] 본 발명에 따른 항LAG3단일 클론 항체의 수침 또는 동결 건조 제제에 있어서, 바람직하게는, 약학적으로 허용 가능한 담체로 계면활성제, 용액 안정제, 등장성 조정제 및 완충액 중의 하나 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 여기서, 바람직하게, 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르(polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester)(트윈(Tween) 20 또는 80); 폴록사머(Poloxamer)(예를 들어, Poloxamer 188); 트리톤(Triton); 도데실황산나트륨(SDS); 라우릴황산나트륨; 미리스틸-사르코신, 리놀레일 사르코신(linoleyl sarcosine) 또는 옥타데실사르코신(octadecyl sarcosine); Pluronic; MONAQUATM 등과 같은 비이온성 계면활성제를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 이는 항LAG3단일 클론 항체의 파괴화되는 경향을 최소화하는 양으로 첨가되어야 한다. 바람직하게, 용액 안정제는 환원당 및 비환원당과 같은 당류; 글루탐산모노나트륨(monosodium glutamate) 또는 히스티딘과 같은 아미노산류; 3가 알코올, 고급 당알코올, 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 등과 같은 알코올류 등 중 하나 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않고, 용액 안정제의 첨가량은 마지막으로 형성된 제제가 당업자에 의해 안정된 것으로 간주되는 기간 동안 안정적인 상태를 유지하도록 하여야 한다. 바람직하게, 등장성 조정제는 염화나트륨, 만니톨 중의 하나 또는 이들의 조합 중 하나를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게 완충액은 트리스(Tris), 히스티딘 완충액, 인산염 완충액 중 하나 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 제7 양태에 있어서, 약물 제조에서의 상술한 항LAG3단일 클론 항체 또는 이의 조성물의 응용을 제공한다.
- [0053] 바람직하게, 상기 응용은 LAG3분자 차단 약물 제조에서의 용도이다. 더욱 바람직하게, 상기 LAG3분자 차단 약물 제조에서의 용도는 구체적으로 종양 치료 또는 종양 진단 약물 제조이다.
- [0054] 바람직하게, 본 발명에 따른 약물은 항종양, 자가 면역 질환 치료, 감염성 질환 및/또는 항이식 거부 반응을 치료하는 약물이고, 더욱 바람직하게는, 자가 면역 질환을 치료하는 약물이며, 보다 더 바람직하게는 항종양 약물이다. 본 발명에 따른 항LAG3단일 클론 항체는 단독 또는 기타 항종양 약물과 병용 가능하다. 상기 기타 항종양 약물은 본 분야의 통상적인 항종양 약물로서, 항체 약물 또는 소분자 항종양 약물을 포함한다. 상기 항체 약물은 본 분야의 통상적인 항체 약물로서, 바람직하게는 항PD-1단일 클론 항체를 포함한다. 상기 소분자 항종양 약물은 본 분야의 통상적인 항체 약물로서, 파클리탁셀, 5-Fu 피리미딘 등을 포함한다.
- [0055] 여기서, 상기 항종양 약물에 의해 표적화된 종양은 바람직하게는 흑색종, 폐암, 간암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 결장암, 신경교종, 방광암, 유방암, 신장암, 식도암, 위암, 구강편평세포암, 요로상피세포암, 췌장암 및/또는 두경부 종양 중 하나 또는 다수를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에서 언급된 항종양 약물은 종양을 억제 및/또는 치료하는 약물을 지칭하고, 종양과 관련된 증상의 발달

지연 및/또는 이러한 증상의 중증도 감소를 포함할 수 있으며, 이미 존재하는 종양에 수반되는 증상을 완화하고 기타 증상이 나타나는 것을 방지하는 것을 더 포함하며, 종양 전이의 감소 또는 방지 등도 포함한다.

[0057] 본 발명에서의 항LAG3단일 클론 항체 및 이의 조성물을 인간을 비롯한 동물에게 투여하는 경우, 투여 조제량은 환자의 연령 및 체중, 질환의 특정 및 중증도, 및 투여 경로에 따라 상이하고, 동물 실험 결과 및 다양한 상황을 참조할 수 있으며, 총 투여량은 일정 범위를 초과할 수 없다. 일반적으로, 정맥 주사의 조제량은 1-1800 mg/일이다.

[0058] 본 분야의 상식에 부합되는 기초 상에서, 상기 각각의 바람직한 조건을 임의로 조합하여 본 발명의 각각의 바람직한 구현예를 얻을 수 있다.

[0059] 본 발명의 유의한 효과는 다음과 같다.

[0060] 본 발명의 항LAG3단일 클론 항체는 우수한 생물 활성을 구비하고, 포유동물 세포에서 높은 발현량을 가지며, LAG3에 대해 유의한 친화력과 리간드-수용체 결합을 억제하는 능력을 가진다. 상기 단일 클론 항체는 종양 면역 치료, 진단 및 스크리닝에 단독으로 또는 기타 항종양 약물과 병용하여 적용될 수 있고, 종양, 감염성 질환, 자가 면역 질환 및 항면역 거부 등을 치료하는 약물의 제조에 효과적으로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 항LAG3항체와 세포 표면의 LAG3의 결합 능력 실험 결과이다.
- 도 2는 항LAG3항체에 의한 LAG3과 이의 리간드MHC II 결합 차단 실험 결과이다.
- 도 3은 항LAG3키메라 항체와 LAG3의 결합 능력 실험 결과이다.
- 도 4는 항LAG3키메라 항체와 세포 표면의 LAG3의 결합 능력의 실험 결과이다.
- 도 5는 항LAG3인간화 항체와 LAG3의 결합 능력 실험 결과이다.
- 도 6은 항LAG3인간화 항체와 세포 표면의 LAG3의 결합 능력 실험 결과이다.
- 도 7은 항LAG3인간화 항체와 LAG3 친화력의 표면 플라즈마 공명 실험 결과이다.
- 도 8은 항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드MHC II 결합 차단 실험 결과이다.
- 도 9는 항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드LSEctin 결합 차단 실험 결과이다.
- 도 10은 항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드FGL1 결합 차단 실험 결과이다.
- 도 11은 항LAG3인간화 항체중 교차 반응에 대한 ELISA 실험 결과이다.
- 도 12는 항LAG3인간화 항체중 교차 반응에 대한 유세포 분석기 실험 결과이다.
- 도 13은 항LAG3인간화 항체중 교차 반응에 대한 표면 플라즈마 공명 실험 결과이다.
- 도 14는 항LAG3인간화 항체에 의한 T세포 활성화 실험 결과이다.
- 도 15는 항LAG3인간화 항체에 의한 hLAG3 KI마우스 모델에서 종양 성장 억제 실험 결과이다.
- 도 16은 h6H11B10#40과 HLX10의 병용에 의한 IL-2의 방출의 활성화를 나타낸다.
- 도 17은 h6H11B10#40과 HLX10의 병용에 의한 IFN- γ 의 방출의 활성화를 나타낸다.
- 도 18은 MC38 모델에서 각 그룹의 마우스 종양 부피의 성장 그래프를 나타낸다.
- 유의: 데이터는 "평균값 \pm 표준오차"로 표시된다.
- 도 19는 A20 모델에서 각 그룹의 마우스 종양 부피의 성장 그래프를 나타낸다.
- 유의: 1. 데이터는 "평균값 \pm 표준오차"로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 본 발명은 기재된 실시예 범위에 의해 제한되지 않는다. 실시예에서 구체적인 조건을 명시하지 않은 실험 방법은 통상적인 방법 및 조건, 또는 제품 설명서에 따라 선택된

다. 실시예에 따른 실온은 본 분야의 통상적인 실온이고, 일반적으로 10-30℃이다. 달리 설명되지 않는 한, 사용된 시약 및 원료는 모두 시중에서 구입할 수 있다.

[0063] 본 발명의 보호 범위가 하기의 특정 실시형태에 제한되는 것은 아니고; 본 발명의 실시예에 사용된 용어는 본 발명의 보호 범위를 제한하기 위한 것이 아니라, 본 발명의 구체적인 실시형태를 설명하기 위한 것으로 이해되어야 하며; 본 발명의 명세서 및 청구범위에 있어서, 본문에서 달리 명시되지 않는 한, 단수 형태 "1개", "하나" 및 "이것"은 복수 형태를 포함한다.

[0064] 용어 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역(VL) 또는 항체 중쇄의 가변 영역(VH)을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 3개의 상보성 결정 영역(CDR)(초가변 영역으로도 지칭됨)에 의해 연결된 4개의 프레임 영역(FR)으로 구성된다. 각 사슬에서의 CDR은 FR에 의해 단단히 함께 유지되고 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 2가지 기술은, (1) 종에 걸친 서열 변이성에 기반한 방법(즉, Kabat 등 Sequences of Proteins of Immunological Interest(제5판, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기반한 방법(Al-Lazikani 등, J. Molec. Biol. 273: 927-948(1997))이 있다. 본문에 사용된 바와 같이, CDR은 임의의 하나의 방법 또는 두 가지 방법의 조합에 의해 결정된 CDR을 지칭한다.

[0065] 용어 "항체 프레임" 또는 "FR영역"은 가변 도메인의 항원 결합 고리(CDR)의 스캐폴드(scaffold)로 사용되는 가변 도메인 VL 또는 VH의 일부분을 지칭한다. 본질적으로, 이는 CDR의 가변 도메인을 구비하지 않는다.

