



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월10일

(11) 등록번호 10-2669477

(24) 등록일자 2024년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2896 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0116949

(22) 출원일자 2023년09월04일

심사청구일자 2023년09월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180133399 A

(73) 특허권자

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

진형승

서울특별시 성북구 월곡로14길 24, 월곡래미안 루
나밸리 111동 903호

김효리

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 파크리오 228동
402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 15 항

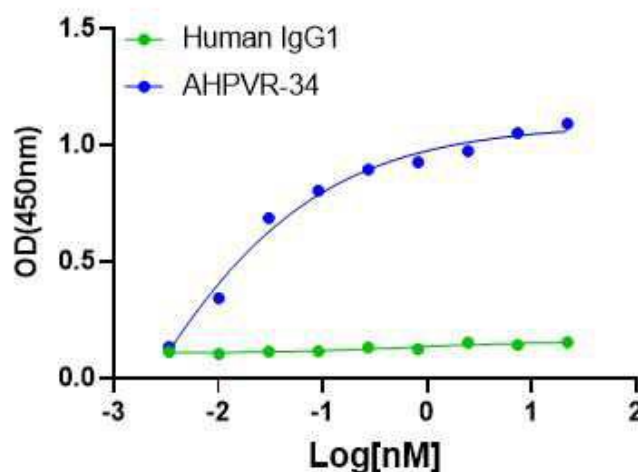
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 신규 항-PVR 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 항-PVR 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 이들의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합하여, NK 세포 매개 ADCC를 통해 PVR 발현 암세포의 사멸을 촉진하며, TIGIT 면역관문 수용체 억제제를 통해 T 세포의 항암 활성 증진 효능을 나타낼 뿐만 아니라, 인간 항체에서 거부 반응의 염려 없이 인간을 대상으로 한 약학적 조성물의 유효성분으로 적용할 수 있어, 암의 치료나 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

이아눔

서울특별시 강북구 한천로170길 1-9

정유정

서울특별시 송파구 오금로11길 43, 310호

심혜인

경기도 의정부시 신곡로 13, 현대2차아파트 203동 1602호

김혜빈

울산광역시 동구 옥류로 92, 벽산유토피아아파트 102동 314호

최승현

서울특별시 양천구 목동서로 130, 목동신시가지아파트4단지 404동 1508호

안혜진

강원특별자치도 정선군 정선읍 비봉안길 6-1, 3층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188034
과제번호	2020M3A9G7103935
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	신규 치료용 항암, 항바이러스 인공단백질 발굴 및 그 생리적 기능 실험적 검증
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 CDR1-H, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 CDR2-H 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 CDR3-H를 포함하는 중쇄 가변영역; 및

서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 CDR1-L, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 CDR2-L 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 CDR3-L을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하고

PVR(Poliiovirus receptor)에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 항체의 항원 결합 단편은 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment; scFv)인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 중쇄 가변영역은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 경쇄 가변영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 중쇄는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 경쇄는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

청구항 1의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 유전자.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

청구항 1의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄는 서열번호 11의 염기서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 것인, 유전자.

청구항 8

청구항 6의 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 9

청구항 8의 재조합 발현 벡터가 도입된, 단리된 숙주세포.

청구항 10

청구항 9의 단리된 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법.

청구항 11

청구항 1의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 암은 PVR(Poliiovirus receptor)을 발현하는 암인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 암은 폐암, 간암, 신장암, 신경교종, 흑색종, 위암, 신경모세포종, 대장암, 유방암, 자궁암, 췌장암, 만성 골수성 백혈암, 전립선암 및 두경부암으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서,

상기 항체는 하기 i) 및 ii)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 활성을 갖는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

- i) NK 세포 매개 ADCC를 통한 암세포의 사멸 촉진; 및
- ii) TIGIT 면역관문 수용체 억제제를 통한 T 세포의 항암 활성 촉진.

청구항 15

세투스맵(cetuximab) 또는 티라골루맵(tiragolumab); 및

청구항 1의 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

을 포함하는, 암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 약학적 조성물.

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 항-PVR 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] CD155라고도 하는 폴리오바이러스 수용체(Poliovirus Receptor, PVR)는 세포의 기질 분자에 대한 세포 부착을 매개하는 데 관여하는 막횡단 당단백질이며, 종래 연구에서, 교모세포종, 수모세포종 및 결장직장암을 포함한 신경외배엽암 및 췌장암과 관련이 있는 종양 항원으로 알려진 바 있다. PVR은 Ras-Raf-MEK-ERK 신호 전달을 통한 혈청 유도 활성화, 사이클린 D2 및 E의 상향조절, 세포주기 진행을 억제하는 p27Kip1의 하향조절을 통해, 결국 세포 주기의 G0/G1 단계 기간을 단축시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로, 종양 세포의 PVR을 차단하면, 종양세포의 생존력을 감소시킬 것으로 예상하고 있다.

[0004] 또한, PVR은 혈관신생에 중요한 역할을 하며, 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)와 인테그린 및 VEGFR2-매개 Rap I-Akt 신호전달 경로의 상호작용을 조절함으로써 VEGF 유도 혈관신생을 조절하는 것으로 알려져 있다. 추가적으로, PVR은 IGFIR과 복합체를 형성하고, 티로신-단백질 키나아제 Met(cMet) 신호전달에 참여하고, 복합체 형성을 차단하여 세포 생존을 및 혈관신생을 감소시킨다.

[0005] 나아가, 최근 몇 년 동안 PVR이 중요한 면역 체크포인트 리간드임이 밝혀졌다. PVR 은 다양한 암세포에서 발현되는 세포 표면마커로서 면역 세포에서 발현되는 TIGIT 등의 면역관문 수용체들과 결합하여 항암면역반응을 조절할 수 있다.

[0006] 최근 TIGIT 억제 항체 치료제의 항암 효능이 보고되면서 PVR 조절을 통한 암세포와 면역 세포 동시 타겟의 중요성이 대두되고 있다. 이에, 면역 관문 수용체 억제를 통한 항암 활성을 증진시키고, NK 세포 매개 ADCC를 통해 PVR 발현 암세포의 사멸을 촉진시킬 수 있는 항-PVR 항체에 대한 연구, 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 PVR에 특이적을 결합하는 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 유전자와, 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고 PVR에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

- [0013] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0014] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 유전자와, 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 상기 신규 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 결합하여, NK 세포 매개 ADCC를 통해 PVR 발현 암세포의 사멸을 촉진하며, TIGIT 면역관문 수용체 억제제를 통해 T 세포의 항암 활성 증진 효과를 나타낼 수 있다. 상기 신규 항체는 인간 항체로, 거부 반응의 염려 없이 인간을 대상으로 한 약학적 조성물의 유효성분으로 적용할 수 있어, 암의 치료나 예방에 유용하게 이용될 수 있다. 아울러, 기존 알려진 면역관문 억제제와 병용 처리시, 종양 세포에 대하여 ADCC에서 시너지 효과를 나타냄으로써, 기존 치료제의 한계를 보완할 수 있다. 또한, 상기 항체는 인간 PVR과 마우스 PVR에 동시에 결합하는 교차 반응성(cross-reactivity)을 갖고 있어, 약물 유효성 평가의 편의성이 높다.
- [0018] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명 항체의 중쇄를 제작하기 위한 벡터맵이다.
- 도 2는 본 발명 항체의 경쇄를 제작하기 위한 벡터맵이다.
- 도 3은 본 발명의 항체와 인간 PVR 단백질의 결합력을 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 항체와 인간 PVR을 발현하는 CHO 세포의 결합력을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 항체의 인간 TIGIT 단백질과 인간 PVR 단백질의 결합을 차단하는 것을 확인한 ELISA 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 항체의 인간 TIGIT 단백질과 인간 PVR 단백질의 결합을 차단하는 것을 확인한 FACS결과이다.
- 도 7은 본 발명의 항체가 인간 뿐만 아니라 마우스 PVR 단백질에 대해서도 교차 반응성을 나타냄을 확인한 결과이다.
- 도 8은 만성 골수성 백혈암 세포에 본 발명의 항체를 처리하는 경우, NK 세포에 의한 ADCC가 증가함을 확인한 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 항체와 면역관문 억제제를 병행 처리하였을 때 단독으로 처리하였을 때보다 시너지 효과를 나타내는 것을 확인한 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 항체를 처리하였을 때의 T 세포의 암세포 사멸 효능이 증진되는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 먼저, 본 발명의 명세서에서 이용된 용어를 설명한다.
- [0022] 본 발명에서 일컫는 '항체'는 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두 개의 중쇄 각각에 하나씩의 경쇄가 이황화 결합에 의해 연결된 구조를 갖는 면역글로불린 분자 및 이들의 다량체를 의미한다. 경쇄는 두 개의 영역, 즉 하나의 가변영역(경쇄 가변영역, VL)과 하나의 불변 영역(경쇄 불변 영역, CL)을 포함하고, 중쇄는 네 개의 영역, 즉 하나의 가변영역(중쇄 가변영역, VH)과 세 개의 불변 영역(중쇄 불변 영역, CH; CH1, CH2 및 CH3)을 포함한다. 경쇄와 중쇄의 불변 영역은 경쇄 및/또는 중쇄들 간의 결합, 분비, 보체 결합, Fc 수용체(FcR)와의 결합 등과 같은 생물학적 성질을 부여하는 역할을 하고, 경쇄와 중쇄의 가변영역은 항원에 대한 인식 및 결합 특이성을 결정한다. 특히, 항체의 결합 특이성은 항체 결합 자리(antigen binding site) 및 항원 결정기(epitope) 사이의 구조적인 상보성에 의한 것인데, 상기와 같은 항체 결합 자리는 주로 중쇄와 경쇄의 가변영역에 포함된 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)이라고 불리는 3개의 초가변영역에서 유래한 잔기들로 이루어지기 때문에, 상기와 같은 상보성 결정 영역을 항체의 결합 특이성을 정의하는 아미노산 서열들로

