

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)



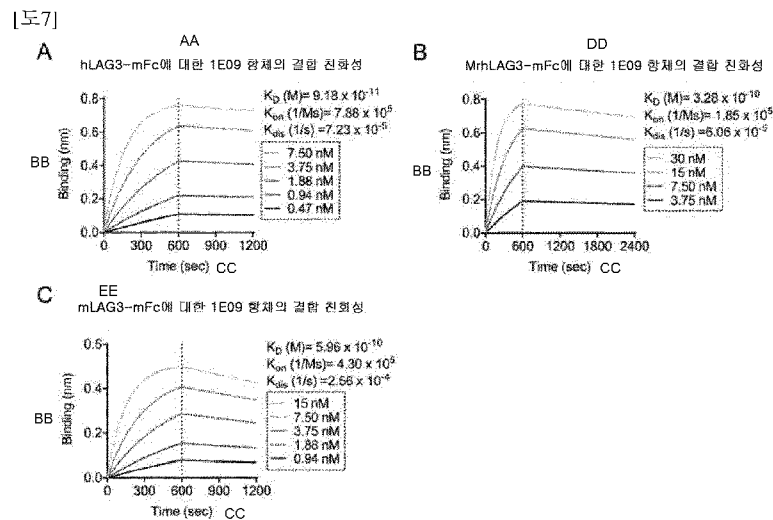
(10) 국제공개번호
WO 2020/005003 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007877
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 28일 (28.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0075581 2018년 6월 29일 (29.06.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 와이바이오로지스 (Y-BIOLOGICS INC.) [KR/KR]; 34014 대전시 유성구 테크노4로 29, 3층, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이상필 (LEE, Sang Pil); 34011 대전시 유성구 구죽로 25, 315동 1001호, Daejeon (KR). 신지영 (SHIN, Ji-Young); 34021 대전시 유성구 배울2로 19, 905동 502호, Daejeon (KR). 윤선하 (YOON, Sunha); 35217 대전시 서구 월평동로 45, 106동 1206호, Daejeon (KR). 최

윤선 (CHOI, Yunseon); 34074 대전시 유성구 지족로 190번길 36, 101동 304호, Daejeon (KR). 박재은 (PARK, Jae Eun); 30062 세종시 마운안로 221 2105동 901호, Sejong-si (KR). 이지수 (LEE, Ji Su); 30150 세종시 남세종로 358 211동 1501호, Sejong-si (KR). 송영자 (SONG, Youngja); 34032 대전시 유성구 배울1로 119, 1204동 1502호, Daejeon (KR). 백기선 (BAEK, Gisun); 30150 세종시 남세종로 503 101동 904호, Sejong-si (KR). 유석호 (YOO, Seok Ho); 35235 대전시 서구 둔산남로 30, 103동 1107호, Daejeon (KR). 김웅철 (KIM, Yeung-chul); 34319 대전시 대덕구 석봉로58번안길 10, Daejeon (KR). 이동중 (LEE, Dong Jung); 34007 대전시 유성구 봉산로 16번길 45, 301호, Daejeon (KR). 조영규 (CHO, Young-Gyu); 34032 대전시 유성구 배울2로 114, 1102동 1004호, Daejeon (KR). 박범찬 (PARK, Bum-Chan); 34140 대전시 유성구 어은로 57, 118동 908호, Daejeon (KR). 임정채 (LIM, Jung Chae); 34085 대전시 유성구 은구비남로 55, 704동 401호, Daejeon (KR). 박영우 (PARK, Young Woo); 34207 대전시 유성구 학하로 33, 102동 1201호, Daejeon (KR).

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO LAG-3 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention pertains to: a monoclonal antibody specifically binding to LAG-3; and a use thereof. The antibody of the present invention can bind to LAG-3 and suppress the activity thereof, and is thus expected to be useful for the development of immunotherapeutic agents for various diseases associated with LAG-3.

(57) 요약서: 본 발명은 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항체는 LAG-3에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로 LAG-3과 연관된 다양한 질환의 면역 치료제의 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]



(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구
한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon
(KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 면역 항상성을 유지하는 것은 생명체가 살아가는데 가장 중요하다. 면역 항상성은 면역 활성화 신호 전달 체계와 면역 억제 신호 전달 체계의 밸런스에 의해 조절된다. 면역 억제 신호 전달은 면역관문이라고 불리는 단백질에 의해 활성화 되어 자기 항원에 대한 자기 관용(self-tolerance)을 유지하거나 면역반응 이후 활성화된 T 세포의 기능을 약화시킴으로써 자가 면역 반응과 과도한 염증반응으로부터 정상 조직을 보호하는데 중요한 면역 시스템 중에 하나이다. 하지만 만성적인 바이러스에 감염된 세포나 암세포는 이러한 면역억제 신호 전달 시스템을 이용하여 T 세포의 면역작용으로부터 벗어나 자신들이 잘 살아갈 수 있는 유리한 미세 주변환경(microenvironment)을 만든다.
- [3] 현재까지 CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1(programmed cell death protein 1), TIM-3(T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), LAG-3(lymphocyte activation gene 3), TIGIT(T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains), VISTA(v-domain Ig-containing suppressor of T cell activation)를 포함하여 많은 면역관문 단백질들이 알려져 있다. 암세포의 면역회피(immune evasion) 기전은 T 세포 표면에 위치한 면역관문 단백질과 결합하여 살상기능을 갖는 T 세포(cytotoxic T cells)를 무력화시킴으로써 이루어진다. 이러한 사실은 면역관문 단백질을 타겟하여 활성이 약화된 T 세포의 기능을 다시 되살림으로써 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 사멸시킬 수 있다는 면역관문 억제제의 이론적 배경을 제공했다. 또한 여러 면역관문 단백질의 신호전달 경로는 서로 독특하고 중복되지 않는 것으로 알려져 있어, 면역관문 억제제를 함께 사용함으로써 T 세포의 면역기능을 강화하여 암 치료를 극대화하기 위한 연구가 활발히 진행되는 이유이기도 하다.
- [4] LAG-3(lymphocyte activation gene 3)는 CTLA-4, PD-1, PD-L1과 같은 여러 면역관문 단백질 중 하나로 498개의 아미노산으로 구성된 타입 1 세포막 단백질(type I transmembrane protein)이다. LAG-3 유전자는 12번째 인간 염색체에 존재하며 CD4(cluster of differentiation 4) 유전자에 가깝게 위치해 있고, CD4와 구조적으로 유사하여 두 단백질 모두 MHC(major histocompatibility complex) class II에 결합할 수 있지만, 두 단백질 사이의 아미노산 서열에 대한 유사성은 20%

미만이며, MHC class II에 대한 결합력은 LAG-3가 CD4보다 훨씬 높다. LAG-3는 4개의 면역글로불린 유사 도메인으로 구성된 세포외 영역(extracellular domain)과 막횡단 영역(transmembrane domain) 그리고 세포내 영역(intracellular domain)으로 구성되어 있다. 세포외 영역 중, 첫번째 도메인(Ig-like V-type domain)은 MHC class II 결합에 중요하며, 광범위한 결합부위를 갖는 CD4와 달리 LAG-3는 소수의 몇몇 아미노산이 MHC class II의 결합에 중요하며, MHC class II에 결합하기 위해 LAG-3들간의 결합이 중요하다고 알려져 있다. 세포내 영역은 ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)과 ITSM(immunoreceptor tyrosine-based switch motif) 부위를 포함하지 않고 상대적으로 짧은 편이며, 사람과 쥐의 LAG-3는 잘 보존된 세린 잔기의 인산화 부위, KIEELE 부위, 글루타민-프롤린 반복서열의 세 가지의 특징적 구조를 가지고 있다. 이 중에서 특히 KIEELE 모티프는 T 세포의 활성을 억제하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

- [5] LAG-3 유전자를 없앤 마우스에 포도상구균에서 분비하는 장내독소, staphylococcal enterotoxin B(SEB) 혹은 난백 알부민(ovalbumin)을 처리했을 때, 조절되지 않는 T 세포의 증식과 비장 비대증을 보인다. LAG-3의 발현은 T 세포가 활성화 된 후, CD4⁺, CD8⁺ T 세포와 몇몇 자연살해(natural killer) 세포에서 증가되며, 자연 조절 T 세포(natural Treg cells)와 유도된 CD4⁺FoxP3⁺ 조절 T 세포(iTreg cells)에 더 많은 양의 LAG-3가 발현된다고 보고되었다. MHC class II이외에, LAG-3의 결합단백질(ligand)로는 LSECTin(liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin)과 Galectin-3가 알려져 있으며 LSECTin은 암세포에, Galectin-3는 종양 침투(tumor-infiltrating) CD8⁺ T 세포에 각각 발현되어 T 세포에 존재하는 LAG-3와 결합함으로써 T 세포의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.

- [6] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 인간 LAG-3 단백질의 세포외 도메인을 항원으로 사용하여, 인간 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 파아지 디스플레이 기술을 이용하여 스크리닝 하였고, 스크리닝된 항체 클론의 중쇄와 경쇄의 가변부위를 바탕으로 제조된 단클론항체가 인간, 원숭이 및 마우스 LAG-3 단백질에 높은 친화도로 결합할 수 있으며, LAG-3/MHC class II 복합체의 형성을 저해하여 T 세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 LAG-3에 대한 신규 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는데 있다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는데 있다.

- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 8, 서열번호 53 또는 서열번호 57로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 10, 서열번호 33 또는 서열번호 60으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하여 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 암 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물 및 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 결합된 약물 결합체를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 i) 상기 항체; ii) 막투과성 도메인(transmembrane domain); 및 iii) 상기 i)의 항체가 항원에 결합하면 T 세포 활성화를 가져오는 것이 특징인 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR(chimeric antigen receptor) 단백질을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 다중특이적 항체(multi-specific antibody)를 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명의 LAG-3에 결합하는 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 LAG-3에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로 LAG-3과 연관된 다양한 질환의 면역 치료제의 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 LAG-3 단백질에 결합하는 항체의 제조를 위해 사용된 항원 단백질의 모식도(A) 및 정제된 항원 단백질의 순도(B)와 활성(C)을 확인한 결과이다.
- [24] 도 2는 패닝 횟수에 따른 LAG-3에 대한 파지 풀(pool)의 결합력을 나타낸 것이다.
- [25] 도 3은 LAG-3 단백질에 대한 단일 scFv 파지 클론의 결합력을 나타낸 것이다.
- [26] 도 4는 정제된 LAG-3 항체인 1E09의 환원적 혹은 비환원적 조건에서 SDS-PAGE에 의한 항체의 순도를 분석한 결과이다.
- [27] 도 5는 LAG-3 단백질의 발현이 서로 다른 HEK293E 세포주를 이용하여 1E09의 항원에 대한 결합특이성을 확인한 결과이다.
- [28] 도 6은 인간 LAG-3(A), 원숭이 LAG-3(B) 및 마우스 LAG-3(C)가 과발현된 세포를 이용하여 1E09 항체의 교차반응성과 결합특이성을 확인한 결과이다.
- [29] 도 7은 옥텟을 이용하여 1E09 항체와 인간, 원숭이 및 마우스 LAG-3 단백질들과의 결합 친화성과 키네틱 상수를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 8은 LAG-3의 세포외 영역에서 Ig-like V-type (Ig-V) 도메인을 절단 (Δ Ig-V)하거나 Ig-V 도메인 내 특정 또는 불특정 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 LAG-3-mFc 또는 -His 융합 단백질들(A 및 B)을 이용하여 LAG-3-1E09 항체의 결합 특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과(C)이다.
- [31] 도 9는 재조합 인간 LAG-3 단백질 (hLAG-3-mFc)와 MHC class II를 발현하는 Raji 세포를 이용하여 1E09가 농도 의존적으로 LAG-3/MHC class II 복합체 형성을 저해하는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [32] 도 10은 1E09가 LAG-3/MHC class II 복합체 형성을 저해함으로써 T 세포의 활성을 증가시키는 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 11은 LAG-3에 대한 1E09 항체 변이체의 단일 scFv 클론 파지의 결합력을 나타낸 것이다.
- [34] 도 12는 1E09를 최적화 한 후 선별된 변이체 항체들의 환원적 혹은 비환원적 조건에서 SDS-PAGE에 의해 분석한 순도와 생산량을 나타낸 결과이다.
- [35] 도 13은 변이체 항체인 1E09-AM_2H01과 1E09-FR_1E05의 인간 LAG-3(A), 원숭이 LAG-3(B) 및 마우스 LAG-3(C)가 과발현된 세포를 이용하여 교차반응성과 결합특이성을 확인한 결과이다.
- [36] 도 14는 변이체 항체들이 LAG-3/MHC class II 복합체 형성을 저해함으로써 T 세포의 활성을 증가시키는 것을 보여주는 결과이다.
- [37] 도 15는 옥텟을 이용하여 변이체 항체들과 인간, 원숭이 및 마우스 LAG-3 단백질들과의 결합 친화성과 키네틱 상수를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [38] 도 16은 LAG-3의 세포외 영역에서 Ig-V 도메인을 절단 (Δ Ig-V)하거나 Ig-V 도메인 내 특정 또는 불특정 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 LAG-3-mFc 또는 -His 융합 단백질들(도 8A 및 8B 참고)을 이용하여 LAG-3-1E09의 변이체

항체인 1E09-AM_2H01과 1E09-FR_1E05의 결합 특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [39] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 8, 서열번호 53 또는 서열번호 57로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 10, 서열번호 33 또는 서열번호 60으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [40] 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 인간, 원숭이 또는 마우스의 LAG-3 단백질의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 것이 특징으로, 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 주요조직적합 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하거나, 또는 면역 반응을 자극하거나, 또는 MHC 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하고 면역 반응을 자극할 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 구현 예에 따른 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 바람직하게는, i) 서열번호 1로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 8로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 10으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역으로 이루어진 것일 수 있고, ii) 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 53로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 33으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역으로 이루어진 것일 수 있으며, iii) 서열번호 1로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 57로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 60으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역으로 이루어진 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 i) 서열번호 114의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 115의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것일 수 있고, ii) 서열번호 116의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 117의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것일 수 있으며, iii) 서열번호 118의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 119의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [42] 본 발명에서 용어 "단클론항체"란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에

대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 상기 단클론항체는 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 통해 제조될 수 있다.

- [43] 본 발명에서 항체(antibody)는 전체(whole) 항체 형태를 의미하며, 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전장 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지며, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

- [44] 본 발명의 단클론 항체는 인간항체(fully human antibody), 인간화 항체(humanized antibody), 키메라 항체(chimeric antibody), 마우스 항체(mouse antibody) 및 재조합 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 인간항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 인간항체는 모든 구조가 인간으로부터 유래되었기 때문에, 기존의 인간화 항체 또는 마우스 항체에 비해서 면역화 반응이 일어날 확률이 적어서 인간에게 투여하였을 경우 원하지 않는 면역반응이 일어나지 않는 장점이 있다. 따라서 치료용 항체로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [45] 본 발명에서 용어 "항원 결합 단편"이란, 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 국제공개 특허 WO 88/10649 등에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고, 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [46] 본 발명에서 용어 "가변영역(variable region)"이란 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 부위를 의미하고, 가변영역에는 상보성결정영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 상보성결정영역 사이에는 프레임워크 영역(FR, framework region) 부분이 존재하여 상보성결정영역 고리를 지지해주는 역할을 한다.

- [47] 본 발명에서 용어 "상보성결정영역(CDR, complementarity determining region)"은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [48] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 파지 디스플레이 방법으로 천연 인간 단쇄 Fv 라이브러리(naive human single chain Fv library)를 바이오 패닝하여 LAG-3에 특이적으로 결합하는 인간항체를 제조하였다.
- [49] 본 발명에서 용어 "바이오 패닝(biopanning)"은 파지의 외벽(coat)에 펩타이드를 발현(display)하는 파아지 라이브러리로부터, 표적 분자(항체, 효소, 세포표면 리셉터 등)과 결합하는 성질을 지닌 펩타이드를 표면에 발현하고 있는 파지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다.
- [50] 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 특별히 이에 제한되지 않으나, 투여된 생체 내에서의 체류시간을 증진시키기 위하여, 당화(glycosylation) 및/또는 폐길화(PEGylation)될 수 있다.
- [51] 본 발명의 용어 "당화(glycosylation)"는 글리코실기를 단백질에 전위시키는 가공방법을 의미한다. 상기 당화는 글리코실 전달효소에 의해 글리코실기가 표적 단백질의 세린, 트레오닌, 아스파라긴 또는 히드록실리신 잔기에 결합되어 수행되는데, 상기 당화된 단백질은 생체조직의 구성물질로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 세포표면에서 세포인식에도 중요한 역할을 수행한다. 따라서, 본 발명에서는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 당화 또는 상기 당화의 패턴을 변화시켜서 항체의 효과를 향상시킬 수 있다.
- [52] 본 발명의 용어 "폐길화(PEGylation)"는 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편에 폴리에틸렌글리콜을 도입함으로써, 항체의 혈중 체류시간을 향상시키는 가공방법을 의미한다. 구체적으로, 폴리에틸렌글리콜로 고분자 나노 입자를 폐길화하는 것에 의해, 나노 입자의 표면의 친수성이 증가되며 병원균, 노폐물 및 외부 유입 물질을 포식하고 소화시키는 인체 내의 대식세포(macrophage) 등을 포함하는 면역 기능으로부터의 인식을 방지하는 소위 스텔스 효과(stealth effect)를 통한 신체 내에서의 빠른 분해가 방지될 수 있다. 따라서, 상기 폐길화에 의하여 항체의 혈중 체류 시간이 향상될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 폐길화는 히알루론산의 카르복실 그룹과 폴리에틸렌글리콜의 아민 그룹의 결합에 의해 아미드 그룹을 형성하는 방법으로 형성될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 다양한 방법으로 폐길화를 수행할 수 있다. 이때, 사용되는 폴리에틸렌글리콜은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 100 내지 1,000 사이의 분자량을 갖고, 선형 또는 가지형의 구조를 가지는 것을 사용함이 바람직하다.
- [53] 상기 당화 및/또는 폐길화는 본 발명의 항체의 기능을 유지하는 한 당업계의 공지된 방법에 의해 다양한 당화 및/또는 폐길화 패턴이 변형될 수 있고, 본 발명의 항체는 다양한 당화 및/또는 폐길화 패턴이 변형된 변이 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 모두 포함한다.

