(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0168469
(43) 공개일자 2024년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 31/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7038243(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년07월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7038493
원출원일자(국제) 2013년07월02일
심사청구일자 2023년12월08일
(85) 번역문제출일자 2024년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/048999
(87) 국제공개번호 WO 2014/008218
국제공개일자 2014년01월09일
(30) 우선권주장
61/667,058 2012년07월02일 미국(US)

(71) 출원인
브리스톨-마이어스 스퀴브 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
론베르그, 닐스
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 베이 로드 700 브리스톨-마이어스 스퀴브 컴퍼니 내
스리니바산, 모한
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 베이 로드 700 브리스톨-마이어스 스퀴브 컴퍼니 내
(74) 대리인
양영준, 이귀동

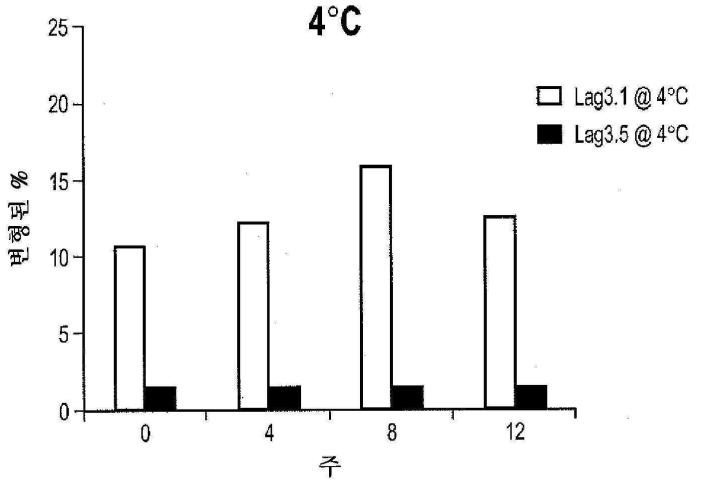
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3)에 결합하는 항체의 최적화, 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은, LAG-3에 특이적으로 결합하고, 이전에 기재된 항-LAG-3 항체, 예컨대 항체 25F7 (US 2011/0150892 A1)과 비교하여 최적화된 기능적 특성을 갖는 단리된 모노클로날 항체를 제공한다. 이들 특성은, 인간 LAG-3에 대한 고친화도 결합을 여전히 유지하면서, 탈아미드화 부위가 감소되는 것, 및 물리적 (즉, 열 및 화학적) 안정성을 포함한다. 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주 세포 및 본 발명의 항체를 발현시키는 방법, 뿐만 아니라 항체를 포함하는 면역접합체, 이중특이적 분자 및 제약 조성물이 또한 제공된다. 본 발명은 또한 본 발명의 항-LAG-3 항체를 사용하여 LAG-3을 검출하는 방법, 뿐만 아니라 치료하는 방법, 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 항체가 적어도 하나의 추가의 면역자극 항체와 공-투여되는 것인 조합 요법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도11a



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이러스 감염이 대상체에서 치료되도록, 인간 LAG-3에 결합하고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 12의 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는 것인, 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분; 상기 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 및 2차 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 이중특이적 분자; 또는 치료제에 연결된 상기 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 면역접합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 바이러스 감염을 치료하는 방법.

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 치료 항체는 제약 업계의 가장 빠르게 성장하는 분야 중 하나이다. 효력 (즉, 활성)을 유지하고 면역원성을 최소화하기 위해, 항체 및 다른 단백질 약물은 제조 및 저장 동안 물리적 및 화학적 분해로부터 보호되어야 한다. 실제로, 항체 치료제 개발에서의 주된 어려움 중 하나는 대상체에게 투여했을 때 빠른 클리어런스를 유발하거나 또는 심지어 아나필락시스성 쇼크를 비롯한 생명을 위협하는 부작용을 유도할 수 있는 잠재적인 면역원성 반응이다. 다양한 요인, 예컨대 항체의 생리화학적 특성 (예를 들어, 순도, 안정성 또는 가용성), 임상 요인 (예를 들어, 용량, 투여 경로, 질환의 이질성 또는 환자 특징) 및 다른 작용제와의 병용 치료가 항체의 면역원성에 영향을 미친다 (Swann et al. (2008) Curr Opinion Immuol 20:493-499).

[0002] 항체의 면역원성 및/또는 항체 활성의 상실은 종종 탈아미드화에 기인한다. 탈아미드화는 단백질 (예를 들어, 항체)에서 자발적으로 발생하는 화학적 분해 과정이다. 탈아미드화는 아미노산 잔기, 예컨대 아스파라긴 및 글루타민으로부터 아미드 관능기를 제거함으로써 그의 아미드-함유 측쇄를 손상시킨다. 이는 다시 단백질 전반에 걸친 구조적 및 생물학적 변경을 야기함으로써 항체의 불균일 형태를 생성한다. 탈아미드화는 재조합적으로 생산된 치료 항체에서 발생하는 가장 통상적인 번역후 변형 중 하나이다.

[0003] 예를 들어, 세포 배양 동안의 탈아미드화에 기인한 모노클로날 항체 h1B4 (인간화 항-CD18 항체)의 중쇄에서의 불균일성이 티사이(Tsai) 등 (Pharm Res 10(11):1580 (1993))에 의해 보고되어 있다. 또한, 탈아미드화에 기인한 생물학적 활성의 감소/상실은 인식된 문제였다. 예를 들어, 크룬(Kroon) 등은 치료 항체 OKT3에서 몇몇 탈아미드화 부위를 특성화하였고, OKT3 생산 로트의 샘플 (14개월 내지 3년 경과된 것)의 활성이 75% 미만으로 저하되었음을 보고하였다 (Pharm Res 9(11):1386 (1992), 1389페이지, 두 번째 열). 또한, 그의 맵에서 대량의 산화된 펩티드를 나타내는 OKT3의 샘플은 항원 결합 효력 검정에서 유의하게 감소된 활성을 가졌다 (1390페이지, 첫 번째 열). 저자는 OKT3의 저장 시 발생하는 화학적 변형의 특정한 부위가 펩티드 맵핑에 의해 확인되었고, 항체의 화학적 분석 및 생물학적 검정에서 관찰된 변화와 상관관계가 있는 것으로 결론지었다 (1392페이지, 첫 번째 열). 생물학적 활성의 상실은 또한 재조합 인간 DNase (Cacia et al. (1993) J. Chromatogr. 634:229-239) 및 재조합 가용성 CD4 (Teshima et al. (1991) Biochemistry 30:3916-3922)를 비롯한 다른 다양한 탈아미드화 치료 단백질에 대해 보고되어 있다.

[0004] 전체적으로, 탈아미드화는 제약 업계에 중요하고 예측불가능한 문제를 제시한다. 특히, 항체 치료제 내의 탈아미드화에 의해 야기되는 가변성을 모니터링하는 것과 연관된 노력, 뿐만 아니라 이 가변성과 연관된 FDA 우려는 비용을 증가시키고, 임상 시험을 지연시킨다. 또한, 재조합 생산과 연관된 조건 (예를 들어, 온도, pH 및 세포 유형)의 변화 및/또는 탈아미드화에 민감한 아미노산의 변경 (예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발)을 비롯한, 상기 쟁점을 다루는 변형은, 특히 항체의 상보성 결정 영역 (CDR) 내에서 변화가 일어날 때, 안정성 및 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 치료 항체의 보다 안정한 버전에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0005] 개요

[0006] 본 발명은, LAG-3 (예를 들어, 인간 LAG-3)에 결합하고, 이전에 기재된 항-LAG-3 항체와 비교하여 최적화된 물

리적 안정성을 갖는 단리된 모노클로날 항체 (예를 들어, 인간 모노클로날 항체)를 제공한다. 특히, 본 발명은 비변형된 항체와 비교하여 유의하게 개선된 열 및 화학적 안정성을 나타내는 항체 25F7 (US 2011/0150892 A1)의 변형된 형태에 관한 것이다. 구체적으로, 항체 25F7의 중쇄 CDR2 도메인의 결정적 결합 영역을 변경함으로써, 변형된 항체는 유의하게 더 높은 물리적 및 열 안정성, 감소된 탈아미드화, 더 높은 열 가역성 및 더 낮은 응집을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 동시에, 변형된 항체는 예상외로 동일하게 높은 비변형된 항체의 인간 LAG-3에 대한 결합 친화도 및 기능적 활성, 예컨대 주요 조직적합성 (MHC) 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하고 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 능력을 유지하는 것으로 관찰되었다. 변형된 항체의 실질적 안정성 증가 및 결합/생물학적 활성 유지의 조합은, 특히 항체 기능에 대한 CDR 영역의 중요성에 비추어 볼 때 놀라웠다.

[0007] 본 발명의 항체는 종양-보유 또는 바이러스-보유 대상체에서의 LAG-3 단백질의 검출 및 항원-특이적 T 세포 반응의 자극을 비롯한 다양한 적용에 사용될 수 있다.

[0008] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 단리된 모노클로날 항체 (예를 들어, 인간 항체) 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 (예를 들어, 각각 서열 15, 16 및 17)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 (예를 들어, 각각 서열 18, 19 및 20)을 추가로 포함한다.

[0009] 바람직한 실시양태에서, 항체는 적어도 25F7과 동일한 인간 LAG-3에 대한 결합 친화도를 여전히 유지하면서, 항체 25F7과 비교하여 증가된 물리적 특성 (즉, 열 및 화학적 안정성)을 나타낸다. 예를 들어, 항체는 적어도 약 1×10^{-7} M 이하의 K_D (보다 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하의 K_D, 5×10^{-9} M 이하의 K_D, 또는 1×10^{-9} M 이하의 K_D)의 인간 LAG-3에 대한 결합 친화도를 여전히 유지하면서, 항체 25F7과 비교하여 감소된 탈아미드화에 기인한 중쇄 CDR2 영역에서의 서열 가변성, 예를 들어 4℃에서 12주 후에 (즉, 본원에 기재된 바와 같은 "실시간" 안정성 연구 하에) 아미노산 서열의 대략 2.5% 이하의 변형 및/또는 40℃에서 12주 후에 (즉, 본원에 기재된 바와 같은 가속화된 스트레스 조건 하에) 아미노산 서열의 대략 12.0% 이하의 변형을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 pH8.0의 PBS 중에서 적어도 약 40%의 열 가역성을 나타낸다.

[0010] 또 다른 실시양태에서, 항체는 비변형된 항체와 비교하여 더 높은 용융 온도 (생체내에서의 더 큰 전체 안정성을 가리킴)을 보유한다 (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). 한 실시양태에서, 항체는 60℃ 초과, 예를 들어 65℃ 초과, 또는 70℃ 초과의 T_{M1} (초기 언폴딩 온도)을 나타낸다. 항체의 융점은 시차 주사 열량측정법 (Chen et al. (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) Immunol Lett 68:47-52) 또는 원평광 이색성 (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0011] 또 다른 실시양태에서, 항체는 빠른 분해에 대한 그의 저항성을 특징으로 한다. 항체의 분해는 모세관 전기영동 (CE) 및 MALDI-MS를 사용하여 측정할 수 있다 (Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

[0012] 또 다른 실시양태에서, 항체는 최소 응집 효과, 예를 들어 25% 이하, 예컨대 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 4% 이하의 응집을 나타낸다. 응집은 원치 않는 면역 반응의 촉발 및/또는 변경되거나 또는 불리한 약동학적 특성을 유발할 수 있다. 응집은 크기-배제 칼럼 (SEC), 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및 광 산란을 비롯한 몇몇 기술에 의해 측정할 수 있다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 항체는 하기 특성:

[0014] (a) 원숭이 LAG-3에 대한 결합;

[0015] (b) 마우스 LAG-3에 대한 결합의 결여;

[0016] (c) 주요 조직적합성 (MHC) 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합의 억제; 및

[0017] (d) 면역 반응, 특히 항원-특이적 T 세포 반응의 자극

[0018] 중 적어도 하나를 추가로 나타낸다.

[0019] 바람직하게는, 항체는 특성 (a), (b), (c) 및 (d) 중 적어도 2개를 나타낸다. 보다 바람직하게는, 항체는 특성

(a), (b), (c) 및 (d) 중 적어도 3개를 나타낸다. 훨씬 더 바람직하게는, 항체는 특성 (a), (b), (c) 및 (d) 중 4개 모두를 나타낸다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 항체는 항원-특이적 T 세포 반응, 예컨대 항원-특이적 T 세포 반응에서의 인터류킨-2 (IL-2) 생산을 자극한다. 다른 실시양태에서, 항체는 면역 반응, 예컨대 항종양 반응 (예를 들어, 생체내 종양 이식편 모델에서의 종양 성장의 억제) 또는 자가면역 반응 (예를 들어, NOD 마우스에서의 당뇨병의 발병)을 자극한다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 PGHPLAPG (서열 21)를 포함하는 인간 LAG-3의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 HPAAPSSW (서열 22) 또는 PAAPSSWG (서열 23)를 포함하는 인간 LAG-3의 에피토프에 결합한다.