[0066] 용어 "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 항원 결합에 주로 기여하는 항체의 가변 도메인 내의 6개의 초가변 영역 중 하나를 지칭한다. 통상적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 존재하고, 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 존재한다. 다양한 공지된 임의의 방안으로 CDR의 아미노산 서열 경계를 결정할 수 있고, "Kabat" 넘버링 규칙(Kabat 등 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 를 참조 바람), "Chothia" 넘버링 규칙(Al-Lazikani 등 (1997), JMB 273: 927-948) 및 ImMunoGenTics(IMG) 넘버링 규칙(Lefranc M.P., Immunologist, 7,132-136 (1999); Lefranc, M.P. 등, Dev. Comp. Immunol., 27,55-77 (2003)) 등을 포함한다. 예를 들어, 고전 형식의 경우, Kabat의 규칙에 따르면, 상기 중쇄 가변 도메인(VH) 내의 CDR 아미노산 잔기 번호는 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)이고; 경쇄 가변 도메인(VL) 내의 CDR아미노산 잔기 번호는 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)이다. Chothia의 규칙에 따르면, VH 내의 CDR아미노산 번호는 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)이고; VL 내의 아미노산 잔기 번호는 26-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 91-96(LCDR3)이다. Kabat 및 Chothia 둘의 CDR 정의를 조합하면, CDR은 인간 VH 내의 아미노산 잔기 26-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)와 인간 VL 내의 아미노산 잔기 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)으로 구성된다. IMG의 규칙에 따르면, VH 내의 CDR아미노산 잔기 번호는 대략 26-35(HCDR1), 51-57(HCDR2) 및 93-102(HCDR3)이고, VL 내의 CDR아미노산 잔기 번호는 대략 27-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)이다. IMG의 규칙에 따라, 항체의 CDR 영역은 IMG/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다.

[0067] 용어 "LAG3"은 면역 체크포인트(immune checkpoint) 수용체 또는 T세포 공동-억제 인자인 림프구 활성화 유전자-3 단백질을 지칭하고, CD223으로도 지칭된다. 전장LAG3의 아미노산 서열은 GenBank에서 수탁 번호 NP_002277.4로 제공된다. 용어 ""는 변이체, 동형체, 상동체, 동원체 및 이원체를 포함한다. 예를 들어, LAG3단백질 변이체, 재조합 LAG3 또는 이의 단편, 및 예를 들어 히스티딘 태그, 마우스 또는 인간Fc 또는 신호 서열(예를 들어, ROR1)에 접합된 LAG3 또는 이의 단편이다.

[0068] 실시예에서 수치 범위가 주어졌을 경우, 본 발명에서 달리 설명되지 않는 한, 각각의 수치 범위의 2개의 끝점 및 2개의 끝점 사이의 임의의 하나의 수치를 선택하여 사용할 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 실시예에서 사용된 구체적인 방법, 설비, 재료 외에, 당업자에 의한 선행 기술에 대한 숙달 및 본 발명의 기재에 따라, 본 발명의 실시예에 따른 방법, 설비, 재료와 유사하거나 동등한 선행 기술의 모든 방법, 설비 및 재료로 본 발명을 구현할 수 있다.

[0069] 달리 설명되지 않는 한, 본 발명에 개시된 모든 실험 방법, 검출 방법, 제조 방법은 모두 본 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 분자 생물학, 생물 화학, 염색질 구조 및 분석, 분석 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 기술 및 관련 분야의 통상적인 기술을 사용한다. 이러한 기술은 선행 문헌에 잘 설명되어 있고, 구체적으로, Sambrook 등, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and

Third edition, 2001; Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P.M. Wassarman and A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 및 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 등을 참조 바란다.

[0070] 양성 대조 항체 BMS986016: 아미노산 서열은 브리스톨 마이어스 스쿼브 회사의 특허 출원 WO 2015/042246 A1에 기재되어 있다. 본 발명에서는 상기 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제한효소로 pURO 백테에 클로닝한 후, 상기 라스미드를 CHO-S세포에 형질감염시키고, 카르베니실린(Carbenicillin) 내성 스크리닝을 통해 고발현 세포주를 얻으며, 상기 세포주를 확대 배양하여, 배지 상등액을 수집하고, 단백질 A(protein A) 친화성 크로마토그래피의 제조 공정을 통해 상기 대조 항체를 얻는다.

[0071] 음성 대조 HLX10(h1G4): 서열은 CN 109923126 A에서 인용되었다.

[0072] 양성 대조 ab40465: Abcam회사, 카탈로그 번호는 ab40465이다.

[0073] 동종형-인간IgG4(hIgG4): 크라운 바이오사이언스 인터내셔널(Crown Bioscience International)회사, Cat: AB180018이다.

[0074] 제조합 마우스LAG3-Fc융합 단백질: 시노바이오컬(Sino Biological)에서 구입하였고, Cat: 53069-M02H이다.

[0075] 제조합 시노폴구스 원숭이 LAG3-Fc융합 단백질: 시노바이오컬에서 구입하였고, Cat: 90841-C08H이다.

[0076] 항 마우스PD1항체 RMP1-14: BioXCell회사, Cat: 71791801이다.

[0077] **실시에 1 항LAG3항체의 스크리닝**

[0078] 본 실시예에서, 자가적으로 구축하고 발현 정제된 LAG3-His(아미노산 서열은 SEQ ID No: 1로 표시됨) 단백질 및 전장 LAG3을 발현하는 CHO-S세포를 사용하여 마우스를 공동 면역화하고, 비장 세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 얻은 후, ELISA를 사용하여 양성 클론을 스크리닝하였다.

[0079] 구체적으로, 먼저, LAG3의 세포외 영역의 23-450개 아미노산을 코딩하는 핵산 서열을 제한효소로 pEE14.4백테에 클로닝하고, 여기서 LAG3코딩 영역의 C말단에 6xHis를 코딩하는 태그를 가지며, 이 후, 플라스미드를 CHO-S세포에 전기적 형질감염(electro transfer)시켜, LAG3-his융합 단백질의 발현이 높은 단일 클론을 GS(Glutamine Synthetase, 글루타민합성효소) 스크리닝 시스템으로 스크리닝하고, 단일 클론을 확장하여 배양하며, 배지의 상등액을 수집하여, 니켈-칼럼 친화성 크로마토그래피를 통해 목적 단백질을 제조하였다. 이 후, 마우스를 상기 단백질 및 전장 LAG3을 발현하는 CHO-S 세포로 공동 면역화시켰다. 양성 하이브리도마를 스크리닝하는 과정에서, 먼저 LAG3-His제조합 단백질을 96웰-하프웰 플레이트(작업 부피는 30 μ l임)에 2 μ g/ml로 코팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 코팅하였다. 과량의 LAG3-His를 0.05%의 트윈20을 함유하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 5%의 무지방 우유의 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. PBST로 3회 세척한 후, 희석된 하이브리도마 세포 배양 상등액을 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치한 후, PBST로 3회 세척하고, PBS로 희석된 거자무과산화효소로 표지된 염소 항류린 IgG 2차 항체(컴윈바이오텍 회사(ComWin Biotech))를 30 μ l 넣으며, 희석 비율은 1 : 2000이고, 실온에서 1시간 동안 정치한 후, PBST로 6회 세척하며, TMB를 넣어 발색하고, 30 μ l의 2M의 H₂SO₄로 반응을 종료하였다. 마이크로플레이트 리더로 450 nm 파장에서의 광흡수를 관독하였다.

[0080] 더 나아가, 유세포 분석기 방법으로 ELISA 스크리닝에 의해 얻은 항체를 발현하는 양성 하이브리도마 클론을 결정하였다. 먼저, 인간 LAG3 전장 유전자를 발현하는 정상 성장된 CHO-S세포를 PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하여, 세포 농도를 5 X 10⁵/100 μ l로 조정하였다. 하이브리도마 상등액을 추가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 500 X g의 조건 하에서 5분 동안 원심분리하였다. 음성 대조군에는 항체가 추가되지 않았다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 1 : 100으로 희석된 염소 항류린 IgG-FITC(컴윈바이오텍 회사)를 추가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 200 μ l의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 1에 도시된 바와 같고, ELISA로 스크리닝하여 얻은 양성 클론 대부분은 세포 표면의 LAG3에 결합할 수 있다.

[0081] 유세포 분석기 방법으로 상기 ELISA로 스크리닝하여 얻은 하이브리도마 양성 클론에 의해 발현된 항체가 LAG3-Fc(Acro회사)에 대한 세포 표면의 MHC II 결합을 차단하는 능력을 테스트하였다. PBS(2%의 FBS)로 Daudi 세포를

2회 세척하고, 세포 농도를 $3 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 로 조정하였다. 융합 종양 상등액에 LAG3-Fc를 $2 \mu\text{g/ml}$ 농도로 혼합한 후, 다시 Daudi 세포와 혼합하여, 4°C 에서 30분 동안 인큐베이션하였다. $500 \times g$ 의 조건 하에서 세포를 5분 동안 원심분리하였다. 동시에 항체가 없는 것을 음성 대조로 사용하고, 항LAG3항체 BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 1 : 300으로 희석된 염소 항인간IgG-Fc-FITC(Thermo회사)를 추가하고, 4°C 에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 2에 도시된 바와 같고, 최종적으로 세포 표면의 MHC II가 LAG3-Fc에 결합하는 것을 차단하는 능력을 가진 여러 단일 클론 하이브리도마 세포계를 스크리닝하여 얻었고, 가장 우수한 단일 클론 하이브리드 도마 세포계는 6H11B10이다. 6H11B10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 2로 표시되고, 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID No: 3으로 표시되며; 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 4로 표시되고, 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID No: 5로 표시된다.