- [54] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 LAG-3 단백질에 $1.5 \times 10^{-10}M$ 이하의 K_D 로 결합하는 것일 수 있고, 원숭이 LAG-3 단백질에 $7.0 \times 10^{-10}M$ 이하의 K_D 로 결합하는 것일 수 있으며, 마우스 LAG-3 단백질에 $6.0 \times 10^{-10}M$ 이하의 K_D 로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [55] 본 발명은 또한, 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [56] 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 인간항체의 경쇄 및 중쇄 또는 그의 단편을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.
- [57] 본 발명은 또한, 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [58] 본 발명에서 용어 "발현 벡터"란 숙주세포에서 목적유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코스미드(cosmid) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터 및 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함하며, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.
- [59] 본 발명의 적합한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자

작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 원핵 세포에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터가 있으나 이로 제한되지는 않는다. 진핵세포에는 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV) 프로모터, HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스 프로모터, 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV) 프로모터, 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터 뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤모글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다.

- [60] 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다.
- [61] 또한, 벡터는 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 폴리뉴클레오티드인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다. 바이러스(예를 들어, 바쿨로바이러스) 또는 파지 벡터, 및 레트로바이러스 벡터와 같은 숙주 세포의 게놈내로 삽입될 수 있는 벡터도 사용 가능하다. 전체 항체 또는 항체 단편을 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(cotransformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입하고, 경쇄(또는 중쇄)를 함유하는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별한다.
- [62] Fab 형태의 항체를 제작하기 위해서, 인간 경쇄의 가변영역(VL)과 불변영역(CL) 및 인간 중쇄의 가변영역(VH)과 첫 번째 불변 영역 도메인(CH1)의 아미노산을 코딩하는 유전자를 삽입한 벡터를 이용한다.
- [63] 본 발명은 또한, 본 발명의 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [64] 상기 벡터의 적합한 숙주세포는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*),

취조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 식물 세포일 수 있다. 또한 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 포유동물세포로부터 유래된 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [65] 본 발명에서 "숙주세포로의 형질 전환"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민(lipofectamine) 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본 발명은 또한,
- [67] (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양액을 제조하는 단계; 및
- [68] (b) 상기 (a) 단계의 배양액으로부터 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 정제하는 단계를 포함하는, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.
- [69] 상기 제조방법에 있어서 형질전환체의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주 또는 동물세포에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [70] 형질전환체를 배양하여 수득한 항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며 추가로 다양한 통상의 방법, 예를 들면 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 이들을 단독 또는 조합하여 이용할 수 있다. 그 중에서 친화 크로마토그래피가 가장 많이 사용되며, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 있다.
- [71] 상기 방법으로 제작된 항체는 항원에 대한 친화도(affinity)가 증가된 항체이다. 용어 "친화도"는 항원의 특정부위를 특이적으로 인식하고 결합하는 능력으로, 항체의 항원에 대한 특이성과 함께 고도의 친화도는 면역 반응에서 중요한 요소이다. 본 발명에서는 중쇄 가변영역을 무작위로 돌연변이시켜 인간화 중쇄 라이브러리 세포를 제작하고 이 라이브러리 세포를 대상으로 콜로니 리프트 어세이를 실시하여 항원 결합능이 높은 변이체 클론을 먼저 선별하였고 선별된 클론들을 대상으로 경쟁적 ELISA를 실시하여 각 클론의 친화도를 조사하였다.

- 그 외에도 항원에 대한 친화도를 측정하기 위한 다양한 방법을 사용할 수 있고, 표면 플라즈몬 공명 기술(surface plasmon resonance technology)이 그의 예이다.
- [72] 본 발명에 사용되는 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수(dissociation constant)를 의미하며, 항체의 항원에 대한 친화도를 측정하는 척도로 사용되었다. K_D 값이 낮으면 낮을수록 항체의 항원에 대한 친화력이 높음을 의미한다.
- [73] 본 발명은 또한, 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 면역 반응을 자극하기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 LAG-3에 특이적인 항체는 MHC 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하거나, 또는 면역 반응을 자극하거나, 또는 MHC 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하고 면역 반응을 자극할 수 있으므로, 본 발명의 LAG-3에 특이적인 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역 반응을 자극할 수 있는 것이다.
- [74] 본 발명은 또한, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [75] 본 발명의 항체는, MHC와 T 세포 수용체의 상호작용을 차단하여 T 림프구의 활성을 감소시키는 LAG-3에 고친화도로 결합하므로, LAG-3의 활성을 억제하여 T 림프구의 활성을 증진시켜 면역반응을 자극할 수 있다. 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [76] 본 발명에서 용어, "암"은 본 발명의 인간항체에 의해 치료될 수 있는 암이라면 그 종류에 제한없이 포함하나, 그 예로 간암, 유방암, 신장암, 뇌종양, 담도암, 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 자궁경부암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종 및 다발성 골수종 혈액암 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [77] 본 발명에서 제공하는 상기 각 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 약학적으로 허용가능한 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 완충식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [78] 본 발명의 상기 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 암 치료용 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하,

질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

- [79] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.
- [80] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [81] 본 발명의 조성물은 대상체에 본 발명의 항체를 투여하면 대상체에서 종양의 성장이 억제되도록 한다.
- [82] 본 발명의 상기 약학 조성물은 면역자극성 항체를 추가로 포함할 수 있고, 상기 면역자극성 항체는 바람직하게는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-CTLA-4 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 항-PD-L1 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [83] 본 발명은 또한, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 치료용 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [84] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [85] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 암 치료용 조성물을 약학적 유효량으로

투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 암의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

- [86] 또한, 상기 개체는 LAG-3의 과도한 활성화로 인하여 종양 발달과 신생혈관생성 등의 질병이 발생할 수 있는 임의의 동물을 의미하는 것으로, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [87] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 LAG-3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [88] 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 암에 대해서는 전술한 바와 같다. 본 발명의 LAG-3에 특이적인 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 진단용 조성물을 사용하여 LAG-3의 발현 여부와 발현 정도와 관련된 질환, 예컨대 암을 진단할 수 있다.
- [89] 상기 암을 진단하는 방법은 본 발명의 LAG-3에 특이적인 단클론항체를 암이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 분석함으로써 검출할 수 있으며, 이를 통해 암의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [90] 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜 LAG-3의 존재 또는 암의 유무를 확인할 수 있다.
- [91] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 LAG-3 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 통상적인 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있으며, 상기 LAG-3에 대한 항체를 이용한 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [92] 상기 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 암을

진단할 수 있다. 즉, 의심되는 개체로부터 분리한 생물학적 시료에서 본 발명의 LAG-3 단백질이 과발현되어 시그널이 정상 개체로부터 분리한 생물학적 시료보다 강하게 나오는 경우에는 암으로 진단된다.

- [93] 또한, 본 발명에 따른 키트는 본 발명의 LAG-3에 대한 항체를 포함하고, 시료와 항체가 반응함으로써 나타내는 시그널을 분석하여, 암을 진단할 수 있다. 이 때, 상기 시그널은 항체에 결합된 효소 예를 들어 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 또는 사이토크롬 P450을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이 때 효소에 대한 기질은 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(nitroblue tetrazolium, NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [94] 또한, 본 발명에 따른 키트는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 포함할 수 있으며, 상기 레이블은 화학물질 (예컨대, 바이오틴), 효소 (예컨대, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질 (예컨대, ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P 및 ^{35}S), 형광물질 (예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [95] 암 진단을 위해 사용되는 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이를 통해 LAG-3 발현을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있다.
- [96] 본 발명은 또한, 본 발명의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 결합된 항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate)를 제공한다.
- [97] 본 발명에서 용어 "약물"이란, 본 발명의 LAG-3에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합될 수 있고, 산성조건에 의하여 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 분리될 수 있으며, 표적 세포에 대한 치료효과를 나타내는 화합물을 의미한다.
- [98] 본 발명에 따른 항체-약물 결합체에 사용될 수 있는 약물은 세포독성 또는 세포증식 억제 효과를 갖는 임의의 화합물, 부분 또는 기를 포함하며, (i) 마이크로투블린 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 또는 DNA

인터칼레이터로서 기능할 수 있는 화학요법제; (ii) 효소적으로 기능할 수 있는 단백질 독소; 및 (iii) 방사선동위원소(방사선 핵종) 등이 포함되며, 상기 화합물에서 1종 이상이 사용될 수 있다.

- [99] 이러한 약물의 비제한적인 예로는 마이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 트리코테센, CC1065, 칼리케아미신 및 다른 에네딘 항생제, 타산, 안트라시클린, 메토틱세이트, 아드리아마이신, 빈테신, 빈카 알카로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신, 다우노마이신, 에토포시드, 테니포시드, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신류, 블레오마이신류, 에스페라미신류, 5-플루오로우라실, 멜팔란, 기타 질소 머스타드 및 그의 입체 이성질체, 동배체, 동족체 또는 유도체, 시스-백금 및 시스-백금 동족체, 기타 삽입제인 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산분해 효소, 항생제, 독소(세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소), 시스플라틴, CPT-11, 독소루비신, 파클리탁셀 및 도세탁셀 등의 각종 항종양 또는 항암제 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 방사선 동위원소(방사선 핵종)에는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며, 이에 제한되지 않으며, 특정 암유전자(oncogene)의 발현을 억제시킬 수 있는 마이크로 RNA (miRNA), siRNA 및 shRNA 등도 사용될 수 있다.
- [100] 본 발명은 또한, i) 본 발명의 항체; ii) 막투과성 도메인(transmembrane domain); 및 iii) 상기 i)의 항체가 항원에 결합하면 T 세포 활성화를 가져오는 것이 특징인 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR(chimeric antigen receptor) 단백질을 제공한다.
- [101] 본 발명에서, 상기 CAR 단백질은 본 발명의 단클론항체와, 공지의 막통과 도메인 및 세포 내 신호전달 도메인으로 구성됨으로써 특정될 수 있다.
- [102] 본 발명에서 용어, "CAR(chimeric antigen receptor)"은, 면역 효과기 세포에 특정 항원에 대한 특이성을 부여할 수 있는, 자연적으로 존재하지 않는 수용체를 의미한다. 보통, 상기 CAR은 T 세포에 단클론항체의 특이성을 이식하기 위하여 사용되는 수용체를 말한다. CAR은 대개 세포 외 도메인, 막투과성 도메인(transmembrane domain) 및 세포 내 도메인으로 구성된다.
- [103] 상기 세포 외 도메인은 항원 결합 부위(antigen recognition region)를 포함하며, 본 발명에서 상기 항원 결합 부위는 LAG-3에 특이적인 항체이다. LAG-3에 특이적인 항체는 전술한 것과 같으며, CAR에 사용되는 항체는 항체 단편의 형태인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 Fab 또는 scFv 형태이나, 이에 제한되지 않는다.
- [104] 또한, CAR의 막투과성 도메인은 세포 외 도메인과 연결된 형태로서, 자연적 또는 합성된 것에서 유래한 것일 수 있다. 자연적으로 존재하는 것에서 유래한 경우, 막 결합 또는 막투과성 단백질에서 유래한 것일 수 있으며, T 세포

수용체의 알파, 베타 또는 제타 체인, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 또는 CD8 등 다양한 단백질의 막투과성 영역에서 유래한 부분일 수 있다. 이러한 막투과성 도메인의 서열은 막투과성 단백질의 막투과성 영역 부분을 공지하고 있는 당업계에 공지된 문헌 등으로부터 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [105] 또한, 상기 막투과성 도메인이 합성된 것일 경우, 이는 류신 및 발린과 같은 소수성 아미노산 잔기를 주로 포함할 수 있으며, 그 예로 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성된 막통과 도메인에 존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [106] 본 발명의 CAR에서 상기 세포 내 도메인은 세포 내에 존재하는 CAR의 도메인 일부로서, 막투과성 도메인과 연결된 형태이다. 본 발명의 상기 세포 내 도메인은 CAR의 항원 결합 부위에 항원이 결합하면 T 세포 활성화, 바람직하게는 T 세포 증식을 가져오는 것이 특징인, 세포 내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 상기 세포 내 신호전달 도메인은 세포 외에 존재하는 항원 결합 부위에 항체가 결합하면, T 세포 활성화를 가져올 수 있는 신호를 전달하는 부분이라면 특별히 그 종류에 제한되지 않으며, 다양한 종류의 세포 내 신호전달 도메인이 사용될 수 있으며, 그 예로 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)일 수 있으며, 상기 ITAM은 CD3 제타(ξ , zeta), FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d 또는 FcεRI γ 에서 유래한 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 또한, 본 발명의 CAR의 세포 내 도메인은 세포 내 신호전달 도메인과 함께 공동자극 도메인(costimulatory domain)을 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 공동자극 도메인은, 본 발명의 CAR에 포함되어 세포 내 신호전달 도메인에 의한 신호에 더하여, T 세포에 신호를 전달하는 역할을 수행하는 부분으로서, 공동자극 분자의 세포 내 도메인을 포함하는, CAR의 세포 내 부분을 의미한다.
- [108] 상기 공동자극 분자는 세포 표면 분자로서, 항원에 대한 림프구의 충분한 반응을 가져오는데 필요한 분자를 의미하며, 그 예로 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 공동자극 도메인은 이러한 공동자극 분자 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자의 세포 내 부분일 수 있다.
- [109] 또한, 선택적으로, 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커가 CAR의 세포 내 도메인 및 막투과성 도메인을 연결할 수 있으며, 상기 링커는 본 발명의 CAR에 포함되어도, 세포 외에 위치한 항체에 항원이 결합하였을 때 세포 내 도메인을 통한 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 링커라면, 특별히 그 길이에

제한되지 않는다.

- [110] 본 발명은 또한, 상기 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 다중특이적 항체를 제공한다.
- [111] 본 발명에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 바람직하게는 이중특이적 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [112] 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 본 발명에 따른 항-LAG-3 항체가 면역효능세포-특이적 표적분자에 대한 결합능을 가지는 항체 또는 그 단편과 결합된 형태가 바람직하다. 면역효능세포-특이적 표적분자는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, TIGIT, BTLA, KIR, A2aR, VISTA, B7-H3, TCR/CD3, CD16(FcγRIIIa) CD44, Cd56, CD69, CD64(FcγRI), CD89 및 CD11b/CD18(CR3)에서 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [113] 다중특이적 항체는 동일한 항원 또는 두 개 이상의 다른 항원에 대하여 동시에 서로 다른 다중(이중 이상)의 에피토프를 인식하는 항체로, 다중특이적 항체에 속하는 항체들은 scFv 기반 항체, Fab 기반 항체 및 IgG 기반 항체 등으로 구분할 수 있다. 다중특이적, 예를 들어 이중특이적 항체의 경우 두 개의 신호를 동시에 억제 또는 증폭시킬 수 있기 때문에 하나의 신호를 억제/증폭하는 경우보다 더욱 효과적일 수 있으며, 각각의 신호를 각각의 신호억제제로 처리했을 경우와 비교하면, 저용량 투약이 가능하며, 동일한 시간 및 공간에서의 두 개의 신호를 억제/증폭시킬 수 있다.
- [114] 이중특이적 항체의 제조 방법은 널리 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 두 개의 중쇄가 상이한 특이성을 가지는 조건에서 두 개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동 발현을 근간으로 한다.
- [115] scFv를 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 상이한 scFv들의 VL과 VH를 각기 서로 조합하여 혼성 scFv를 heterodimeric 형태로 제조하여 디아바디(diabody)를 만들 수 있고(Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444, 1993), 상이한 scFv를 서로 연결해서 tandem ScFv를 제조할 수 있으며, Fab의 CH1과 CL을 각각의 scFv의 말단에 발현시켜 heterodimeric 미니항체(miniantibody)를 제조할 수 있고(Muller et al., FEBS lett., 432:45, 1998), 그리고 Fc의 homodimeric 도메인인 CH3 도메인의 일부 아미노산을 치환하여 'knob into hole' 형태의 heterodimeric 구조로 변경시켜, 이들 변경된 CH3 도메인을 상이한 각각의 scFv 말단에 발현시킴으로써 heterodimeric scFv 형태의 미니바디(minibody)를 제조할 수 있다(Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998).
- [116] Fab을 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 특정 항원에 대한 개별 Fab'를 이황화결합 또는 매개체를 이용해서 서로 조합하여 heterodimeric Fab 형태로 제조할 수 있고, 특정 Fab의 중쇄 또는 경쇄의 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 발현시킴으로써 항원 결합가(valency)를 2개로 하거나, Fab과 scFv 사이에

경첩부위(hinge region)를 둠으로써 homodimeric 형태로 4개의 항원결합가를 가지도록 제조할 수 있다. 또한, Fab의 경쇄 말단과 중쇄 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 만든 이중표적 바이바디(bibody), Fab의 경쇄말단과 중쇄말단에 상이한 scFv를 각각 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 가지도록 한 삼중표적 바이바디, 상이한 Fab 3개를 화학적으로 접합시킴으로써 얻어진 간단한 형태의 삼중표적항체 F(ab')₃의 제조방법이 당업계에 알려져 있다.