[0022] 다른 실시양태에서, 항체는 면역조직화학에 의해 뇌하수체 조직을 염색하거나, 또는 면역조직화학에 의해 뇌하수체 조직을 염색하지 않는다.

[0023] 본 발명의 항체는 중쇄간 디술피드 가교 불균일성이 감소되거나 또는 제거되도록, 임의로 중쇄 불변 영역 힌지 영역 내에 (문헌 [Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105-108]에 기재된 바와 같은 위치 241에 상응하는 위치에서) 세린에서 프롤린으로의 돌연변이를 갖는, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4 이소형의 전장 항체일 수 있다. 한 측면에서, 불변 영역 이소형은 아미노산 잔기 228에서의 돌연변이, 예를 들어 S228P를 갖는 IgG4이다. 대안적으로, 항체는 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab' 또는 Fab'2 단편, 또는 단일 쇄 항체일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체 (또는 그의 항원-결합 부분)는 항체에 연결된 치료제, 예를 들어 세포독소 또는 방사성 동위원소를 포함하는 면역접합체의 일부이다. 또 다른 측면에서, 항체는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 기능적 모이어티 (예를 들어, 2차 항체)를 포함하는 이중특이적 분자의 일부이다.

[0025] 임의로 제약상 허용되는 담체 중에 제제화된 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 면역접합체 또는 이중특이적 분자를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.

[0026] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 (예를 들어, 가변 영역 및/또는 CDR)을 코딩하는 핵산 분자, 뿐만 아니라 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 이러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 이러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 사용하여 항-LAG-3 항체를 제조하는 방법이 또한 제공되고, 이는 (i) 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 단계, 및 (ii) 숙주 세포로부터 항체를 단리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-LAG-3 항체를 사용하여 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 항원-특이적 T 세포 반응이 자극되도록, T 세포를 본 발명의 항체와 접촉시킴으로써 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포에 의한 인터류킨-2 생산이 자극된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 종양-보유 대상체이고, 종양에 대한 면역 반응이 자극된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 바이러스-보유 대상체이고, 바이러스에 대한 면역 반응이 자극된다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 종양의 성장이 대상체에서 억제되도록, 대상체에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 바이러스 감염이 대상체에서 치료되도록, 대상체에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 이들 방법은 본 발명의 조성물, 이중특이적 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다.

[0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, 예를 들어 종양 성장을 억제하기 위해 또는 항바이러스 반응을 자극하기 위해 면역 반응이 대상체에서 자극되도록, 대상체에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 및 적어도 하나의 추가의 면역자극 항체, 예컨대 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 추가의 면역자극 항체는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 추가의 면역자극제는 항-PD-L1 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 추가의 면역자극제는 항-CTLA-4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 시토카인 (예를 들어, IL-2 및/또는 IL-21) 또는 공동자극 항체 (예를 들어, 항-CD137 및/또는 항-GITR 항체)와 함께 투여된다. 항체는, 예를 들어 인간, 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 방법에 사용하기 위한, 또는 상기 방법에 사용하기 위한 (예를 들어, 치료를 위한) 의약의 제조를 위한, 본 발명의 항-LAG-3 항체 및 조성물을 제공한다.

[0031] 본 개시내용의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이고, 이들은 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다. 본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 진뱅크(Genbank) 등록물, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 명확하게 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a는 25F7 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 1) 및 아미노산 서열 (서열 2)을 나타낸 것이다. CDR1 (서열 5), CDR2 (서열 6) 및 CDR3 (서열 7) 영역이 선으로 표시되어 있고, V, D 및 J 배선 유래가 표시되어 있다. CDR 영역은 카바트(Kabat) 시스템 (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)을 사용하여 선으로 표시되어 있다.

도 1b는 25F7 인간 모노클로날 항체의 카파 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 3) 및 아미노산 서열 (서열 4)를 나타낸 것이다. CDR1 (서열 8), CDR2 (서열 9) 및 CDR3 (서열 10) 영역이 선으로 표시되어 있고, V 및 J 배선 유래가 표시되어 있다. 항체 25F7의 전장 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 32 및 34에 나타낸다.

도 2a는 LAG3.5 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 (서열 12)을 나타낸 것이다. CDR1 (서열 15), CDR2 (서열 16) 및 CDR3 (서열 17) 영역이 선으로 표시되어 있다. 항체 LAG3.5의 전장 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 35 및 37에 나타낸다.

도 2b는 LAG3.5 모노클로날 항체의 카파 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 13) 및 아미노산 서열 (서열 14)을 나타낸 것이다. CDR1 (서열 18), CDR2 (서열 19) 및 CDR3 (서열 20) 영역이 선으로 표시되어 있다.

도 3은 항체 25F7 (LAG3.1)의 CDR2 중쇄 가변 영역 서열 (서열 41) 및 상응하는 인간 배선 서열 (서열 27)의 아미노산 서열과 비교한, LAG-3 변이체 LAG3.5 (서열 42), LAG3.6 (서열 43), LAG3.7 (서열 44) 및 LAG3.8 (서열 45)의 CDR2 중쇄 가변 영역 서열의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. LAG3.5의 CDR2 중쇄 가변 영역은 (아스파라긴 (N)에 대한) 위치 54에서의 아르기닌 (R) 및 (아스파라긴 (N)에 대한) 위치 56에서의 세린 (S)에 의해 25F7의 CDR2 중쇄 가변 영역과 상이하다. LAG3.5 및 25F7의 나머지 CDR은 동일하다. 도 3은 또한 서열 40을 개시한다.

도 4a 및 4b는 활성화된 인간 CD4+ T 세포에 대한 항체 LAG3.1 (25F7), LAG3.2, LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 및 LAG3.8의 결합 활성 (각각 EC_{50} 및 친화도)을 나타내는 그래프이다. 도 4b는 출현 순서대로 각각 서열 41, 42, 45, 44 및 43을 개시한다.

도 5a, b, c, d 및 e는 각각 항체 LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 및 LAG3.8의 열 용융 곡선 (즉, 열 안정성)을 나타내는 그래프이다.

도 6a, b, c, d 및 e는 각각 항체 LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 및 LAG3.8의 열 가역성 곡선 (즉, 열 안정성)을 나타내는 그래프이다.

도 7은 활성화된 인간 CD4+ T 세포 및 항원 결합 (비아코어(Biacore))에 대한 항체 LAG3.1 (25F7) 및 LAG3.5의 결합 활성을 나타내는 그래프이다.

도 8은 본원에 기재된 바와 같은 가속화된 스트레스 조건 하에 5일 동안 인큐베이션한 후의 탈아미드화 및 이성질체화를 반영하는 항체 LAG3.1 (25F7) 및 LAG3.5에 대한 질량-분광측정법 (화학적 변형/분자 안정성)을 사용한 펩티드 맵핑의 결과를 나타낸 것이다. 도 8은 출현 순서대로 각각 서열 46-52를 개시한다.

도 9는 항체 LAG3.1 (25F7) 및 LAG3.5의 친수성 프로파일을 비교하는 그래프이다.

도 10a, b, c 및 d는 4℃ 및 40℃, 즉 본원에 기재된 바와 같은 가속화된 스트레스 조건 및 "실시간" 안정성 연구 둘 다에서의 항체 LAG3.1 및 LAG3.5의 친화도 및 물리적 안정성 (즉, 열 및 화학적 안정성)을 비교하는 그래프이다.

도 11a 및 b는 4℃ 및 40℃에서의 항체 LAG3.1 및 LAG3.5의 아미노산 서열의 변형 퍼센트를 비교하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 개시내용을 보다 용이하게 이해할 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시되어 있다.

[0034] 용어 "25F7", "항체 25F7", "항체 LAG3.1" 및 "LAG3.1"은 US2011/0150892 A1에 기재된 항-인간 LAG-3 항체를 지칭한다. 25F7 (LAG3.1)의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 1) 및 상응하는 아미노산 서열 (서열 2)은 (각각 서열 4, 5 및 7로서 지정된 CDR 서열과 함께) 도 1a에 나타낸다. 25F7 (LAG3.1)의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 3) 및 상응하는 아미노산 서열 (서열 4)은 (각각 서열 8, 9 및 10으로서 지정된 CDR 서열과 함께) 도 1b에 나타낸다.

[0035] 용어 "LAG-3"은 림프구 활성화 유전자-3을 지칭한다. 용어 "LAG-3"은 변이체, 이소형, 상동체, 오르토로그 및 파라로그를 포함한다. 예를 들어, 인간 LAG-3 단백질에 특이적인 항체는, 특정 경우에 인간 이외의 종으로부터의 LAG-3 단백질과 교차-반응할 수 있다. 다른 실시양태에서, 인간 LAG-3 단백질에 특이적인 항체는 인간 LAG-3 단백질에 완전히 특이적일 수 있고, 종 또는 다른 유형의 교차-반응성을 나타내지 않을 수 있거나, 또는 모든 다른 종이 아닌 다른 특정 종으로부터의 LAG-3과 교차-반응할 수 있다 (예를 들어, 원숭이 LAG-3과는 교차-반응하지만 마우스 LAG-3과는 교차-반응하지 않음). 용어 "인간 LAG-3"은 인간 서열 LAG-3, 예컨대 진뱅크 등록 번호 NP_002277 (서열 29)을 갖는 인간 LAG-3의 완전한 아미노산 서열을 지칭한다. 용어 "마우스 LAG-3"은 마우스 서열 LAG-3, 예컨대 진뱅크 등록 번호 NP_032505를 갖는 마우스 LAG-3의 완전한 아미노산 서열을 지칭한다. 또한, LAG-3은, 예를 들어 CD223으로서 관련 기술분야에 공지되어 있다. 인간 LAG-3 서열은, 예를 들어 보존된 돌연변이 또는 비-보존 영역 내의 돌연변이를 가짐으로써 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 인간 LAG-3과 상이할 수 있고, LAG-3은 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 인간 LAG-3과 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 갖는다. 예를 들어, 인간 LAG-3의 생물학적 기능은 본 개시내용의 항체에 의해 특이적으로 결합되는 에피토프를 LAG-3의 세포외 도메인에 갖는 것이거나 또는 인간 LAG-3의 생물학적 기능은 MHC 클래스 II 분자에 결합하는 것이다.

[0036] 용어 "원숭이 LAG-3"은 시노몰구스 원숭이 LAG-3 및 레서스 원숭이 LAG-3을 포함하지만 이에 제한되지 않는 구세계 및 신세계 원숭이에 의해 발현되는 LAG-3 단백질을 포함하는 것으로 의도된다. 원숭이 LAG-3에 대한 대표적인 아미노산 서열은 또한 진뱅크 등록 번호 XM_001108923으로서 기탁된, 레서스 원숭이 LAG-3 아미노산 서열이다. 원숭이 LAG-3의 또 다른 대표적인 아미노산 서열은 US 2011/0150892 A1에 기재된 바와 같은 클론 pa23-5의 다른 레서스 원숭이 서열이다. 상기 다른 레서스 서열은 진뱅크-기탁 서열에 비해 위치 419에서 단일 아미노산 차이를 나타낸다.

[0037] 특정한 인간 LAG-3 서열은 전형적으로 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 인간 LAG-3과 아미노산 서열이 적어도 90% 동일할 것이고, 다른 종 (예를 들어, 뮤린)의 LAG-3 아미노산 서열과 비교할 때 아미노산 서열을 인간의 것으로서 확인시켜 주는 아미노산 잔기를 함유한다. 특정 경우에, 인간 LAG-3은 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 LAG-3과 아미노산 서열이 적어도 95%, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 LAG-3 서열은 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 LAG-3 서열과 10개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 것이다. 특정 실시양태에서, 인간 LAG-3은 진뱅크 등록 번호 NP_002277의 LAG-3 서열과 5개 이하, 또는 심지어 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 수 있다. 동일성 퍼센트는 본원에 기재된 바와 같이 결정할 수 있다.

[0038] 용어 "면역 반응"은 병원체가 침입한 인간 신체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암성 세포, 또는 자가면역 또는 병적 염증의 경우에 정상 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적인 손상, 파괴 또는 제거를 유발하는, 예를 들어 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구 및 상기 세포 또는 간에 의해 생산되는 가용성 거대분자 (항체, 시토카인 및 보체 포함)의 작용을 지칭한다.