[0082] 실시예 2 항LAG3키메라 항체의 친화력 측정

[0083] 마우스 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 증폭은 Anke Krebber 등(Journal of Immunological Methods 201.1997. 35-55)에 설명된 방법에 따라 수행되었다. 대체적인 방법은 단일 클론 하이브리드 세포계 6H11B10으로부터 총 RNA를 제조하고, 역전사 키트(TaKaRa회사)를 사용하여 단일 가닥 cDNA를 제조하는 것을 포함한다. 마우스 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 상보적으로 매칭되는 프라이머를 이용하는 Anke Krebber 등의 제시에 따라, PCR반응을 통해 항체의 중쇄 가변 영역(SEQ ID No: 3)과 경쇄 가변 영역(SEQ ID No: 5)의 유전자를 증폭시켰다. 이 후, 다시 6H11B10의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 유전자를 중쇄IgG4의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 15) 및 경쇄의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 17)에 각각 융합시켜, 6H11B10의 키메라 항체 중쇄 유전자 및 경쇄 유전자를 얻었다.

[0084] 6H11B10의 키메라 항체 유전자를 각각 CHO-S세포에 형질감염시키고, 발현시켜, 키메라 항체 단백질 c6H11B10을 얻었다. ELISA 기술을 사용하여 LAG3에 대한 키메라 항체의 친화력을 검출하였다. LAG3-Fc제조항 단백질을 ELISA 플레이트(작업 부피는 $30 \mu\text{l}$ 임)에 $2 \mu\text{g/ml}$ 로 코팅하고, 4°C 에서 하룻밤 정치하였다. 0.05%의 트윈20을 함유하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 5%의 무지방 우유의 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. PBST로 3회 세척한 후, 구배로 희석된 c6H11B10을 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. 동시에 양성 대조로 BMS986016을 사용하였다. PBST로 3회 세척하고, 1 : 4000으로 희석된 겨자무과산화효소로 표지된 염소 항인간IgG가과 경쇄(kappa light chain) 2차 항체(Millipore회사)를 $30 \mu\text{l}$ 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. PBST로 6회 세척하고, TMB를 넣어 발색하며, 2M의 H_2SO_4 로 반응을 종료하고, 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 판독하였다. 결과는 도 3에 도시된 바와 같고, 항LAG3키메라 항체c6H11B10은 LAG3에 대해 강력한 친화력을 가지며, 낮은 농도에서, c6H11B10의 친화력은 대조 항체 BMS986016보다 높다.

[0085] 실시예 3. 항LAG3키메라 항체의 친화력 측정

[0086] 유세포 분석기 방법으로 세포 표면의 LAG3에 대한 키메라 항체 단백질 c6H11B10의 친화력을 측정하였다. 형질감염하여 인간 LAG3 전장 유전자가 발현된 Jurkat 세포를 취하여, PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하고, 세포 농도를 $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 로 조정하였다. 구배로 희석된 키메라 항체c6H11B10 및 뮤린 항체m6H11B10를 추가하여, 4°C 에서 30분 동안 인큐베이션하였다. $500 \times g$ 의 조건 하에서 세포를 5분 동안 원심분리하였다. 동시에 BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 키메라 항체 및 BMS986016의 경우, 1 : 300으로 희석된 염소 항인간 IgG Fab-FITC(Thermo Fisher 회사)를 추가하고, 뮤린 항체의 경우, 1 : 100으로 희석된 염소 항뮤린IgG-FITC(컴윈바이오텍 회사)를 추가하며, 4°C 에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 4에 도시된 바와 같고, 키메라 항체c6H11B10은 세포 표면의 LAG3에 강력하게 결합할 수 있으며, c6H11B10의 친화력은 대조 항체 BMS986016보다 우수하다.

[0087] 실시예 4. 항LAG3 뮤린 항체 6H11B10의 인간화

[0088] 뮤린 항체6H11B10의 인간화의 경우, 인간 항체 경쇄 가변 영역의 생식 계열 유전자 IGKV2-28*01 및 중쇄 가변 영역의 생식 계열 유전자IGHV3-11*06을 사용하여 뮤린 항체6H11B10 내의 프레임 영역을 대체하고, 원래의 상보성 결정 영역(CDR)을 유지하여, 항6H11B10인간화 항체 h6H11B10을 얻었다. h6H11B10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 6으로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 8로 표시된다. h6H11B10의 중쇄 가변 영역의 유전자 서열은 SEQ ID No: 7로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 유전자 서열은 SEQ ID No: 9로 표시되며, 다시 중쇄IgG4의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 15) 및 경쇄의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 17)에

각각 융합시켜, 항LAG3인간화 항체h6H11B10의 중쇄 유전자 및 경쇄 유전자를 얻었다. h6H11B10중쇄의 3개의 CDR은 각각 HCDR1(SEQ ID No: 18), HCDR2(SEQ ID No: 19) 및 HCDR3(SEQ ID No: 20)이고; 경쇄의 3개의 CDR은 각각 LCDR1(SEQ ID No: 22), LCDR2(SEQ ID No: 24) 및 LCDR3(SEQ ID No: 25)이다.

[0089] 항LAG3인간화 항체 h6H11B10을 파지 디스플레이 기술을 사용하여 친화력을 성숙시키고, 점 돌연변이가 있는 프라이머를 설계하여, h6H11B10의 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR을 PCR로 각각 돌연변이시켜, 돌연변이 라이브러리를 획득하였으며, 파지 디스플레이 벡터를 대장간균 TG1 또는 SS320세포로 형질전환하여 파지 라이브러리를 생성하였다. 스트렙타비딘(streptavidin)가 접합된 자기 비드M-280(Thermo Fisher회사)과 비오틴 표지된 LAG3 단백질을 사용하여, 파지 라이브러리에 대해 2라운드의 스크리닝을 수행하였다. 다시 ELISA로 친화력이 가장 높은 클론 h6H11B10#40 하나를 스크리닝하였다. h6H11B10#40의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 10으로 표시되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID No: 12로 표시된다. h6H11B10#40의 중쇄 가변 영역 유전자는 SEQ ID No: 11로 표시되고, 경쇄 가변 영역 유전자는 SEQ ID No: 13으로 표시되며, 다시 중쇄IgG4의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 15) 및 경쇄의 불변 영역 유전자(SEQ ID No: 17)에 각각 융합시켜, 항LAG3인간화 항체h6H11B10#40의 중쇄 유전자 및 경쇄 유전자를 얻었다. h6H11B10#40중쇄의 3개의 CDR은 각각 HCDR1(SEQ ID No: 18), HCDR2(SEQ ID No: 19) 및 HCDR3(SEQ ID No: 21)이고; 경쇄의 3개의 CDR은 각각 LCDR1(SEQ ID No: 23), LCDR2(SEQ ID No: 24) 및 LCDR3(SEQ ID No: 25)이다.

[0090] 실시예 5. LAG3에 대한 항LAG3인간화 항체의 친화력 검출

[0091] h6H11B10 및 h6H11B10#40 항LAG3인간화 항체 유전자를 각각 CHO-S세포에 형질감염시키고 발현시켜, h6H11B10 및 h6H11B10#40 항체 단백질을 획득하였다. ELISA 기술로 LAG3에 대한 인간화 항체의 친화력을 검출하였다. LAG3-Fc 제조항 단백질을 ELISA 플레이트(작업 부피는 30 μ l)에 2 μ g/ml로 코팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 정치하였다. 0.05%의 트윈20을 함유하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 5%의 무지방 우유의 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. PBST로 3회 세척한 후, 구배 희석된 h6H11B10 및 h6H11B10#40의 인간화 항체 단백질을 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. 동시에 BMS986016을 음성 대조로 사용하였다. PBST로 3회 세척하고, 1 : 4000으로 희석된 겨자무과산화효소로 표지된 염소 항인간 IgG 카파 라이트(IgG kappa light) 2차 항체(Millipore회사)를 30 μ l 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. PBST로 6회 세척하고, TMB를 넣어 발색하며, 2M의 H₂SO₄로 반응을 종료하였다. 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 판독하였다. 결과는 도 5에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체는 LAG3에 강한 친화력을 가지며, 여기서, h6H11B10#40은 h6H11B10보다 우수하고, 양자는 모두 양성 대조 BMS986016보다 우수하다.

[0092] 유세포 분석기 방법으로 세포 표면의 LAG3에 대한 인간화 항체의 결합을 측정하고, 형질감염하여 인간 LAG3 전장 유전자가 발현된 CHO-S 또는 Jurkat세포를 취하여, PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하며, 세포 농도를 5X 10⁵/100 μ l로 조정하였다. 1 : 3 구배로 희석된 항LAG3인간화 항체를 넣어, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 동시에 BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. 500 X g의 조건 하에서 세포를 5분 동안 원심분리하였다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 1 : 300으로 희석된 염소 항인간IgG Fab-FITC(Thermo Fisher회사)를 넣어, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 200 μ l의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 6에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체는 세포막 상의 LAG3에 대해 모두 강한 친화력을 가지고, h6H11B10#40 및 h6H11B10은 모두 양성 대조 BMS986016보다 우수하다.