- [117] IgG를 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 트리온파마(Trion Pharma)사에 의해 마우스와 랫트 하이브리도마를 다시 교잡함으로써, 하이브리드 하이브리도마, 일명 쿼드로마(quadromas)를 제조하여 이중특이적 항체를 생산하는 방법이 알려져 있다. 또한, 경쇄부분은 공유하면서, 상이한 중쇄에 대해서 Fc의 CH3 homodimeric 도메인의 일부 아미노산을 변형시켜 heterodimeric 형태로 제작한 이른 바 'Holes and Knob' 형태의 이중특이적 항체의 제조방법(Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998), heterodimeric 형태의 이중특이적 항체 이외에, 상이한 2종의 scFv를 IgG의 경쇄와 중쇄의 가변 도메인 대신 constant 도메인에 각각 융합 발현시켜 homodimeric 형태의 (scFv)₄-IgG로 제조한 방법이 알려져 있다. 또한, 임클론(ImClone)사는 인간 VEGFR-2에 대한 키메라 단클론항체인 IMC-1C11을 기반으로 하여, 이 항체의 경쇄 아미노 말단에 마우스 혈소판유도성장인자수용체-알파(Platelet-derived Growth Factor Receptor- α)에 대한 single variable domain만을 융합시켜 이중특이적 항체를 제작하여 보고하였다. 또한, Rossi 등은 단백질 카이네이즈 A(protein kinase A, PKA) R 서브유닛의 dimerization and docking domain(DDD)과 PKA의 anchoring domain을 이용한 이른 바 'dock and lock(DNL)' 방법을 통해서 CD20에 대한 다수의 항원결합가를 지니는 항체를 선보인 바 있다(Rossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103:6841, 2006).

[118]

- [119] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[120]

- [121] 실시예 1. LAG-3 항원 제작과 정제 및 활성 확인

- [122] 1-1. LAG-3 항원 단백질 발현 벡터 제작

- [123] LAG-3 단백질의 클로닝은 LAG-3 gene cDNA clone 플라스미드(#HG16498-G, Sino Biological Inc, China)를 이용하여 세포외 도메인(29-450번째 아미노산 서열)만을 얻기 위해 5' 말단과 3' 말단에 제한효소 *Sfi*I 자리가 포함된 LAG-3에 대한 프라이머(표 1)를 이용하여 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 발현 벡터를 이용하여 카복시-말단에 마우스 Fc(mFc)를 융합시켜 제작하였다(도 1A).

[124]

[표1]

LAG-3 클로닝을 위한 PCR 프라이머

프라이머 명칭	서열번호 (5'→3')
LAG-3-F	gtcccggtggtgtgggccaggag (서열번호 112)
LAG-3-R	gaggtggcctgctgggagggcacc (서열번호 113)

[125]

[126] 1-2. LAG-3 항원 단백질의 발현 및 정제

[127] 제작한 LAG-3 플라스미드는 HEK293F 세포(Invitrogen, USA)에 PEI (Polyethylenimine: #23966, Polysciences, USA)를 사용하여 형질감염(transfection)시킨 후, 무혈청 배지인 프리스타일 293 발현 배지(FreeStyle 293 Expression Medium: #AG100009, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 7일 동안 배양하였다. LAG-3 단백질을 포함하는 세포 배양액을 회수하여 10분간 5,000 rpm에서 원심분리하고 0.22 μ m TOP-필터(Millipore, USA)를 통해 남아있는 세포와 부유물질을 제거하였다. LAG-3 단백질의 정제는 단백질 A 아가로스 레진(protein A agarose resin)을 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용하였으며 1차 정제된 단백질은 Superdex 200 (1.5 cm x 100 cm) 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography)를 이용하여 2차 정제를 진행하였다.

[128] 정제된 단백질은 환원 혹은 비환원 조건에서 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 순도를 확인하였다. 그 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이, 정제된 LAG-3-mFc 단백질의 순도는 95% 이상의 순도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[129]

[130] 1-3. LAG-3 항원 단백질의 활성 확인

[131] 정제한 LAG-3-mFc 단백질 활성은 LAG-3 리셉터인 MHC class II를 발현하고 있는 Daudi(human B cell line) 세포에 결합할 수 있는지를 통해 확인하였다. 5×10^5 의 Daudi 세포(# 10213, Korean Cell Line Bank, Korea)는 10 μ g/ml의 LAG-3-mFc 또는 MHC class II 항체(blocking antibody)인 200 μ g/ml의 항-인간 HLA-DR, DP, DQ (#555556, BD, USA) 항체와 함께 4°C에서 45분간 반응시켰다. 그 후, 세포들은 2% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) (#26140-079, Thermo Fisher Scientific)이 포함된 PBS(phosphate buffered saline: #LB001-02, Welgene, Korea)로 3차례 수세하고, 세포 표면에 결합한 LAG-3 확인을 위해 PE(phycoerythrin) 형광물질이 결합된 항-인간 LAG-3 항체(#565616, BD Biosciences, USA)를 4°C에서 30분간 처리한 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.2 ml의 2% FBS가 든 PBS로 현탁 시킨 후, 유세포 분석기(flow cytometry)인 FACSCanto II (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

- [132] 그 결과, 정제한 LAG-3-mFc 단백질은 Daudi 세포에 잘 결합하였으며, MHC class II에 대한 항체를 처리하여 블로킹(blocking) 하였을 때는 그 결합이 감소하는 것을 확인하였다(도 1C). 이 결과는 정제한 LAG-3-mFc 단백질이 세포 표면에 발현하고 있는 MHC class II와 결합할 수 있으며 구조적으로 활성을 가지고 있음을 나타낸다.
- [133]
- [134] 실시예 2. LAG-3 인간항체의 선별
- [135] 2-1. 바이오패닝
- [136] 실시예 1에서 제작한 LAG-3-mFc 및 Sino Biological Inc.에서 구입한 LAG-3-his(#16498-H08H) 단백질 항원 50 μ g을 면역 흡착(immunosorb) 튜브에 코팅한 후, 블로킹을 수행하였다.
- [137] 인간항체 라이브러리 파지는 2.7×10^{10} 의 다양성을 가진 인간 scFv(single-chain variable fragment) 라이브러리를 박테리아에 감염 시킨 후, 박테리아를 30°C에 16시간 동안 배양하였다. 배양 후, 원심 분리하여 상층액을 PEG(polyethylene glycol, Sigma)로 농축한 다음, 이를 PBS 완충용액에 녹여 인간항체 라이브러리를 준비하였다. 면역튜브에 라이브러리 파지를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응한 다음, 1 x PBS-Tween20(PBS-T)와 1 x PBS로 수세한 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파지들만 용출하였다. 용출된 파지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝 과정을 통해 양성 파지의 풀(pool)을 얻고, 비슷한 방법으로 2~3차 라운드 패닝을 수행하였고, 각 패닝 라운드에서의 파지 유입수와 결합수는 표 2에 나타낸 바와 같다.

- [138] [표2]
패닝횟수에 따른 항체의 역가 비교

패닝횟수	파지의 유입수	파지의 결합수
1회	8×10^{12}	8×10^6
2회	3×10^{12}	5×10^5
3회	4×10^{12}	1×10^5

- [139]
- [140] 2-2. 폴리(poly) 파지 ELISA
- [141] 실시예 2-1의 각 라운드의 패닝 과정을 통해 수득한 양성 폴리 scFv-파지 항체 풀에 대한 항원과의 특이성을 알아보기 위해 폴리 파지 ELISA(enzyme linked immunoassay)를 수행하였다.
- [142] 각 1차부터 3차까지 패닝하여 얼려두었던 세포 스톡(stock)을 5 ml의 2 x YTCM (Yeast extract 10 g, Tryptone 17 g, NaCl 5 g, chloramphenicol 34 μ g/ml), 2% 글루코오스, 5 mM MgCl₂ 배지에 OD₆₀₀에서 0.1 되게 넣어준 다음, 37°C에서 2~3시간(OD₆₀₀=0.5~0.7) 배양한 후 M1 헬퍼 파지를 감염하여 2 x YTCMK (2 x

YTCM, Kanamycin 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5 mM MgCl_2 , 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(4,500 rpm, 15 분, 4°C) 후, 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 96-웰 면역-플레이트(#439454, NUNC, USA)에는 카복시-말단이 다른 표지(tag)로 융합된 두 종류의 인간 LAG-3 항원, LAG-3-mFc와 LAG-3-his 단백질을 각각 웰 당 100 ng씩 4°C에서 16시간 정도 코팅완충용액(coating buffer)으로 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킴 밀크(skim milk)를 사용하여 각 웰을 블로킹(blocking)하였다. 그 후, 각 웰 마다 PBS-T 0.2 ml 사용하여 수세하고, 1차~3차 패닝 폴리 scFv-파지를 각 웰에 100 μl 씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰 마다 PBS-T 0.2 ml를 사용하여 4번 수세 후 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 마우스 항-M13 항체(#11973-MM05, Sino Biological Inc.)를 1:2,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. PBS-T로 수세 후에 OPD tablet(#8787-TAB, Sigma)을 PC 완충용액(0.1 M Na_2HPO_4 , 0.005 M Na-Citrate, pH 5.0)에 녹인 기질용액을 만들어 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어 10분 동안 발색 시킨 다음, 흡광도(absorbance) 490 nm에서 분광광도계(spectrophotometer: Molecular Devices, USA)로 측정하였다.

- [143] 그 결과 도 2에 따르면, 카복시-말단의 표지(tag)가 다른 2가지 인간 LAG-3 항원인 LAG-3-mFc와 LAG-3-his 단백질들에 대한 결합능이 3차 폴리 scFv-파지에서 증강(enrichment) 됨을 ELISA 분석법으로 확인하였다.

[144]

[145] 2-3. 단일클론 선별

- [146] 항원에 대해 특이적인 단일 scFv 파지 클론을 선별하기 위해 결합능이 큰 3차 패닝 다클론 파지 항체군에서 얻은 콜로니를 선택하여 2 x YTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl_2 배지 1 ml이 포함된 96-딥 웰 플레이트(#90030, Bioneer, Korea)에서 37°C 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1 ml의 2 x YTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl_2 배지에 OD_{600} 에서 값이 0.1이 되도록 100~200 μl 를 취해 넣어준 다음, 37°C에서 2~3시간($\text{OD}_{600}=0.5\sim0.7$) 배양하고, M1 헬퍼 파지를 MOI(multiplicity of infection) 값이 1:20이 되도록 감염시킨 이후, 상기 실시예 2-2와 같이 동일한 방법으로 진행하여 단일 scFv 파지에 대해 파지-ELISA를 수행하였다.

- [147] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 재조합 인간 LAG-3-his 항원에 대해 결합능이 강한 28개의 단일 파지 클론을 선별하여 얻었다. 선별된 파지 클론들은 아래 실시예 2-4 염기서열 분석과 실시예 3 내지 실시예 5와 같은 항체 특성 분석 과정을 통해 추가 선별 되었으며, 그 중에서 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단일클론 1E09 클론에 대해 실시예를 기술하였다.

[148]

[149] 2-4. 단일클론의 염기서열 분석

- [150] 선별된 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단일클론 1E09에 대해 DNA 정제 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA-prep을 수행하고 서열 분석을

의뢰하였다(Solgent, Korea). 서열 분석 결과를 보고 선별된 항체의 VH(variable region of heavy chain)와 VL(variable region of light chain)의 CDR(complementarity determining region) 부위를 확인하였고, 이들 항체와 생식계열(germ line) 항체군의 유사성을 NCBI의 웹페이지 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 조사하였다. LAG-3에 특이적으로 결합하는 단일클론 1E09의 특성을 표 3에 정리하여 제시하였다.

[151] [표3]

LAG-3 단일클론 1E09의 특성

클론명	VH	유사성	VL	유사성	그룹
1E09	VH3-11	88.8%	O12	89.5%	1

[152] 선별된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR(frame work region) 서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 4 및 표 5와 같다.

[153] [표4]

LAG-3 단일클론 1E09의 중쇄 가변영역

클론명	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1E09	QVQLV QSGGD LVKPG GSLRLS CAAS (서열번 호 4)	GFSFSD HY (서열번 호 1)	MNWIR QAPGK GLEWV AY (서열번 호 5)	IDTSAT YI (서열번 호 2)	YYADS VKGRFT ISRDNA KNSLYL QMNSL RAEDT AVYYC (서열번 호 6)	ARDNW GSLDY (서열번 호 3)	WGQGA LVTVSS (서열번 호 7)

[154] [표5]

LAG-3 단일클론 1E09의 경쇄 가변영역

클론명	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1E09	DIQMTQ SPSSLSP SVGDR VTITCQ AS (서열번 호 11)	QEISY (서열번 호 8)	LNWYQ QKPGK APKLLI Y (서열번 호 12)	DAS (서열번 호 9)	NLETGV PSRFSG SGSGTD FTLTSS LQPEDF ATYYC (서열번 호 13)	QQTYIT PYT (서열번 호 10)	FGQGT KLDIK (서열번 호 14)

[155]

[156] 실시예 3. LAG-3 인간 단일 항체의 생산

[157] 3-1. scFv 형태를 IgG 형태로 전환(conversion)

[158] 선별된 LAG-3에 대한 단일 클론 파지 항체 1E09를 완전(fully) IgG 형태로 전환하기 위해 중쇄와 경쇄의 DNA 염기서열에 대해 각각 *SfiI*/*NheI*과 *SfiI*/*BglII* 제한효소 자리 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR(iCycler iQ, Bio-Rad, USA)을 수행하였다. 중쇄와 경쇄 PCR 산물들은 각각 일치하는 제한효소 자리를 갖는 각각의 발현벡터들과 함께 절단하여 DNA-gel extraction 키트(Qiagen)로 DNA를 용출하였다. 라이게이션(ligation)은 벡터 1 μ l(10 ng), 중쇄 또는 경쇄 15 μ l(100~200 ng), 10 x 버퍼 2 μ l, ligase(1 U/ μ l) 1 μ l, 증류수를 혼합하여 실온에서 1~2시간 방치 후, 형질전환 세포(competent cell, XL1-blue)에 넣어 얼음에 5분간 놓고, 42°C에서 90초간 열 충격(heat shock)을 주었다.

[159] 열 충격 후 배지 1 ml을 넣은 뒤 1시간 동안 37°C에서 키운 후, LB Amp 플레이트에 스프레딩(spreading)하여 37°C에 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 얻은 콜로니를 취해 LB Amp 배지 5 ml을 접종하여 37°C에 16시간 동안 배양 후, DNA-prep 키트(Nuclogen)를 이용하여 DNA-prep을 수행하였다. 얻은 DNA는 서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

[160] 그 결과, 완전 IgG로 전환한 1E09의 중쇄와 경쇄 클론의 DNA 염기서열이 표 3의 클론의 파지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. 이후 1E09의 항체 생산을 위해 각각의 중쇄와 경쇄 클론을 LB Amp 100 ml 배지에 키워 midi-prep 키트(QIAGEN)를 이용하여 각각 다량의 플라스미드를 얻었다.

[161]

[162] 3-2. 인간 단일 항체의 생산

[163] 준비된 중쇄와 경쇄를 포함하는 발현벡터는 6:4의 비율로 HEK-293F 세포에 동시 형질감염(co-transfection)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22 μ m Top-필터를 통해 세포와 부유물질을 제거한 후, 상층액을 모아 단백질 A 친화성 크로마토그래피(protein A affinity chromatography)를 수행하여 IgG 항체를 정제하였다. 정제 후, 글리신 완충용액(glycine buffer)으로 항체를 용출하고, 최종 PBS 완충용액으로 교환하였다. 정제된 항체는 항체의 몰흡광계수(molar extinction coefficient)를 이용하여 분광광도계(SpectraMX M5, Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도(absorbance) 280 nm에서 정량되었고, 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 정제된 항체는 환원, 비환원 조건에서 각 5 μ g씩 로딩하여 SDS-PAGE 분석하여 정제 단백질의 순도 및 이동도(mobility) 상태를 확인하였다.

[164] 그 결과, LAG-3 인간 단일 항체 1E09는 비환원 조건에서 150 kDa 이상 크기에서 검출되었고, 생산량은 130 mg/L였다(도 4).

[165]

[166] 실시예 4. LAG-3 인간 단일 항체의 특성

[167] 4-1. LAG-3 항원에 대한 항체 특이성

- [168] 인간 LAG-3을 과발현하는 형질전환 세포 풀은 인간 LAG-3(NCBI accession number NM_002286.5)을 포함하고 있는 pcDNA3.1 플라스미드를 HEK293E에 형질감염 시킨 후, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin(#R25001, Thermo Fisher Scientific)이 들어있는 선택적 배양 배지에서 선별과정을 수행하였다. 선별과정 후 세포 풀은 PE(phycoerythrin) 형광물질이 결합된 항-인간 LAG-3 항체(#565616, BD, USA)를 이용한 FACS(fluorescence activated cell sorting) 분석을 통해 발현 상태를 확인하여 분리하였고, 항원에 대한 항체의 특성분석 평가를 위해 사용되었다.
- [169] LAG-3-1E09 항체의 항원 특이성은 제조한 인간 LAG-3 과발현 HEK293E 세포 풀에 LAG-3 siRNA(small interfering RNA) (Bioneer, Korea)을 처리하여 LAG-3 발현을 감소시킨 후, 항체의 결합 정도를 FACS 분석을 통해 감소전과 비교하여 확인하였다.
- [170] 인간 LAG-3 과발현 세포에 20 nM의 대조 siRNA (siCon) 또는 LAG-3 siRNA (siLAG-3)를 처리하고 48시간 후에 웨스턴 블랏(Western blot)을 통해 확인한 결과, LAG-3 siRNA를 처리한 세포에서 LAG-3의 발현량이 90% 이상 감소하는 것을 확인하였다(도 5A). 이때 LAG-3 항체의 세포 결합을 확인하기 위해 시료당 0.5×10^6 의 각 세포를 준비하여 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체와 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후, 세포들은 2% FBS가 포함된 PBS로 3차례 수세하고, FITC(fluorescein isothiocyanate) 형광물질이 결합된 항-인간 IgG 항체(#FI-3000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 30분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.2 ml의 2% FBS가 든 PBS로 현탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer를 사용하여 분석하였다. 그 결과 LAG-3-1E09 인간 단일 항체는 인간 LAG-3 과발현 세포에는 잘 결합하였으나, LAG-3 siRNA 처리에 의해 LAG-3 발현이 감소한 세포에서는 결합이 감소되는 것을 보여주었다(도 5B). 이 결과는 LAG-3-1E09 인간 단일 항체가 인간 LAG-3 항원에 특이적으로 결합한다는 것을 의미하였다.