지칭한다. 상기와 같은 3개의 CDR은 프레임워크 영역(framework region, FR)이라고 불리는 4개의 비교적 잘 보존된 영역들 사이에 배치되는데, 이들은 N-말단에서 C-말단의 방향으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 배치되어 연결된다. 이때, 상기 중쇄 가변영역에 포함되는 3개의 CDR을 각각 CDR1-H, CDR2-H 및 CDR3-H라고 하고, 상기 경쇄 가변영역에 포함되는 3개의 CDR을 각각 CDR1-L, CDR2-L 및 CDR3-L이라고 한다.

[0023] 본 발명에서 일컫는 '항원 결합 단편'은 온전한 항체의 일부분, 특히 온전한 항체의 항원 결합 자리 또는 가변 영역을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 당단백질을 의미한다. 상기와 같은 항체 결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의하거나, 온전한 항체를 효소적 또는 화학적으로 분해함으로써 생성될 수 있고, 상기 항체 결합 단편의 예로는 Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, 디아바디(diabodies) 등은 물론, 이들로부터 형성된 이중특이적 및 다중특이적 항체들도 포함하며, 이에 국한되지 않는다.

[0024] 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1 개의 항원 결합 부위를 가진다. 상기 Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 상기 Fab와 차이가 있다. 상기 F(ab')₂는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. 상기 Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체 조각을 의미한다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통해 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은, 단백질 가수분해 효소를 이용하거나(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다.), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10 내지 25개 아미노산 길이를 가지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 링커에는 글리신(G) 및/또는 세린(S)과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있다. 상기 링커는 예를 들어, (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n 또는 (GnS)_m(n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으며, 예를 들어 (GnS)_m(n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에서 일컫는 '단일클론 항체'는 "mAb"라고도 지칭되는 단일 아미노산 서열의 항체 분자를 지칭하는데, 이는 특정 항원을 대상으로 하며, 임의의 특별한 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않는다. 예컨대, 단일클론 항체는 B 세포의 단일 클론 또는 하이브리도마에 의해 생산될 수 있지만, 재조합될 수도 있다.

[0027] 본 발명에서 일컫는 '인간화 항체'는 전체적으로 또는 부분적으로 비인간 동물에서 유래한 것이고, 인간에서 면역 반응을 회피하거나 최소화하기 위하여, 예를 들어 중쇄 및 경쇄의 가변영역의 프레임워크 영역의 특정 아미노산을 교체하도록 변형된 항체를 지칭한다. 인간화 항체의 불변 영역은 대부분의 경우 인간 중쇄 및 경쇄의 불변 영역이다.

[0028] 본 발명에서 일컫는 '인간 항체'는 인간 면역글로불린 서열에서 유래한 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 사람 항체는, 예를 들면, CDR에서, 특히 CDR3에서 인간 면역글로불린 서열(예를 들면, 시험관내 랜덤 또는 부위-특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에서 일컫는 '인간 항체'는 마우스와 같은 다른 비인간 동물 유래의 배선로부터 유도된 CDR 서열이 사람 프레임워크 서열 상에 절편이식된 항체를 포함하지 않는다.

[0029] 본 발명에서 일컫는 '항원 결정기(epitope)'는 파라토프로서 공지되어 있는 항체의 항원 결합 자리에 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 부위를 의미한다. 단일 항원은 1개 이상의 항원 결정기를 가질 수 있고, 동일한 항원에 결합하는 것이라도 항체가 결합하는 항원의 구체적인 부위가 다른 경우에 이들 항체는 항원 결정기가 다른 것이다. 상기 항원 결정기는 통상적으로 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 또한, 상기 항원 결정기는 입체적인 또는 비입체적인 구조를 갖는 것일 수도 있고, 입체적 항원 결정기와 비입체적 항원 결정기는 변성 용매의 존재 하에서 입체적 항원 결정기에 대한 결합은 소실되지만 비입체적 항원 결정기에 대한 결합은 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.

[0030] 본 발명에서 일컫는 '보존적 치환'은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것을 의미한다. 예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘과 같은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들 중에서 치환되는 것이

보존적인 치환에 해당한다. 그 밖에, 아스파르트산, 글루탐산과 같은 산성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기; 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인과 같은 비대전성 극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기; 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판과 같은 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기; 트레오닌, 발린, 이소류신과 같은 β -분지 측쇄를 갖는 아미노산 잔기; 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘과 같은 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들 중에서의 치환도 마찬가지로 보존적인 치환에 해당한다.

[0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033] 1. 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편

[0034] 본 발명의 일 측면은 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0035] 본 발명에서 PVR(Poliovirus Receptor, PVR)은 세포의 기질 분자에 대한 세포 부착을 매개하는 데 관여하는 막 횡단 당단백질이다.

[0036] 본 발명의 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR1-H, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR2-H 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR3-H 를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR1-L, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR2-L 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR3-L을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.

[0037] 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 항체 또는 인간 항체 또는 이들의 항원 결합 단편일 수 있고, 특히 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0038] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 예컨대 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄 불변영역 및/또는 경쇄 불변영역을 더 포함할 수 있으며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 PVR에 대해 특이적으로 결합하는 특성을 저해하지 않는 것이라면, 상기 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄 불변영역 및/또는 경쇄 불변영역은 그 종류나 아미노산 서열에 제한없이 이용될 수 있다.

[0039] 앞서 설명한 아미노산 서열들은, 이를 포함하는 폴리펩타이드의 구조, 기능, 활성 등에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 가지는 변이체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열들은 당업계에 알려진 통상적인 변형이 일어난 아미노산을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 아미노산 변형은 예컨대 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등일 수 있다. 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 앞서 설명한 아미노산 서열들을 포함하는 것뿐만 아니라, 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이나 이의 변이체를 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것의 의미는, 앞서 설명한 아미노산 서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 상기 중쇄는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 경쇄는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10nM 이하, 7nM 이하, 5nM 이하, 3nM 이하, 2nM 이하, 1.5nM 이하 또는 1.0nM 이하의 EC₅₀ 값을 갖는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1.4nM 이하, 1.3nM 이하, 1.2nM 이하, 1.1nM 이하, 1.0nM 이하, 0.97nM 이하, 0.95nM 이하, 0.93nM 이하, 0.90nM 이하, 0.87nM 이하, 0.85nM 이하, 0.83nM 이하, 0.80nM 이하, 0.77nM 이하, 0.75nM 이하, 0.73nM 이하, 0.70nM 이하, 0.67nM 이하, 0.65nM 이하, 0.63nM 이하, 0.60nM 이하, 0.57nM 이하, 0.55nM 이하, 0.53nM 이하, 0.50nM 이하, 0.47nM 이하, 0.45nM 이하, 0.43nM 이하, 0.40nM 이하, 0.37nM 이하, 0.35nM 이하, 0.33nM 이하, 0.30nM 이하, 0.27nM 이하, 0.25nM 이하, 0.23nM 이하, 0.20nM 이하, 0.17nM 이하, 0.15nM 이하, 0.13nM 이하, 0.10nM 이하, 0.07nM 이하, 0.05nM 이하, 0.03nM 이하, 0.02nM 이하, 0.01nM 이하, 0.009nM 이하, 0.008nM 이하, 0.007nM 이하, 0.006nM 이하, 0.005nM 이하, 0.004nM 이하, 0.003nM 이하, 0.002nM 이하 또는 0.001nM 이하의 EC₅₀ 값으로 PVR 단백질에 결합할 수 있다.