[0093] 표면 플라즈마 공명(SPR)을 사용하여 LAG3 단백질에 대한 항LAG3인간화 항체의 결합 친화력 및 동역학 상수를 측정하였다. 먼저, LAG3-Fc단백질을 칩에 고정시킨 후, 항LAG3인간화 항체h6H11B10#40 및 BMS986016을 HBSPE 완충액에 각각 80 μ g/ml 내지 2.5 μ g/ml 구배로 희석하여, 각각 칩으로 흐르게 하였다. 실험에서 얻은 데이터는 평가 소프트웨어를 사용하여 분석되었고, 그래프를 1 : 1 랑뮈어(Langmuir) 결합 모델로 피팅하였다. 결합 및 해리 역학 및 계산된 친화력 상수(KD)는 표 1에 나타낸 바와 같다. 결과는 도 7에 도시된 바와 같고, 친화력 성숙 후, LAG3에 대한 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40의 친화력은 크게 향상되었으며, 결합 및 해리 상수는 양성 대조 BMS986016보다 모두 우수하다.

[0094] 표1

시료	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
BMS986016	3.22E + 04	2.04E-04	6.35E-09
h6H11B10#40	4.35E + 04	1.37E-05	3.13E-10

[0095]

[0096] 실시예 6. LAG3과 이의 리간드의 결합을 차단하는 항LAG3인간화 항체의 능력

[0097] 유세포 분석기 방법으로 Raji세포 표면의 MHC II과LAG3-Fc 결합을 차단하는 항LAG3인간화 항체의 능력을 측정하였다. PBS(2%의 FBS)로 Raji세포를 2회 세척하고, 세포 농도를 $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 로 조정하였으며, 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40을 1 : 3 구배로 희석한 후, 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LAG3-Fc와 혼합한 다음, 실온에서 30분 동안 방치하고, 동시에 hIgG4 단백질을 음성 대조로 사용하며, 항LAG3항체BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. 다시 Raji세포와 혼합하여, 4°C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 500 X g의 조건 하에서 세포를 5분 동안 원심분리하였다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 1 : 500으로 희석된 염소 항인간 IgG-Fc-Alexa Fluor 488(Jackson회사)을 넣어, 4°C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 200 μl 의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 8에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40은 세포 표면의 MHC II와 LAG3-Fc 결합을 차단하는 능력을 가지며, 능력은 BMS986016과 유사하다.

[0098] ELISA 기술로 LAG3-Fc와 이의 리간드LSEctin 결합을 차단하는 인간화 항체의 능력을 검출하였다. LAG3-Fc재조합 단백질을 ELISA 플레이트(작업 부피는 100 μl 임)에 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 코팅하고, 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 0.05%의 트윈20을 함유하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 5%의 무지방 우유의 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하고, PBST로 3회 세척하였다. 1 : 5구배로 희석된 h6H11B10#40의 인간화 항체 단백질을 넣고, 동시에 hIgG4 단백질을 음성 대조로 사용하며, 항LAG3항체BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. 이 외에, LSEctin(R & D회사)을 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 배합하여 사용하고, 항체와 1 : 1로 혼합하여, 실온에서 30분 동안 정치하였다. 이 후, ELISA 플레이트에 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. PBST로 3회 세척하고, 1 : 5000으로 희석된 겨자무과산화효소로 표지된 마우스 항His태그 2차 항체(진스크립트(GenScript)회사)를 100 μl 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. PBST로 6회 세척하고, TMB를 넣어 발색하며, 2M의 H₂SO₄로 반응을 종료하였다. 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 판독하였다. 결과는 도 9에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체h6H11B10#40은 LAG3-Fc와 이의 리간드 LSEctin 결합을 차단하는 능력을 갖는다.

[0099] 실시예 7. LAG3과 이의 리간드 결합을 차단하는 항LAG3인간화 항체의 능력

[0100] 상업용 항LAG3항체의 LAG3과 FGL1의 결합을 차단하는 키트(Cisbio회사에서 구입하고, 카탈로그 번호는 63ADK000CB10PEG임)를 사용하여, LAG3과 FGL1 결합을 차단하는 항LAG3인간화 항체의 능력을 측정하였다. 이 실험은 먼저 4 μL 의 Tag1-LAG3 단백질과 4 μL 의 Tag2-FGL1 단백질을 혼합하고, 농도 희석된 테스트 시료와 실온에서 15분 동안 반응시킨 후, 미리 혼합된 10 μL 의 항-Tag1-Tb3+ 및 항-Tag2-XL665를 넣어, 상기 테스트 플레이트를 밀봉하며, 실온에서 하룻밤 반응시킨 후, 마이크로플레이트 리더로 665/620 nm에서의 형광 흡수값을 판독하였다. 결과는 도 10에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체h6H11B10#40은 LAG3과 이의 리간드FGL1 결합을 차단하는 능력을 갖는다.

[0101] 실시예 8. 항LAG3인간화 항체의 종 교차 반응성

[0102] 재조합 마우스 및 시노물구스 원숭이 LAG3-Fc융합 단백질은 시노바이오칼(SinoBiological)에서 구입하였다. LAG3-Fc재조합 단백질을 ELISA 플레이트(작업 부피는 30 μl 임)에 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 코팅하고, 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 0.05%의 트윈20을 함유하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 5%의 무지방 우유의 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. PBST로 3회 세척하고, 구배로 희석된 항LAG3인간화 항체 h6H11B10 및 h6H11B10#40을 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. 동시에 양성 대조로 BMS986016을 사용하였다. PBST로 3회 세척하고, 1 : 2000으로 희석된 겨자무과산화효소로 표지된 염소 항인간IgG 카파 라이트(IgG kappa light) 2차 항체(millipore회사)를 30 μl 넣어, 실온에서 1시간 동안 정치하였다. PBST로 6회 세척하고, TMB를 넣어 발색하며, 2M의 H₂SO₄로 반응을 종료하였다. 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 판독하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, BMS986016 대비, 항LAG3인간화 항체 h6H11B10 및 h6H11B10#40은 시노물구스 원숭이 LAG3에 대해 매우 높은 친화력을 갖는 반면, BMS986016은 시노물구스 원숭이 LAG3에 대해 낮은 친화력을 갖는다. BMS986016 및 h6H11B10은 마우스LAG3에 대해 모두 약한 친화력을 갖는다(도면에 도시되지 않음).

[0103] 유세포 분석기 방법으로 세포 표면의 시노물구스 원숭이 LAG3에 대한 인간화 항체의 결합을 측정하였고, 형질감염하여 인간 LAG3 전장 유전자가 발현된 CHO-S세포를 취하여, PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하며, 세포 농도를 $5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 로 조정하였다. 1 : 3 구배로 희석된 항LAG3인간화 항체를 넣어, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 동시에 BMS986016을 양성 대조로 사용하였다. 500 X g의 조건 하에서 세포를 5분 동안 원심분리하였다. PBS(2%의 FBS)로 2회 세척하였다. 1 : 300으로 희석된 염소 항인간IgG Fab-FITC(Thermo Fisher회사)를

넣어, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS(2%의 FBS)로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 200 μl의 PBS에 현탁시키고, 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 도 12에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체h6H11B10#40 및 h6H11B10은 세포막 상의 시노물구스 원숭이 LAG3에 대해 모두 강한 친화력을 갖고, h6H11B10#40 및 h6H11B10은 모두 양성 대조 BMS986016보다 우수하다.

[0104] 표면 플라즈마 공명 (SPR)을 사용하여 시노물구스 원숭이 LAG3 단백질에 대한 항LAG3인간화 항체의 결합 친화력 및 동역학 상수를 측정하였다. 먼저, 시노물구스 원숭이LAG3-Fc단백질을 칩에 고정시킨 후, 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40 및 BMS986016을 HBSPE 완충액에 각각 80 μg/ml 내지 2.5 μg/ml 구배로 희석하여, 각각 칩으로 흐르게 하였다. 실험에서 얻은 데이터는 평가 소프트웨어를 사용하여 분석되었고, 그래프를 1 : 1 랑뮈어 (Langmuir) 결합 모델로 피팅하였다. 결합 및 해리 역학 및 계산된 친화력 상수(KD)는 표 2에 나타난 바와 같다. 결과는 도 13에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40은 시노물구스 원숭이 LAG3에 대해 매우 높은 친화력을 갖는다.

[0105] 표2

시료	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
h6H11B10#40	2.17E + 04	3.09E-05	1.422E-09

[0106]

[0107] **실시예 9. T 세포를 활성화하는 항LAG3인간화 항체의 능력**

[0108] Raji세포를 취하여, 500 X g의 조건 하에서 5분 동안 원심분리하고, 세포 농도를 1.2 X 10⁶/ml로 조정하였다. 최종 농도가 0.024 ng/ml가 되도록 SEE(Toxin Technology)를 넣어, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. LAG3 유전자 및 NFAT-Luc 리포터 유전자로 형질감염된 Jurkat 세포(Promega회사)를 취하여, 500 X g의 조건 하에서 5분 동안 원심분리하고, 세포 농도를 1.6 X 10⁶/ml로 조정하였다. 1 : 3 구배로 희석된 항LAG3인간화 항체의 경우, 동시에 BMS986016을 양성 대조로 사용하고, 각각 25 μl 취하여 동일한 부피의 Jurkat 세포와 혼합한 후, 25 μl의 SEE로 처리된 Raji세포를 더 넣어, 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. Bio-Glo(Promega)를 넣어, 다기능 마이크로플레이트 리더로 판독하였다. 결과는 도 14에 도시된 바와 같고, 항LAG3인간화 항체는 Jurkat 세포를 활성화시켜 루시페라아제를 발현시키며, 그 효과는 BMS986016과 유사하다.