[0039] "항원-특이적 T 세포 반응"은 T 세포가 특이적인 항원으로 T 세포를 자극함으로써 발생하는 T 세포에 의한 반응을 지칭한다. 항원-특이적 자극 시의 T 세포에 의한 반응의 비제한적인 예는 증식 및 시토카인 생산 (예를 들어, IL-2 생산)을 포함한다.

[0040] 본원에 언급된 바와 같은 용어 "항체"는 전체 항체 및 그의 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 단일 쇄를 포함한다. 전체 항체는 디술피드 결합에 의해 상호-연결되어 있는 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에 V_H라 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에 V_L이라 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 추가로 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역

(CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 세분화될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 숙주 조직 또는 인자, 예컨대 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 전통적 보체계의 제1 성분 (C1q)에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 항체의 "항원-결합 부분" (또는 간단히 "항체 부분")이라는 용어는 항원 (예를 들어, LAG-3 단백질)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예는 다음을 포함한다: (i) V_L, V_H, C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (vi) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546); (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및 (viii) 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 함유하는 중쇄 가변 영역인 나노바디. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인 V_L 및 V_H는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일 쇄 Fv (scFv)로서 공지됨; 예를 들어, 문헌 [Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄가 되도록 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다. 또한, 이러한 단일 쇄 항체는 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 단편은 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 존재하지 않는 항체를 지칭하도록 의도된다 (예를 들어, LAG-3 단백질에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 LAG-3 단백질 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 존재하지 않음). 그러나, 인간 LAG-3 단백질에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 LAG-3 단백질에 대한 교차-반응성을 가질 수 있다. 또한, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성물인 항체 분자 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래하는 것인 가변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 또한, 항체가 불변 영역을 함유하는 경우, 불변 영역도 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식된 것인 항체를 포함하도록 의도되는 것은 아니다.

[0045] 용어 "인간 모노클로날 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래하는 것인 가변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 비-인간 동물, 예를 들어 트랜스제닉 마우스로부터 수득되는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리되는 모든 인간 항체, 예컨대 (a) 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대하여 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말인 동물 (예를 들어, 마우스) 또는 그로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체 (하기에 추가로 기재함), (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 단리된 항체, (c) 재조합된 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 이뮤노글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 프레임워크 및 CDR 영역이 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래하는 것인 가변 영역을 갖는다.

그러나, 특정 실시양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래하고 이와 관련되지만, 자연적으로는 생체내 인간 항체 배선 레퍼토리 내에 존재할 수 없는 서열이다.

[0047] 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

[0048] 어구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 본원에서 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환가능하게 사용된다.

[0049] 용어 "인간 항체 유도체"는 인간 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어 항체와 또 다른 작용제 또는 항체의 접합체를 지칭한다.

[0050] 용어 "인간화 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 것인 항체를 지칭하도록 의도된다. 추가의 프레임워크 영역 변형이 인간 프레임워크 서열 내에서 일어날 수 있다.

[0051] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래된 것인 항체, 예컨대 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래된 것인 항체를 지칭하도록 의도된다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 "인간 LAG-3에 특이적으로 결합하는" 항체는 인간 LAG-3 단백질 (및 가능하게는 하나 이상의 비-인간 종으로부터의 LAG-3 단백질)에 결합하지만 비-LAG-3 단백질에는 실질적으로 결합하지 않는 항체를 지칭하도록 의도된다. 바람직하게는, 항체는 인간 LAG-3 단백질에 "고친화도"로, 즉 1×10^{-7} M 이하, 보다 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 보다 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하, 보다 바람직하게는 1×10^{-9} M 이하의 K_D로 결합한다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은, 단백질 또는 세포에 "실질적으로 결합하지 않는"이라는 용어는 단백질 또는 세포에 결합하지 않거나 또는 고친화도로 결합하지 않는 것, 즉 단백질 또는 세포에 1×10^{-6} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-5} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-4} M 이상, 보다 바람직하게는 1×10^{-3} M 이상, 훨씬 더 바람직하게는 1×10^{-2} M 이상의 K_D로 결합하는 것을 의미한다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "K_{assoc}" 또는 "K_a"는 특정한 항체-항원 상호작용의 회합 속도를 지칭하는 것으로 의도되는 반면, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "K_{dis}" 또는 "K_d"는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하도록 의도된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "K_D"는 K_d 대 K_a의 비 (즉, K_d/K_a)로부터 획득되는 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도되고, 몰 농도 (M)로서 표시된다. 항체에 대한 K_D 값은 관련 기술분야에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D를 측정하기 위한 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공명, 바람직하게는 바이오센서 시스템, 예컨대 비아코어® 시스템을 사용하는 것이다.

[0055] IgG 항체에 대한 용어 "고친화도"는 표적 항원에 대해 1×10^{-7} M 이하, 보다 바람직하게는 5×10^{-8} M 이하, 훨씬 더 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 훨씬 더 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하, 훨씬 더 바람직하게 1×10^{-9} M 이하의 K_D를 갖는 항체를 지칭한다. 그러나, "고친화도" 결합은 다른 항체 이소형에 대해서 달라질 수 있다. 예를 들어, IgM 이소형에 대한 "고친화도" 결합은 10^{-6} M 이하, 보다 바람직하게는 10^{-7} M 이하, 훨씬 더 바람직하게는 10^{-8} M 이하의 K_D를 갖는 항체를 지칭한다.

[0056] 용어 "탈아미드화"는 단백질 (예를 들어, 항체)에서 자발적으로 발생하는 화학적 분해 과정을 지칭한다. 탈아미드화는 아미노산 잔기, 예컨대 아스파라긴 및 글루타민으로부터 아미드 관능기를 제거함으로써 그의 아미드-함유 측쇄를 손상시킨다. 구체적으로, 아스파라긴의 측쇄는 인접 펩티드 기를 공격하여 대칭 숙신이미드 중간체를 형성한다. 중간체의 대칭은 2개의 가수분해 산물, 아스파르테이트 또는 이소아스파르테이트를 생성한다.

유사한 반응이 또한 아스파르테이트 측쇄에서 발생하여 이소아스파르테이트로의 부분적 전환을 일으킬 수 있다. 글루타민의 경우에, 탈아미드화의 비율은 일반적으로 아스파라긴보다 10배 적지만, 메카니즘은 본질적으로 동일하고, 진행되는데 물 분자만이 요구된다.

[0057] 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함하지만, 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소 및 말이 바람직하다.

[0058] 본 발명의 다양한 측면은 하기 하위섹션에서 추가로 상세히 설명된다.

[0059] 증가된 안정성 및 유리한 기능적 특성을 갖는 항-LAG-3 항체

[0060] 본 발명의 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합하고, 이전에 기재된 항-LAG-3 항체와 비교하여, 특히 항체 25F7 (LAG3.1)과 비교하여 최적화된 안정성을 갖는다. 상기 최적화는 인간 LAG-3에 대한 고친화도 결합을 여전히 유지하면서, 탈아미드화가 감소되는 것 (예를 들어, 화학적 안정성이 증가되는 것), 및 열적 재폴딩이 증가되는 것 (예를 들어, 물리적 안정성이 증가되는 것)을 포함한다.

[0061] 탈아미드화 부위를 확인하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 이온 교환, 역상 및 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및 단백질분해적 소화의 펩티드 맵핑 (LC-MS) 참조). 물리적 안정성을 측정하는데 적합한 검정은, 예를 들어 융점 및/또는 변성 후 항체 구조의 재폴딩의 분석 (예를 들어, 실시예 3, 섹션 3에 기재된 바와 같은 가역성 퍼센트)을 포함한다.

[0062] 인간 LAG-3에 대한 결합은 또한 관련 기술분야에 잘 확립된 하나 이상의 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 항체는 항체를 인간 LAG-3을 발현하는 세포주, 예컨대 그의 세포 표면 상에서 LAG-3 (예를 들어, 인간 LAG-3 또는 원숭이 LAG-3 (예를 들어, 레서스 또는 시노몰구스 원숭이) 또는 마우스 LAG-3)을 발현하도록 형질감염된 CHO 세포와 반응시키는 것인 유동 세포측정법 검정에 의해 시험될 수 있다. 유동 세포측정법 검정에서 사용하기에 적합한 다른 세포는 천연 LAG-3을 발현하는 항-CD3-자극된 $CD4^+$ 활성화된 T 세포를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 결합 동역학 (예를 들어, K_D 값)을 비롯한 항체의 결합은 비아코어 검정에서 시험될 수 있다. 또 다른 적합한 결합 검정은, 예를 들어 재조합 LAG-3 단백질을 사용하는 ELISA 검정을 포함한다.

[0063] 본 발명의 항체는 바람직하게는 1×10^{-7} M 이하, 보다 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 또는 1×10^{-9} M 이하의 K_D로 인간 LAG-3 단백질에 결합한다.

[0064] 전형적으로, 항체는 림프성 조직, 예컨대 편도, 비장 또는 흉선에서 LAG-3에 결합하고, 이는 면역조직화학에 의해 검출될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 면역조직화학에 의해 측정되는 바와 같이 뇌하수체 조직을 염색한다 (예를 들어, 뇌하수체에 잔류함). 또 다른 실시양태에서, 항체는 면역조직화학에 의해 측정되는 바와 같이 뇌하수체 조직을 염색하지 않는다 (예를 들어, 뇌하수체에 잔류하지 않음).

[0065] 추가의 기능적 특성은 다른 종으로부터의 LAG-3과의 교차-반응성을 포함한다. 예를 들어, 항체는 원숭이 LAG-3 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 레서스 원숭이)에 결합하지만, 마우스 LAG-3으로부터의 LAG-3에는 실질적으로 결합하지 않을 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 인간 LAG-3에 고친화도로 결합한다.

[0066] 다른 기능적 특성은 면역 반응, 예컨대 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 항체의 능력을 포함한다. 이는, 예를 들어 항원-특이적 T 세포 반응에서 인터류킨-2 (IL-2) 생산을 자극하는 항체의 능력을 평가함으로써 시험될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 LAG-3에 결합하고, 항원-특이적 T 세포 반응을 자극한다. 다른 실시양태에서, 항체는 인간 LAG-3에 결합하지만, 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하지 않는다. 면역 반응을 자극하는 항체의 능력을 평가하기 위한 다른 수단은, 예컨대 생체내 종양 이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력 (예를 들어, 실시예 6 참조) 또는 자가면역 반응을 자극하는 능력, 예컨대 자가면역 모델에서 자가면역 질환의 발병을 촉진하는 능력, 예를 들어 NOD 마우스 모델에서 당뇨병의 발병을 촉진하는 능력을 시험하는 것을 포함한다.

[0067] 본 발명의 바람직한 항체는 인간 모노클로날 항체이다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는, 예를 들어 키메라 또는 인간화 모노클로날 항체일 수 있다.

[0068] 모노클로날 항체 LAG3.5

[0069] 본 발명의 바람직한 항체는 하기 및 하기 실시예에 기재된 바와 같이 구조적으로 및 화학적으로 특성화된 인간

모노클로날 항체 LAG3.5이다. LAG3.5의 V_H 아미노산 서열은 서열 12 (도 2a)에 나타낸다. LAG3.5의 V_L 아미노산 서열은 서열 14 (도 2b)에 나타낸다.

[0070] 인간 LAG-3에 결합하는 다른 항-LAG-3 항체의 V_H 및 V_L 서열 (또는 CDR 서열)은 항체 LAG3.5의 V_H 및 V_L 서열 (또는 CDR 서열)과 "혼합 및 매칭"될 수 있다. 바람직하게는, V_H 및 V_L 쇄 (또는 이러한 쇄 내의 CDR)가 혼합 및 매칭되는 경우, 특정한 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 유사하게, 바람직하게는 특정한 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다.

[0071] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은

[0072] (a) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (즉, LAG3.5의 V_H); 및

[0073] (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (즉, LAG3.5의 V_L) 또는 또 다른 항-LAG-3 항체 (즉, LAG3.5와 상이한 것)의 V_L

[0074] 을 포함하며, 여기서 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합한다.

[0075] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은

[0076] (a) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 (즉, 각각 서열 15, 16 및 17인 LAG3.5의 CDR 서열); 및

[0077] (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 (즉, 각각 서열 18, 19 및 20인 LAG3.5의 CDR 서열) 또는 또 다른 항-LAG3 항체 (즉, LAG3.5와 상이한 것)의 CDR

[0078] 을 포함하며, 여기서 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합한다.

[0079] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 LAG-3에 결합하는 다른 항체의 CDR, 예를 들어 상이한 항-LAG-3 항체의 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 및/또는 CDR3, 및/또는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3과 조합된 LAG3.5의 중쇄 가변 CDR2 영역을 포함한다.