[0043] 일 측면에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합할

수 있다. 이와 같은 교차 반응성(cross-reactivity)로 인해, 약물 유효성 평가의 편이성이 높다.

[0044] 또한, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 70℃ 이상, 73℃ 이상, 75℃ 이상, 77℃ 이상 또는 80℃ 이상의 용융 온도(T_m)를 갖는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 81℃ 이상, 82℃ 이상, 83℃ 이상, 84℃ 이상, 85℃ 이상, 86℃ 이상, 87℃ 이상, 88℃ 이상, 89℃ 이상, 90℃ 이상, 91℃ 이상, 92℃ 이상, 93℃ 이상, 94℃ 이상 또는 95℃ 이상의 용융 온도(T_m)를 갖는 것일 수 있다.

[0045] 한편, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 PVR 단백질에 결합하여, TIGIT과의 결합을 억제하는 활성을 갖는다. 면역세포 표면에 발현되는 TIGIT 면역관문 수용체와 종양세포 표면에 발현되는 PVR의 결합을 차단하는 것을 통해, T 세포의 항암 활성을 증진시키는 역할을 할 수 있다.

[0046] 또한, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10nM 이하, 7nM 이하, 5nM 이하, 3nM 이하, 2nM 이하, 1.5nM 이하 또는 1.0nM 이하의 IC₅₀ 값을 갖는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1.4nM 이하, 1.3nM 이하, 1.2nM 이하, 1.1nM 이하, 1.0nM 이하, 0.97nM 이하, 0.95nM 이하, 0.93nM 이하, 0.90nM 이하, 0.87nM 이하, 0.85nM 이하, 0.83nM 이하, 0.80nM 이하, 0.77nM 이하, 0.75nM 이하, 0.73nM 이하, 0.70nM 이하의 IC₅₀ 값으로 PVR과 TIGIT 사이의 상호 결합을 효과적으로 차단할 수 있다.

[0048] 2. 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 관련 유전자, 및 이를 포함하는 벡터 및 형질전환체

[0049] 본 발명의 다른 측면은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자를 제공한다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 암호화하는 유전자와 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 암호화하는 유전자를 각각 제공할 수 있다. 상기 중쇄 또는 경쇄의 가변영역을 암호화하는 유전자는 암호화 영역으로부터 발현되는 상기 가변영역들의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 암호화 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 암호화 영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변이가 이루어질 수 있다. 결국, 상기 가변영역들의 유전자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이러한 변이 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[0051] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역에 포함되는 CDR들 각각을 암호화하는 유전자를 제공한다. 구체적으로, CDR1-H를 암호화하는 유전자, CDR2-H를 암호화하는 유전자 및 CDR3-H를 암호화하는 유전자를 각각 개별적으로 제공한다. 특히, 상기 CDR1-H를 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 CDR2-H를 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 CDR3-H를 암호화하는 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 또 다른 구현예에서는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역에 포함되는 CDR들 각각을 암호화하는 유전자를 제공한다. 구체적으로, CDR1-L를 암호화하는 유전자, CDR2-L를 암호화하는 유전자 및 CDR3-L를 암호화하는 유전자를 각각 개별적으로 제공한다. 특히, 상기 CDR1-L를 암호화하는 유전자는 서열번호 6의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 CDR2-L를 암호화하는 유전자는 서열번호 7의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 CDR3-L를 암호화하는 유전자는 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있다.

[0053] 상기 CDR들을 암호화하는 유전자는 암호화 영역으로부터 발현되는 상기 CDR들의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 암호화 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 암호화 영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변이가 이루어질 수 있다. 결국, 상기 CDR들의 유전자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이러한 변이 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[0054] 구체적으로, 본 발명의 유전자는 상기 PVR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 염기 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 중쇄는 서열번호 11의 염기서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 유전자는 상기 나열된 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동일한 염기서열이란, 예컨대 전사 및 번역되었을 때 동일한 아미노산이 합성될 수 있는 경우를 포함하며, 상기

나열된 염기서열들과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 유전자는 이를 도입시켜 발현시키고자 하는 생물의 종류와 상기 생물의 전사, 번역 등 발현 시스템에 따라, 최적화된 염기서열을 포함할 수 있다. 이는 코돈의 축퇴성(degeneracy)에서 기인한 것으로, 이에 따라 발현되는 단백질을 암호화할 수 있는 다양한 조합의 뉴클레오타이드 서열이 존재할 수 있으며 이들은 모두 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 코돈 최적화에 따른 폴리뉴클레오타이드의 변형은, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시켜 적용시키고자 하는 생물의 종류에 따라 결정될 수 있으며, 예컨대 본 발명의 유전자는 포유동물, 영장류의 코돈 선택에 최적화하여 변형된 유전자일 수 있고, 더욱 구체적으로는 인간으로부터 발현시켜 작용하기에 적합하도록 최적화되어 변형된 것일 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0059] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자를 포함하고, 상기 유전자는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0060] 상기 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0061] 상기 재조합 발현 벡터는 본 발명의 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 발현 또는 생산하고자 하는 숙주 세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 터미네이터(terminator), 엔핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절서열, 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 목적에 따라 조합할 수 있다.

[0062] 상기 발현 벡터는 벡터가 도입된 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 추가로 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현 벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.

[0063] 또한, 상기 재조합 발현 벡터는 발현 단백질의 정제를 용이하게 하기 위한 서열을 포함할 수 있으며, 구체적으로 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자에 작동 가능하도록 분리정제용 태그를 암호화하는 유전자가 연결될 수 있다. 이때, 상기 분리정제용 태그는 GST, poly-Arg, FLAG, 히스티딘-태그(His-tag), c-myc 등이 단독으로 사용되거나 이들 중 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수도 있다. 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자는 제한효소 절단 위치를 통해 클로닝될 수 있으며, 상기 벡터에 단백질 절단효소 인식 부위를 암호화하는 유전자가 사용된 경우에는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자와 틀이 맞도록(in frame) 연결되어, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 수득한 후 단백질 절단효소로 절단 시, 원래 형태의 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부가 생산될 수 있도록 할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 형질전환체에는 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 전부 또는 일부를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터가 도입된다.

[0065] 본 발명에 따른 상기 재조합 발현 벡터를 발현 목적에 따라 박테리아, 효모, 대장균, 진균류, 식물 세포 및 동물 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 적절한 숙주 세포에 형질 전환시킴으로써 형질전환체를 제조할 수 있다. 예컨대, 상기 숙주 세포는 대장균(E. coli BL21(DE3), DH5 α 등) 또는 효모 세포(Saccharomyces 속, Pichia 속 등) 등일 수 있다. 이때, 숙주 세포의 종류에 따라 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다.

[0066] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 인간 또는 마우스의 PVR 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명의 형질전환체 제조를 위한 재조합 발현 벡터의 도입 방법은 공지의 기술, 즉, 열 충격법, 전기충격법 등을 사용할 수 있다.

[0068] 상기 형질전환체로부터 발현된 단백질은 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이므로, 상기 형질전환체를 대량 배양하여 상기 유전자를 발현시킴으로써, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 대량 생산을 용이하게 할 수 있다.