[0109] **실시예 10. hLAG3 KI 마우스 모델 종양 성장에 대한 항LAG3인간화 항체의 억제 활성**

[0110] hLAG3 KI 마우스를 이용하여, 생체 내 종양 세포 성장에 대한 항LAG3인간화 항체의 억제 능력을 검출하였다. 마우스 결장암 세포 M38을 hLAG3 KI 마우스의 등에 마우스당 1 X 10⁶개의 세포로 피하 접종하였다. 종양 부피가 약 80-120 mm³에 도달하면, 0.5 mg/kg의 조제량의 항-마우스 PD-1 항체 RMP1-14(크라운(Crown)회사), 및 각각 30 mg/kg 및 10 mg/kg의 두 가지 조제량이 있는 항LAG3인간화 항체 h6H11B10#40을 복강 주사 시작하고, 약 2-3 주 동안 주 2회 주사하였다. 동시에 PBS를 주사하여 음성 대조로 사용하고, 항마우스PD-1 항체 RMP1-14 및 항LAG3 항체 BMS986016을 주사하여 양성 대조로 사용하였다. 각 마우스의 종양 형성 크기를 매주 2회 관찰하였다. 종양 부피 계산 방법은 V(mm³) = 0.5 X (길이(mm) X 폭(mm) X 폭(mm))이다. 결과는 도 15에 도시된 바와 같고, PBS를 주사한 대조군 대비, 항LAG3항체와 항 마우스PD-1 항체의 주사는 종양의 성장을 모두 현저하게 억제할 수 있고, 여기서, 높은 조제량의 군에서, h6H11B10#40과 항 마우스PD-1 항체를 병용한 경우, 단독 항체보다 그 효능이 우수하다.

[0111] **실시예 11. 소진된 T세포의 항LAG3항체 매개 재활성화**

[0112] 인간 PBMC세포를 500 g의 조건 하에서 10분 동안 원심분리하여, 상등액을 제거하고, 배양 완충액(RPMI-1640배지+2%의 FBS)으로 2회 세척하며, 계수 후 자극 완충액(RPMI-1640배지+2%의 FBS+20 ng/mL의 SEB)으로 재현탁시키고, 96웰 세포 배양 플레이트(5 X 10⁵개의 세포/웰)에 접종하여, 37°C, 7%의 CO₂ 조건의 인큐베이터 놓아 하룻밤 자극하여 배양하였다. 다음날, 필요한 테스트 시료를 배양 완충액으로 순차적으로 구배 희석하였고, IL-2 및 IFN-γ 테스트 실험에서, 테스트군은 동일 구배 희석된 h6H11B10#40 시료군(최고 테스트 농도는 10 μg/mL임), 동일 구배 희석된 HLX10군(최고 테스트 농도는 10 μg/mL임)을 각각 포함하며, 여기서, 병용 투약군은 h6H11B10#40을 각각 상이한 농도의 HLX10용액(1 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL 및 0.001 μg/mL)으로 희석하고, 희석된 검출 시료를 하룻밤 자극된 PBMC에 각각 넣어, 37°C, 7%의 CO₂ 조건의 인큐베이터에 놓아, 계속하여 2-3일 동안 배양하였다. 상등액을 취하여 IL-2 및 IFN-γ 키트를 사용하여 그룹별 IL-2 및 IFN-γ의 방출량

을 측정하였다.

[0113] 도 16 및 17의 데이터에 나타난 바와 같이, h6H11B10#40 또는 HLX10 단독 처리군에서 IL-2 및 IFN- γ 의 양이 적고, HLX10의 농도가 약 1 μ g/mL에 도달했을 때 h6H11B10#40와 병용 투약하는 경우, IL-2 및 IFN- γ 방출량은 h6H11B10#40 단독 투약 및 HLX10 단독 투약군보다 높으며, 병용 투약군(HLX10 농도가 1 μ g/mL 및 0.1 μ g/mL인 경우)에서, h6H11B10#40은 농도 의존적 효과를 나타냈다. 이러한 체외 실험은 h6H11B10#40 및 HLX10 병용 투약이 소진된 T세포를 재활성화시키고, 사이토카인 방출을 증가시킬 수 있음을 설명한다.

[0114] 실시예 12. hLAG-3/hPD-1 유전자 변형 마우스MC38 또는 A20피하 이식 종양 모델에서의 효능 평가

[0115] MC38세포를 성장 배지(RPMI-1640+10%의 FBS)에서 배양하고, 대수 성장기의 세포를 접종 전에 수집하며, 마우스의 피하 접종을 위해 PBS와 매트릭젤(matrigel)(0.1 mL/마리)에 재현탁시키고, MC38세포(1×10^6 /마리)를 접종 대기 실험 마우스(주령은 6-8주임), 우측 등의 후방 및 하측에 피하 접종하였다. 평균 종양 부피가 78.03 mm³일 때, 종양 크기에 따라 무작위로 그룹을 나누었다. 그룹 간 종양 부피의 변동 계수(CV)는 $CV = SD/MTV \times 100\%$ 공식으로 계산되었고, 40% 미만이어야 한다. 그룹을 나눈 당일을 0일째로 정의하고, 투여는 0일째에 시작하였다. 실험 과정에서 관찰된 임상 증상은 모두 원본 데이터에 기록하였다. 종양 부피 계산 공식은 종양 부피(mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (공식에서 a는 긴 지름을 나타내고, b는 짧은 지름을 나타냄)이다. 결과는 도 18에 도시된 바와 같고, MC38모델은, 실험 과정에서 투여 17일째에 대조군 마우스 종양이 2500 mm³에 도달하였기에 마우스를 안락사시켰고, D17데이터 분석에 따르면, 단독 투약군 HLX10 및 h6H11B10#40의 TGI는 각각 35.22% 및 4.88%이다. 병용 투약군은, HLX10 조제량이 1.5 mg/kg이고, h6H11B10#40의 조제량이 각각 10 mg/kg 및 30 mg/kg으로 설정되었을 때, TGI는 각각 62.2% 및 56.7%이며, 모두 단독 투약군보다 높았다. 이러한 데이터는 h6H11B10#40 및 HLX10 병용 투약이 단독 투약보다 종양 억제 효과가 우수한 것을 설명한다.

[0116] A20세포를 배지 RPMI-1640+10%FBS에서 배양하고, 지수 성장기의 A20세포를 수집하고, 마우스의 피하 접종을 위해 PBS에 적절한 농도(0.1 mL/마리)로 재현탁시켰다. 실험 마우스의 우측 견갑골에 A20세포(5×10^5 /마리)를 피하 접종하였고, 평균 종양 부피가 90.44 mm³일 때 종양 크기에 따라 무작위로 그룹을 나누었다. 그룹 간 종양 부피의 변동 계수(CV)는 $CV = SD/MTV \times 100\%$ 공식으로 계산되었고, 40% 미만이어야 한다. 그룹을 나눈 당일을 0일째로 정의하고, 투여는 0일째에 시작하였다. A20모델은 투약 과정에서 14일째에 종양 부피가 2500 mm³을 초과하였기에 안락사시켜, 마우스 수량이 감소하였고, 14일째를 TGI 분석으로 사용하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, 단독 투약군 3 mg/kg의 HLX10, 10 mg/kg의 h6H11B10#40 및 단독 투약 30 mg/kg의 h6H11B10#40의 TGI는 각각 13.36%, 12.83% 및 22.20%이다. 병용 투약군은, HLX10 조제량이 3 mg/kg이고, h6H11B10#40이 각각 10 mg/kg 및 30 mg/kg일 때, 이의 TGI는 각각 25.9% 및 62.4%이며, 모두 단독 투약군보다 우수하여, 병용 투약군의 종양 억제 효과를 나타냈다.

[0117] 본 발명의 상기 내용을 열독한 후, 당업자는 본 발명에 대해 다양한 변경 또는 수정을 가할 수 있고, 이러한 등가적 형태도 본원 발명의 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 범위에 속한다는 것을 이해해야 한다.