[171]

[172] 4-2. 다른 종의 LAG-3 단백질에 대한 교차반응성(cross-reactivity) 분석

- [173] 실시예 4-1의 인간 LAG-3 과발현 형질전환 세포 풀 제작과 동일한 방법으로 원숭이(Rhesus monkey) LAG-3(NCBI accession number XM_001108923.2) 또는 마우스 LAG-3(NCBI accession number NM_008479)를 포함하고 있는 pcDNA3.1 플라스미드를 HEK293E 세포에 각각 형질전환하여 세포 풀을 만들고, 항원에 대한 1E09 항체의 특성분석 평가를 위해 사용하였다.
- [174] LAG-3-1E09 인간 단일 항체의 교차반응성 확인을 위해 인간, 원숭이, 마우스 LAG-3을 각각 과발현하는 형질전환 HEK293E 세포를 시료당 0.2×10^6 개로 준비하고, 항체를 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (40 nM)부터 1/3 희석 배수로 연속적으로 희석하여 준비된 세포와 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후, 세포는 2% FBS가 포함된 PBS로 3차례 수세하고, FITC 형광물질이 결합된 항-인간 IgG 항체(#FI-3000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 30분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후

0.2 ml의 2% FBS 가 든 PBS로 현탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer를 사용하여 분석하였다.

- [175] 그 결과, LAG-3 인간 단일 항체 1E09는 세포 표면에 과발현된 인간, 원숭이 및 마우스의 LAG-3 단백질에 대해 모두 특이적으로 결합하였고, 항체 농도에 의존적으로 결합이 증가함을 보였다(도 6). 이때 항체의 세포 결합능(cell binding capacity)을 최대 결합의 50%에 이르게 하는 양(EC_{50})으로 계산했을 때, 세포 결합 정도를 나타내는 MFI(mean fluorescence intensity) 값들을 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 분석한 결과, LAG-3-1E09 항체의 세포 결합능을 나타내는 EC_{50} 값은 인간 LAG-3에 대해서는 $0.0757 \mu\text{g/ml}$, 원숭이 LAG-3에 대해서는 $0.2462 \mu\text{g/ml}$, 마우스 LAG-3에 대해서는 $1.5003 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다.

[176]

[177] 4-3. LAG-3 인간 단일 항체의 항원에 대한 친화도(affinity) 확인

- [178] LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 항원에 대한 결합 친화도는 카복시-말단에 마우스 Fc(mFc)가 융합된 재조합 융합 단백질들인 인간 LAG-3(hLAG-3-mFc), 원숭이 LAG-3(MrhLAG-3-mFc), 마우스 LAG-3(mLAG-Fc) 항원을 이용하여 Octet® QK® (Fortebio Inc. USA) 분석 장비를 통해 측정하였다.

- [179] 항원 항체간 친화도 측정을 위해 AHC(anti-human Fc capture: #18-5060, Fortebio Inc.) 또는 AMC(anti-mouse Fc capture: #18-5088, Fortebio Inc.) 바이오 센서를 완충액(#18-1042, Fortebio Inc.)에 10분간 안정화시킨 후에 항원 또는 항체를 고정하고 완충액(#18-1042, Fortebio Inc.)에 10분간 안정화시킨 후에 고정되지 않은 항원 또는 항체는 완충액으로 5분간 세척하고, 96-웰 플레이트(#655209, Greiner Bio-One, USA)에 결합을 원하는 항체 또는 항원을 농도별($0.94\text{-}60 \text{ nM}$)로 준비하여 10분간 결합(association) 반응을 수행하고, 이어서 10분 또는 30분간 해리(dissociation) 반응을 수행하였다. 모든 실험은 30°C , 1,000 rpm 조건에서 수행하였고, 시간에 따른 결합과 해리 과정 중의 센서그램(sensorgram) 데이터를 수집하여 Octet 데이터 분석 소프트웨어 9.0에 따라 1:1 글로벌 바인딩 피팅 모델(global binding fitting model)을 적용하여 평형 해리상수(equilibrium dissociation constant, K_D)를 구하였다.

- [180] 그 결과, 도 7과 같이, LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 항원 결합력(K_D)은 인간 LAG-3 항원에 대해 0.0918 nM (도 7A)로 가장 높은 친화도를 보였고, 원숭이 LAG-3 항원에는 0.328 nM (도 7B), 마우스의 LAG-3 항원에는 0.596 nM (도 7C)의 친화도를 보였다.

[181]

[182] 4-4. ELISA 분석법을 통한 LAG-3 항원에 대한 결합부위(epitope) 결정

- [183] LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 항원에 대한 결합부위를 알아보기 위해 도 8A에서와 같이 LAG-3의 세포외 영역에서 Ig-V 도메인(29-167번째 아미노산 서열)을 절단($\Delta\text{Ig-V}$)하거나 Ig-V 도메인 내 특정 또는 불특정 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변이체(M1-M7)와 wild-type(WT)을 mFc 또는 His 태그와

융합하여 제작한 재조합 LAG-3 단백질들을 상기 실시예 1과 같이 생산, 정제하였다(도 8A 및 8B). 다만, LAG-3-His (WT)은 Sino Biological Inc. (#16498-H08H)에서 구입하여 사용하였고, 생산한 재조합 LAG-3-His 단백질들은 Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (#17531803, GE Healthcare)을 이용한 친화성 크로마그래피(affinity chromatography)를 통해 정제하였다. 정제 또는 구매한 재조합 LAG-3 단백질들은 SDS-PAGE를 통해 순도를 확인한 후(도 8B), LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 결합 특이성 확인을 위해 ELISA 분석에 사용하였다(도 8C).

- [184] LAG-3 항원 변이체를 이용한 ELISA 분석결과, LAG-3-1E09 항체는 wild-type LAG-3 항원과 비교하여 LAG-3- Δ Ig-V 변이체에 결합하지 않았고, LAG-3 Ig-V 도메인 변이체에서는 M7>M6≥M4>M1의 순서로 결합이 감소하는 것을 알 수 있었다(도 8C). 이 결과로 LAG-3-1E09 인간 단일 항체는 LAG-3의 세포외 영역 부분 중, Ig-V 도메인(29-167번째 아미노산 서열)에 결합부위를 갖는 것으로 확인되었고, 세부적으로는 LAG-3 Ig-V 도메인의 M1, M4, M6, M7 변이체의 변이 아미노산 위치에 결합 부위를 가지며, 상기 아미노산 위치는 wild-type LAG-3에서 각각 ⁵²DL⁵³, ¹⁰⁷GGLRSGRLPLQ¹¹⁷, ¹³⁷R, ¹⁵⁰AVHLRDRALSCR¹⁶¹인 것으로 확인되어, 본 발명의 LAG-3-1E09 항체는 입체형태적 에피토프(conformational epitope)를 갖는 것을 확인하였다.

[185]

[186] 실시예 5. LAG-3 인간 단일 항체의 활성평가

[187] 5-1. LAG-3 항체에 의한 LAG-3/MHC class II 복합체 형성 억제 확인

[188] LAG-3-1E09 항체가 LAG-3/MHC class II 복합체 형성을 억제할 수 있는지 확인하기 위해, 세포 표면에 MHC class II를 발현하고 있는 Raji 세포주(Burkitt 림프종유래의 인간 백혈병세포)를 각각 시료당 0.2×10^6 개로 준비하고, 200 nM (14.4 μ g/ml)의 LAG-3-mFc 단백질에 항체들을 400 nM에서부터 1/2 희석 배수로 연속적으로 희석하여 4°C에서 30분간 반응(pre-incubation) 시킨 후, 항원-항체 혼합물을 준비한 세포와 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후, 세포는 2% FBS가 포함된 PBS로 3차례 수세하고, LAG-3-mFc를 검출할 수 있는 FITC 형광물질이 결합된 항-마우스 IgG 항체(#FI-2000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 30분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.2 ml의 2% FBS가 든 PBS로 현탁시킨 후, 유세포 분석기인 CytoFLEX (Beckman coulter, USA)을 사용하여 분석하였다.

[189] LAG-3-1E09 항체의 LAG-3/MHC class II 복합체 형성을 막는 저해 능력은 MHC class II 발현세포에 결합하는 LAG-3-mFc의 결합력 감소로 알 수 있고, 실험 결과에서 대조항체(한국공개특허공보 제2015-0023909호)를 포함하여 LAG-3 인간 단일 항체 1E09는 농도 의존적으로 LAG-3와 MHC class II 복합체의 형성을 저해함을 확인하였다(도 9). 그 저해 정도는 항체에 의한 최대 억제의 50%에 이르는데 필요한 시료의 양(IC₅₀)으로 나타낼 수 있고, LAG-3-mFc의 결합 정도를 확인하는 MFI 값들과 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용하여 분석한

결과, 대조항체(reference)와 1E09 항체의 IC₅₀ 값은 각각 26.6084 nM과 25.0922 nM로 유사하게 확인되었다.

[190]

[191] 5-2. LAG-3-1E09 항체의 T 세포에 대한 활성 평가

[192] LAG-3에 결합하는 인간 단일 항체 1E09의 활성 평가 실험은 LAG-3/MHC class II 차단 바이오어세이 키트(blockade bioassay kit: #CS194822, Promega)를 사용하여 진행하였다. MHC class II가 과발현되어 있는 APC 세포주를 96-웰 플레이트에 16시간 이상 배양 후, 10 µg/ml의 항체 농도로부터 1/2.5 희석 배수로 연속 희석한 각 항체들을 처리하고, 인간 LAG-3가 과발현되는 작용 세포주(Jurkat T 세포주)를 6시간 동안 함께 배양하였다. 항체의 저해 회복 정도는 루시페라제(luciferase)가 기질을 분해하여 나오는 발광세기로 알 수 있고, 분광광도계(GloMax® Discover System, Model # GM3000, Promega)로 측정하였다. 대조항체(reference)를 포함하여 LAG-3-1E09 항체는 LAG-3/MHC II 복합체 형성으로 감소되어 있던 작용 세포주인 Jurkat T 세포의 시그널을 농도 구배 의존적으로 회복시키는 활성을 보였다(도 10). 그 회복 정도는 항체에 의한 최대 효과의 50%에 이르는데 필요한 시료의 양(EC₅₀)으로 나타낼 수 있고, GraphPad Prism 소프트웨어를 이용하여 분석한 결과, LAG-3-1E09 항체의 저해 회복 능력인 EC₅₀ 값은 0.05784 µg/ml, 대조항체(reference)는 0.16811 µg/ml로 확인되어, 본 발명의 1E09 항체는 대조항체 대비 약 2.9배 우월한 활성도를 보였다.

[193]

[194] 실시예 6. LAG-3 인간 단일 항체의 최적화

[195] 6-1. 1E09 항체의 최적화를 위한 라이브러리 제작

[196] 항체 최적화는 중쇄는 고정하고 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 10⁵-10⁶ 경쇄(light chain, LC) 풀(pool)을 넣어 새로운 LC 셔플링 라이브러리(LC shuffling library)를 제작하고, 1) LC 셔플링, 2) 중쇄의 소수성 코어(hydrophobic core), 노출 잔기(exposed residue), 전하 클러스터(charge cluster), 염 브릿지(salt bridge) 등과 같이 구조적으로 중요한 부위의 잔기들과 비교분석을 하여 보존된 잔기(conserved residue)로 변이시킨 뒤 LC 셔플링을 진행하는 코어 패킹(core packing) + LC 셔플링, 3) 항체 가변 영역(variable region)의 DNA는 *in vivo* 친화도 성숙(affinity maturation) 과정에서 빈번하게 변이 될 수 있는 변이 핫스팟(mutational hot spot)을 랜덤하게 변이시킨 뒤 LC 셔플링을 진행하는 CDR 핫스팟 + LC 셔플링의 3가지 방법으로 진행을 하였다.

[197] LC 셔플링 라이브러리를 제작하기 위해 1E09 항체의 LC 유전자를 BstX I으로 절단한 다음 벡터로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트(insert)로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 사각 접시(square plate)에 형질전환된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한

결과 약 1.5×10^7 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 중쇄(heavy chain, HC)의 서열은 모두 같으며 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.

- [198] Core 패킹 + LC 서플링 라이브러리를 제작하기 위해 1E09 항체의 FR 부분을 보존(conserved)된 아마노산 서열로 치환한 뒤 LC 유전자를 BstX I으로 절단한 다음 벡터로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 사각 접시에 형질전환된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약 8.4×10^6 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR 부위가 보존된 아마노산 서열로 치환되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.
- [199] CDR 핫스팟 + LC 서플링 라이브러리를 제작하기 위해 1E09 항체의 FR 부분을 보존(conserved)된 아마노산 서열로 치환한 뒤 CDR1, CDR2의 핫스팟 라이브러리를 SfiI으로 절단한 다음 인서트로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 SfiI으로 절단하여 벡터로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행 하였다. 사각 접시에 형질 전환 된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약 5.6×10^6 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR 부위가 보존된 아마노산 서열로 치환되었고 CDR1, CDR2의 핫스팟 서열의 아미노산이 랜덤하게 변이되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.
- [200]
- [201] 실시예 7. LAG-3 인간 단일 항체 변이체의 선별
- [202] 7-1. 바이오패닝
- [203] 1E09 항체의 변이체 선별을 위한 바이오패닝은 실시예 6-1에서 항체 최적화를 위해 제작한 인간항체 라이브러리들을 박테리아에 감염시킨 후, 실시예 2-1과 동일한 방법으로 진행하였고, LAG-3 항원에 특이적으로 결합하는 scFv-파지들을 용출하였다. 용출된 파지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝 과정을 통해 양성 파지의 풀(pool)을 얻었고, 항체 변이체를 얻기 위한 패닝은 첫 번째 라운드만 진행하였다. 그 결과, 표 6과 같이 최적화 인간항체 라이브러리들을 이용한 패닝에서의 파지 유입수와 항원에 대한 결합수를 확인하였다.

[204]

[표6]

최적화 패닝에 따른 항체의 역가 비교

시료	파지의 유입수	파지의 결합수
1E09 (LC shuffling, LS)	8.0×10^{12}	3.2×10^8
1E09 (Core packing+LS)	1.2×10^{13}	1.1×10^8
1E09 (CDR hotspot+LS)	2.0×10^{12}	3.4×10^8
1E09 (Core packing+CDR hotspot+LS)	4.0×10^{12}	8.0×10^7

[205]

[206] 7-2. LAG-3 항체 변이체의 단일 클론 선별

[207] LAG-3 항원에 대해 특이적인 단일 scFv 파지 클론을 선별하기 위해 제작한 최적화 인간항체 라이브러리들을 이용한 패닝에서 얻은 콜로니를 실시예 2-3과 동일한 방법으로 진행하여 단일 scFv 파지에 대해 파지-ELISA를 수행하였다.

[208] 그 결과, 1E09 최적화 인간항체 라이브러리들을 이용한 패닝 결과들 중에서, 예를 들어 Core 패킹+ LC 셔플링(도 11A)와 Core 패킹+CDR 핫스팟+LC 셔플링(도 11B) 방법을 통해 얻은 132개의 클론들 중에서 모항체(1E09)와 유사하게 항원에 대한 결합능을 갖는 클론을 포함하여 78개의 단일 파지 클론을 확인할 수 있었다.

[209]

[210] 7-3. LAG-3 항체 변이체의 염기서열 분석

[211] 선별된 단일 클론에 대한 염기서열 분석은 실시예 2-4와 같이 동일한 방법으로 수행 및 조사 하였다. 그 결과, 모항체 1E09와 유사성에 차이가 있는 22종의 새로운 파지 항체를 확인하였고, 표 7에 정리하였다.

[212]

[표7]

최적화 과정을 통해 선별된 LAG3 인간항체 변이체의 단일 클론의 특성

클론명	VH	유사도	VL	유사도 2	그룹
LAG3-1E09_LS_1A10	VH3-11	88.80%	O12	100%	1
LAG3-1E09_LS_1E06	VH3-11	88.80%	O12	90.50%	2
LAG3-1E09_LS_1G11	VH3-11	85.70%	O12	91.60%	3
LAG3-1E09_LS_1H04	VH3-11	88.80%	O18	92.60%	4
LAG3-1E09_FR_1A06	VH3-11	88.80%	A27	85.40%	5
LAG3-1E09_FR_1A10	VH3-11	89.80%	O18	88.40%	6
LAG3-1E09_FR_1E05	VH3-11	87.80%	O18	88.40%	7
LAG3-1E09_FR_1E09	VH3-11	89.80%	O18	92.60%	8
LAG3-1E09_FR_1E10	VH3-11	88.80%	O18	91.60%	9
LAG3-1E09_FR_1F03	VH3-11	89.80%	O18	94.70%	10
LAG3-1E09_FR_1G07	VH3-11	88.80%	O12	89.50%	11
LAG3-1E09_CDR_1D04	VH3-11	88.80%	O18	96.70%	12
LAG3-1E09_CDR_1E03	VH3-11	87.80%	O18	88.40%	13
LAG3-1E09_AM_1B03	VH3-11	86.70%	O18	94.70%	14
LAG3-1E09_AM_1E09	VH3-11	88.80%	L6	90.00%	15
LAG3-1E09_AM_1F09	VH3-11	88.80%	O12	88.40%	16
LAG3-1E09_AM_1H07	VH3-11	85.70%	O12	92.60%	17
LAG3-1E09_AM_2E04	VH3-11	86.70%	O12	93.70%	18
LAG3-1E09_AM_2E09	VH3-11	86.70%	O18	84.20%	19
LAG3-1E09_AM_2G11	VH3-11	86.70%	O12	91.60%	20
LAG3-1E09_AM_2H01	VH3-11	87.80%	O12	87.40%	21
LAG3-1E09_AM_2H06	VH3-11	87.80%	O18	96.70%	22

[213] 선별된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR 서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 8 내지 표 13과 같다.