[0070] **3. 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도**

- [0071] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0072] 상기 암은 종양 세포의 표면에 PVR을 발현하는 암일 수 있다.
- [0073] 예시적으로, 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 암은 폐암, 간암, 신장암, 신경교종, 흑색종, 위암, 신경모세포종, 대장암, 유방암, 자궁암, 췌장암, 만성 골수성 백혈암, 전립선암 및 두경부암일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 예방 또는 치료될 수 있다면, 그러한 암은 제한없이 상기 암의 범위에 포함될 수 있다.
- [0074] PVR은 다양한 암세포에서 발현되는 세포 표면 마커로서, 면역 세포에서 발현되는 TIGIT 등의 면역관문 수용체와 결합하여 항암 면역반응을 조절할 수 있다. 여기서, 상기 면역 세포는 암세포에 대한 사멸 효능이 있는 NK 세포, T 세포를 포함할 수 있다. 따라서, TIGIT과 PVR의 결합을 억제하면, 면역관문 수용체 억제를 통해 면역 세포의 항암 활성이 감소되는 것을 방지할 수 있다.
- [0075] 또한, 본 발명의 항체를 이용하는 경우, NK 세포는 항체 의존 세포 독성(Antibody-Dependent cellular Cytotoxicity, ADCC)을 통한 암세포의 사멸을 촉진할 수 있다. 종양 세포의 표면에 존재하는 PVR에 본 발명의 항체가 결합하게 되고, NK 세포의 표면 수용체는 종양 세포에 결합한 항체를 인식하여, NK 세포의 세포 사멸 활성이 증가할 수 있다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PVR을 발현하는 암의 예방 또는 치료에 유효성분으로 이용될 수 있다.
- [0077] 상기 예방은 암의 시작을 억제 또는 지연되도록 하는 모든 조치를 의미한다. 또한, 상기 치료는 발현된 암의 증상이 개선되거나 호전되도록 하는 모든 조치를 의미하며, 상기 치료의 바람직한 효과에는 암의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 암의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후 등을 포함한다.
- [0078] 상기 약학적 조성물은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 외에, 약학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 또는 첨가제를 더 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 '약학적으로 허용 가능한'의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다. 상기 담체는 세포 또는 조직 내로의 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하고, 상기 첨가제는 약학적 조성물을 필요한 제형으로 제조하기 위해 필요한 임의의 성분들, 예컨대 부형제, 붕해제, 결합제, 착향제, 방부제, 활택제, 안정화제, 점성화제 등을 의미한다.
- [0080] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 이 때, 상기 약학적 조성물은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 더하여, 적어도 하나의 면역관문 억제제를 더 포함할 수 있다.
- [0081] 일 측면에 있어서, 상기 면역관문 억제제는 세투시맵(cetuximab) 또는 티라골루맵(tiragolumab)일 수 있다. 본 발명의 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 면역관문 억제제와 병용 투여하는 경우, 각각을 단독으로 처리한 경우에 비해, 항암 효능에서 상승 효과가 나타날 수 있다.
- [0082] 이때, 상기 병용투여용 약학적 조성물에 있어서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역관문 억제제와 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 면역관문 억제제를 개체에 먼저 투여한 후, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학적 조성물을 상기 개체에 추가로 투여하거나, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학적 조성물을 개체에 먼저 투여한 후, 면역관문 억제제를 개체에 추가로 투여할 수 있다. 또한, 경우에 따라서, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학적 조성물과 면역관문 억제제를 동시에 개체에 투여할 수도 있다.
- [0084] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학적 조성물을 필요한 개체에 투여하는 것을 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0085] 상기 개체는 포유 동물일 수 있고, 예컨대 인간일 수 있으며, 특히 환자일 수 있다. 또한, 상기 '필요한 개체'는 암을 앓고 있거나, 앓을 가능성이 있는 개체를 의미한다.
- [0086] 또한, 상기 조성물은 1회량 또는 다회 용량으로 나누어서 투여될 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때,

부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 복용량은 특별하게 한정되지는 않으나, 환자의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약의 종류, 투여경로 및 투여 시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변경된다. 특히, 상기 약학적 조성물은 하루에 1회량 또는 다회 용량으로 인간을 포함하는 포유 동물 내로 전형적으로 허용된 경로, 예컨대, 경구로, 직장으로, 정맥으로(intravenously), 피하로(subcutaneously), 복강내로(intraperitoneally), 자궁내로(intrauterinely) 또는 뇌혈관내로(intracerebrovascularly) 투여될 수 있다.

[0087] 상기 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 '약학적으로 유효한 양'은 모든 의학적 치료에 적용 가능한 합당한 이익/위험 비율(benefit/risk ratio)로 충분히 예방 또는 치료의 효과를 나타내는 양을 의미한다. 또한, 상기 '약학적으로 유효한 양'은 치료해야 할 질환의 중증도, 환자의 나이 및 성별, 질환의 종류, 약제의 활성도, 약제에 대한 민감도, 투여시간, 투여경로, 분비속도, 치료기간, 약제의 공투여 및 본 분야에서 알려진 다른 파라미터를 포함한 다양한 요인에 따라서 달라진다.

[0089] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0090] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[실시예 1]

[0093] 신규 항체의 설계 및 제작

[0094] 암 세포에서 발현되는 PVR 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항-PVR 항체로, 하기 표 1에 기재된 서열번호 1, 2 및 3의 CDR1-H, CDR2-H 및 CDR3-H를 포함하는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄와, 서열번호 6, 7 및 8의 CDR1-L, CDR2-L 및 CDR3-L을 포함하는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하도록 설계하였다.

표 1

영역	서열이름	아미노산 서열	서열번호
중쇄	CDR1-H	SYWIG	1
	CDR2-H	I IYPGDS DTRYSPSFQG	2
	CDR3-H	ISGSSDY	3
	Variable region of heavy chain	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARISGSSDYWGQGTLVTVSS	4
	heavy chain	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARISGSSDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	5
경쇄	CDR1-L	TGTSSDVGGYNYVS	6
	CDR2-L	DVSNRPS	7
	CDR3-L	SSYTSSITWV	8
	Variable region of light chain	ELALTQPPSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSITWVFGGGTKLTVL	9
	light chain	ELALTQPPSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSITWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWQSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	10

[0096] 상기의 서열을 포함하도록 제작된 항체 AHPVR-34(Anti-hPVR-34, 이하 'AHPVR-34')를 제조하였다. 구체적으로, 상기와 같이 설계된 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 암호화하는 서열번호 11의 염기서열을 pFUSEss-CHlg-hG1 벡터에 클로닝하고(도 1 참고), 상기와 같이 설계된 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열을 pFUSE2ss-CLILg-h12 벡터에 클로닝하였다(도 2 참고). 그리고 상

기와 같이 클로닝된 두 발현 벡터 pFUSEss-CHlg-hG1 벡터 및 pFUSE2ss-CLILg-h12 벡터를 각 50ug씩 총 100ug을 Opti-MEM 배지 6ml에 희석하고, ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit의 시약(ExpiFectamine™ 293 Reagent) 320ul를 Opti-MEM 배지 6ml에 희석하여 각각 5분간 정치하였다. 상기 벡터를 첨가한 배지와 상기 시약을 첨가한 배지를 섞어 10분 간 더 정치한 후, Expi293F™ 세포 100ml(2.0×10^6 cells/ml)에 첨가하여 24시간 동안 부유 배양하였다. 상기와 같이 배양된 세포에 ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer를 첨가하여 4일 동안 추가 배양한 다음, 10,000xg로 30분 동안 원심분리하고 0.2um필터로 여과하여 상층액을 회수하였다. 그리고 상층액 내로 발현된 단백질을 AKTA purifier100 기기를 이용하여 친화성 컬럼(MabSelect prismA)에 결합시킨 후 산성 용출액(50mM의 아세트산 완충용액, pH 4.0)으로 용출시켰다. 상기와 같이 용출시킨 단백질을 제염 컬럼(desalting column, Hiprep 6/10)을 사용하여 PBS 완충용액으로 최종 정제하였다. 상기와 같이 정제된 단백질은 비환원(non-reducing) 및 환원(reducing) 조건 하에서의 SDS-PAGE 분석을 통해, 중쇄(약 50 kDa) 및 경쇄(약 25 kDa)를 갖는 총 분자량 약 150 kDa의 항체임을 확인하였다.

[0098] **[실시예 2]**

[0099] **항체의 항원에 대한 친화도 확인**

[0100] 상기 실시예 1에서 준비한 항체의 인간 PVR 단백질에 대한 결합력을 확인하였다.

[0101] 인간 PVR 단백질에 대한 AHPVR-34의 결합력을 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 분석하였다. 결합 분석은 25℃에서 수행하였다. 96 웰 플레이트의 각 웰에 인간 PVR-his 단백질을 코팅 용액 (1.59 g/L Na₂CO₃, 2.93 g/L NaHCO₃ pH 9.6)에 0.5 µg/mL 농도로 희석하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 블로킹 용액 (5% skim milk in PBS [8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl pH 7.4])에 희석된 항체를 플레이트에 첨가한 후, 1시간 동안 배양하였다. 세척 후, HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 항-인간 IgG Fc 항체를 블로킹 용액에 희석 후 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 배양하였다. 100 µL/웰 처리 후, 50 µL/웰의 0.5N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 450nm에서 5분 이내에 ELISA 플레이트 판독기로 흡광도를 측정하고 SoftMax Pro 5.4 소프트웨어(Molecular Device)의 4개 매개변수 물류 방정식을 사용하여 데이터를 분석했다.