[0118] 서열표

[0119] SEQ ID NO: 1(LAG3-His 아미노산 서열)

LQPGA EVPVVWAQEGAPAQLPCSPPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSW
GPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCR
LRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFPQV
SPMDSGPWGICILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTTRSFLTAKWTPPG
GGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIHTVTPKSFSGPSGLKLLCEVTP
VSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAP
GALPAGHLGSGHHHHHH

[0120]

[0121] SEQ ID NO: 2(6H11B10중쇄 가변 영역 아미노산 서열)

EVQVVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMFWVRQTPEERLEWVATINDGGDYTNYPDSVKGRFT
ISRNDNDKNKLYLQMNLSKSEDTAMYYCARESGIYYDYASFGYWGQGLTVTVSS

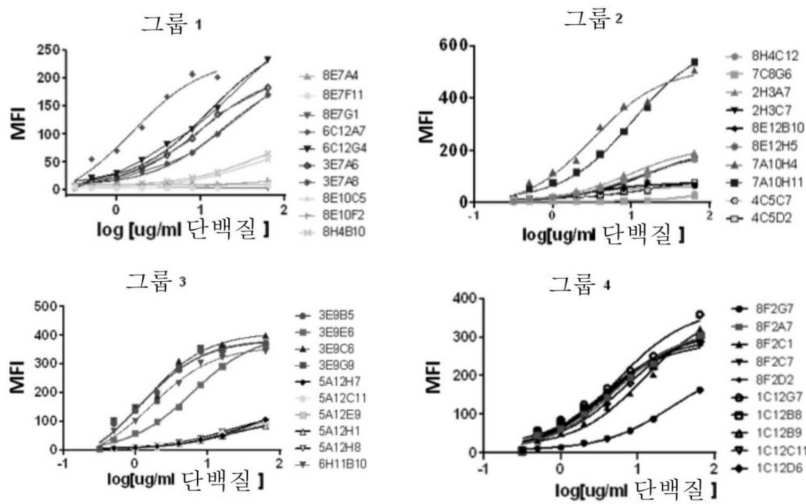
[0122]

- [0123] SEQ ID NO: 3(6H11B10중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열)
 gaggtgcagggtggtgagctctggggagggttagtgaagcctggagggtccctgaactctctgtgcagcgtctggatcacttctcagtgactattacatgttttgggtt
 cggccagactccggaaagagaggtctggagtggtgcaaccattaatgatggtggtgattacaccaactatccagacagtgtaaggggcgatccaccatccagag
 acaatgacaagaacaaactgtacctgcaaatgaacagtctgaagctgagacacagccatgtattactgtgcaagagagagtggtgatctactatgattacgctctgtt
 ggtfactggggccaggggactctggtcactgtctct
- [0125] SEQ ID NO: 4(6H11B10경쇄 가변 영역 아미노산 서열)
 DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGS
 GTDFTLRISRVEADVGVYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRNL
- [0127] SEQ ID NO: 5(6H11B10경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열)
 galatgtgatgaccaggctgcaatcccaatccagtcactctggaacatcagctccatctctgaggcttagtaagagctcttatatagtaatggcactcattttg
 taitgtatctgcagaagccagccagctctccagctctgattatcagatgtccaacctgctccagagctccagacaggtcagtagcagtggtcagggaactg
 attcactagagaatcagcagagtgaggctgaggatgtgggtgtttactgctcaaaaacttagaactccgtggactggtggaggcaccgaactggaaat
 caaacgtaactctg
- [0129] SEQ ID NO: 6(h6H11B10중쇄 가변 영역 아미노산 서열)
 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFWIRQAPGKGLEWVATINDGGDYTNYPDSVKGRFT
 ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESGIYYDYASFGYWGQGLTVTVSS
- [0131] SEQ ID NO: 7(h6H11B10중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열)
 cagggtgcagctggtgagagcggaggaggactggtgaagccaggaggatctctgaggctgctctgcccagctagcggcttcaccttttctgactactatagtctctgg
 atcagacagctccagcgaaggactggtggtgctaccatcaacagcggcggcgtattacaaaatctctgactccgtgaaggcagggtttaccatctctg
 ggataaccgaagaatccctgtacctgcagatgaacagcctgagagccaggacacagccgtgactattgtcccgcgagctggtcatctactatgattacgcttc
 ctctggctattggggccaggccaccctggtgacagtgctctcc
- [0133] SEQ ID NO: 8(h6H11B10경쇄 가변 영역 아미노산 서열)
 DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSKSLLYSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGS
 GTDFTLKISRVEADVGVYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRNL
- [0135] SEQ ID NO: 9(h6H11B10경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열)
 gacatcgtgatgaccagctcccactgtctctgtccgtgacaccaggagagcctgctagcatctctgacagatccagaagtcctctgtatagcaacggcatcacct
 acctgtattgtacctgcagaagccaggccagagccccagctgctgactaccagatgtctaactctggcttccggagtgccctgacaggttctccggaagcggatctg
 gaaccgacttcacctgaagatctctgggtgagccggagatggtggcgtgtactattgtctcagaacctggagctgcatgaccttccgagggaggaacaaa
 gctggagatcaagcgaactctg
- [0137] SEQ ID NO: 10(h6H11B10#40중쇄 가변 영역 아미노산 서열)
 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFRFSDYYMFWIRQAPGKGLEWVATINDGGDYTNYPDSVKGRFT
 ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESGIYYDWASFGYWGQGLTVTVSS
- [0139] SEQ ID NO: 11(h6H11B10#40중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열)
 cagggtgcagctggtgagagcggaggaggactggtgaagccaggaggatctctgaggctgctctgcccagctagcggcttccgttttctgactactatagtctctgg
 atcagacagctccagcgaaggactggtggtgctaccatcaacagcggcggcgtattacaaaatctctgactccgtgaaggcagggtttaccatctctg
 ggataaccgaagaatccctgtacctgcagatgaacagcctgagagccaggacacagccgtgactattgtcccgcgagctggtcatctactatgattggccttc
 ctctggctattggggccaggccaccctggtgacagtgctctcc

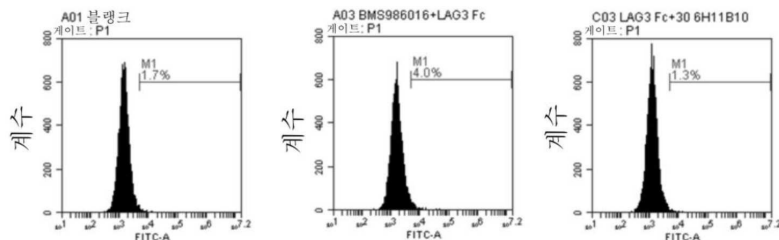
- [0159] SEQ ID NO: 21(h6H11B10#40 HCDR3아미노산 서열)
- [0160] ESGIYYDWASFGY
- [0161] SEQ ID NO: 22(h6H11B10 LCDR1아미노산 서열)
- [0162] RSSKSLLYSNGITYLY
- [0163] SEQ ID NO: 23(h6H11B10#40 LCDR1아미노산 서열)
- [0164] RSSKSLKYNSNGITYLY
- [0165] SEQ ID NO: 24(h6H11B10 및 h6H11B10#40 LCDR2아미노산 서열)
- [0166] QMSNLAS
- [0167] SEQ ID NO: 25(h6H11B10 및 h6H11B10#40 LCDR3아미노산 서열)
- [0168] AQNLELPWT

도면

도면1

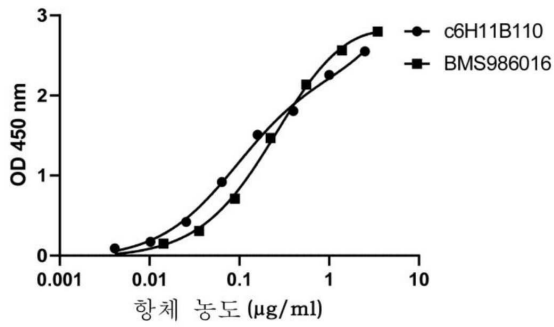


도면2



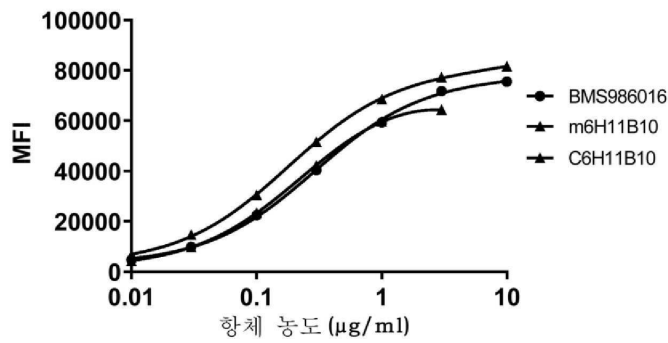
도면3

항LAG3키메라 항체와 LAG3-FC의 결합



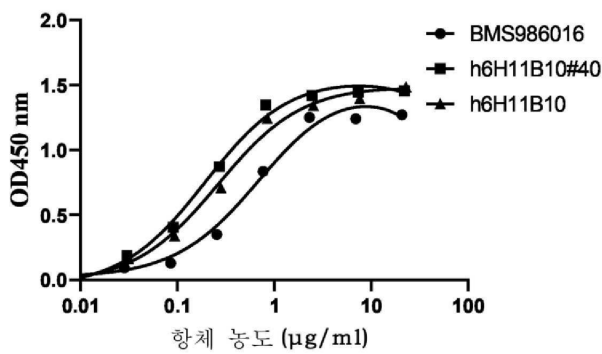
도면4

항LAG3키메라 항체와 세포 표면의 LAG3의 결합



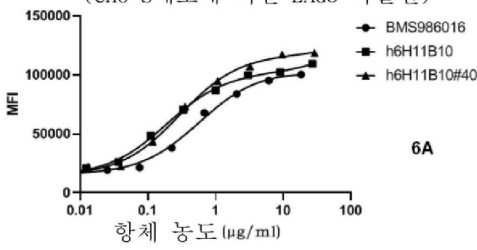
도면5

항LAG3인간화 항체와 hLAG3-FC단백질의 결합

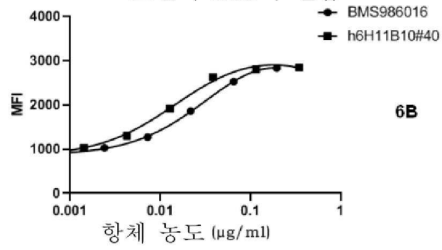


도면6

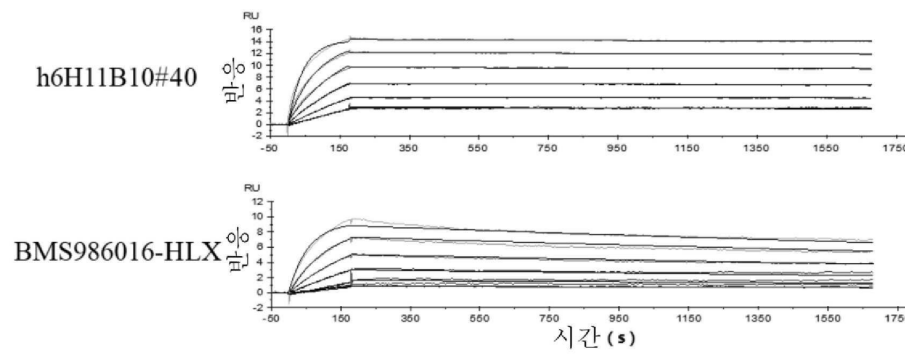
항LAG3인간화 항체와 세포 표면의 LAG3의 결합 (CHO-S세포에 의한 LAG3 과발현)