[0080] 또한, CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과는 독립적으로, CDR3 도메인은 단독으로 동족 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정할 수 있고, 공통 CDR3 서열에 기초하여 동일한 결합 특이성을 갖는 다수의 항체들을 예측가능하게 생성할 수 있다는 것이 관련 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849 (2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:2529-2533 (1995); Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996); Berezov et al., BIAjournal 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10 (1998); Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329 (1994) 및 Xu and Davis, Immunity 13:37-45 (2000)]을 참조한다. 또한, 미국 특허 번호 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 및 5,760,185를 참조한다. 각각의 이들 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0081] 따라서, 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 LAG3.5의 중쇄 가변 영역의 CDR2 및 적어도 LAG3.5의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 CDR3 (서열 17 및/또는 20), 또는 또 다른 LAG-3 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 CDR3을 포함하며, 여기서 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합할 수 있다. 이들 항체는 바람직하게는 (a) LAG3.5와 결합에 대해 경쟁하고/거나; (b) LAG3.5의 기능적 특징을 보유하고/거나; (c) LAG3.5와 동일한 에피토프에 결합하고/거나; (d) LAG3.5와 유사한 결합 친화도를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 추가로 LAG3.5의 경쇄 가변 영역의 CDR2 (서열 17 및/또는 20), 또는 또 다른 LAG-3 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR2를 포함할 수 있으며, 여기서 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 추가로 LAG3.5의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 CDR1 (서열 17 및/또는 20), 또는 또 다른 LAG-3 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 CDR1을 포함할 수 있으며, 여기서 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0082] 보존적 변형

[0083] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 LAG3.5의 것과 하나 이상의 보존적 변형에 의해 상이한 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, V_H CDR2의 잔기 54 및 56은 각각 아르기닌 및 세린으로서 남아있다 (즉, 돌연변이되지 않음). 항원 결합을 제거하지 않는 특정 보존적 서열 변형이 이루어질 수 있음은 관련 기술분야에서 이해된다. 예를 들어, 문헌 [Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. 10:341-6 및 Beers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43]을 참조한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

[0084] (a) 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 15 및/또는 그의 보존적 변형을 위치 54 및 56을 제외하고 포함하고/거나;

[0085] (b) 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 17 및 그의 보존적 변형을 포함하고/거나;

[0086] (c) 경쇄 가변 영역 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3 서열은 서열 18 및/또는 서열 19 및/또는 서열 20 및/또는 그의 보존적 변형을 포함하고;

[0087] (d) 항체는 인간 LAG-3에 특이적으로 결합한다.

[0088] 추가로 또는 대안적으로, 항체는 상기 설명된 다음의 기능적 특성, 예컨대 인간 LAG-3에 대한 고친화도 결합, 원숭이 LAG-3에 대한 결합, 마우스 LAG-3에 대한 결합의 결여, MHC 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하는 능력 및/또는 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 능력 중 하나 이상을 보유할 수 있다.

[0089] 다양한 실시양태에서, 항체는, 예를 들어 인간, 인간화 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 미치지 않거나, 또는 이를 유의하게 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하도록 의도된다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 관련 기술분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의하여 본 발명의 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체는 본원에서 설명되는 기능 검정을 사용하여 유지하고 있는 기능 (즉, 상기 제시된 기능)에 대해 시험될 수 있다.

[0091] 조작 및 변형된 항체

[0092] 본 발명의 항체는 변형된 항체를 조작하기 위해 출발 물질로서 LAG3.5의 V_H 및/또는 V_L 서열 중 하나 이상을 갖는 항체를 사용하여 제조될 수 있다. 항체는 하나 또는 둘 다의 가변 영역 (즉, V_H 및/또는 V_L), 예를 들어 하나 이상의 CDR 영역 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내의 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는, 예를 들어 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시키기 위해 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다.

[0093] 특정 실시양태에서, 항체의 가변 영역을 조작하기 위해 CDR 이식이 사용될 수 있다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 위치하는 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 개별 항체 사이에서 CDR 외부의 서열보다 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 갖는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열 상에 이식된, 특정한 자연 발생 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써 특정한 자연 발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Riechmann et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. See. U.S.A. 86:10029-

10033]; 미국 특허 번호 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).

[0094] 따라서, 본 발명의 다른 실시양태는 각각 서열 15, 16, 17을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 각각 서열 18, 19, 20을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다 (즉, LAG3.5의 CDR). 이들 항체는 모노클로날 항체 LAG3.5의 V_H 및 V_L CDR 서열을 함유하지만, 이들은 상이한 프레임워크 서열을 함유할 수 있다.

[0095] 이러한 프레임워크 서열은 배선 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 배선 DNA 서열은 "VBase" 인간 배선 서열 데이터베이스 (인터넷 웹사이트 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 이용가능) 뿐만 아니라 상기에서 언급된 문헌 [Kabat et al. (1991)]; 문헌 [Tomlinson et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 및 Cox et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836]에서 찾아볼 수 있고, 이들 각각의 내용은 본원에 명확하게 참조로 포함된다. 또 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 배선 DNA 서열은 진뱅크 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견된 하기 중쇄 배선 서열은 첨부하는 진뱅크 등록 번호로 이용가능하다: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 3-33 (NG_0010109 & NT_024637) 및 3-7 (NG_0010109 & NT_024637). 또 다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견된 하기 중쇄 배선 서열은 첨부하는 진뱅크 등록 번호로 이용가능하다: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 5-51 (NG_0010109 & NT_024637), 4-34 (NG_0010109 & NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678).

[0096] 항체 단백질 서열은 통상의 기술자에게 익히 공지된 갭(Gapped) BLAST (상기 문헌 [Altschul et al. (1997)])로 불리는 서열 유사성 검색 방법 중의 하나를 사용하여 컴파일링된 단백질 서열 데이터베이스에 대해 비교한다.

[0097] 본 발명의 항체에 사용하기 위한 바람직한 프레임워크 서열은 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 프레임워크 서열과 구조적으로 유사한 것, 예를 들어 본 발명의 바람직한 모노클로날 항체에 의해 사용되는 V_H 4-34 프레임워크 서열 및/또는 V_K L6 프레임워크 서열과 유사한 것이다. V_H CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 그로부터 프레임워크 서열이 유래하는 배선 이뮤노글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 프레임워크 영역 상에 이식될 수 있거나, 또는 CDR 서열은 배선 서열에 비해 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 프레임워크 영역 상에 이식될 수 있다. 예를 들어, 특정 경우에 항체의 항원 결합 능력을 유지하거나 또는 증진시키기 위하여 프레임워크 영역 내에서 잔기를 돌연변이시키는 것이 유리하다고 밝혀졌다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).

[0098] 또 다른 유형의 가변 영역 변형은 V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 관심있는 항체의 하나 이상의 결합 특성 (예를 들어, 친화도)을 개선하기 위한 것이다. 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발이 돌연변이(들)를 도입하기 위해 수행될 수 있고, 항체 결합에 대한 효과, 또는 관심있는 다른 기능적 특성은 본원에 기재되고 실시예에서 제공되는 것과 같이 시험관내 또는 생체내 검정으로 평가될 수 있다. 바람직하게는, 보존적 변형 (상기 논의된 바와 같음)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있지만, 치환이 바람직하다. 또한, 전형적으로 CDR 영역 내에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0099] 따라서, 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 15, 또는 서열 15와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; (b) 서열 16, 또는 서열 16과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역 (여기서 위치 54 및 56은 바람직하게는 서열 16에서의 것과 동일함); (c) 서열 17, 또는 서열 17과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 영역; (d) 서열 18, 또는 서열 18과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 영역; (e) 서열 19, 또는 서열 19와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 영역; 및 (f) 서열 20, 또는 서열 20과 비교하여 1, 2, 3, 4

또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항-LAG-3 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0100] 본 발명의 조작된 항체는 V_H 및/또는 V_L 내의 프레임워크 잔기를 변형시켜, 예를 들어 항체의 특성을 개선한 것을 포함한다. 전형적으로, 이러한 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이루어진다. 예를 들어, 한가지 접근법은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 배선 서열로 "복귀돌연변이"시키는 것이다. 보다 구체적으로, 체세포 돌연변이를 거친 항체는 그로부터 항체가 유래하는 배선 서열과 상이한 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 잔기는 항체 프레임워크 서열을 그로부터 항체가 유래하는 배선 서열과 비교함으로써 확인될 수 있다.

[0101] 또 다른 유형의 프레임워크 변형은 프레임워크 영역 내의, 또는 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내의 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거함으로써 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키는 것을 수반한다. 이러한 접근법은 또한 "탈면역화"로서 지칭되고, 미국 특허 공개 번호 20030153043에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0102] 프레임워크 또는 CDR 영역 내에서 이루어진 변형에 추가로 또는 대안적으로, 본 발명의 항체는 전형적으로 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포성 세포독성을 변경하기 위하여 Fc 영역 내에 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형될 수 있거나 (예를 들어, 하나 이상의 화학적 모이어티를 항체에 부착시킬 수 있음), 그의 글리코실화를 변경시키고, 다시 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경시키기 위하여 변형될 수 있다. 각각의 이들 실시양태는 하기에 추가로 상세히 기재된다. Fc 영역에서 잔기의 넘버링은 카바트의 EU 인덱스의 것이다.

[0103] 바람직한 실시양태에서, 항체는 중쇄 불변 영역의 힌지 영역 내의 위치 228에 상응하는 위치에 세린의 프롤린으로의 돌연변이 (S228P; EU 인덱스)를 포함하는 IgG4 이소형 항체이다. 상기 돌연변이는 힌지 영역 내의 중쇄간 디술피드 가교의 불균일성을 제거하는 것으로 보고되어 있다 (상기 문헌 [Angal et al.]; 위치 241은 카바트 넘버링 시스템을 기초로 함).

[0104] 한 실시양태에서, CH1의 힌지 영역이 변형되어 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 수가 변경, 예를 들어 증가 또는 감소된다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,677,425에 추가로 기재되어 있다. CH1의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 수는, 예를 들어 경쇄 또는 중쇄의 어셈블리를 촉진하거나, 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키도록 변경된다.

[0105] 또 다른 실시양태에서, 항체의 Fc 힌지 영역은 돌연변이되어 항체의 생물학적 반감기를 감소시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 영역에 도입되어, 항체는 천연 Fc-힌지 도메인 스타필로코실 단백질 A (SpA) 결합에 비해 손상된 SpA 결합을 갖게 된다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 6,165,745에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0106] 또 다른 실시양태에서, 항체는 변형되어 그의 생물학적 반감기가 증가된다. 다양한 접근법이 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,277,375에 기재된 바와 같이, 다음 돌연변이 중 하나 이상이 도입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 대안적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해서, 항체는 미국 특허 번호 5,869,046 및 6,121,022에 기재된 바와 같이, IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 유도된 샐비지 수용체 결합 에피토프를 함유하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 적어도 1개의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체함으로써 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시킴으로써 변경된다. 예를 들어, 항체가 이펙터 리간드에 대한 변경된 친화도를 갖지만 모 항체의 항원-결합 능력은 보유하도록, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 그에 대한 친화도가 변경된 이펙터 리간드는, 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,624,821 및 5,648,260에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0108] 또 다른 예에서, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 또는 제거된 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 갖도록 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산을 상이한 아미노산 잔기로 대체할 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 6,194,551에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0109] 또 다른 예에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 변경시킴으로써 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경시킬 수 있다. 이러한 접근법은 PCT 공개 WO 94/29351에 추가로 기재되어 있다.

[0110] 또 다른 예에서, Fc 영역은 항체가 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하는 능력을 증가시키고/시키거나, 하기 위치의 1개 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 Fcɣ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키도록 변형된다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 접근법은 PCT 공개 WO 00/42072에 추가로 기재되어 있다. 또한, 인간 IgG1 상의 FcɣR1, FcɣRII, FcɣRIII 및 FcRn에 대한 결합 부위는 맵핑되어 있고, 결합이 개선된 변이체가 기재되어 있다 (문헌 [Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604] 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특이적 돌연변이는 FcɣRIII에 대한 결합을 개선시키는 것으로 나타났다. 추가로, 다음 조합 돌연변이체는 FcɣRIII 결합을 개선시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0111] 또 다른 실시양태에서, 항체의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어, 비-글리코실화된 항체가 생산될 수 있다 (즉, 항체에 글리코실화가 결여됨). 글리코실화는, 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화도가 증가하도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위를 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위를 제거하여 이 부위에서 글리코실화가 제거되도록, 하나 이상의 아미노산 치환이 일어날 수 있다. 이러한 비-글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861을 참조한다.