[0102] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 인간 PVR 단백질에 결합하는 AHPVR-34의 EC₅₀는 0.0005786 nM로 측정되어, 1pM 이하의 수준으로, 항원인 인간 PVR 단백질에 대하여 매우 우수한 친화력을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0104] **[실시예 3]**

[0105] **본 발명 항체의 인간 PVR 발현 세포에 대한 세포 결합력 확인**

[0106] 상기 실시예 1에서 준비한 항체가 정제된 단백질 항원뿐만 아니라, 항원을 발현하는 세포에 대해서도 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였다.

[0107] AHPVR-34 항체를 FACS 버퍼 (0.5 % BSA, 0.05 % 아자이드화 나트륨 (NaN₃) in 1x PBS)에 희석한 후, 인간 PVR을 발현하는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포에 다양한 농도로 처리하고, 4℃에서 30분 배양하였다. 이 후, CHO-PVR 세포를 FACS 버퍼로 세척한 후 APC 형광물질이 결합된 이차 항체로 배양하였다. 음성대조군으로는 hIgG 항체(BioXcell, Catalog #BP0297)를 사용하였다. AHPVR-34 항체의 세포 결합은 유세포 분석기(CytoFlex, Beckman coulter)를 이용하여 측정하였으며, EC₅₀ 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 8.3.0; GraphPad)를 사용하여 결정하였다.

[0108] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 인간 PVR 발현 CHO에 결합하는 AHPVR-34의 EC₅₀는 0.9924nM로 측정되어, 수백 pM의 수준으로, 항원인 인간 PVR을 발현하는 세포에 대해서도 매우 우수한 친화력을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0110] **[실시예 4]**

[0111] **인간 TIGIT 단백질과 인간 PVR 단백질 결합에 대한 본 발명 항체의 차단 특성 확인**

[0112] 종양 세포 표면에서 발현되는 PVR은 면역세포 표면에서 발현되는 TIGIT과 결합하여 항암 면역반응을 조절할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체를 이용하는 경우, 본 발명의 항체가 TIGIT과 PVR이 결합하는 것을 차단할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0113] **[4-1] ELISA를 이용한 분석**

[0114] 구체적으로, 인간 TIGIT 단백질과 인간 PVR 단백질의 결합에 대한 AHPVR-34의 차단 특성을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 기반 블로킹 에세이를 사용하여 분석하였다. 해당 실험은 25℃에서 수행하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 정제한 인간 PVR-his 단백질을 코팅 용액 (1.59 g/L Na₂CO₃, 2.93 g/L NaHCO₃ pH 9.6)에 0.5 µg/mL 농도로 희석하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 블로킹 용액 (5% skim milk in PBS [8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl pH 7.4])에 희석된 항체 및 재조합 인간 TIGIT-mIgG2a 단백질을 플레이트에 첨가한 다음, 1시간 동안 배양하였다. 세척 후, HRP(horseradish peroxidase)가 부착된 항-마우스 IgG Fc 항체를 블로킹 용액에 희석 후 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 배양하였다. 100 µL/웰 처리 후, 50 µL/웰의 0.5N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 450nm에서 5분 이내에 ELISA 플레이트 판독기로 흡광도를 측정하고 SoftMax Pro 5.4 소프트웨어(Molecular Device)의 4개 매개변수 물류 방정식을 사용하여 데이터를 분석했다. ELISA를 사용하여 PVR과 TIGIT 사이의 상호 결합의 AHPVR-34에 의한 결합 차단 효능을 평가했다.

[0115] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, AHPVR-34의 IC₅₀ 값은 0.1474nM로 측정되어, TIGIT과 PVR이 결합하는 것을 효과적으로 차단할 수 있음을 확인하였다.

[0116] **[4-2] FACS를 이용한 분석**

[0117] 나아가, 인간 PVR과 인간 TIGIT 단백질의 결합에 대한 AHPVR-34의 차단 특성을 FACS를 사용하여 분석하였다.

[0118] AHPVR-34 항체를 FACS 버퍼 (0.5 % BSA, 0.05 % 아자이드화 나트륨(NaN₃) in 1x PBS)에 희석한 후 인간 PVR을 발현하는 CHO 세포에 다양한 농도로 처리하고 재조합 인간 TIGIT-mIgG2a 단백질과 함께 4℃에서 30분 배양하였다. 이 후 CHO-PVR 세포를 FACS 버퍼로 세척한 후 APC 형광물질이 결합된 항-마우스 이차 항체로 배양하였다. 음성대조군으로는 hIgG 항체를 사용하였다. AHPVR-34 항체의 차단 특성은 유세포 분석기(CytoFlex, Beckman coulter)를 이용하여 측정하였으며, IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 8.3.0; GraphPad)를 사용하여 결정하였다.

[0119] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, AHPVR-34의 IC₅₀ 값은 0.5214nM로 측정되어, AHPVR-34가 PVR과 TIGIT 사이의 상호 결합을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0121] **[실시예 5]**

[0122] **본 발명 항체의 마우스 PVR 발현 세포에 대한 교차 반응성(cross-reactivity) 확인**

[0123] 상기 실시예 1에서 준비한 항체가 인간뿐만 아니라 마우스 PVR 단백질에 대해서도 교차 결합 반응성을 나타내는 지 여부를 확인하였다.

[0124] AHPVR-34 항체를 FACS 버퍼 (0.5 % BSA, 0.05 % 아자이드화 나트륨(NaN₃) in 1x PBS)에 희석한 후 마우스 PVR을 발현하는 CHO 세포에 2 µg/ml로 처리하고 4℃에서 30분 배양하였다. 이 후, CHO-마우스 PVR 세포를 FACS 버퍼로 세척한 후 APC 형광물질이 결합된 이차 항체로 배양하였다. 음성대조군으로는 hIgG 항체를 사용하였다. AHPVR-34 항체의 세포 결합은 유세포 분석기(CytoFlex, Beckman coulter)를 이용하여 측정하였다.

[0125] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, AHPVR-34 항체는 세포 표면에 발현된 마우스 PVR 수용체에 결합함이 확인되었다. AHPVR-34 항체는 인간 PVR과 마우스 PVR 단백질에 교차 반응성을 갖는 독특한 성질을 지닌다는 것을 보여준다.

[0127] **[실시예 6]**

[0128] **항체 처리시 NK 세포에 의한 ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) 증가 확인**

[0129] 상기 실시예 1에서 준비한 항체를 처리하는 경우, NK 세포에 의한 ADCC 가 증가하는지 여부를 만성 골수성 백혈암 세포에서 확인하였다.

[0130] 우선, NK 세포를 얻기위한 인간 말초 혈액 단핵 세포(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 혈액 샘플로부터 퍼콜 밀도 기울기 원심분리(Percoll density gradient centrifugation)를 이용해 분리하였다. 인간 PBMC를 미토마이신C 50µg/ml (Sigma)이 처리된 K562 세포와 함께 RPMI1640 배지에 재조합 인간 IL-2 100U/mL을

첨가하여 공동 배양하였다. 배지는 이틀마다 재조합 인간 IL-2를 포함한 새로운 배지로 교체하였다. 일주일 배양 후, 남아있는 T 세포를 CD3 양성 선택 키트(positive selection kit)를 이용하여 제거하였다. 남아있는 NK 세포는 인간 IL-15 (5ng/ml)을 포함한 배지에 이틀마다 새 배지로 교체되면서 2주 더 배양시켰다. NK 세포의 순도는 항-인간 CD56 항체를 이용하여 유세포 분석기(CytoFlex, Beckman coulter)로 측정하여, 95% 이상 될 경우만 에세이에 사용하였다.

[0131] 또한, K562 세포를 반딧불이 루시페라아제 유전자를 발현하도록 변형하여 K562-Luc 세포를 제조하였다. ADCC(Antibody-dependent cellular cytotoxicity) 분석에서, 이들 K562-Luc 세포는 인간 IgG1 또는 AHPVR-34 항체(33nM 또는 67nM의 농도)의 존재 하에 인간 NK 세포와 함께 인간 NK 세포 배양 배지(RPMI + 10% FBS + 20mM HEPES + 1X GlutaMAX + 1X MEM NEAA + 1mM 피루브산 나트륨 + 1% 페니실린 스트렙토마이신)에서 배양하였다. 공동 배양은 4시간 동안 5% CO₂로 37℃에서 수행하였다. NK세포의 세포 살상력은 살아있는 세포의 루시페라아제 활성을 측정하여 결정하였다. 공동 배양 후 세포 용해 용액 (25mM 트리스 인산염(pH 7.8) + 2mM DTT + 2mM 1,2-다이아미노사이클로헥세인-N,N,N',N'-테트라아세트산 + 10% 글리세롤 + 1% 트리톤® X-100) 을 50ul/웰 처리한 후 10분 뒤 루시페라아제의 기질인 D-루시페린이 첨가된 루시페라아제 반응 버퍼(PBS)를 50ul/웰 처리하여 세포 용해물에서 방출된 발광 신호를 루시페라아제 분석 시스템 (GloMax® Discover Microplate Reader) 을 사용하여 정량화하였다.