항LAG3인간화 항체와 세포(Jurkat) 표면의 LAG3의 결합

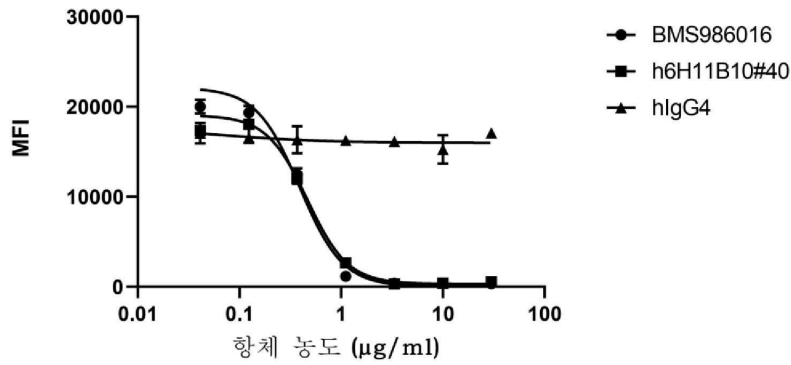


도면7



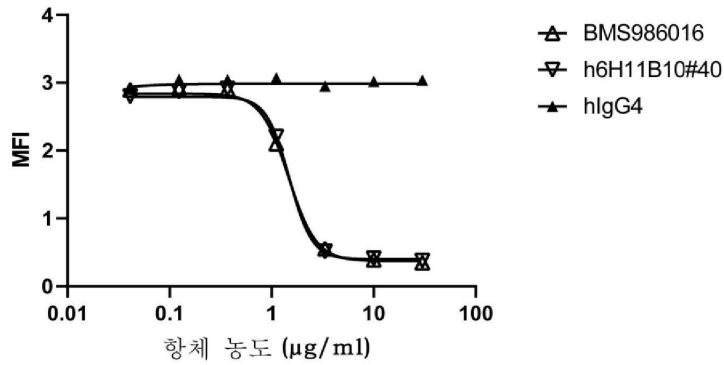
도면8

항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드MHC II 결합 차단



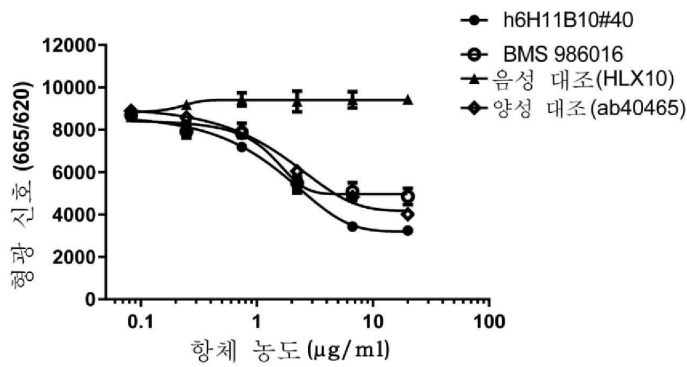
도면9

항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드LSECtin 결합 차단



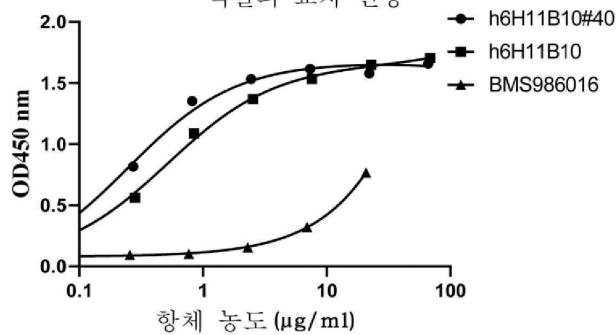
도면10

항LAG3인간화 항체에 의한 LAG3과 이의 리간드FGL1 결합 차단



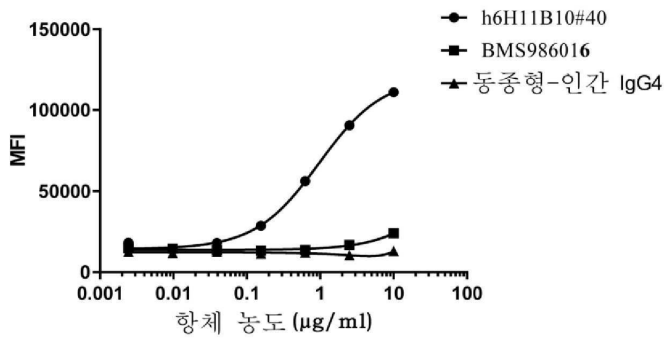
도면11

인간화 항체와 시노물구스 원숭이 LAG3단백질의 교차 반응

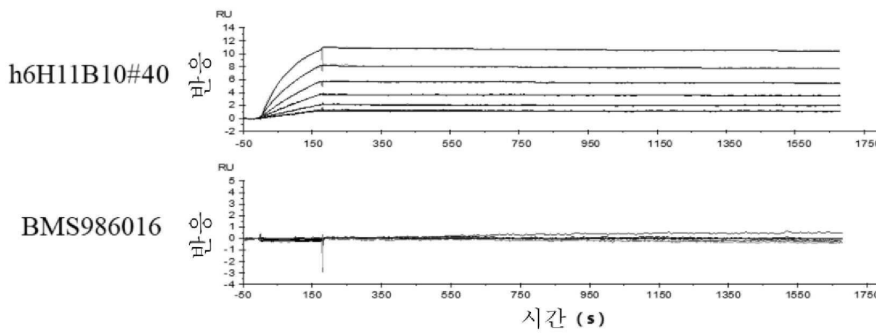


도면12

인간화 항체와 시노볼구스 원숭이종(시노볼구스 원숭이의 LAG3을 과발현하는 CHO-S)의 교차 반응 유세포 결합도

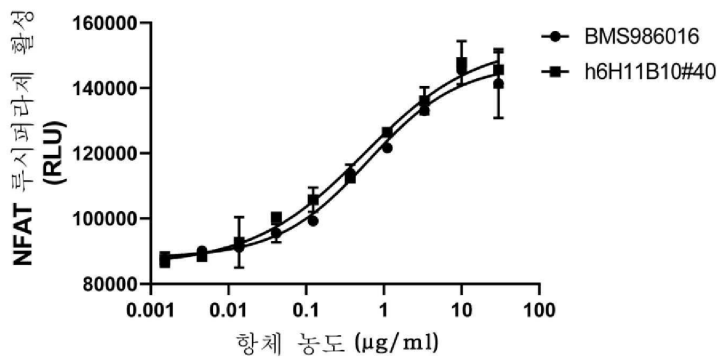


도면13

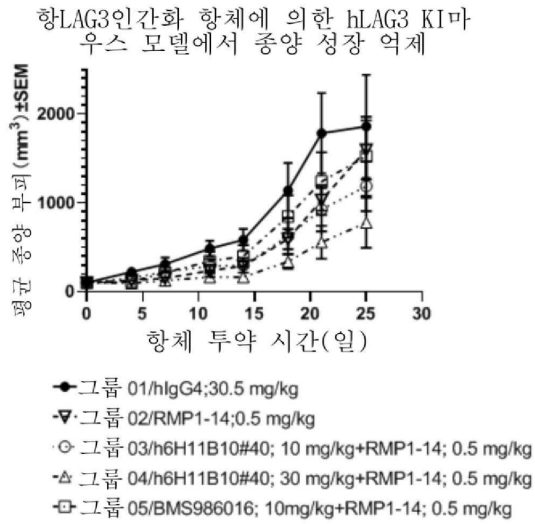


도면14

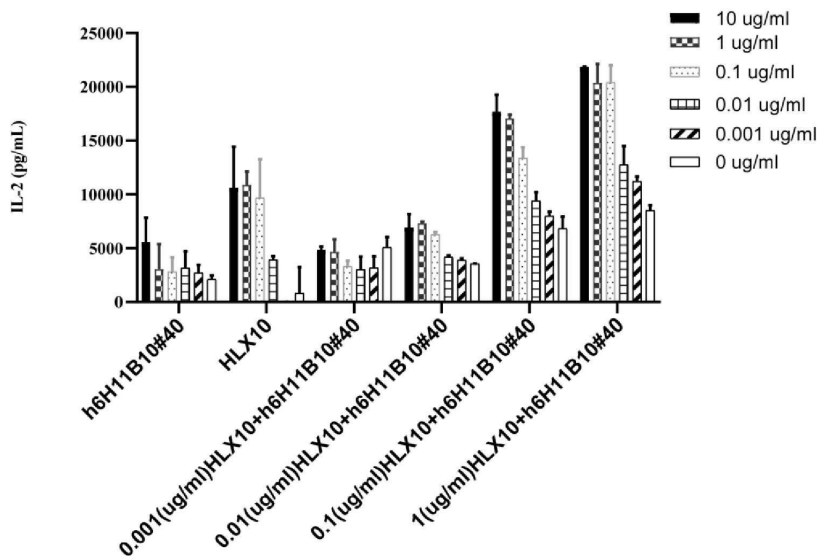
항LAG3인간화 항체에 의한 T세포 활성화



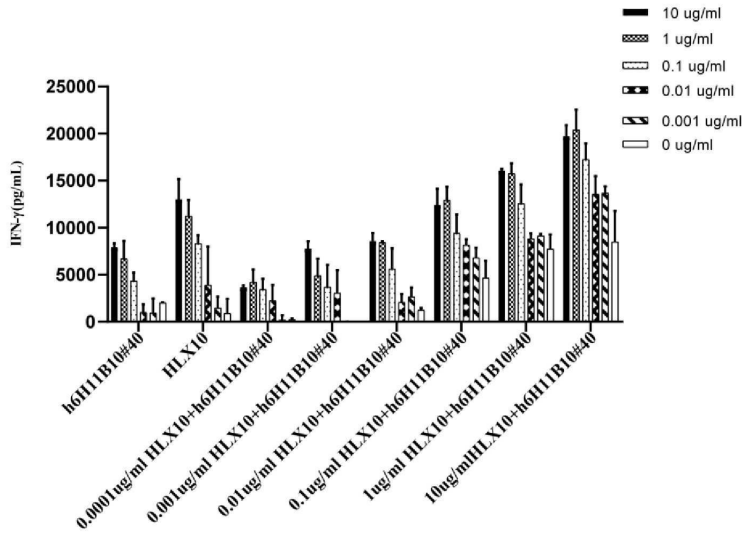
도면15



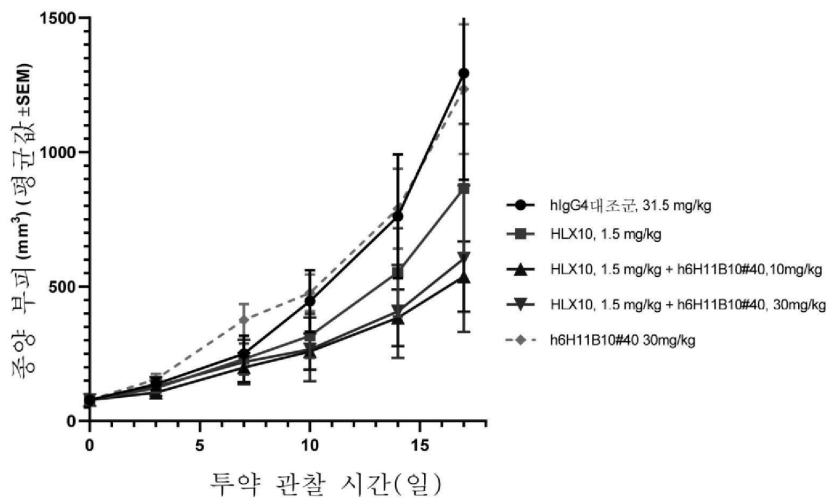
도면16



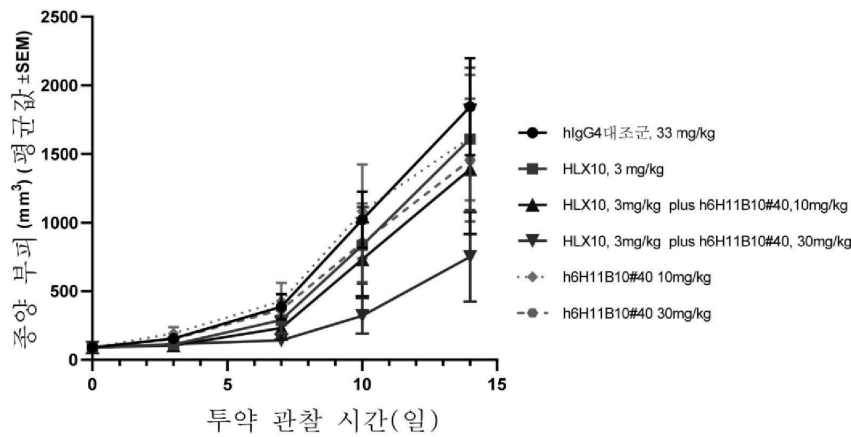
도면17



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SHANGHAI HENLIUS BIOTECH, INC.

□SHANGHAI HENLIUS BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> ANTI-LAG3 MONOCLONAL ANTIBODY, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

<130> SH1903-20P450230

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LAG3-His LAG3-His 羧基

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly

35 40 45

Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro

50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala

115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 路정읍긴협뵓宐學埼긔

<400> 3

gaggtgcagg tggtaggagtc tgggggaggt ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tctgtgcag cgctggatt cactttcagt gactattaca tgttttgggt tegccagact 120

ccggaagaga ggctggagtg ggtcgcaacc attaatgatg gtggtgatta caccaactat 180

ccagacagtg tgaagggcg attcaccatc tccagagaca atgacaagaa caaactgtac 240

ctgcaaatga acagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagagagt 300

gggatctact atgattacgc ttcgtttggt tactggggcc aggggactct ggtcactgtc 360

tct 363

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 하정읍긴협갓샘學埼긔

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Asn Leu

115

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 하경읍긴협뵆必學埼窠

<400> 5

```

gatattgtga tgaccaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggAAC atcagcttcc      60
atctctgcga ggictagtaa gagtctctta tatagtaatg gcatcactta ttgtattgg      120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctctgattt atcagatgtc caaccttgcc      180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta atctg                        345
    
```

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> 路경읍긴협갓샘學埼窠

<400> 6

```

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

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 路경읍긴협뵆必學埼췘
 <400> 7

caggtgcagc tggaggagag cggaggagga ctggtgaagc caggaggatc tctgaggctg 60
 tcctgcgcc ctaggcgtt cacctttct gactactata tgttctggat cagacaggct 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtggctacc atcaacgacg gcggcgatta cacaaattat 180
 cctgactccg tgaagggcag gtttaccatc tctcggata acgccaagaa ttcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acagccgtgt actattgtgc ccgcgagtct 300
 ggcatctact atgattacgc ttccttcggc tattggggcc agggcaccct ggtgacagtg 360

tcctcc 366

<210> 8