[214]

[표8]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 중쇄 가변영역

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LAG3-1E09_LS_1A10	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_LS_1E06	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_LS_1G11	EVQLVESG GDLVQPGG SLRLSCAAS (서열번호 17)	GFNF SDHY (서열번호 18)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTT ATYI (서열번호 20)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_LS_1H04	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1A06	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1A10	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1E05	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS (서열번호 22)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1E09	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)

[215]

[표9]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 중쇄 가변영역 (continued)

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LAG3-1E09_FR_1E10	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1F03	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_FR_1G07	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 21)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_CDR_1D04	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_CDR_1E03	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFTF NDH Y (서열번호 23)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTT ATYI (서열번호 20)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_1B03	EVQLVESG GDLVQPGG SLRLSCAAS (서열번호 17)	GFSF NDH Y (서열번호 24)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_1E09	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_1F09	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAAS (서열번호 15)	GFNF SDHY (서열번호 18)	MNWIRQ APGKGL EWVAY (서열번호 5)	IDTS ATYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGTL VTVSS (서열번호 16)

[216]

[표10]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 중쇄 가변영역 (continued)

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LAG3-1E09_AM_1 H07	EVQLVESG GDLVQPGG SLRLSCAA S (서열번호 17)	GFSF NDHY (서열번호 24)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTSA TYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_2 E04	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAA S (서열번호 15)	GFSF NDHY (서열번호 24)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTSA TYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_2 E09	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAA S (서열번호 15)	GFSF SDHY (서열번호 1)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTNA TYI (서열번호 25)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_2 G11	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAA S (서열번호 15)	GFSF TDHY (서열번호 26)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTSA TYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_2 H01	EVQLVESG GDLVQPGG SLRLSCAA S (서열번호 17)	GFTF SDHY (서열번호 27)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTSA TYI (서열번호 2)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)
LAG3-1E09_AM_2 H06	EVQLVESG GDLVKPGG SLRLSCAA S (서열번호 15)	GFTF SDHY (서열번호 27)	MNWVRQ APGKGL EWVAY (서열번호 19)	IDTIA TYI (서열번호 28)	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC (서열번호 6)	ARDN WGSL DY (서열번호 3)	WGQGT LVTVSS (서열번호 16)

[217]

[표11]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 경쇄 가변영역

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LAG3-1E09-LS_1A10	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRAS (서열번호 29)	QSISS Y (서열번호 30)	LNWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 12)	AAS (서열번호 31)	SLQSGVPSRFS SGSGGTDFTL TISSLQPEDFA TYYC (서열번호 32)	QQSYS TPYT (서열번호 33)	FGQGT KLEIK (서열번호 34)
LAG3-1E09-LS_1E06	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS HY (서열번호 36)	LNWYRQ KPGKAP KLLIY (서열번호 37)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGGTDLFT LTISSLQPEDF ATYYC (서열번호 38)	QQSYS TPYT (서열번호 33)	FGQGT KLEIK (서열번호 34)
LAG3-1E09-LS_1G11	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDID KY (서열번호 39)	LNWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 12)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGGTDFTL LTISSLQPEDF ATYYC (서열번호 13)	QQSYS TPNT (서열번호 40)	FGQGT KLDIK (서열번호 14)
LAG3-1E09-LS_1H04	DIQMTQSPS SLSASAGDR VTITCQAS (서열번호 41)	QDIR NS (서열번호 42)	LSWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 43)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGGTYYFT FTISSLQPEDF ATYYC (서열번호 44)	QQYD NVPV T (서열번호 45)	FGGGT KLEIK (서열번호 46)
LAG3-1E09-FR_1A06	DIQMTQSP GTLMSMPG EKATLSCR AS (서열번호 47)	QTV TTN (서열번호 48)	LAWYQQ KSGQAP RLLIY (서열번호 49)	DAS (서열번호 9)	TRATGVPDFR SGSGGTDFTL LTISRLEPEDF AVYYC (서열번호 50)	QQYGS SPYT (서열번호 51)	FGQGT KLDIK (서열번호 14)
LAG3-1E09-FR_1A10	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAN (서열번호 52)	QDIS NY (서열번호 53)	LNWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 12)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGGGGTDFTL LTINNLQPEDF ATYYC (서열번호 54)	HHSY NTPIT (서열번호 55)	FGQGT RLEIK (서열번호 56)
LAG3-1E09-FR_1E05	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRAS (서열번호 29)	QSISS W (서열번호 57)	LAWYQH KPGKAP KLLIY (서열번호 58)	DAS (서열번호 9)	NLETGAPSRF SGSGGTDFTL FTIYSLQPEDV ATYYC (서열번호 59)	QQYD TVPPT (서열번호 60)	FGPGT KVDIK (서열번호 61)
LAG3-1E09-FR_1E09	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열번호 53)	LNWYQQ KPGKAP NLLIY (서열번호 62)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGGTDFFA LTISSLQPEDF ATYYC (서열번호 63)	QQSDS TPIT (서열번호 64)	FGQGT RLDIK (서열번호 65)

[218]

[표12]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 경쇄 가변영역 (continued)

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR 2	FR3	CDR3	FR4
LAG3 - 1E09_ FR_1E 10	DIQMTQSPS SLSASVGDR VIITCQAS (서열번호 66)	QDIT NY (서열 번호 67)	LNWYQQ KPGKAPK LLIY (서열번호 12)	DAS (서열 번호 9)	NLETGVPSRF TGSGSGTDFT FTISLQPEDIA TYHC (서열번호 68)	QQSYS TPPYT (서열번 호 69)	FGQG TKLEI K (서열번 호 34)
LAG3 - 1E09_ FR_1F 03	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열 번호 53)	LNWYQQ KPGKAPK LLIY (서열번호 12)	DAS (서열 번호 9)	NLETGVPSRF SGSGSGTDFT FTISLQPEDF ATYYC (서열번호 70)	QQSYS TPFA (서열번 호 71)	FGPGT KVEIK (서열번 호 72)
LAG3 - 1E09_ FR_1G 07	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRAS (서열번호 29)	QGIS TY (서열 번호 73)	LNWYQQ KPGKAPK LLIY (서열번호 12)	DAS (서열 번호 9)	NLETGVPSRF SGSGSGTDFT LTISGLQPDDF ALYYC (서열번호 74)	QQSYT TPYS (서열번 호 75)	FGPGT KVEIK (서열번 호 72)
LAG3 - 1E09_ CDR_1 D04	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열 번호 53)	LNWYQQ KPGKAP NLLIY (서열번호 62)	DAS (서열 번호 9)	NLETGVPSRF SGSGSGTDFT LTISLQPEDF ATYYC (서열번호 13)	QQSYI TPYT (서열번 호 76)	FGQG TKLDI K (서열번 호 14)
LAG3 - 1E09_ CDR_1 E03	DIQMTQSLS SLSASVGDS VTITCQAS (서열번호 77)	QDIS NY (서열 번호 53)	LNWYRQ KPGKAPE LLIY (서열번호 78)	DTS (서열 번호 79)	NLETGVPSRF SGSGSGTDFT LTISLQPEDF ATYYC (서열번호 13)	QQSYS IPYT (서열번 호 80)	FGQG TKVEI K (서열번 호 81)
LAG3 - 1E09_ AM_1 B03	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTMTCQAS (서열번호 82)	QDVS NY (서열 번호 83)	LNWYQQ KPGKAPK LLIY (서열번호 12)	DAS (서열 번호 9)	NLEIGVPSRFS GSGSGTDFTF TISLQPEDTA TYYC (서열번호 84)	QQYD HLPPY T (서열번 호 85)	FGQG TKLEI K (서열번 호 34)
LAG3 - 1E09_ AM_1 E09	DIQMTQSPA TLVSPGER ATLSCRAS (서열번호 86)	QSVM NN (서열 번호 87)	LAWYQQ KPGQAPR LLIY (서열번호 88)	DAS (서열 번호 9)	NRATGIPARFS GSGSGTDFTL TISRLEPEDFA VYYC (서열번호 89)	EQYVR SPYT (서열번 호 90)	FGQG TKLDI K (서열번 호 14)
LAG3 - 1E09_ AM_1 F09	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIR NY (서열 번호 91)	LGWYQQ KPGKAP NLLIY (서열번호 92)	DAS (서열 번호 9)	TLETGVPSRF SGSGSGTDFT LAISLQPEDF ATYYC (서열번호 93)	QQSYS TPYT (서열번 호 33)	FGQG TKLEI K (서열번 호 34)

[219]

[표13]

선별된 LAG3 인간항체 변이체의 경쇄 가변영역 (continued)

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LAG3-1E09-AM_1 H07	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열번호 53)	LNWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 12)	EAS (서열번호 94)	SLESGVPSRFS GSGSGTEFTL TINSLQPEDFA TYYC (서열번호 95)	QQSYS TPFA (서열번호 71)	FGPGT KVEIK (서열번호 72)
LAG3-1E09-AM_2E 04	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTIICRAS (서열번호 96)	QDIS NY (서열번호 97)	LNWYQQ EPGKAP KLLIY (서열번호 98)	DAS (서열번호 9)	NLESGVPSRFS GSGSGTDFTL TISSLQPEDFA TYYC (서열번호 99)	QQSYS TPYT (서열번호 33)	FGQG TKVEI K (서열번호 81)
LAG3-1E09-AM_2E 09	DIQMTQSSS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 100)	QDIT DF (서열번호 101)	LNWYQQ KPGKAP KLLIY (서열번호 12)	DAS (서열번호 9)	NLETGIPSRFS GSGSGREFTL TINSLQPEDVA SYTC (서열번호 102)	QQSYT TPLT (서열번호 103)	FGGG TKVDI K (서열번호 104)
LAG3-1E09-AM_2 G11	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRAS (서열번호 29)	QDIS YY (서열번호 105)	LNWYQQ RPGKAP KLLIY (서열번호 106)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGTGTEFT LTISLQPEDF ATYYC (서열번호 107)	QQSYS TPFA (서열번호 71)	FGPGT KVEIK (서열번호 72)
LAG3-1E09-AM_2 H01	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열번호 53)	LNWYQQ KPGKAP NLLIY (서열번호 62)	DAS (서열번호 9)	TLETGVPSRF SGSGYGTDF LTISGLQPDDF ALYYC (서열번호 108)	QQSYS TPYS (서열번호 33)	FGPGT KVEIK (서열번호 72)
LAG3-1E09-AM_2 H06	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCQAS (서열번호 35)	QDIS NY (서열번호 53)	LNWYQQ TPGKAP KLLIY (서열번호 109)	DAS (서열번호 9)	NLETGVPSRF SGSGSGTDF LTISLQPEDF ATYYC (서열번호 13)	QQGY GTPYT (서열번호 110)	YGQG TKLEI K (서열번호 111)

[220]

[221] 실시예 8. 선별된 LAG-3 인간 단일 항체 변이체의 생산

[222] 8-1. scFv 형태를 IgG 형태로 전환(conversion)

[223] 선별된 22종의 LAG-3에 대한 단일 클론 파지 항체들을 파지에서 완전 인간 IgG 형태로 전환하기 위해 실시예 3-1과 동일한 방법을 수행하였고, 중쇄와 경쇄 DNA 염기서열을 포함하는 각각의 플라스미드 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

[224] 그 결과, 완전 IgG로 전환한 LAG-3에 대한 22개 항체 클론의 중쇄와 경쇄 서열은 각각 파지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. 이후, 각각의 서열이 확인된 중쇄와 경쇄 플라스미드 DNA는 항체 생산을 위해 사용되었다.

[225]

[226] 8-2. LAG-3 항체 변이체의 생산

[227] 선별된 1E09 항체 변이체인 22종의 항체들 생산은 실시예 3-2에 기술한 동일한 과정으로 수행되었다. 클로닝된 중쇄와 경쇄를 포함하는 각각의 벡터는 동물 임시발현 세포 HEK-293F에 동시 형질감염하여 발현 시킨 후, 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제하여 생산량을 확인하고, 환원, 비-환원 조건에서 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 순도 및 이동도 상태를 확인하였다.

[228] 그 결과, 도 12와 같이 LAG-3-1E09 인간 단일 항체 변이체들은 비환원 조건에서는 모두 150 kDa 이상의 크기에서 검출되었고, 생산량은 최저 22 mg/L에서 최대 186 mg/L 사이로 다양하게 확인되었다.

[229]

[230] 실시예 9. 선별된 LAG-3 인간 항체 변이체의 특성

[231] 9-1. 선별된 LAG-3 인간 항체 변이체의 교차반응성(cross-reactivity)

[232] LAG-3 인간 단일 항체의 변이체인 22종 항체들의 인간 LAG-3 항원에 대한 결합 및 다른 종간 교차반응성은 실시예 4-1, 4-2에 기술한 방법으로 인간, 원숭이 또는 마우스 LAG-3가 과발현된 HEK293E 세포에서 유세포 분석기인 CytoFLEX를 사용하여 항체 결합을 나타내는 MFI 값을 측정하여 확인하였다. LAG-3-1E09 모항체(parent)를 포함하여 그 변이 항체들의 인간 LAG-3 항원에 대한 결합과 원숭이, 마우스 종간 교차반응성 여부는 각각 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 항체 농도에서 측정한 값을 사용하여 하기 표 14에 나타내었다.

[233]

[표14]

선별된 LAG3 인간 단일 항체 변이체의 교차반응성

Abs	Cell Surface Binding at 2 μ g/ml		
	HEK23E-hLAG3 (Human)	HEK293E- MrhLAG3 (Rhesus Monkey)	HEK293E- mLAG3 (Mouse)
Parent (1E09)	Yes	Yes	Yes
LS_1A10	Yes	Yes	No
LS_1E06	Yes	Yes	Yes
LS_1G11	Yes	Yes	Yes
LS_1H04	Yes	Yes	No
FR_1A06	Yes	Yes	No
FR_1A10	Yes	Yes	Yes
FR_1E05	Yes	Yes	No
FR_1E09	Yes	Yes	No
FR_1E10	Yes	Yes	Yes
FR_1F03	Yes	Yes	Yes
FR_1G07	Yes	Yes	Yes
CDR_1D04	Yes	Yes	Yes
CDR_1E03	Yes	Yes	Yes
AM_1B03	Yes	Yes	No
AM_1E09	Yes	Yes	No
AM_1F09	Yes	Yes	No
AM_1H07	Yes	Yes	No
AM_2E04	Yes	Yes	No
AM_2E09	Yes	Yes	Yes
AM_2G11	Yes	Yes	Yes
AM_2H01	Yes	Yes	Yes
AM_2H06	Yes	Yes	Yes

[234] 또한, 22종의 항체들에서, 예로 1E09_AM_2H01, 1E09_FR_1E05 항체들의 경우, 세포 결합능(cell binding capacity)은 도 13에 나타낸 EC₅₀ 값과 같다.

[235]

[236] 9-2. 선별된 LAG-3 인간 단일 항체 변이체 항체의 활성 평가

[237] LAG-3 인간 단일 항체 1E09 변이체인 22종 항체들의 활성 평가 실험은 실시예

5-2와 같은 방법으로 LAG-3/MHC class II 차단 바이오어세이 키트를 사용하여 진행하였다. MHC II가 과발현되어 있는 APC 세포주를 96-웰 플레이트에 16시간 이상 배양 후, 항체 농도는 25 $\mu\text{g/ml}$ (도 14A) 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ (도 14B)로부터 1/2.5 희석 배수로 연속 희석된 각 항체들을 처리하고, 인간 LAG-3 가 과발현되는 작용 세포주를 6시간 동안 함께 배양하였다. 항체의 저해 회복 정도는 루시퍼라제가 기질을 분해하여 나오는 발광세기를 분광광도계(GloMax[®] Discover System, Model # GM3000, Promega)로 측정하여 확인하였다. LAG-3-1E09 모항체(parent)을 포함하여 22종의 항체들 중에서, 예로 15종 항체들의 경우 LAG-3/MHC class II 복합체 형성으로 감소되어 있던 작용 세포주(Jurkat T 세포)의 시그널을 농도 구배 의존적으로 회복시키는 활성을 보였다(도 14). 대조항체(reference)와 비교하였을 때, 본 발명의 12종의 항체가 우월한 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었고, 각 항체들의 저해 회복 능력을 나타내는 EC₅₀ 값은 표 15에 나타내었다.

[238]

[표15]

선별된 LAG3 인간 단일 항체 변이체의 *in vitro* 효능 확인

Abs	Top	bottom	EC ₅₀ (μg/ml)	R-Square
LAG3/MHC class II Blockade bioassay (도 13A)				
Parent (1E09)	62520	15050	0.1864	0.8975
LS_1G11	24780	14490	1.5117	0.8773
LS_1H04	55840	13050	0.2840	0.9590
FR_1A10	55270	13420	0.8108	0.9028
FR_1F03	55910	12690	0.4854	0.9582
FR_1G07	61250	14650	0.2419	0.9292
CDR_1D04	49540	13940	0.6555	0.9710
CDR_1E03	48700	13570	1.0594	0.9741
AM_1F09	52880	12600	0.4877	0.8923
AM_1H07	54730	12810	0.4484	0.8925
AM_2E09	49470	14130	0.4817	0.9301
LS_1E06	56800	13570	0.1510	0.8312
AM_1B03	39910	13010	1.8245	0.9024
AM_2G11	51620	13210	0.2459	0.9436
AM_2H06	49020	13910	0.6061	0.8905
Reference	57200	14010	0.7160	0.9887
LAG3/MHC class II Blockade bioassay (도 13B)				
Parent (1E09)	54820	21910	0.0688	0.8267
AM_2H01	53740	21300	0.0822	0.8373
FR_1E05	56655	20280	0.0938	0.8493
Reference	51815	21865	0.1540	0.9388

[239]

[240] 9-3. 선별된 LAG-3 인간 단일 항체 변이체들의 항원에 대한 친화도 확인

[241] 선별된 LAG-3 인간 단일 항체 변이체들의 항원에 대한 친화도는 실시예 4-3과 같이 제조합 융합 단백질들인 인간 LAG-3(hLAG-3-mFc), 원숭이 LAG-3(MrhLAG-3-mFc), 마우스 LAG-3(mLAG-Fc) 항원을 이용하여 Octet® QK[®]

(Fortebio Inc. USA) 분석 장비를 통해 동일한 방법으로 평형 해리상수(K_D)를 구하여 확인하였다.