[0132] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 음성 대조군인 hIgG1을 이용한 경우보다, 본 발명의 항체를 이용한 경우, ADCC에 의한 세포 사멸 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 항체의 농도를 33nM을 사용했을 경우보다, 67nM을 사용하였을 때 세포 사멸 활성이 더욱 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 항체를 이용하는 경우, PVR을 발현하는 세포에서 NK 세포에 의한 ADCC 가 증가함을 알 수 있다.

[0134] **[실시예 7]**

[0135] **본 발명의 항체와 세투스맵(cetuximab) 항체 병용 처리 시 NK 세포에 의한 폐암 세포의 ADCC 증가**

[0136] 상기 실시예 1에서 준비한 항체와 다른 항암제 중 하나인 면역관문 억제제 세투스맵(cetuximab)과 병행 처리시, 각각을 단독으로 처리했을 때보다 NK 세포에 의한 ADCC를 더욱 증가시킬 수 있는지 확인하였다.

[0137] 구체적으로, 반딧불이 루시페라아제 유전자를 A549 세포에 도입하여 A549-Luc 세포를 제조하였다. ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) 분석에서, A549-Luc 세포는 모두 67nM의 농도에서 인간 IgG1, AHPVR-34, 세투스맵 또는 AHPVR-34와 세투스맵 항체의 조합의 존재 하에 인간 NK 세포와 함께 인간 NK 세포 배양 배지(RPMI + 10% FBS + 20mM HEPES + 1X GlutaMAX + 1X MEM NEAA + 1mM 피루브산 나트륨 + 1% 페니실린 스트렙토마이신)에 배양시켰다. 공동 배양은 4시간 동안 5% CO₂, 37℃에서 수행하였다. NK세포의 세포 살상력은 살아있는 세포의 루시페라아제 활성을 측정하여 결정하였다. 공동 배양 후 세포 용해 용액 (25mM 트리스 인산염(pH 7.8) + 2mM DTT + 2mM 1,2-다이아미노사이클로헥세인-N,N,N',N'-테트라아세트산 + 10% 글리세롤 + 1% 트리톤® X-100) 을 50ul/웰 처리한 후 10분 뒤 루시페라아제의 기질인 D-루시페린이 첨가된 루시페라아제 반응 버퍼(PBS)를 50ul/웰 처리하여 세포 용해물에서 방출된 발광 신호를 루시페라아제 분석 시스템 (GloMax® Discover Microplate Reader)을 사용하여 정량화하였다.

[0138] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 음성 대조군인 hIgG1을 이용한 경우 세포 사멸 활성이 약 18%인 것에 반해, 본 발명의 항체 또는 세투스맵을 이용한 경우, ADCC에 의한 세포 사멸 활성이 각각 약 38%, 약 35%로 증가하는 것을 확인하였다. 나아가, 본 발명의 항체와 세투스맵을 각각 단독으로 처리한 경우보다, 병용하여 처리한 경우, 세포 사멸 활성 약 55%로, 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0140] **[실시예 8]**

[0141] **본 발명 항체에 의한 암항원 특이적 T 세포의 암세포 사멸 효능 증진**

[0142] 본 발명의 항체를 이용하여 암세포 발현 PVR을 차단하여 T 세포의 암세포 사멸 효능을 증진시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 여기서 이용한 티라골루맵(Tiragolumab)은 T세포에서 발현하는 TIGIT과 결합할 수 있는 면역 항암제의 일종이다. T 세포의 암살상 효능을 티라골루맵과 비교하여 확인하였다.

[0143] 인간 CD8⁺ T세포는 EasySep 인간 T 세포 분리 키트 (STEMCELL Technologies)을 이용하여 PBMC로부터 분리시켰다. 분리된 인간 CD8⁺ T세포는 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen)을 이용하여 인간 IL-2 100ng/ml의 존재 하에 자극하였다. RPMI1640 배지에 배양 3일 후, HLA-A2 제한 NY-ESO-1 펩티드 항원(NY-

ESO-1:157-165)에 특이적인 T-세포 수용체(TCR)를 코딩하는 렌티바이러스를 polybrene 8ug/ml과 함께 활성화된 CD8+ T세포에 형질도입 시켰다. 48시간 후, polybrene과 Dynabeads가 포함된 렌티바이러스 배양액을 제거하고 RPMI1640 배지에 IL-2 100ng/ml과 함께 배양하였다. NY-ESO-1 특이적 TCR의 발현은 항-인간 V β 13.1 TCR chain 항체를 이용하여 유세포 분석기(CytoFlex, Beckman coulter)로 측정하였다. 다음으로, NY-ESO-1 TCR을 발현하는 인간 CD8+ T 세포를 안정적으로 반딧불이 루시페라아제와 NY-ESO-1 펩티드 항원을 발현하는 A375 세포와 함께 배양하였다. 공동 배양은 72시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 수행하였다. 음성대조군으로는 hIgG1 항체를 사용하였다. hIgG1, 티라글루탐 또는 AHPVR-34의 존재 하에 인간 T 세포 배양 배지 (RPMI + 10% FBS + 20mM HEPES + 1X GlutaMAX + 1X MEM NEAA + 1mM 피루브산 나트륨 + 1% 페니실린 스트렙토마이신)에서 진행하였다. 이어서, 루시페라아제 활성의 손실을 측정함으로써 종양세포 세포독성을 결정하였다.

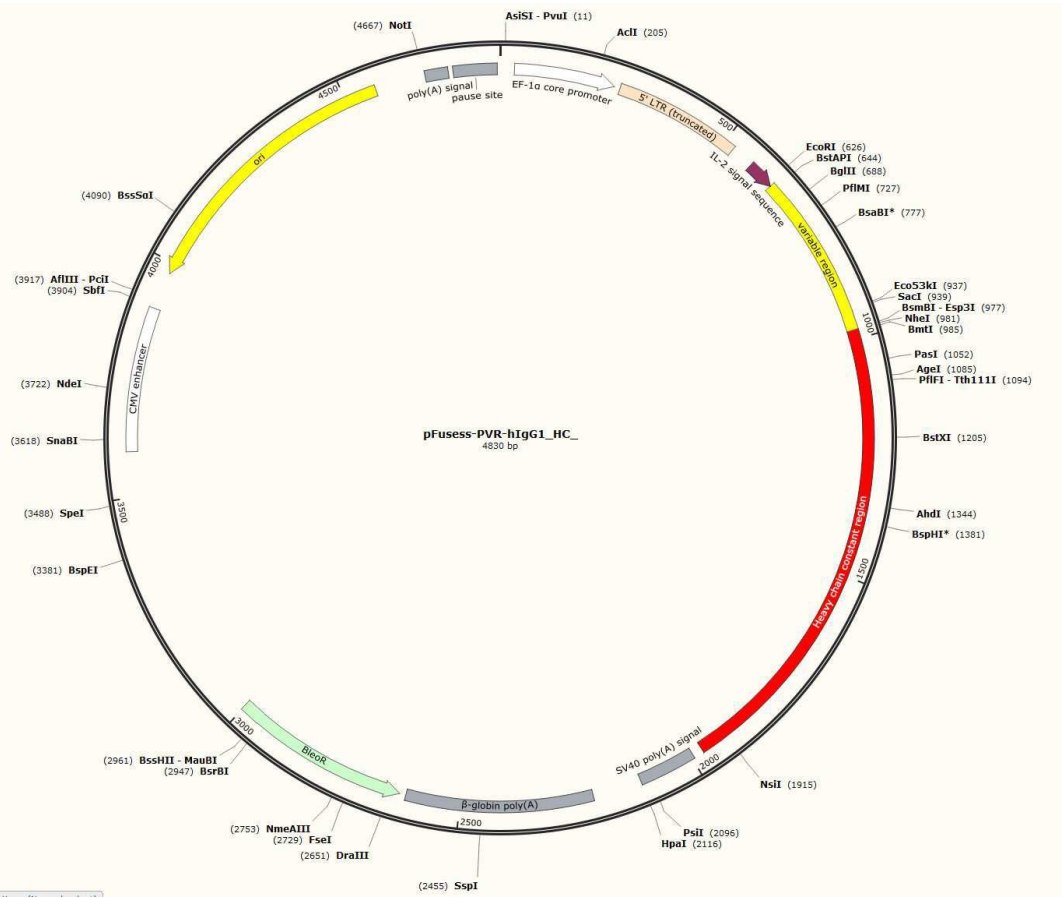
[0144] 공동 배양 후 세포 용해 용액 (25mM 트리스 인산염 (pH 7.8) + 2mM DTT + 2mM 1,2- 다이아미노사이클로헥세인-N,N,N',N' 테트라아세트산 + 10% 글리세롤 + 1% 트리톤® X-100) 을 50ul/웰 처리한 후 10분 뒤, 루시페라아제의 기질인 D-루시페린이 첨가된 루시페라아제 반응 버퍼(PBS)를 50ul/웰 처리하여 세포 용해물에서 방출된 발광 신호를 루시페라아제 분석 시스템 (GloMax® Discover Microplate Reader) 을 사용하여 정량화하였다.