[0112] 추가로 또는 대안적으로, 글리코실화 유형이 변경된 항체, 예컨대 푸코실 잔기 양이 감소된 저푸코실화 항체 또는 양분성 GlcNac 구조가 증가한 항체가 생산될 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴이 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증된 바 있다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포 내에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 관련 기술분야에 기재되어 있으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜 글리코실화가 변경된 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709는 푸코실트랜스퍼라제 유전자 FUT8 (α(1,6)푸코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현된 항체의 탄수화물에 푸코스가 결여되어 있다. Ms704, Ms705 및 Ms709 $FUT8^{-/-}$ 세포주는 2개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포 내의 FUT8 유전자를 표적화 파괴함으로써 생성되었다 (미국 특허 공개 번호 20040110704 및 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22] 참조). 또 다른 예로서, EP 1,176,195에는 FUT8 유전자가 기능상 파괴된 세포주가 기재되어 있고, 이것은 푸코실 트랜스퍼라제를 코딩하며, 이러한 세포주에서 발현된 항체는 α-1,6 결합-관련 효소를 감소시키거나 또는 제거함으로써 저푸코실화를 나타낸다. 또한, EP 1,176,195에는 항체의 Fc 영역에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 부가하는 낮은 효소 활성을 갖는 세포주, 또는 효소 활성을 갖지 않는 세포주, 예를 들어 래트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC CRL 1662)이 기재되어 있다. PCT 공개 WO 03/035835에는 푸코스를 Asn(297)-연결 탄수화물에 부착시키는 능력이 감소되고, 또한 이 숙주 세포에서 발현된 항체를 저푸코실화시키는 변이체 CHO 세포주 Lec13 세포가 기재되어 있다 (또한, 문헌 [Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740] 참조). 또한, 변형된 글리코실화 프로파일을 갖는 항체는 PCT 공개 WO 06/089231에 기재된 바와 같이 계란에서 생산될 수 있다. 대안적으로, 변형된 글리코실화 프로파일을 갖는 항체는 식물 세포, 예컨대 렘나(Lemna)에서 생산될 수 있다. 식물계에서 항체를 생산하는 방법은 2006년 8월 11일 출원된 알스톤 & 버드 엘엘피(Alston & Bird LLP) 대리인 문서 번호 040989/314911에 상응하는 미국 특허 출원에 개시되어 있다. PCT 공개 WO 99/54342에는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예를 들어, β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 세포주를 조작하여, 조작된 세포주 내에서 발현된 항체의 양분성 GlcNac 구조가 증가하도록 만들고, 이에 의해 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것이 기재되어 있다 (또한, 문헌 [Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180] 참조). 대안적으로, 항체의 푸코스 잔기는 푸코시다제 효소를 사용하여 절단 제거할 수 있는데; 예를 들어 푸코시다제 α-L-푸코시다제는 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다 (Tarentino et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

[0113] 본 개시내용에 의해 고려되는 본원의 항체의 또 다른 변형은 PEG화다. 항체는 PEG화되어, 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시킬 수 있다. 항체를 PEG화하기 위해, 전형적으로 항체 또는 그의 단편을, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서 PEG, 예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킨다. 바람직하게는, PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화하기 위해 사용되는 임의의 형태의 PEG, 예컨대 모노 (C1-

C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하도록 의도된다. 특정 실시양태에서, PEG화되는 항체는 비-글리코실화된 항체이다. 단백질을 PEG화하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용할 수 있다. 예를 들어, EP 0 154 316 및 EP 0 401 384를 참조한다.

[0114] 항체 물리적 특성

[0115] 본 발명의 항체는 그의 상이한 클래스의 검출 및/또는 구별을 위한 다양한 물리적 특성에 의해 특성화될 수 있다.

[0116] 예를 들어, 항체는 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내에 하나 이상의 글리코실화 부위를 함유할 수 있다. 이러한 글리코실화 부위는 항체의 면역원성을 증가시키거나 또는 변경된 항원 결합에 의한 pK의 변경을 유발할 수 있다 (Marshall et al. (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706). 글리코실화는 N-X-S/T 서열을 함유하는 모티프에서 일어나는 것으로 공지되어 있다. 일부 경우에서, 가변 영역 글리코실화를 함유하지 않는 항-LAG-3 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 가변 영역 내에 글리코실화 모티프를 함유하지 않는 항체를 선택하거나, 또는 글리코실화 영역 내의 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성될 수 있다.

[0117] 바람직한 실시양태에서, 항체는 아스파라긴 이성질현상 부위를 함유하지 않는다. 아스파라긴의 탈아미드화는 N-G 또는 D-G 서열 상에서 나타날 수 있고, 폴리펩티드 쇄 내에 비틀림을 도입하고 그의 안정성을 감소시키는 이소아스파르트산 잔기를 생성한다 (이소아스파르트산 효과).

[0118] 각각의 항체는 특유한 등전점 (pI)을 가질 것이고, 이는 일반적으로 6 내지 9.5의 pH 범위에 해당한다. IgG1 항체에 대한 pI는 전형적으로 7-9.5의 pH 범위에 해당하고, IgG4 항체에 대한 pI는 전형적으로 6-8의 pH 범위에 해당한다. 정상 범위를 벗어난 pI를 갖는 항체는 생체내 조건 하에 약간의 언폴딩 및 불안정성을 가질 수 있다는 추측이 존재한다. 따라서, 정상 범위에 해당하는 pI 값을 갖는 항-LAG-3 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위 내의 pI를 갖는 항체를 선택하거나, 또는 하전된 표면 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성될 수 있다.

[0119] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 핵산은 전세포 내에, 세포 용해물 내에, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 관련 기술분야에 익히 공지되어 있는 다른 기술을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포성 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포성 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때 "단리되거나" 또는 "실질적으로 순수하게" 된다 (문헌 [Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York] 참조). 본 발명의 핵산은, 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있고, 인트론 서열을 함유할 수 있거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0121] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어, 하기에 추가로 기재된 바와 같은 인간 이뮤노글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 대해, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 이뮤노글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻어진 항체에 대해 (예를 들어, 파지 디스플레이 기술을 사용하여), 이러한 항체를 코딩하는 핵산은 유전자 라이브러리로부터 회수할 수 있다.

[0122] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 LAG3.5 모노클로날 항체의 V_H 및 V_L 서열 (각각 서열 12 및 14) 또는 CDR을 코딩하는 것을 포함한다. V_H 및 V_L 절편을 코딩하는 DNA 단편을 수득하면, 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 쇄 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시키기 위해 이들 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작할 수 있다. 이들 조작에서, V_L- 또는 V_H-코딩 DNA 단편은 또 다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 DNA 단편에 작동가능하게 연결된다. 상기 문맥에서 사용된 바와 같은 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 서열이 인-프레임(in-frame)으로 유지되도록 2개의 DNA 단편이 연결되는 것을 의미하도록 의도된다.

[0123] V_H 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또 다른 DNA 분

자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 상기 문헌 [Kabat et al. (1991)] 참조), 이들 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자에 대해, V_H-코딩 DNA는 중쇄 CH1 불변 영역만을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0124] V_L 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 V_L-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역 CL을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 상기 문헌 [Kabat et al.] 참조), 이들 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다.

[0125] scFv 유전자를 생성하기 위해, V_H- 및 V_L-코딩 DNA 단편은 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어 아미노산 서열 $(Gly_4-Ser)_3$ (서열 28)을 코딩하는 또 다른 단편에 작동가능하게 연결되어, V_H 및 V_L 서열이 인접한 단일-쇄 단백질로서 발현될 수 있고, V_L 및 V_H 영역은 가요성 링커에 의해 연결된다 (예를 들어, [Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554] 참조).

[0126] 본 발명의 모노클로날 항체의 생산

[0127] 본 발명의 모노클로날 항체 (mAb)는 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495]의 익히 공지된 체세포 혼성화 (하이브리도마) 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 모노클로날 항체 생산을 위한 다른 실시양태는 B 림프구의 바이러스 또는 종양유전자 형질전환 및 파지 디스플레이 기술을 포함한다. 키메라 또는 인간화 항체도 관련 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370을 참조하고, 이들 내용은 그 전문이 구체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0128] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클로날 항체이다. 인간 LAG-3에 대해 지시된 이러한 인간 모노클로날 항체는 마우스계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소믹 마우스를 사용하여 생성할 수 있다. 이들 트랜스제닉 및 트랜스크로모소믹 마우스는 본원에서 각각 HuMAb 마우스® 및 KM 마우스®로서 지칭되는 마우스를 포함하고, 본원에서 집합적으로 "인간 Ig 마우스"로서 지칭된다.

[0129] HuMAb 마우스® (메다렉스®, 인크.(Medarex®, Inc.))는 내인성 μ 및 κ 쇄 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재정렬되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니유전자좌를 함유한다 (예를 들어, 문헌 [Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859] 참조). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진이 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 거쳐 고친화도 인간 IgG κ 모노클로날 항체를 생성한다 (상기 문헌 [Lonberg et al. (1994)]; 문헌 [Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 및 Harding and Lonberg (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546]에서 검토됨). HuMab 마우스®의 제조 및 용도, 및 이러한 마우스가 보유하는 게놈 변형은 문헌 [Taylor et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; 및 Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]에 추가로 기재되어 있고, 이들 모든 내용은 그 전문이 구체적으로 본원에 참조로 포함된다. 또한, 미국 특허 번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; 및 5,545,807; PCT 공개 번호 WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 및 WO 01/14424를 참조하고, 이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0130] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 항체는 트랜스진 및 트랜스크로모솜 상에 인간 이뮤노글로불린 서열을 보유하는 마우스, 예컨대 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스크로모솜을 보유하는 마우스를 사용하여 발생될 수 있다. 이 마우스는 본원에서 "KM 마우스®"로서 지칭되고, PCT 공개 WO 02/43478에 상세히 기재되어 있다. 내인성 FcγRIIB 수용체 유전자의 동형접합 파괴를 추가로 포함하는 상기 마우스의 변형된 형태도 PCT 공개 WO 02/43478에 기재되어 있고, 본원에서 "KM/FCGR2D 마우스®"로서 지칭된다. 또한, HCo7 또는 HCo12 중쇄

트랜스진 또는 둘 다를 갖는 마우스도 사용될 수 있다.

[0131] 추가의 트랜스제닉 동물 실시양태는 제노마우스 (아브게닉스, 인크.(Abgenix, Inc.), 미국 특허 번호 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963)를 포함한다. 추가 실시양태는 "TC 마우스" (Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727) 및 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스크로모솜을 보유하는 소 (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894; PCT 공개 WO 02/092812)를 포함한다. 이들 특허 및 공개공보의 내용은 그 전문이 구체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0132] 한 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 인간 이뮤노글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717; 5,969,108;6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 및 6,593,081을 참조하고, 이들의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0133] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 면역화 시에 인간 항체 반응이 생성될 수 있도록 인간 면역 세포를 그 내부로 재구성시킨 SCID 마우스를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,476,996 및 5,698,767을 참조하고, 이들의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0134] 또 다른 실시양태에서, 인간 항-LAG-3 항체는 파지가 이전에 LAG-3으로 면역화된 트랜스제닉 동물에서 생성되는 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 파지 디스플레이를 사용하여 제조된다. 바람직한 실시양태에서, 트랜스제닉 동물은 HuMab, KM 또는 키린(Kirin) 마우스이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,794,132을 참조하고, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0135] 인간 Ig 마우스의 면역화

[0136] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 Ig 마우스는 LAG-3 항원, 재조합 LAG-3 단백질, 또는 LAG-3 단백질을 발현하는 세포의 정제된 또는 농축된 제제로 면역화된다. 예를 들어, 상기 문헌 [Lonberg et al. (1994); Fishwild et al. (1996)]; 및 PCT 공개 WO 98/24884 및 WO 01/14424를 참조하고, 이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 6-16주령 마우스를 5-50 μg의 LAG-3 단백질로 면역화시킬 수 있다. 대안적으로, 비-LAG-3 폴리펩티드에 융합된 LAG-3의 부분을 사용한다.

[0137] 한 실시양태에서, 트랜스제닉 마우스는 완전 프로인트(Freund) 아주반트 중의 LAG-3 항원을 이용하여 복강내로 (IP) 또는 정맥내로 (IV) 면역화시킨 후, 불완전 프로인트 아주반트 중의 항원을 이용하여 후속적으로 IP 또는 IV 면역화시킨다. 다른 실시양태에서, 프로인트 이외의 아주반트 또는 아주반트의 부재 하의 전세포가 사용된다. 혈장은 ELISA에 의해 스크리닝할 수 있고, 충분한 역가의 항-LAG-3 인간 이뮤노글로불린을 갖는 마우스로부터의 세포를 융합을 위해 사용할 수 있다.