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> 하경읍긴협갓샘學埼췘
 <400> 8

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

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

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

Arg Asn Leu
 115

<210> 9

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 하정읍긴협뵆必學埼췘

<400> 9

gacatcgtga tgaccagtc cccactgtct ctgtccgtga caccaggaga gctgctagc 60
 atctcttga gatccagcaa gtcctgtctg tatagcaacg gcacaccta cctgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gagccccag ctgctgatct accagatgic taatctggct 180
 tccggagtgc ctgacaggtt ctccggaagc ggatctggaa ccgacttac cctgaagatc 240
 tctcgggtgg aggccgagga tgtggcgtg tactattgtg ctcagaacct ggagctgcca 300

tggaccttcg gcggaggaac aaagctggag atcaagcga atctg 345

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 路정읍긴협갚뵆必學埼췘

<400> 10

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

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

85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Asn Leu

115

<210> 13

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 하정읍긴힘뵈必學埼窠

<400> 13

gacatcgtga tgaccagtc cccactgtct ctgtccgtga caccaggaga gcctgctagc 60
 atctcttgca gatccagcaa gtcctgaag tatagcaacg gcatcaccta cctgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gagccccag ctgctgatct accagatgic taatctggct 180

tccggagtgc ctgacaggtt ctccggaagc ggatctggaa ccgacttcac cctgaagatc 240
 tctcgggtgg aggccgagga tgtggcgctg tactattgtg cgcagaacct ggagctgcca 300
 tggaccttcg gcggaggaac aaagctggag atcaagcga atctg 345

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 路정뵈뵈힘갠삼學埼窠

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 15

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 路경빙맥힘뵆必舉埼긔

<400> 15

gccagcacia aggcccatc ggtcttccc ctaccacct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagccc cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaaactcag ggccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 300

aaatatggtc ccccatgcc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360

ttcctgttcc ccccaaac caaggacct ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540

cgtgtggtea gcttctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctcccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag 780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 840

gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960

ctctcctgt ctctgggtaa a 981

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR1값샘舉埼젯

<400> 18

Asp Tyr Tyr Met Phe

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR2값샘舉埼젯

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR3값샘舉埼젯

<400> 20

Glu Ser Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR3값샘舉埼젯

<400> 21

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

1 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR1값샘舉琦젿

<400> 22

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

1

5

10

15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR1값샘舉琦젿

<400> 23

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

1

5

10

15

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR2값샘舉琦젿

<400> 24

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR3값샘舉琦젿

<400> 25

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Trp Thr

1

5