[0145] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 음성 대조군인 hIgG1을 5ug/ml, 10ug/ml 이용한 경우 모두 세포 사멸 활성이 약 5%인 것에 반해, 티라글루탐을 5ug/ml, 10ug/ml 사용한 경우 각각 약 12%, 14%였고, 본 발명의 항체를 5ug/ml, 10ug/ml 사용한 경우 약 15%, 18%의 세포 사멸 활성을 나타냈다. 즉, 본 발명의 항체를 이용하는 경우, 기존에 알려진 면역 항암제인 티라글루탐보다 동일한 양을 처리하더라도 더욱 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다. 해당 결과는 PVR과 TIGIT이 상호 결합하여 T 세포의 활성을 조절하더라도, 암세포 발현 PVR을 차단하는 접근 방법이 T 세포 발현 TIGIT을 차단하는 접근 방법보다 T 세포의 항암 효능을 더 증진시킬 수 있다는 가능성을 제시한다.

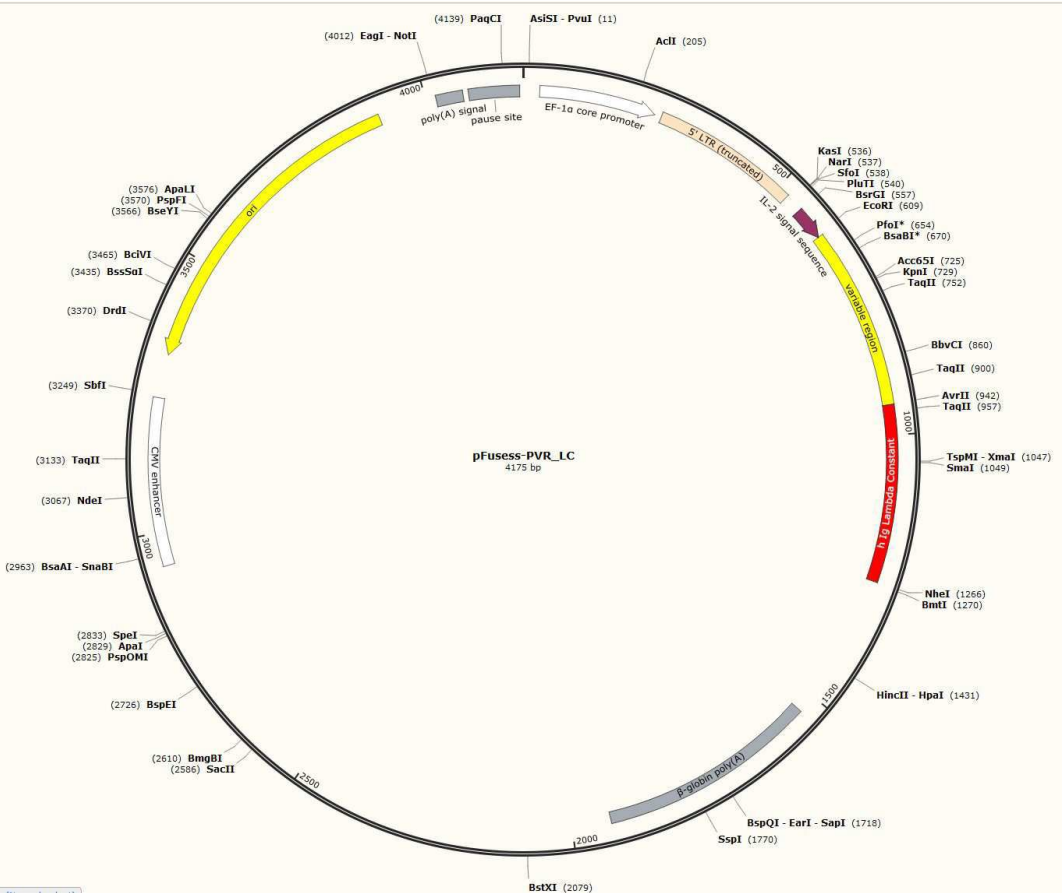
[0147] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