[0138] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0139] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화시킨 마우스로부터의 비장세포 및/또는 림프절 세포를 단리하고, 적절한 불멸화 세포주, 예컨대 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 생성되는 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝할 수 있다. 하이브리도마의 생성은 관련 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York]을 참조한다.

[0140] 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

[0141] 본 발명의 항체는 또한 예를 들어, 관련 기술분야에 익히 공지된 바와 같은 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법의 조합을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Morrison, S. (1985) Science 229:1202]). 한 실시양태에서, 표준 분자 생물학 기술에 의해 얻은 부분 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를, 유전자가 전사 및 번역 조절 서열에 작동가능하게 연결되도록 하나 이상의 발현 벡터 내로 삽입한다. 상기 문맥에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그들의 의도된 기능을 수행하도록, 항체 유전자가 벡터 내로 라이게이션되는 것을 의미하도록 의도된다.

[0142] 용어 "조절 서열"은 항체 쇄 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 서열은, 예를 들어 문헌 [Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))]에 기재되어 있다. 포유동물 숙주 세포 발현을 위해 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질 발

현을 지시하는 바이러스 요소, 예컨대 시토메갈로바이러스 (CMV), 원숭이 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래하는 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 대안적으로, 비-바이러스성 조절 서열, 예컨대 유비퀴틴 프로모터 또는 β-글로빈 프로모터를 사용할 수 있다. 또한 추가로, SV40 초기 프로모터 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 유형 1의 긴 말단 반복으로부터의 서열을 함유하는 SRα 프로모터 시스템과 같은 상이한 공급원으로부터의 서열들로 구성된 조절 요소 (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)를 사용할 수 있다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현 숙주 세포와 상용성이도록 선택된다.

[0143] 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 동일한 또는 별개의 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 가변 영역은, V_H 절편이 벡터 내에서 C_H 절편(들)에 작동가능하게 연결되고 V_L 절편이 벡터 내에서 C_L 절편에 작동가능하게 연결되도록 이들을 이미 목적하는 이소형의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 코딩하는 발현 벡터 내로 삽입함으로써 임의의 항체 이소형의 전장 항체 유전자를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 쇄의 분비를 촉진하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 쇄 유전자는 신호 펩티드가 항체 쇄 유전자의 아미노 말단에 인-프레임으로 연결되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 이뮤노글로불린 신호 펩티드 또는 이종 신호 펩티드 (즉, 비-이뮤노글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.

[0144] 항체 쇄 유전자 및 조절 서열, 뿐만 아니라 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예컨대 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 기점) 및 선택 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,399,216; 4,634,665 및 5,179,017 참조). 예를 들어, 전형적으로, 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 대해 약물, 예컨대 G418, 히그로마이신 또는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여한다. 바람직한 선택 마커 유전자는 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자 (메토트렉세이트 선택/증폭과 함께 dhfr-숙주 세포에서 사용하기 위해) 및 neo 유전자 (G418 선택을 위해)를 포함한다.

[0145] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의해 숙주 세포 내로 형질감염시킨다. 다양한 형태의 용어 "형질감염"은 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로의 외인성 DNA의 도입을 위해 통상적으로 사용되는 매우 다양한 기술, 예를 들어 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체를 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내에서 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵 세포, 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포 내에서의 항체 발현이 가장 바람직하고, 이는 이러한 진핵 세포, 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다 적절하게 폴딩된 면역학상 활성 항체를 어셈블링하고 분비하기가 더 쉽기 때문이다.

[0146] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위해 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들어, 문헌 [R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621]에 기재된 바와 같이 DHFR 선택 마커와 함께 사용되는, 문헌 [Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재되어 있는 $dhfr^-$ CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포와 함께 사용하기 위한, 또 다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338,841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포 내로 도입할 때, 항체는, 숙주 세포에서 항체의 발현을 허용하는데, 또는 보다 바람직하게는 숙주 세포를 성장시키는 배양 배지 내로 항체의 분비를 허용하는데 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생산된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0147] 면역접합체

[0148] 본 발명의 항체는 치료제에 접합되어 면역접합체, 예컨대 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있다. 적합한 치료제는 항대사물, 알킬화제, DNA 좁은 홈 결합제, DNA 삽입제, DNA 가교제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 핵 유출 억제제, 프로테아솜 억제제, 토포이소머라제 I 또는 II 억제제, 열 쇼크 단백질 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항생제 및 항유사분열제를 포함한다. ADC에서, 항체 및 치료제는 바람직하게는 절단가능한 링커, 예컨대 펩티딜, 디술피드, 또는 히드라존 링커를 통해 접합된다. 보다 바람직하게는, 링커는 펩티딜 링커, 예컨대 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (서열 39), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser 또는 Glu이다. ADC는 미국 특허 번호 7,087,600; 6,989,452; 및 7,129,261; PCT 공개 WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; 및 WO 08/103693; 미국 특허 공개 20060024317; 20060004081; 및 20060247295에 기재된 바와 같이 제조될 수 있고,

이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0149] 이중특이적 분자

[0150] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 다른 기능적 분자, 예를 들어 또 다른 펩티드 또는 단백질 (예를 들어, 수용체에 대한 또 다른 항체 또는 리간드)에 연결되어, 적어도 2개의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성하는 하나 이상의 본 발명의 항체를 포함하는 이중특이적 분자를 특징으로 한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 "이중특이적 분자"는 3 이상의 특이성을 갖는 분자를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 분자는 LAG-3에 대한 제1 결합 특이성 및 LAG-3 발현 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 이펙터 세포를 동원하는 촉발 분자에 대한 제2 결합 특이성을 포함한다. 적합한 촉발 분자의 예는 CD64, CD89, CD16 및 CD3이다. 예를 들어, 문헌 [Kufer et al., TRENDS in Biotechnology, 22 (5), 238-244 (2004)]을 참조한다.

[0151] 한 실시양태에서, 이중특이적 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-LAG-3 결합 특이성 뿐만 아니라 제3 특이성을 갖는다. 제3 특이성은 항-증진 인자 (EF), 예를 들어 세포독성 활성에 관여하는 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자에 대한 것일 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자는 세포독성 T-세포 (예를 들어, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 또는 ICAM-1을 통해), 또는 다른 면역 세포에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0152] 이중특이적 분자는 많은 상이한 포맷 및 크기로 존재할 수 있다. 크기 범위의 한 끝에서, 이중특이적 분자는 전통적인 항체 포맷을 유지하되, 동일한 특이성의 두 결합 아암을 갖는 대신에, 각각 상이한 특이성을 갖는 두 결합 아암을 갖는다. 다른 극단에는, 펩티드 쇄에 의해 연결된 2개의 단일-쇄 항체 단편 (scFv)으로 이루어진 이중특이적 분자, 즉 $Bs(scFv)_2$ 구축물이 존재한다. 중간-크기의 이중특이적 분자는 펩티딜 링커에 의해 연결된 2개의 상이한 F(ab) 단편을 포함한다. 이들 및 다른 포맷의 이중특이적 분자는 유전공학, 체세포 혼성화, 또는 화학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kufer et al., 상기에 언급됨; Cao and Suresh, Bioconjugate Chemistry, 9 (6), 635-644 (1998); 및 van Spriel et al., Immunology Today, 21 (8), 391-397 (2000)], 및 그 안에 언급된 참고문헌을 참조한다.

[0153] 제약 조성물

[0154] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 제약상 활성 성분, 예컨대 또 다른 항체 또는 약물을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 제약 조성물은, 예를 들어 또 다른 면역자극제, 항암제, 항바이러스제, 또는 항-LAG-3 항체가 백신에 대한 면역 반응을 증진시키도록 백신과 조합 요법으로 투여될 수 있다.

[0155] 제약 조성물은 임의의 수의 부형제를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 담체, 표면 활성제, 농후제 또는 유화제, 고체 결합제, 분산 또는 현탁 보조제, 가용화제, 착색제, 향미제, 코팅제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 보존제, 등장화제 및 그의 조합물을 포함한다. 적합한 부형제의 선택 및 사용은 문헌 [Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)]에 교시되어 있고, 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0156] 바람직하게는, 제약 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여에 적합하다 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해). 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 산의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 상기 화합물을 보호하는 물질 내에 코팅될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 어구 "비경구 투여"는 대체로 주사에 의한, 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 항체는 비-비경구 경로를 통해, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로로, 예를 들어 비강내로, 경구로, 질내로, 직장으로, 설하로 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0157] 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용되는 염을 포함할 수 있다. "제약상 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 유지하고, 임의의 바람직하지 않은 독성학적 효과를 나타내지 않는 염을 지칭한다. 이러한 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기 산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등으로부터 유도되는 것 뿐만 아니라 비독성 유기 산, 예컨대 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유도되는 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리 토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터

유도되는 것 뿐만 아니라 비독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유도되는 것을 포함한다.

[0158] 제약 조성물은 멸균 수용액 또는 분산액 형태일 수 있다. 이들은 또한 마이크로에멀젼, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 구조로 제제화될 수 있다.

[0159] 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 대상체 및 특정한 투여 방식에 따라 변할 것이고, 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 제약상 허용되는 담체와 조합될 때 100% 중의 상기 양은 약 0.01% 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30% 범위의 활성 성분일 것이다.

[0160] 투여 요법은 목적하는 최적의 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 몇몇 분할 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 응급성이 나타내는 바와 같이 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료할 대상체에 대한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 구분되는 단위를 지칭하고; 각각의 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 대안적으로, 항체는 지속 방출 제제로서 투여될 수 있고, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다.

[0161] 항체의 투여를 위해, 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 통상적으로 0.01 내지 5 mg/kg (숙주 체중) 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg (체중), 1 mg/kg (체중), 3 mg/kg (체중), 5 mg/kg (체중) 또는 10 mg/kg (체중)일 수 있거나, 또는 1-10 mg/kg 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 매달 1회, 3개월마다 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 항-LAG-3 항체에 대한 바람직한 투여 요법은 정맥내 투여를 통해 1 mg/kg (체중) 또는 3 mg/kg (체중)으로 투여하는 것을 포함하고, 여기서 항체는 다음 투여 스케줄 중 하나를 사용하여 제공된다: (i) 6회 투여량에 대해 4주마다, 이어서 3개월마다; (ii) 3주마다; (iii) 3 mg/kg (체중)으로 1회, 이어서 3주마다 1 mg/kg (체중). 일부 방법에서, 투여량은 약 1-1000 μg/ml, 일부 방법에서 약 25-300 μg/ml의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조정된다.

[0162] 본 발명의 항-LAG-3 항체의 "치료 유효 투여량"은 바람직하게는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속기간 증가, 또는 질환 이환으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 일으킨다. 예를 들어, 종양-보유 대상체의 치료를 위해, "치료 유효 투여량"은 바람직하게는 비처리 대상체에 비해 종양 성장을 적어도 약 20%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 80% 억제한다. 치료 유효량의 치료 화합물은 전형적으로 인간이거나 또는 또 다른 포유동물일 수 있는 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 또는 달리 증상을 개선할 수 있다.

[0163] 제약 조성물은 제어 방출 제제, 예컨대 임플란트, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화 전달 시스템일 수 있다. 생분해성 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0164] 치료 조성물은 (1) 무바늘 피하 주사 장치 (예를 들어, US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 및 4,596,556); (2) 미세-주입 펌프 (US 4,487,603); (3) 경피 장치 (US 4,486,194); (4) 주입 장치 (US 4,447,233 및 4,447,224); 및 (5) 삼투 장치 (US 4,439,196 및 4,475,196)와 같은 의료 장치를 통해 투여될 수 있고; 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0165] 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 생체내 적절한 분포를 보장하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 치료 화합물이 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 것을 보장하기 위해, 이들을 리포솜 내에 제제화할 수 있고, 리포솜은 특정 세포 또는 기관 내로의 선택적 수송을 증진시키는 표적화 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, US 4,522,811; 5,374,548; 5,416,016; 및 5,399,331; 문헌 [V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685; Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038; Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134; Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; 및 Killion and Fidler (1994) Immunomethods 4:273]을 참조한다.

[0166] 본 발명의 용도 및 방법

[0167] 본 발명의 항체 (조성물, 이중특이적 및 면역접합체)는, 예를 들어 LAG-3의 검출 또는 LAG-3의 차단에 의한 면역 반응의 증진을 포함하는, 다수의 시험관내 및 생체내 유용성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 이러한 항체는 다양한 상황에서 면역을 증진시키기 위해 배양액내, 시험관내 또는 생체외 세포에, 또는 인간 대상체에게, 예를 들어 생체내 투여될 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서의 면역 반응이 변형되도록, 대상체에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 변형시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 반응은 증진되거나, 자극되거나 또는 상향조절된다.