- [242] 그 결과, LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 변이체 항체들 중에서 예를 들어 1E09-AM_2H01(도 15, A-C)과 1E09-FR_1E05(도 15D, E)의 경우, 항원 결합력(K_D)은 인간 LAG-3 항원에 대해 각각 0.136 nM, 0.0906 nM로 확인되었고, 원숭이 LAG-3 항원에는 각각 0.629 nM, 0.456 nM로 확인되었으며, 마우스 LAG-3 항원에는 1E09-AM_2H01은 2.62 nM, 1E09-FR_1E05는 결합 반응을 보이지 않는 것으로 확인되었다.

[243]

- [244] 9-4. 선별된 LAG-3 인간 단일 항체 변이체들의 항원에 대한 결합부위(epitope) 결정

- [245] LAG-3 인간 단일 항체 1E09 변이체들의 항원에 대한 결합부위 확인은 실시예 4-4와 같이 LAG-3의 세포외 영역에서 Ig-V 도메인이 절단(Δ Ig-V)되거나 특정 또는 불특정 아미노산 서열을 다른 아미노산으로 치환(M1-M7)한 재조합 LAG-3 돌연변이체들과 WT을 이용하여 ELISA 분석으로 확인하였다(도 16).

- [246] 그 결과, LAG-3 인간 단일 항체 1E09의 변이체 항체들 중에서 예를 들어 1E09-AM_2H01과 1E09-FR_1E05의 경우, 모항체인 1E09(도 8C)와 유사하게 LAG-3 세포외 영역 부분에서 Ig-V 도메인에 결합하고, 세부적으로는 LAG-3 Ig-V 도메인의 M1, M4, M6, M7 부위에 결합하는 것으로 나타나, WT LAG-3의⁵² DL⁵³,¹⁰⁷GGLRSGRLPLQ¹¹⁷,¹³⁷R, 및¹⁵⁰AVHLRDRALSCR¹⁶¹에 결합하는 입체형태적 에피토프(conformational epitope)를 갖는다는 것을 확인하였다(도 16).

청구범위

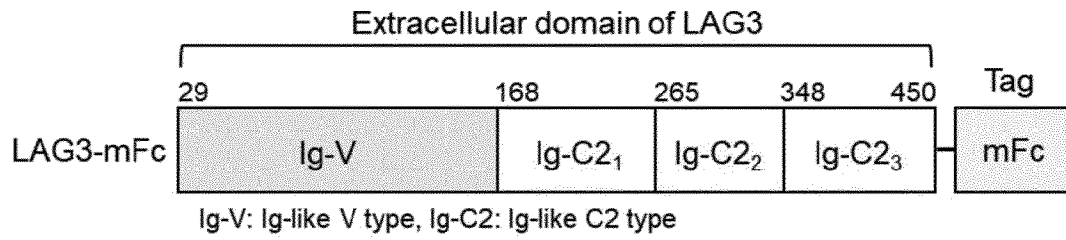
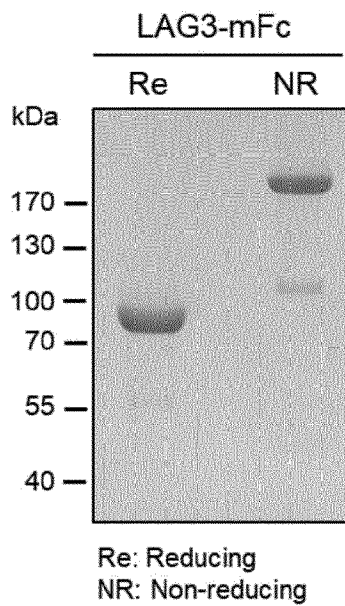
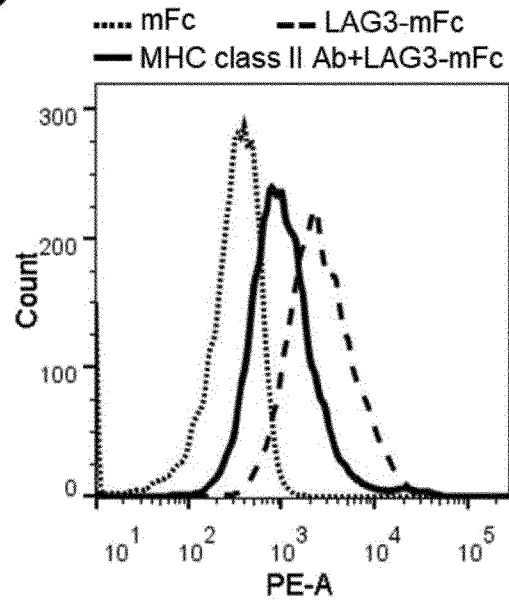
- [청구항 1] 서열번호 1 또는 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 8, 서열번호 53 또는 서열번호 57로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 10, 서열번호 33 또는 서열번호 60으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 1로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 8로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 10으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것인 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 53로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 33으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것인 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 1로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역과, 서열번호 57로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 9로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 60으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것인 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 114의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 115의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것인 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 116의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 117의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것인 LAG-3에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 118의 아미노산 서열로 기재된 중쇄가변영역 및 서열번호 119의 아미노산 서열로 기재된 경쇄가변영역을 포함하는 것인 LAG-3에

- 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단클론항체는 인간항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 재조합 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 LAG-3과 결합하는 scFv(single chain variable fragment), dsFv, Fab, F(ab') 및 F(ab')₂로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 10] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 12] 제11항의 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 13] (a) 제12항의 형질전환체를 배양하여 배양액을 제조하는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 배양액으로부터 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 정제하는 단계를 포함하는, LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에 특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.
- [청구항 14] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 면역 반응을 자극하기 위한 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 조성물은 면역자극성 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 면역자극성 항체는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-CTLA-4 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 암은 간암, 유방암, 신장암, 뇌종양, 담도암, 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 자궁경부암, 갑상선암, 방광암, 골암, 흑색종, 중피종, 췌장암, 난소암, 전립선암, 육종, 피부암, 고환암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종 및 다발성 골수종 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 19] 제15항의 암 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [청구항 20] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 21] 제20항의 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트.
- [청구항 22] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단클론항체 또는 이의 항원 결합

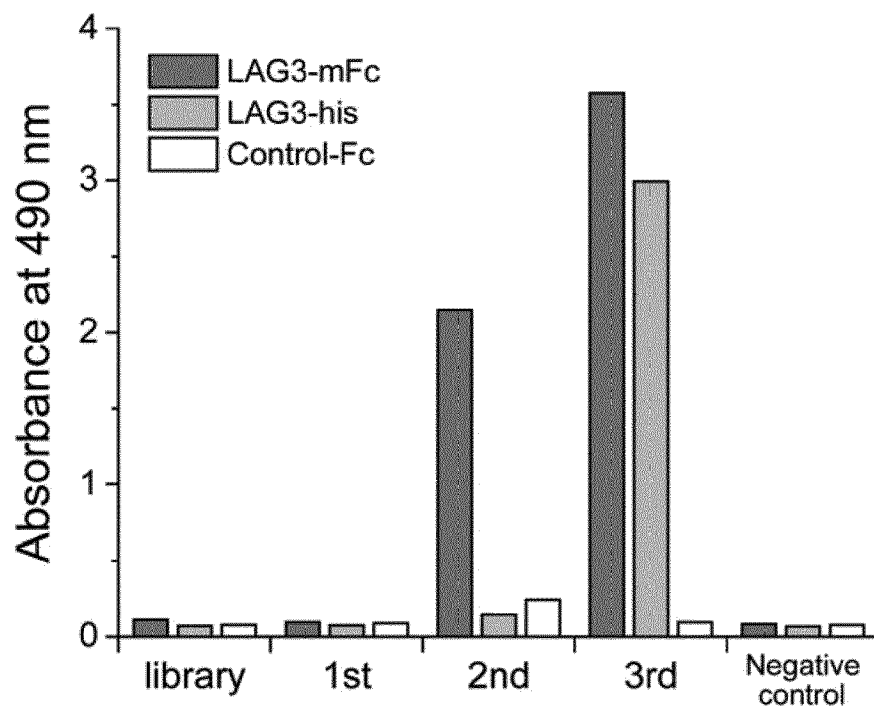
단편에 약물이 결합된 약물 결합체.

- [청구항 23] i) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체;
ii) 막투과성 도메인(transmembrane domain); 및
iii) 상기 i)의 항체가 항원에 결합하면 T 세포 활성화를 가져오는 것이
특징인 세포 내 신호전달 도메인(intracellular signlaing domain)을 포함하는
CAR(chimeric antigen receptor) 단백질.
- [청구항 24] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3)에
특이적으로 결합하는 단클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는
다중특이적 항체(multi-specific antibody).

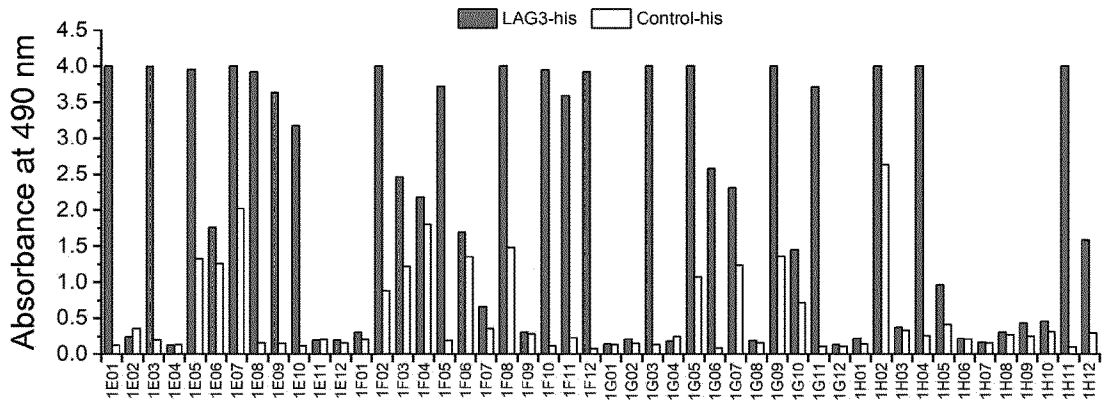
[도1]

A**B****C**

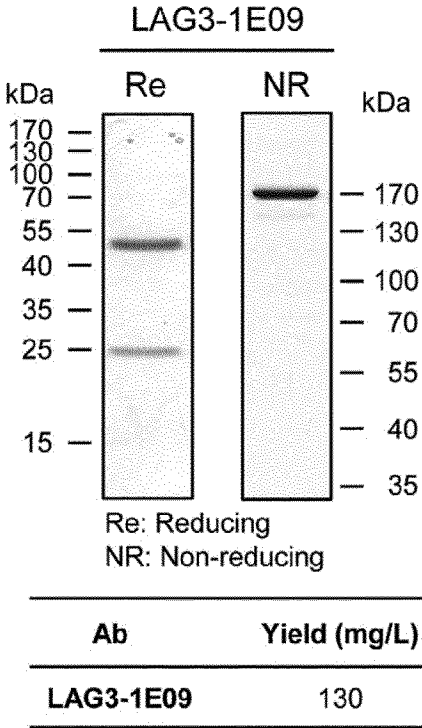
[도2]



[도3]

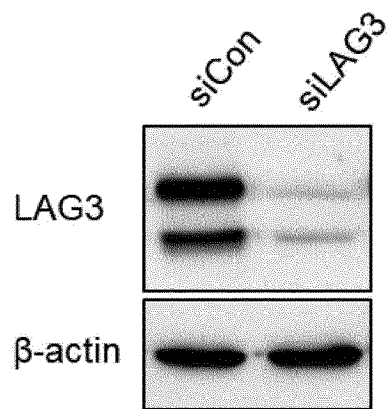


[도4]

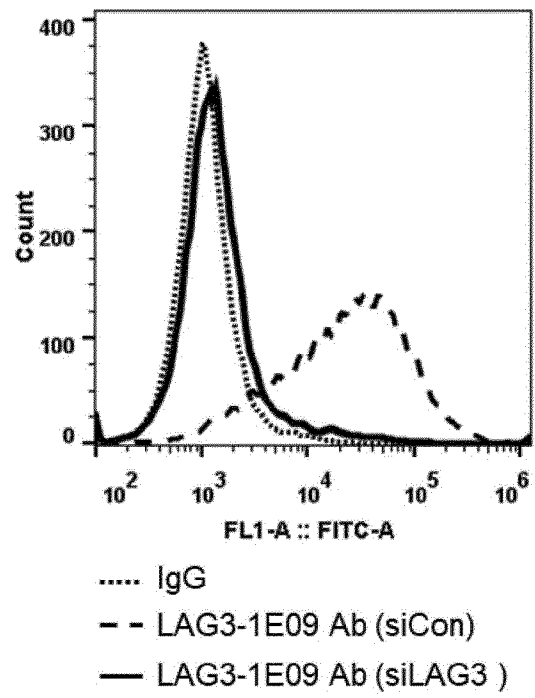


[도5]

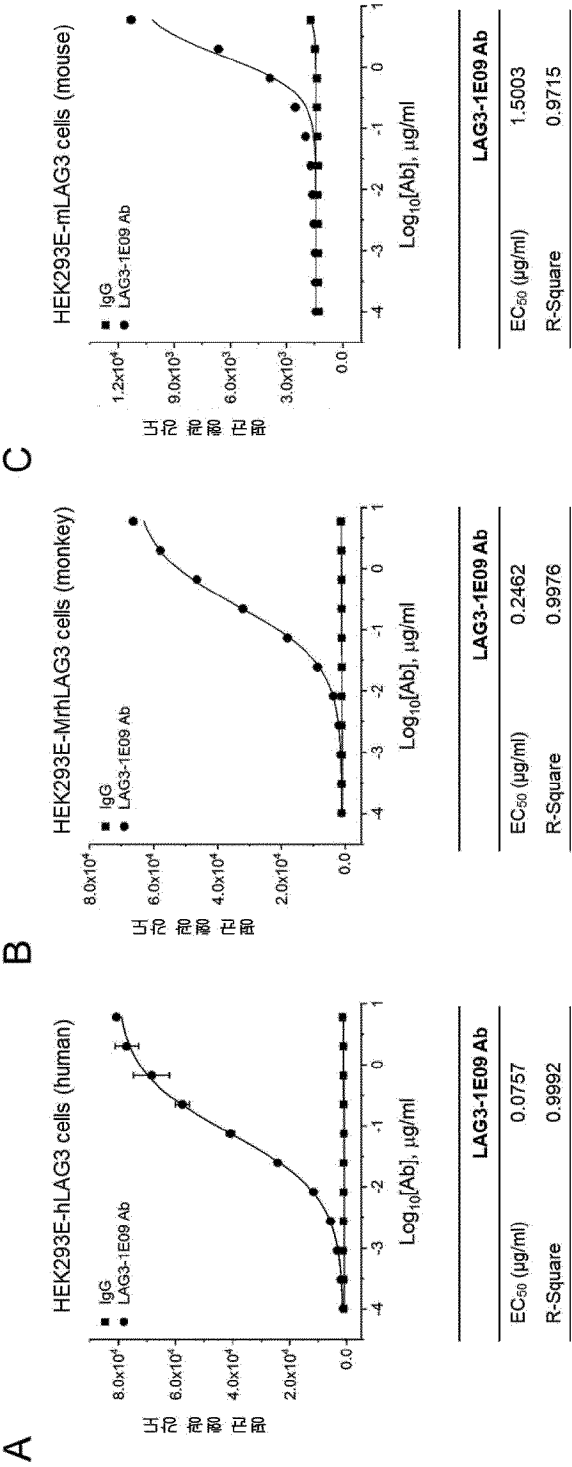
A



B



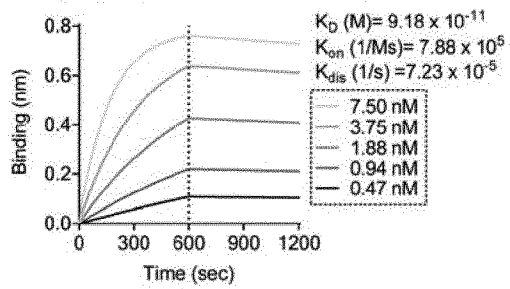
[도6]



[도7]

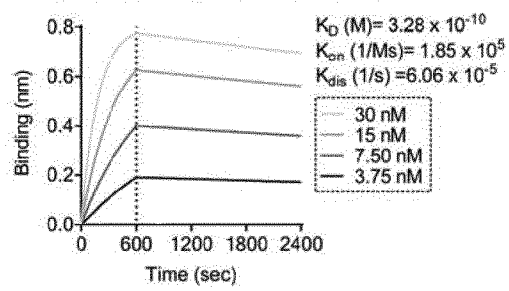
A

hLAG3-mFc에 대한 1E09 항체의 결합 친화성



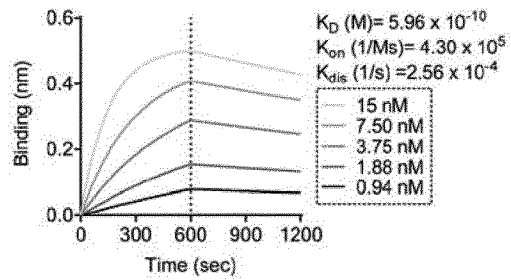
B

MrhLAG3-mFc에 대한 1E09 항체의 결합 친화성



C

mLAG3-mFc에 대한 1E09 항체의 결합 친화성



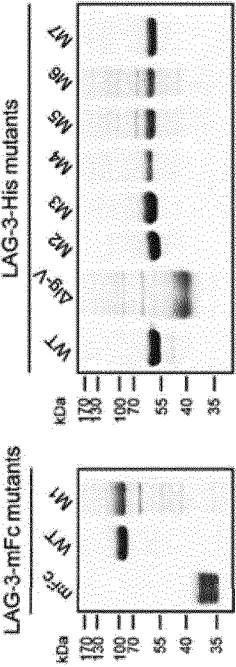
[도8]