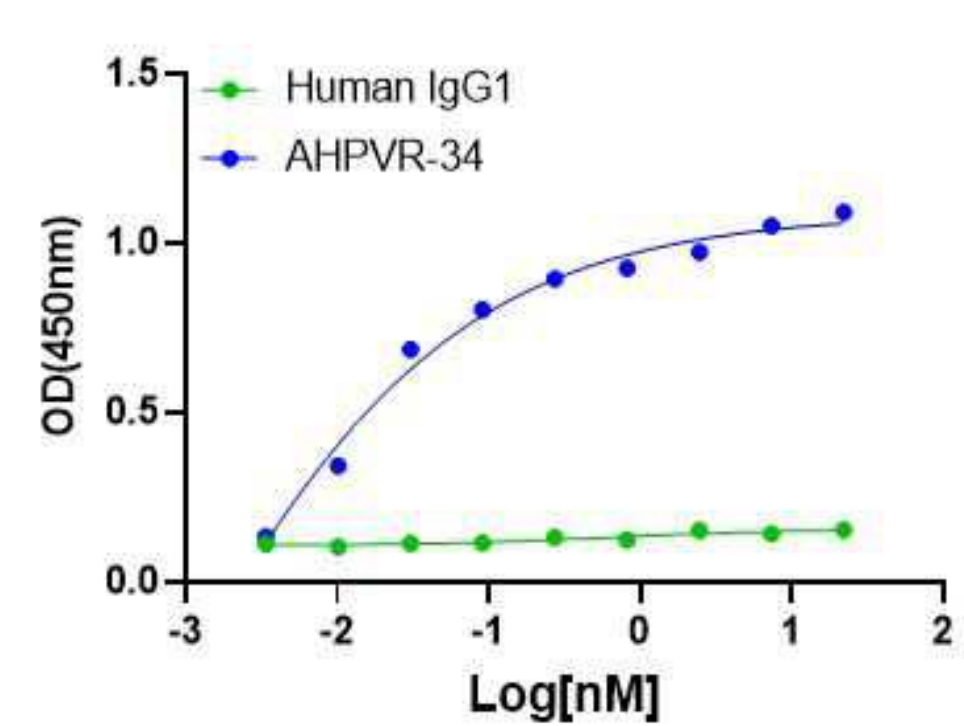
도면1



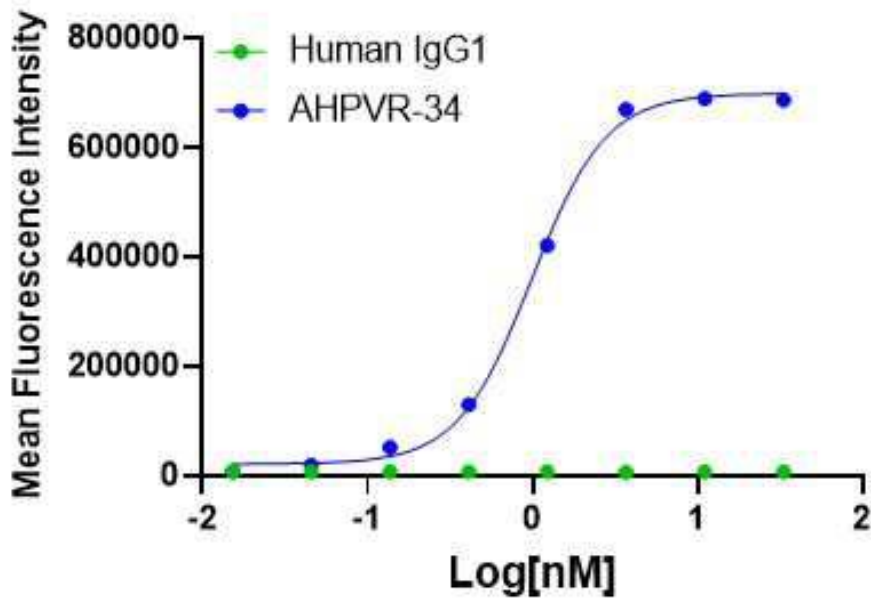
도면2



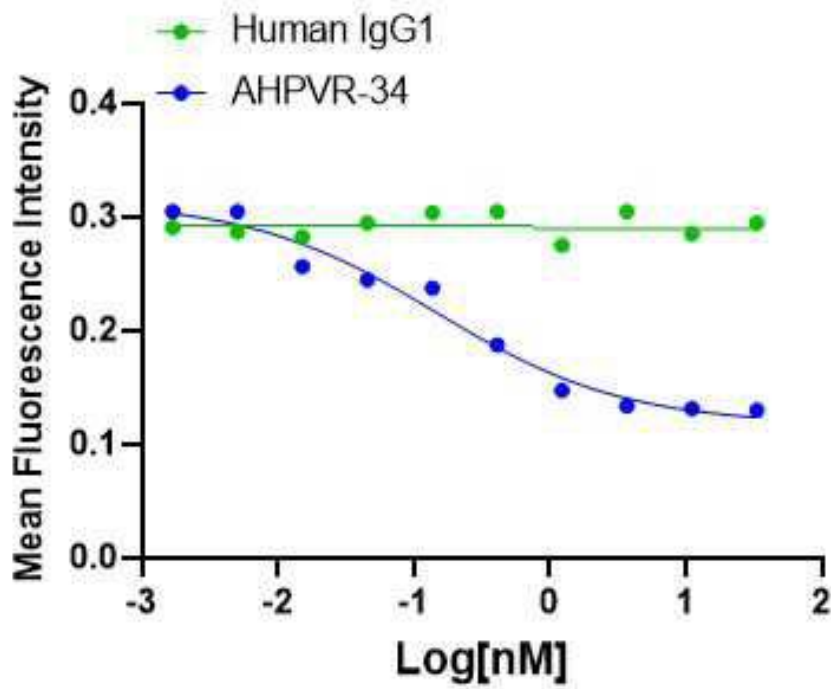
도면3



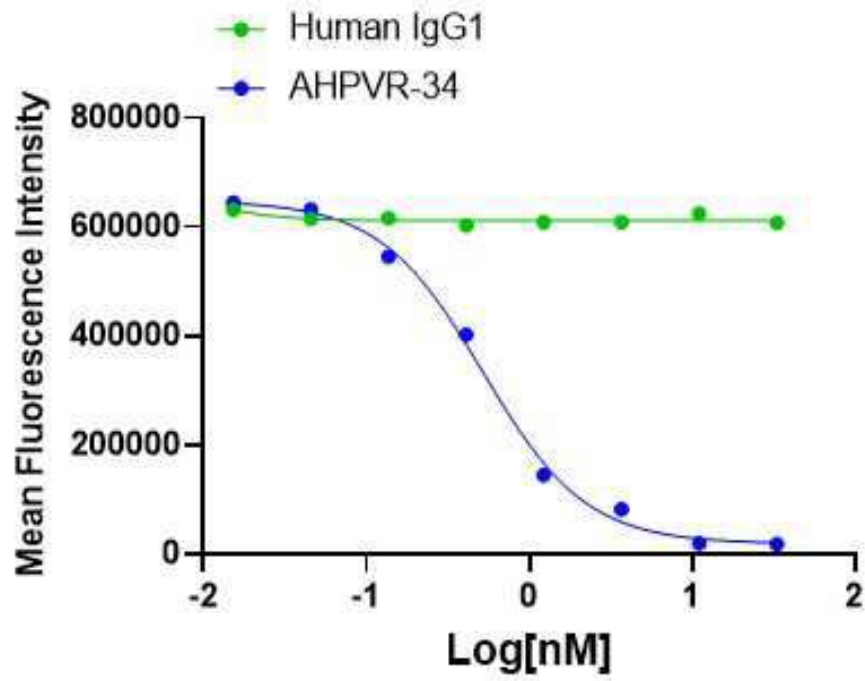
도면4



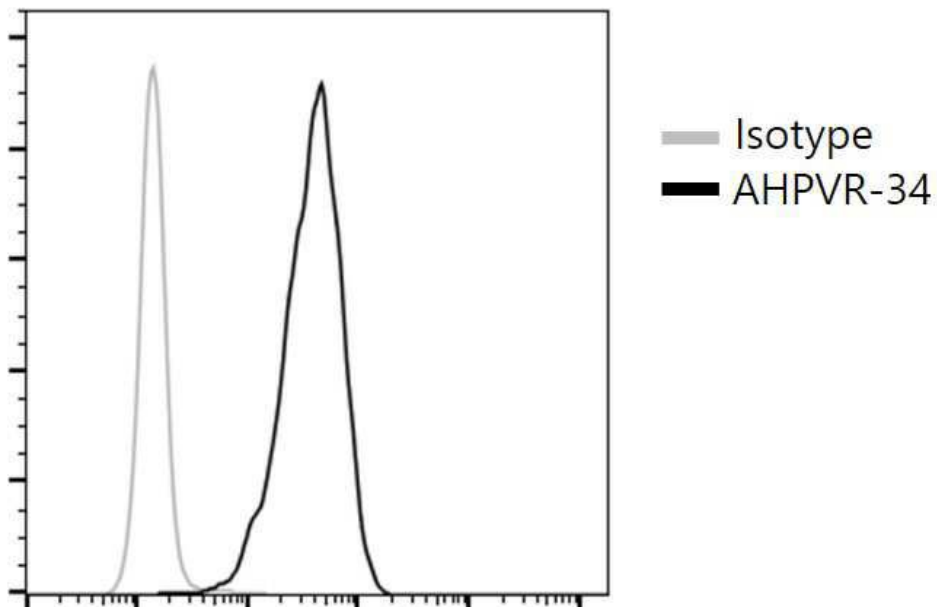
도면5



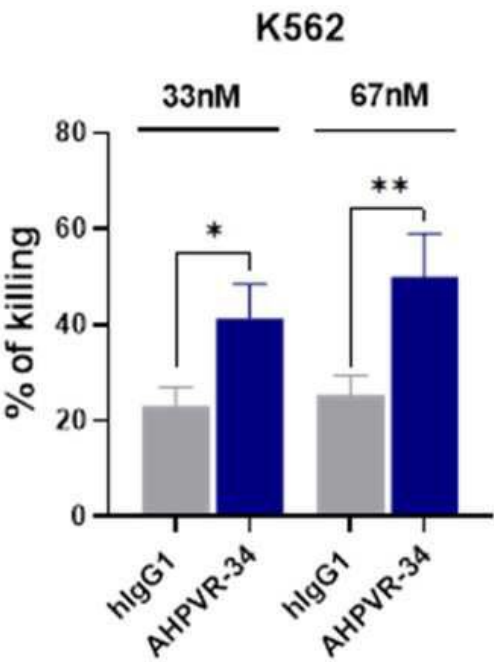
도면6



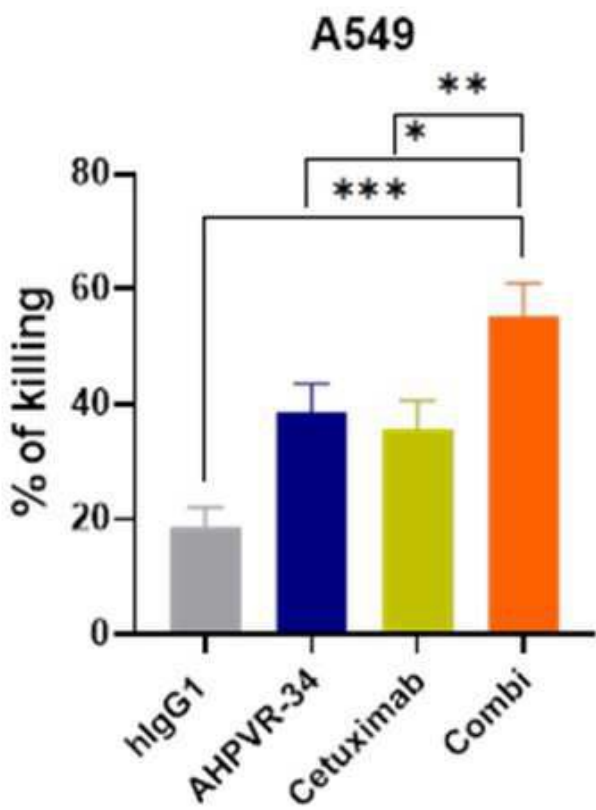
도면7



도면8



도면9



도면10