[0168] 바람직한 대상체는 면역 반응의 증진을 필요로 하는 인간 환자를 포함한다. 방법은 면역 반응 (예를 들어, T-세포 매개된 면역 반응)을 증진시킴으로써 치료될 수 있는 장애를 앓는 인간 환자를 치료하기에 특히 적합하다. 특정한 실시양태에서, 방법은 생체내 암의 치료에 특히 적합하다. 면역의 항원-특이적 증진을 달성하기 위해서, 항-LAG-3 항체는 목적하는 항원과 함께 투여될 수 있거나 또는 항원이 이미 치료할 대상체 (예를 들어, 종양-보유 또는 바이러스-보유 대상체)에 존재할 수 있다. LAG-3에 대한 항체를 다른 작용제와 함께 투여할 때, 2가지는 임의의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0169] 본 발명은 항체 또는 그의 일부와 인간 LAG-3 사이에서 복합체 형성을 허용하는 조건 하에 샘플 및 대조 샘플을 인간 LAG-3에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 접촉시키는 것을 포함하는, 샘플 내에서 인간 LAG-3 항원의 존재를 검출하거나 또는 인간 LAG-3 항원의 양을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 이어서, 복합체 형성이 검출되고, 여기서 대조 샘플에 비한 샘플 사이의 복합체 형성 차이는 샘플 내의 인간 LAG-3 항원의 존재를 표시한다. 또한, 본 발명의 항-LAG-3 항체는 면역친화성 정제를 통해 인간 LAG-3을 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0170] 또한, MHC 클래스 II 분자에 대한 LAG-3의 결합을 억제하고 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 본 발명의 항-LAG-3 항체의 능력을 고려할 때, 본 발명은 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하거나 증진시키거나 또는 상향조절하기 위해 항체를 시험관내 및 생체내 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 항원-특이적 T 세포 반응이 자극되도록 상기 T 세포를 본 발명의 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 항원-특이적 T 세포 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 항원-특이적 T 세포 반응의 임의의 적합한 지시자가 항원-특이적 T 세포 반응을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 상기 적합한 지시자의 비제한적인 예는 항체의 존재 하의 T 세포 증식 및/또는 항체의 존재 하의 시토카인 생산의 증가를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포에 의한 인터류킨-2 생산이 자극된다.

[0171] 또한, 본 발명은 대상체에서의 면역 반응 (예를 들어, 항원-특이적 T 세포 반응)이 자극되도록, 대상체에게 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응 (예를 들어, 항원-특이적 T 세포 반응)을 자극하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 종양-보유 대상체이고, 종양에 대한 면역 반응이 자극된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 대상체는 바이러스-보유 대상체이고, 바이러스에 대한 면역 반응이 자극된다.

[0172] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 종양의 성장이 대상체에서 억제되도록, 대상체에게 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 바이러스 감염이 대상체에서 치료되도록, 대상체에게 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0173] 본 발명의 이들 및 다른 방법은 하기에서 보다 상세히 논의된다.

[0174] 암

[0175] 항체에 의한 LAG-3의 차단은 환자에서 암성 세포에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 암성 종양의 성장이 억제되도록, 항-LAG-3 항체를 사용하는 생체내 대상체의 치료에 관한 것이다. 항-LAG-3 항체는 단독으로 암성 종양의 성장을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 항-LAG-3 항체는 하기에 기재되는 바와 같이 다른 면역원성 작용제, 표준 암 치료제, 또는 다른 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0176] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 인간 항-LAG-3 항체 (예컨대, 본원에 기재된 임의의 인간 항-인간 LAG-3 항체)이다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인간화 항-LAG-3 항체일 수 있다.

[0177] 그의 성장이 본 발명의 항체를 사용하여 억제될 수 있는 바람직한 암은 전형적으로 면역요법에 반응성인 암을 포함한다. 치료를 위해 바람직한 암의 비제한적인 예는 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 신장암 (예를 들어, 투명 세포 암종), 전립선암 (예를 들어, 호르몬 불응성 전립선 선암종), 유방암, 결장암 및 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암)을 포함한다. 추가로, 본 발명은 그의 성장이 본 발명의 항체를 사용하여 억제될 수 있는 불응성 또는 재발성 악성종양을 포함한다.

[0178] 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다른 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부암, 위암, 고환암, 난관의 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 예컨대 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 소아 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평세포암, T-세포 림프종, 환경 유발암, 예컨대 석면에 의해 유발되는 암, 및 상기 암의 조합을 포함한다. 본 발명은 또한 전이성 암, 특히 PD-L1을 발현하는 전이성 암의 치료에 유용하다 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144).

[0179] 임의로, LAG-3에 대한 항체는 면역원성 작용제, 예컨대 암성 세포, 정제된 종양 항원 (재조합 단백질, 펩티드 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극 시토카인을 코딩하는 유전자로 형질감염된 세포와 조합될 수 있다 (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). 사용될 수 있는 종양 백신의 비제한적인 예는 흑색종 항원의 펩티드, 예컨대 gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드, 또는 시토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포를 포함한다 (하기에 추가로 논의됨).

[0180] 인간에서, 일부 종양, 예컨대 흑색종은 면역원성인 것으로 밝혀졌다. LAG-3 차단에 의해 T 세포 활성화의 역치를 상승시킴으로써, 숙주에서의 종양 반응이 활성화될 수 있다.

[0181] LAG-3 차단은 백신접종 프로토콜과 조합될 때 보다 효과적일 가능성이 있다. 종양에 대한 백신접종을 위한 많은 실험상 전략이 고안되었다 (문헌 [Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738] 참조; 또한 문헌 [Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition] 참조). 이들 전략 중의 하나에서, 백신은 자가 또는 동종 종양 세포를 사용하여 제조된다. 이들 세포 백신은 GM-CSF를 발현하도록 종양 세포가 형질도입될 때 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다. GM-CSF는 종양 백신접종을 위한 항원 제시의 강력한 활성화제로 밝혀졌다 (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43).

[0182] 다양한 종양에서 유전자 발현 및 대규모 유전자 발현 패턴의 연구를 통해 소위 종양 특이적 항원에 대한 정의를 확립하였다 (Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281-7). 많은 경우에, 이들 종양 특이적 항원은 종양 및 그로부터 종양이 발생한 세포에서 발현되는 분화 항원, 예를 들어 멜라닌세포 항원 gp100, MAGE 항원, 및 Trp-2이다. 보다 중요하게는, 많은 이들 항원은 숙주에서 발견되는 종양 특이적 T 세포의 표적인 것으로 밝혀질 수 있다. LAG-3 차단을 종양에서 발현되는 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 집합과 함께 사용하여 이들 단백질에 대한 면역 반응을 생성시킬 수 있다. 이들 단백질은 자기 항원으로서 면역계에 의해 정상적으로 인식되고, 따라서 이들에 대해 관용성이다. 종양 항원은 단백질 텔로머라제를 포함할 수 있고, 이것은 염색체의 텔로미어의 합성에 필요하고 85% 초과의 인간 암에서 및 단지 제한된 수의 체세포 조직에서 발현된다 (Kim et al. (1994) Science 266: 2011-2013) (이들 체세포 조직은 다양한 수단에 의해 면역 공격으로부터 보호될 수 있음). 또한, 종양 항원은 단백질 서열을 변경하거나 또는 2개의 관련되지 않은 서열 사이의 융합 단백질 (즉, 필라델피아 (Philadelphia) 염색체 내의 bcr-abl), 또는 B 세포 종양으로부터의 이디오타입을 생성시키는 체세포 돌연변이 때문에 암 세포에서 발현되는 "신생-항원"일 수 있다.

[0183] 다른 종양 백신은 인간 암에 관련되는 바이러스, 예컨대 인간 유두종 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 및 카포시 헤르페스 육종 바이러스 (KHSV)로부터의 단백질을 포함할 수 있다. LAG-3 차단과 함께 사용될 수 있는 또 다른 형태의 종양 특이적 항원은 종양 조직 자체로부터 단리된 정제된 열 쇼크 단백질 (HSP)이다. 이들 열 쇼크 단백질은 종양 세포로부터의 단백질의 단편을 함유하고, 이들 HSP는 종양 면역성을 유발하기 위해 항원 제시 세포로의 전달 시에 매우 효율적이다 (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

[0184] 수지상 세포 (DC)는 항원-특이적 반응을 촉발하기 위해 사용될 수 있는 강력한 항원 제시 세포이다. DC는 생체외 생산되고, 다양한 단백질 및 펩티드 항원 뿐만 아니라 종양 세포 추출물이 부가될 수 있다 (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). 또한, DC는 이들 종양 항원도 발현하기 위해서 유전적 수단에 의해 형질도입될 수 있다. 또한, DC는 면역화를 위해 종양 세포에 직접 융합되었다 (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). 백신접종 방법으로서, DC 면역화는 보다 강력한 항종양 반응을 활성화하기 위해 LAG-3 차단과 효과적으로 조합될 수 있다.

[0185] LAG-3 차단은 또한 표준 암 치료와 조합될 수 있다. LAG-3 차단은 화학치료 요법과 효과적으로 조합될 수 있다. 이 경우에, 투여되는 화학치료 시약의 투여량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). 이러한 조합의 예는 항-LAG-3 항체와 흑색종의 치료를 위한 데카르바진의 조합이다. 이러한 조합의 또 다른 예는 항-LAG-3 항체와 흑색종의 치료를 위한 인터류킨-2 (IL-2)의 조합이다. LAG-3 차단과 화학요법제의 조합된 사용을 위한 과학적인 근거는 세포 사멸, 즉 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과가 항원 제시 경로 내의 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 세포 사멸을 통해 LAG-3 차단과 상승작용을 유발할 수 있는 다른 조합 요법은 방사선요법, 수술 및 호르몬 박탈이다. 각각의 이들 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성시킨다. 또한, 혈관신생 억제제가 LAG-3 차단과 조합될 수 있다. 혈관신생의 억제는 종양 항원을 숙주 항원 제시 경로 내로 공급할 수 있는 종양 세포 사멸을 유발한다.

[0186] LAG-3 차단 항체는 또한 Fcα 또는 Fcγ 수용체-발현 이펙터 세포를 종양 세포에 대해 표적화하는 이중특이적 항체와 조합하여 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,922,845 및 5,837,243 참조). 이중특이적 항체는 2개의 별개의 항원을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-Fc 수용체/항 종양 항원 (예를 들어, Her-2/neu) 이중특이적 항체가 대식세포를 종양 부위에 대해 표적화하기 위해 사용되었다. 상기 표적화는 종양 특이적 반응을 보다 효과적으로 활성화시킬 수 있다. 이들 반응의 T 세포 아암은 LAG-3 차단의 사용에 의해 증가할 것이다. 대안적으로, 항원은 종양 항원 및 수지상 세포 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 이중특이적 항체의 사용에 의해 DC에 직접 전달될 수 있다.

[0187] 종양은 매우 다양한 메카니즘에 의해 숙주 면역 감시를 피한다. 많은 이들 메카니즘은 종양에 의해 발현되고 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은 특히 TGF-β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), 및 Fas 리간드 (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)를 포함한다. 각각의 이들 물질에 대한 항체는 면역억제제의 효과를 상쇄하고 숙주에 의한 종양 면역 반응에 도움을 주기 위해 항-LAG-3과 조합하여 사용될 수 있다.

[0188] 숙주 면역 반응성을 활성화시키는 다른 항체가 항-LAG-3과 조합하여 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능 및 항원 제시를 활성화시키는 수지상 세포의 표면 상의 분자를 포함한다. 항-CD40 항체는 T 세포 헬퍼 활성을 효과적으로 대체할 수 있고 (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478), LAG-3 항체와 함께 사용될 수 있다 (Ito et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). T 세포 공동자극 분자, 예컨대 CTLA-4 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,811,097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997)), 및 ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266)에 대한 활성화 항체도 증가된 수준의 T 세포 활성화를 제공할 수 있다.

[0189] 골수 이식은 조혈계 기원의 다양한 종양의 치료를 위해 현재 사용되고 있다. 이식편 대 숙주 질환이 상기 치료의 결과로 발생하지만, 치료 이익을 이식편 대 종양 반응으로부터 얻을 수 있다. 공여자의 이식된 종양 특이적 T 세포의 유효성을 증가시키기 위해 LAG-3 차단이 사용될 수 있다.