A

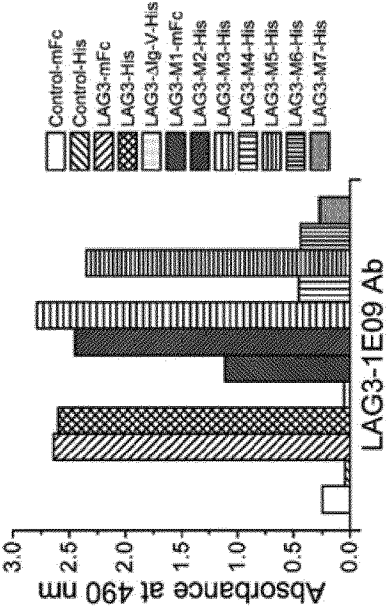
The Ig-V domain mutants of human LAG-3

		Extra loop					
WT	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M1	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOGLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M2	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M3	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M4	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M5	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M6	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167
M7	29	VPYVWADEGAPACQSPPTIPLOQLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHP	LAPGPHAPSSVGFPRRRITVL	SVGGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQGGFSL	ILRPRAPDA	GEYPAAYHLRPRALSQRLLRLG	167

B

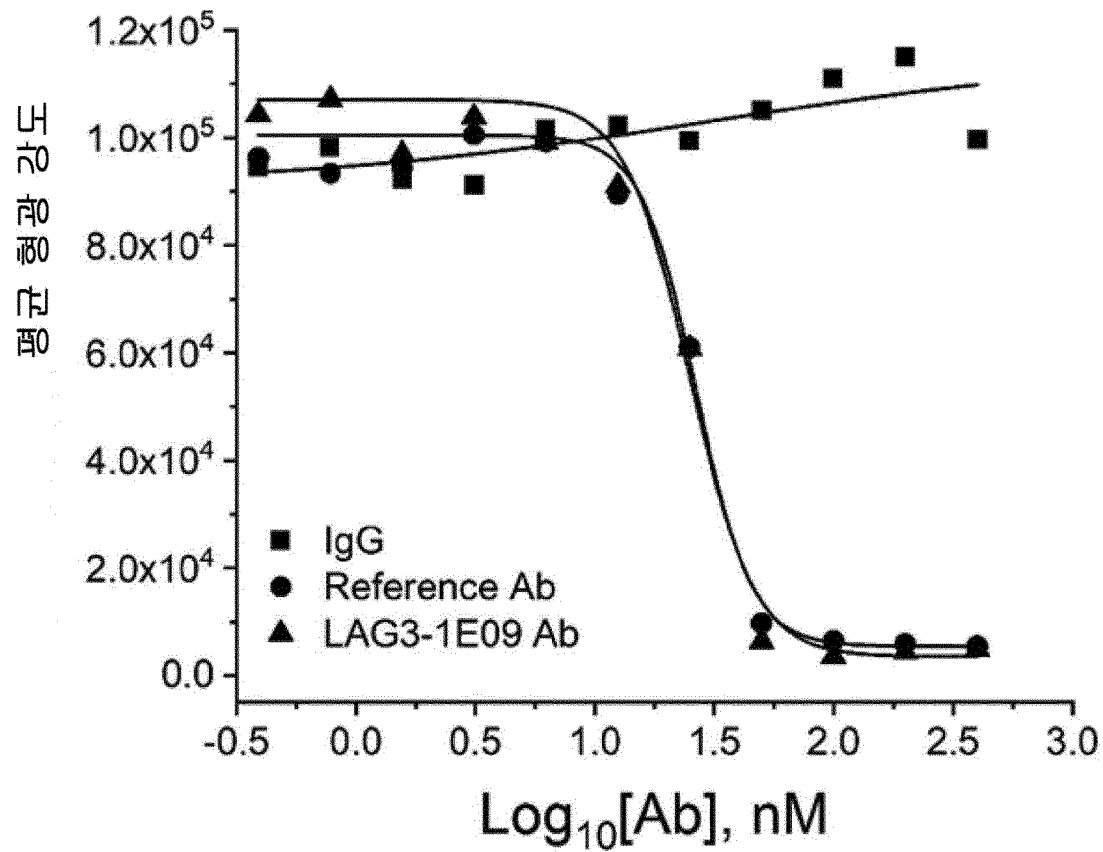


C



[도9]

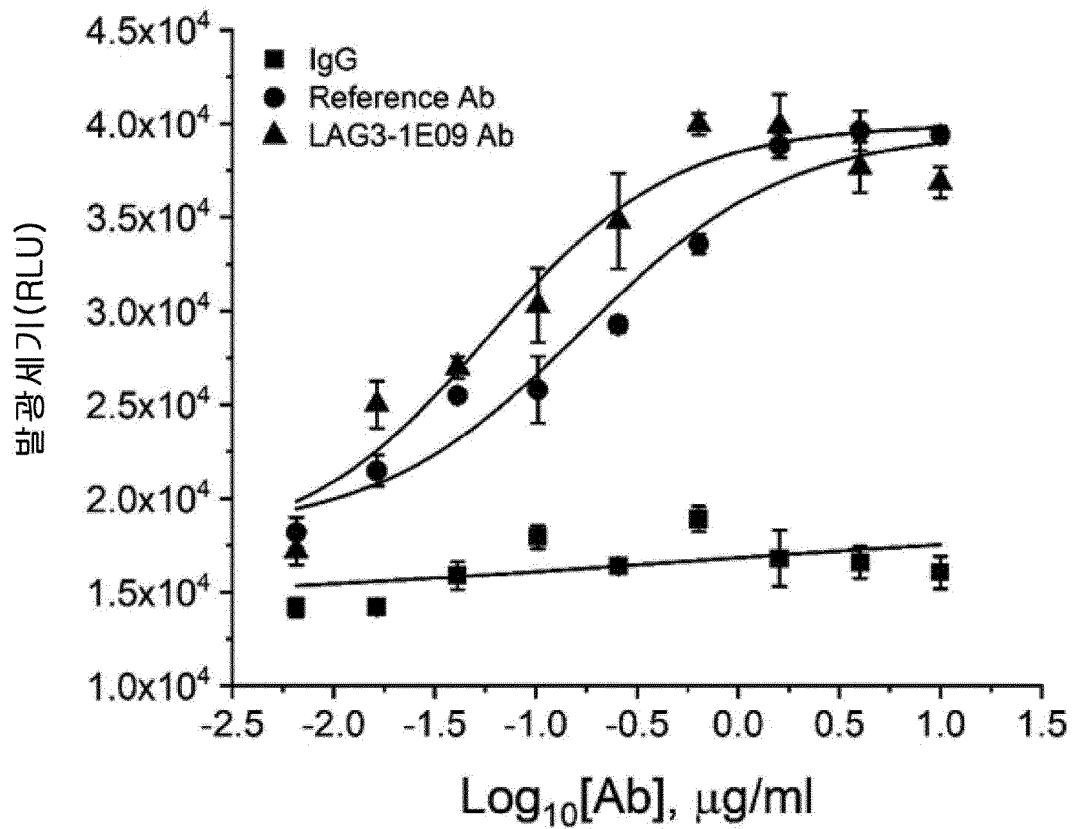
세포 기반 경쟁적 결합 분석(Raji 세포)



	Reference Ab	LAG3-1E09 Ab
Top	100519.6	107092.1
Bottom	5445.7	3549.8
IC ₅₀ (nM)	26.6084	25.0922
R-Square	0.9906	0.9856

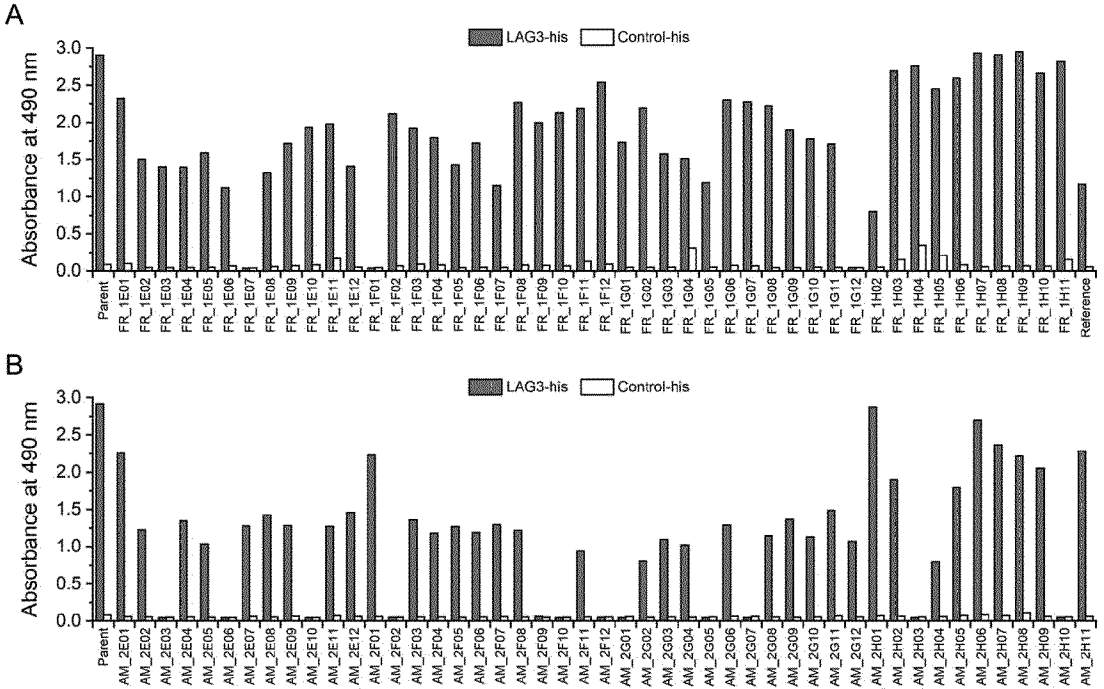
[도10]

LAG-3/MHC class II 차단 바이오어세이

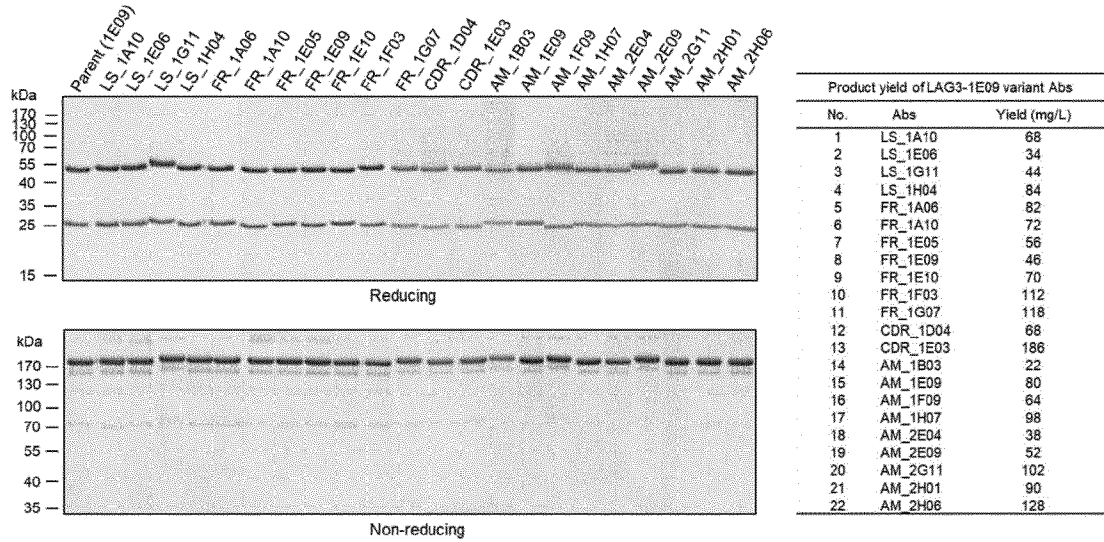


	Reference Ab	LAG3-1E09 Ab
Top	39406	36856
Bottom	18190	17206
EC ₅₀ (µg/ml)	0.16811	0.05784
R-Square	0.9622	0.9234

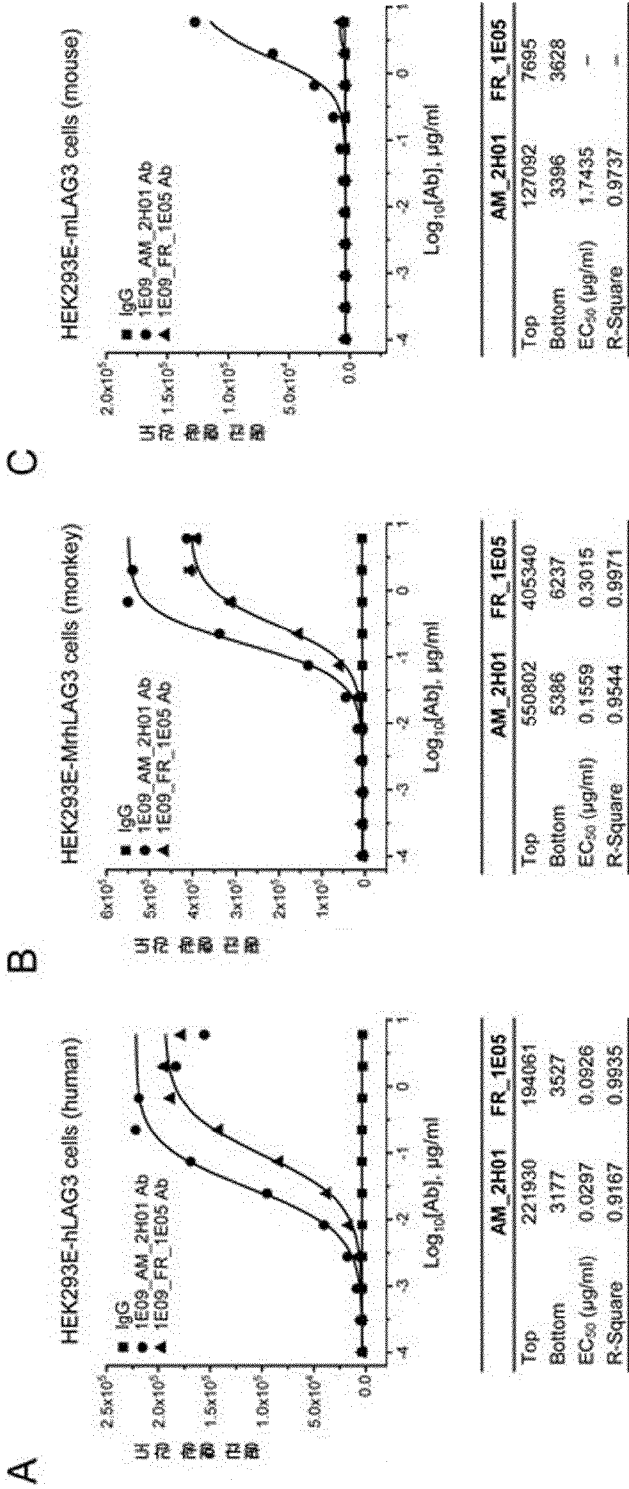
[도 11]



[도 12]



[도13]

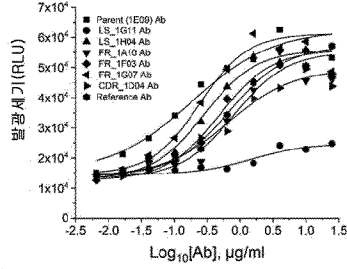


[도14]

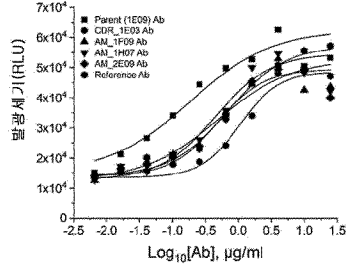
A

LAG3/MHC class II 차단 바이오세이(I)

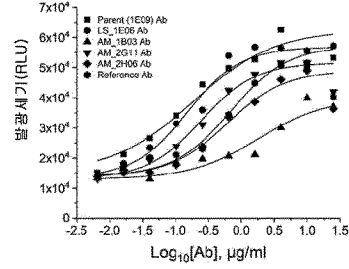
(a)



(b)

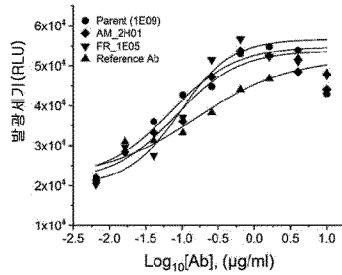


(c)



B

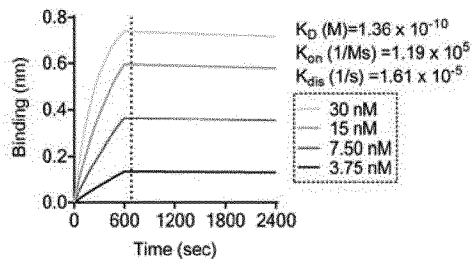
LAG3/MHC class II 차단 바이오세이(II)



[도15]

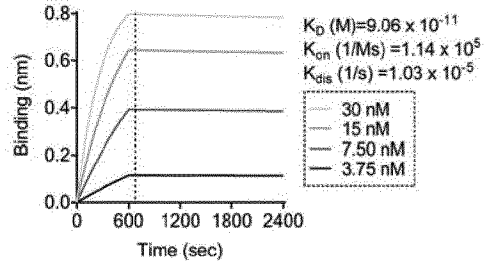
A

hLAG3-mFc에 대한 1E09_AM_2H01 항체의 결합 친화성



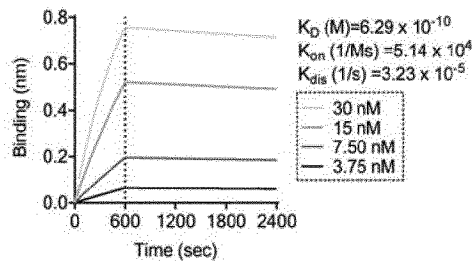
D

hLAG3-mFc에 대한 1E09_FR_1E05 항체의 결합 친화성



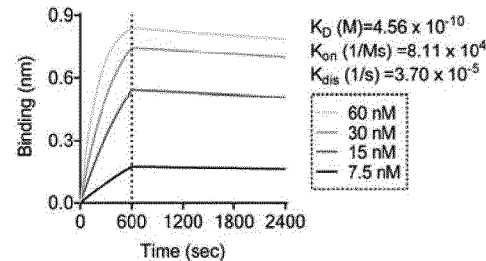
B

MrhLAG3-mFc에 대한 1E09_AM_2H01 항체의 결합 친화성



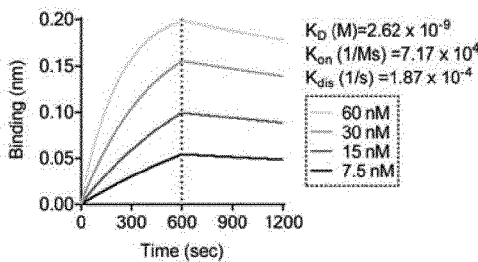
E

MrhLAG3-mFc에 대한 1E09_FR_1E05 항체의 결합 친화성

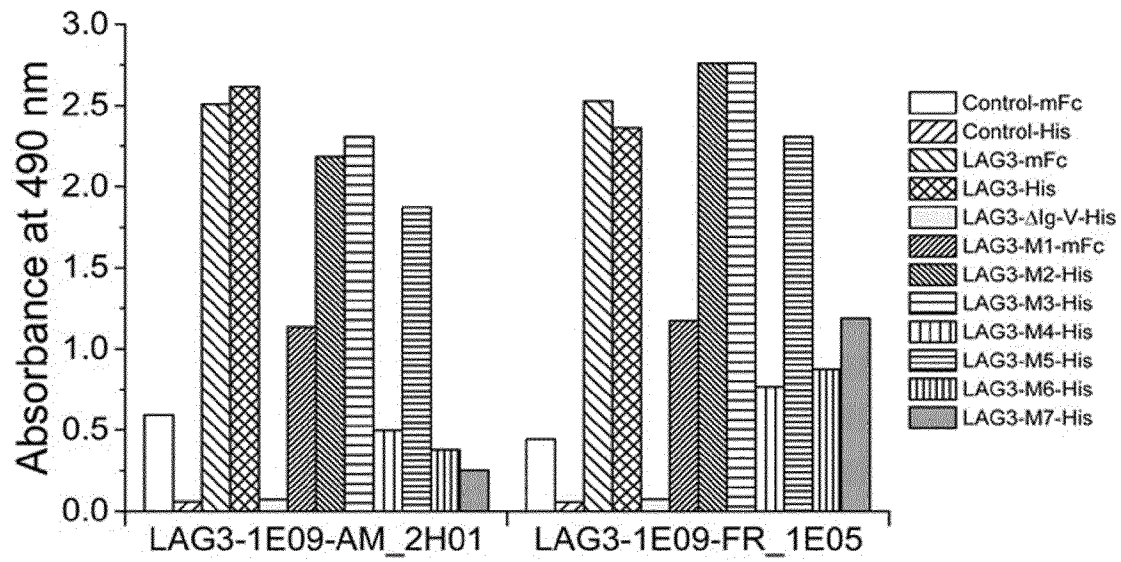


C

mLAG3-mFc에 대한 1E09_AM_2H01 항체의 결합 친화성



[도16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007877

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/00; A61K 39/395; C07K 16/18; C12N 5/10; C07K 14/705; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: LAG-3, monoclonal antibody, CDR1, CDR2, CDR3, cancer, PD-1, PD-L1, CTLA-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0134668 A (NOVARTIS AG. et al.) 23 November 2016 See abstract; paragraphs [0113], [0192]; claims 1-111, 120, 138-144, 146, 149, 152.	1-18,20-24
A	WO 2017-147383 A1 (CELL MEDICA SWITZERLAND AG. et al.) 31 August 2017 See abstract; claims 1, 7, 24.	1-18,20-24
A	KR 10-2017-0116067 A (ANAPTYSBIO, INC.) 18 October 2017 See abstract; claims 1-35, 40, 41.	1-18,20-24
A	US 2017-0101472 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 13 April 2017 See abstract; claims 1-42.	1-18,20-24
A	KR 10-2011-0050507 A (MEDAREX, INC.) 13 May 2011 See abstract; claims 1-62.	1-18,20-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 OCTOBER 2019 (31.10.2019)

Date of mailing of the international search report

31 OCTOBER 2019 (31.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007877

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0134668 A	23/11/2016	AR 100041 A1	07/09/2016
		AU 2015-229103 A1	04/08/2016
		BR 112016018408 A2	26/12/2017
		CA 2936962 A1	17/09/2015
		CL 2016002112 A1	09/06/2017
		CL 2018002694 A1	23/11/2018
		CN 106103484 A	09/11/2016
		CR 20160425 A	26/05/2017
		EA 201691765 A1	30/12/2016
		EP 3116909 A1	18/01/2017
		GT 201600185 A	27/11/2018
		JP 2017-516489 A	22/06/2017
		MA 39336 A1	31/01/2018
		MA 39336 B1	29/03/2019
		MX 2016011993 A	09/12/2016
		PE 00712017 A1	17/03/2017
		PH 12016501545 A1	14/09/2016
		SG 11201605951 A	28/10/2016
		TW 201540727 A	01/11/2015
		US 2015-0259420 A1	17/09/2015
		US 2017-0210804 A1	27/07/2017
		US 2018-0086830 A1	29/03/2018
		US 9908936 B2	06/03/2018
		UY 36032 A	30/10/2015
		WO 2015-138920 A1	17/09/2015
WO 2017-147383 A1	31/08/2017	AU 2017-223846 A1	23/08/2018
		AU 2017-224843 A1	23/08/2018
		BR 112018067696 A2	08/01/2019
		BR 112018067698 A2	08/01/2019
		CA 3014001 A1	31/08/2017
		CA 3014067 A1	31/08/2017
		CN 108699153 A	23/10/2018
		CN 108884164 A	23/11/2018
		EP 3420000 A1	02/01/2019
		EP 3420001 A1	02/01/2019
		JP 2019-513009 A	23/05/2019
		JP 2019-515646 A	13/06/2019
		KR 10-2018-0111870 A	11/10/2018
		KR 10-2019-0003938 A	10/01/2019
		SG 11201807187 A	27/09/2018
		SG 11201807188 A	27/09/2018
		US 2019-0048085 A1	14/02/2019
		US 2019-0055312 A1	21/02/2019
		WO 2017-144681 A1	31/08/2017
		WO 2017-147383 A8	15/11/2018
KR 10-2017-0116067 A	18/10/2017	BR 112017016638 A2	19/06/2018
		CA 2975753 A1	11/08/2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CN 107428836 A	01/12/2017
		EA 201791742 A1	31/01/2018
		EP 3253798 A2	13/12/2017
		EP 3253798 A4	25/07/2018
		JP 2018-505674 A	01/03/2018
		MX 2017009904 A	27/06/2018
		SG 11201706199 A	30/08/2017
		US 2018-0127496 A1	10/05/2018
		US 2019-0256596 A1	22/08/2019
		WO 2016-126858 A2	11/08/2016
		WO 2016-126858 A3	29/09/2016
US 2017-0101472 A1	13/04/2017	AR 106264 A1	27/12/2017
		AU 2016-334256 A1	19/04/2018
		BR 112018007046 A2	23/10/2018
		CA 3000209 A1	13/04/2017
		CL 2018000908 A1	27/07/2018
		CN 108368178 A	03/08/2018
		CO 2018003738 A2	10/07/2018
		EA 201890762 A1	28/09/2018
		EP 3359571 A1	15/08/2018
		JP 2018-536392 A	13/12/2018
		KR 10-2018-0070604 A	26/06/2018
		MX 2018004362 A	01/08/2018
		PH 12018500664 A1	01/10/2018
		TW 201726730 A	01/08/2017
		WO 2017-062888 A1	13/04/2017
		ZA 201801943 B	30/01/2019
KR 10-2011-0050507 A	13/05/2011	AR 072999 A1	06/10/2010
		AU 2009-282134 A1	18/02/2010
		AU 2009-282134 B2	03/07/2014
		AU 2014-221286 A1	02/10/2014
		BR P10917470 A2	01/12/2015
		CA 2734335 A1	18/02/2010
		CA 2734335 C	16/01/2018
		CL 2011000308 A1	27/05/2011
		CL 2013002062 A1	10/01/2014
		CL 2016002624 A1	09/06/2017
		CL 2018001903 A1	09/11/2018
		CN 102176921 A	07/09/2011
		CN 102176921 B	07/05/2014
		CN 103923213 A	16/07/2014
		CN 107474137 A	15/12/2017
		CO 6351751 A2	20/12/2011
		CY 1116582 T1	15/03/2017
		DK 2320940 T3	26/05/2015
		EA 023032 B1	29/04/2016
		EA 201100340 A1	30/08/2011
		EA 201590777 A1	29/01/2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 2320940 A2	18/05/2011
		EP 2320940 A4	23/01/2013
		EP 2320940 B1	04/03/2015
		EP 2905030 A1	12/08/2015
		ES 2537203 T3	03/06/2015
		HK 1151985 A1	11/12/2015
		HK 1212911 A1	24/06/2016
		HR P20150453 T1	19/06/2015
		HU E025250 T2	29/02/2016
		IL 210731 A	31/03/2011
		JP 2012-500006 A	05/01/2012
		JP 2015-096503 A	21/05/2015
		JP 2017-052765 A	16/03/2017
		JP 2019-030307 A	28/02/2019
		JP 5647981 B2	07/01/2015
		KR 10-1700459 B1	26/01/2017
		KR 10-2017-0010901 A	01/02/2017
		KR 10-2019-0000922 A	03/01/2019
		MX 2011001250 A	29/03/2011
		NZ 590991 A	30/11/2012
		NZ 602780 A	30/04/2014
		NZ 623319 A	28/08/2015
		PE 03062011 A1	21/05/2011
		PE 16582014 A1	08/11/2014
		PT 2320940 E	19/06/2015
		SG 10201706497 A	28/09/2017
		SI 2320940 T1	31/07/2015
		SM T201500125 B	09/07/2015
		TN 2011000025 A1	05/09/2012
		TW 201019958 A	01/06/2010
		TW 1491408 B	11/07/2015
		US 10344089 B2	09/07/2019
		US 2011-0150892 A1	23/06/2011
		US 2018-0066054 A1	08/03/2018
		WO 2010-0019570 A2	18/02/2010
		WO 2010-0019570 A3	17/06/2010
		ZA 201101009 B	28/11/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; A61K 39/00; A61K 39/395; C07K 16/18; C12N 5/10; C07K 14/705; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: LAG-3, 단클론항체(monoclonal antibody), CDR1, CDR2, CDR3, 암(cancer), PD-1, PD-L1, CTLA-4

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0134668 A (노파르티스 아게 등) 2016.11.23 요약; 단락 [0113], [0192]; 청구항 1-111, 120, 138-144, 146, 149, 152 참조.	1-18, 20-24
A	WO 2017-147383 A1 (CELL MEDICA SWITZERLAND AG 등) 2017.08.31 요약; 청구항 1, 7, 24 참조.	1-18, 20-24
A	KR 10-2017-0116067 A (아남티스바이오, 아이엔씨.) 2017.10.18 요약; 청구항 1-35, 40, 41 참조.	1-18, 20-24
A	US 2017-0101472 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2017.04.13 요약; 청구항 1-42 참조.	1-18, 20-24
A	KR 10-2011-0050507 A (메다렉스, 인코포레이티드) 2011.05.13 요약; 청구항 1-62 참조.	1-18, 20-24

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 31일 (31.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 31일 (31.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



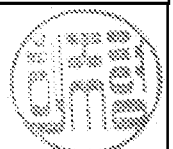
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0134668 A	2016/11/23	AR 100041 A1 AU 2015-229103 A1 BR 112016018408 A2 CA 2936962 A1 CL 2016002112 A1 CL 2018002694 A1 CN 106103484 A CR 20160425 A EA 201691765 A1 EP 3116909 A1 GT 201600185 A JP 2017-516489 A MA 39336 A1 MA 39336 B1 MX 2016011993 A PE 00712017 A1 PH 12016501545 A1 SG 11201605951 A TW 201540727 A US 2015-0259420 A1 US 2017-0210804 A1 US 2018-0086830 A1 US 9908936 B2 UY 36032 A WO 2015-138920 A1	2016/09/07 2016/08/04 2017/12/26 2015/09/17 2017/06/09 2018/11/23 2016/11/09 2017/05/26 2016/12/30 2017/01/18 2018/11/27 2017/06/22 2018/01/31 2019/03/29 2016/12/09 2017/03/17 2016/09/14 2016/10/28 2015/11/01 2015/09/17 2017/07/27 2018/03/29 2018/03/06 2015/10/30 2015/09/17
WO 2017-147383 A1	2017/08/31	AU 2017-223846 A1 AU 2017-224843 A1 BR 112018067696 A2 BR 112018067698 A2 CA 3014001 A1 CA 3014067 A1 CN 108699153 A CN 108884164 A EP 3420000 A1 EP 3420001 A1 JP 2019-513009 A JP 2019-515646 A KR 10-2018-0111870 A KR 10-2019-0003938 A SG 11201807187 A SG 11201807188 A US 2019-0048085 A1 US 2019-0055312 A1 WO 2017-144681 A1 WO 2017-147383 A8	2018/08/23 2018/08/23 2019/01/08 2019/01/08 2017/08/31 2017/08/31 2018/10/23 2018/11/23 2019/01/02 2019/01/02 2019/05/23 2019/06/13 2018/10/11 2019/01/10 2018/09/27 2018/09/27 2019/02/14 2019/02/21 2017/08/31 2018/11/15
KR 10-2017-0116067 A	2017/10/18	BR 112017016638 A2 CA 2975753 A1	2018/06/19 2016/08/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CN 107428836 A	2017/12/01
		EA 201791742 A1	2018/01/31
		EP 3253798 A2	2017/12/13
		EP 3253798 A4	2018/07/25
		JP 2018-505674 A	2018/03/01
		MX 2017009904 A	2018/06/27
		SG 11201706199 A	2017/08/30
		US 2018-0127496 A1	2018/05/10
		US 2019-0256596 A1	2019/08/22
		WO 2016-126858 A2	2016/08/11
		WO 2016-126858 A3	2016/09/29
US 2017-0101472 A1	2017/04/13	AR 106264 A1	2017/12/27
		AU 2016-334256 A1	2018/04/19
		BR 112018007046 A2	2018/10/23
		CA 3000209 A1	2017/04/13
		CL 2018000908 A1	2018/07/27
		CN 108368178 A	2018/08/03
		CO 2018003738 A2	2018/07/10
		EA 201890762 A1	2018/09/28
		EP 3359571 A1	2018/08/15
		JP 2018-536392 A	2018/12/13
		KR 10-2018-0070604 A	2018/06/26
		MX 2018004362 A	2018/08/01
		PH 12018500664 A1	2018/10/01
		TW 201726730 A	2017/08/01
		WO 2017-062888 A1	2017/04/13
		ZA 201801943 B	2019/01/30
KR 10-2011-0050507 A	2011/05/13	AR 072999 A1	2010/10/06
		AU 2009-282134 A1	2010/02/18
		AU 2009-282134 B2	2014/07/03
		AU 2014-221286 A1	2014/10/02
		BR PI0917470 A2	2015/12/01
		CA 2734335 A1	2010/02/18
		CA 2734335 C	2018/01/16
		CL 2011000308 A1	2011/05/27
		CL 2013002062 A1	2014/01/10
		CL 2016002624 A1	2017/06/09
		CL 2018001903 A1	2018/11/09
		CN 102176921 A	2011/09/07
		CN 102176921 B	2014/05/07
		CN 103923213 A	2014/07/16
		CN 107474137 A	2017/12/15
		CO 6351751 A2	2011/12/20
		CY 1116582 T1	2017/03/15
		DK 2320940 T3	2015/05/26
		EA 023032 B1	2016/04/29
		EA 201100340 A1	2011/08/30
		EA 201590777 A1	2016/01/29

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

EP 2320940 A2	2011/05/18
EP 2320940 A4	2013/01/23
EP 2320940 B1	2015/03/04
EP 2905030 A1	2015/08/12
ES 2537203 T3	2015/06/03
HK 1151985 A1	2015/12/11
HK 1212911 A1	2016/06/24
HR P20150453 T1	2015/06/19
HU E025250 T2	2016/02/29
IL 210731 A	2011/03/31
JP 2012-500006 A	2012/01/05
JP 2015-096503 A	2015/05/21
JP 2017-052765 A	2017/03/16
JP 2019-030307 A	2019/02/28
JP 5647981 B2	2015/01/07
KR 10-1700459 B1	2017/01/26
KR 10-2017-0010901 A	2017/02/01
KR 10-2019-0000922 A	2019/01/03
MX 2011001250 A	2011/03/29
NZ 590991 A	2012/11/30
NZ 602780 A	2014/04/30
NZ 623319 A	2015/08/28
PE 03062011 A1	2011/05/21
PE 16582014 A1	2014/11/08
PT 2320940 E	2015/06/19
SG 10201706497 A	2017/09/28
SI 2320940 T1	2015/07/31
SM T201500125 B	2015/07/09
TN 2011000025 A1	2012/09/05
TW 201019958 A	2010/06/01
TW I491408 B	2015/07/11
US 10344089 B2	2019/07/09
US 2011-0150892 A1	2011/06/23
US 2018-0066054 A1	2018/03/08
WO 2010-0019570 A2	2010/02/18
WO 2010-0019570 A3	2010/06/17
ZA 201101009 B	2012/11/28