[0190] 또한, 항원 특이적 T 세포의 생체외 활성화 및 팽창 및 종양에 대한 항원-특이적 T 세포를 자극하기 위한 이들 세포의 수용자 내로의 입양 전달을 수반하는 몇몇 실험적 치료 프로토콜이 존재한다 (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51). 또한, 이들 방법은 감염원, 예컨대 CMV에 대한 T 세포 반응을 활성화시키기 위해 사용될 수 있다. 항-LAG-3 항체의 존재 하에서의 생체외 활성화는 입양 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을 증가시킬 수 있다.

[0191] 감염성 질환

[0192] 본 발명의 다른 방법은 특정 독소 또는 병원체에 노출된 환자를 치료하기 위해 사용된다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 대상체가 감염성 질환에 대해 치료되도록, 대상체에게 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 인간 항-인간 LAG-3 항체 (예컨대, 본원에 기재된 임의의 인간 항-LAG-3 항체)이다. 추가로 또는 대안적으로, 항체

는 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0193] 상기 논의된 바와 같은 종양에 대한 그의 적용과 유사하게, 항체 매개된 LAG-3 차단은 병원체, 독소 및 자기-항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 단독으로 또는 아주반트로서 백신과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 치료 접근법이 특히 유용할 수 있는 병원체의 예는 현재 효과적인 백신이 없는 병원체, 또는 그에 대해 통상적인 백신이 완전한 효과 미만을 나타내는 병원체를 포함한다. 이들은 HIV, 간염 (A, B & C), 인플루엔자 (*Influenza*), 헤르페스(*Herpes*), 지아르디아(*Giardia*), 말라리아(*Malaria*), 리슈마니아(*Leishmania*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. LAG-3 차단은 감염 과정에 걸쳐 변경된 항원을 제시하는 HIV와 같은 작용제에 의한 확립된 감염에 대해 특히 유용하다. 이들 신규한 에피토프는 항-인간 LAG-3 투여 시에 외래물질로서 인식되고, 따라서 LAG-3을 통한 음성 신호에 의해 약화되지 않는 강한 T 세포 반응을 일으킨다.

[0194] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 야기하는 병원성 바이러스의 일부 예는 HIV, 간염 (A, B 또는 C), 헤르페스 바이러스 (예를 들어, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II 및 CMV, 엡스타인 바르(*Epstein Barr*) 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코로나바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 멈프스 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파르보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기 바이러스, 유두종바이러스, 연속종 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스를 포함한다.

[0195] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 야기하는 병원성 박테리아의 일부 예는 클라미디아(*chlamydia*), 리케치아 박테리아(*rickettsial bacteria*), 미코박테리움(*mycobacteria*), 스타필로코쿠스(*staphylococci*), 스트렙토코쿠스(*streptococci*), 뉴모노코쿠스(*pneumonococci*), 메닝고코쿠스(*meningococci*) 및 고노코쿠스(*gonococci*), 클레브시엘라(*klebsiella*), 프로테우스(*proteus*), 세라티아(*serratia*), 슈도모나스(*pseudomonas*), 레지오넬라(*legionella*), 디프테리아(*diphtheria*), 살모넬라(*salmonella*), 바실루스(*bacilli*), 콜레라(*cholera*), 파상풍, 보툴리눔독소증, 탄저병, 흑사병, 렙토스피라증 및 라임병 박테리아를 포함한다.

[0196] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 야기하는 병원성 진균의 일부 예는 칸디다(*Candida*) (알비칸스(*albicans*), 크루세이(*krusei*), 글라브라타(*glabrata*), 트로피칼리스(*tropicalis*) 등), 크립토코쿠스 네오프르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) (푸미가투스(*fumigatus*), 니거(*niger*) 등), 뮤코랄레스(*Mucorales*) 속 (뮤코르(*mucor*), 압시디아(*absidia*), 리조푸스(*rhizopus*)), 스포로트릭스 쉔키이(*Sporothrix schenkii*), 블라스토미세스 데르마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코시디오이데스 브라실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 콕시디오이데스 임미티스(*Coccidioides immitis*) 및 히스토플라스마 캅술라툼(*Histoplasma capsulatum*)을 포함한다.

[0197] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 야기하는 병원성 기생충의 일부 예는 엔트아메바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 발란티디움 콜라이(*Balantidium coli*), 네글레리아포울레리(*Naegleriafowleri*), 아칸트아메바(*Acanthamoeba*) 종, 지아르디아 람비아(*Giardia lambia*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*) 종, 뉴모시스티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 바베시아 미크로티(*Babesia microti*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 리슈마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 니포스트롱길루스 브라실리엔시스(*Nippostrongylus brasiliensis*)를 포함한다.

[0198] 상기 모든 방법에서, LAG-3 차단은 다른 형태의 면역요법, 예컨대 시토카인 치료 (예를 들어, 인터페론, GM-CSF, G-CSF, IL-2), 또는 종양 항원의 증진된 제시를 제공하는 이중특이적 항체 요법과 조합될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]; [Poljak (1994) Structure 2:1121-1123] 참조).

[0199] 자가면역 반응

[0200] 항-LAG-3 항체는 자가면역 반응을 일으키고 증폭시킬 수 있다. 실제로, 종양 세포 및 펩티드 백신을 사용한 항종양 반응의 유도로 많은 항종양 반응이 항-자가 반응성을 수반하는 것으로 드러났다 (문헌 [van Elsas et al. (2001) J. Exp. Med. 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 2982-2987]; 상기 문헌 [Hurwitz, (2000)]; 문헌 [Rosenberg & White (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(1):81-4]). 따라서, 질환 치료를 위해 이들 자기 단백질에 대한 면역 반응을 효과적으로 생성하도록 백신접종 프로토콜을 고안하기 위해 항-LAG-3 차단을 다양한 자기 단백질과 함께 사용하는 것을 고려하는 것이 가능하

다. 예를 들어, 알츠하이머병은 뇌에서 아밀로이드 침착물 내에 Aβ 펩티드의 부적절한 축적을 수반하고; 아밀로이드에 대한 항체 반응은 이들 아밀로이드 침착물을 제거할 수 있다 (Schenk et al. (1999) Nature 400: 173-177).

[0201] 알레르기 및 천식의 치료를 위한 IgE, 및 류마티스 관절염을 위한 TNFα와 같은 다른 자기 단백질이 또한 표적으로서 사용될 수 있다. 마지막으로, 다양한 호르몬에 대한 항체 반응이 항-LAG-3 항체의 사용에 의해 유도될 수 있다. 생식 호르몬에 대한 중화 항체 반응은 피임을 위해 사용될 수 있다. 특정 종양의 성장을 위해 요구되는 호르몬 및 다른 가용성 인자에 대한 중화 항체 반응이 또한 가능한 백신접종 표적으로서 고려될 수 있다.

[0202] 항-LAG-3 항체의 사용을 위한 상기 기재된 바와 같은 유사한 방법은 아밀로이드 침착물, 예컨대 알츠하이머병에서의 Aβ, 시토카인, 예컨대 TNFα, 및 IgE를 비롯한 다른 자기-항원의 부적절한 축적을 갖는 환자를 치료하기 위해 치료적 자가면역 반응의 유도를 위해 사용될 수 있다.

[0203] 백신

[0204] 항-LAG-3 항체는 관심있는 항원 (예를 들어, 백신)과 항-LAG-3 항체의 공투여에 의해 항원-특이적 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 항원에 대한 면역 반응이 증진되도록, 대상체에게 (i) 항원; 및 (ii) 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 인간 항-인간 LAG-3 항체 (예컨대, 본원에 기재된 임의의 인간 항-LAG-3 항체)이다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 항원은, 예를 들어 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 이러한 항원의 비제한적인 예는 상기 섹션에서 논의된 것, 예컨대 상기 논의된 종양 항원 (또는 종양 백신), 또는 바이러스, 박테리아 또는 상기 기재된 다른 병원체로부터의 항원을 포함한다.

[0205] 본 발명의 항체 조성물 (예를 들어, 인간 모노클로날 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역접합체)을 생체내 및 시험관내 투여하는데 적합한 경로는 관련 기술분야에 익히 공지되어 있고, 통상의 기술자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 주사에 의해 (예를 들어, 정맥내 또는 피하) 투여될 수 있다. 사용된 분자의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중 및 항체 조성물의 농도 및/또는 제제에 따라 좌우될 것이다.

[0206] 이전에 기재된 바와 같이, 본 발명의 인간 항-LAG-3 항체는 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 세포독성제, 방사성독성제 또는 면역억제제와 공-투여될 수 있다. 항체는 상기 작용제에 연결될 수 있거나 (면역-복합체로서), 또는 상기 작용제와 별개로 투여될 수 있다. 후자의 경우에 (별개의 투여), 항체는 상기 작용제의 투여 전에, 후에 또는 상기 작용제와 동시에 투여될 수 있거나, 또는 다른 공지된 요법, 예를 들어 항암 요법, 예를 들어 방사선요법과 공-투여될 수 있다. 이러한 치료제는 특히 단독으로는 환자에게 독성 또는 아독성인 수준에서만 효과적인 항신생물제, 예컨대 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실, 다카르바진 및 시클로포스파미드 히드록시우레아를 포함한다. 시스플라틴은 100 mg/ml 용량으로서 4주마다 1회씩 정맥내로 투여되고, 아드리아마이신은 60-75 mg/ml 용량으로서 21일마다 1회씩 정맥내로 투여된다. 화학요법제와 본 발명의 인간 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 공-투여는 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 일으키는 상이한 메카니즘을 통해 작용하는 2가지 항암제를 제공한다. 이러한 공-투여는 항체에 비반응성이 되도록 할 약물에 대한 내성의 발달 또는 종양 세포의 항원성의 변화로 인한 문제를 해결할 수 있다.

[0207] 본 발명의 항체 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 면역접합체) 및 사용 지침서를 포함하는 키트가 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 키트는 적어도 하나의 추가의 시약, 또는 하나 이상의 추가의 본 발명의 인간 항체 (예를 들어, 제1 인간 항체와 구분되는 LAG-3 항원 내의 에피토프에 결합하는 상보성 활성을 갖는 인간 항체)를 추가로 함유할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 지시하는 라벨을 포함한다. 용어 라벨은 키트 상에 또는 키트와 함께 제공되거나, 또는 달리 키트에 동반되는 임의의 문서 또는 기록물을 포함한다.

[0208] 조합 요법

[0209] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-LAG-3 항체 (또는 그의 항원-결합 부분)가 면역 반응을 자극하여 대상체에서 면역 반응을 추가로 증진시키거나, 자극하거나, 또는 상향조절하는데 효과적인 하나 이상의 추가의 항체와 공투여되는 조합 요법의 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은, 예를 들어 종양 성장을 억제하기 위해 또는 항-바이러스 반응을 자극하기 위해 대상체에서의 면역 반응이 자극되도록, 대상체에게 항-LAG-3 항체 및 하나 이상의 추가의 면역자극 항체, 예컨대 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체를 투여하

는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 자극하기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체에게 항-LAG-3 항체 및 항-PD-1 항체를 투여한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체에게 항-LAG-3 항체 및 항-PD-L1 항체를 투여한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체에게 항-LAG-3 항체 및 항-CTLA-4 항체를 투여한다. 한 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 인간 항체, 예컨대 본 개시내용의 항체이다. 대안적으로, 항-LAG-3 항체는, 예를 들어 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다 (예를 들어, 마우스 항-LAG-3 mAb로부터 제조된 것). 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 면역자극 항체 (예를 들어, 항-PD-1, 항-PD-L1 및/또는 항-CTLA-4 항체)는 인간 항체이다. 대안적으로, 적어도 하나의 추가의 면역자극 항체는, 예를 들어 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다 (예를 들어, 마우스 항-PD-1, 항-PD-L1 및/또는 항-CTLA-4 항체로부터 제조된 것).

[0210] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 LAG-3 항체 및 CTLA-4 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 과다증식성 질환 (예를 들어, 암)을 치료하는 방법을 제공한다. 추가 실시양태에서, 항-LAG-3 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 항-CTLA-4 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 또는 둘 다 치료 용량 미만으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-LAG-3 항체 및 치료 용량 미만의 항-CTLA-4 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 면역자극제를 이용한 과다증식성 질환의 치료와 연관된 유해 사례를 변경시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시양태에서, 항-CTLA-4 항체는 인간 서열 모노클로날 항체 10D1 (PCT 공개 WO 01/14424에 기재됨)이고, 항-LAG-3 항체는 인간 서열 모노클로날 항체, 예컨대 본원에 기재된 LAG3.5이다. 본 발명의 방법에 포함되는 다른 항-CTLA-4 항체는, 예를 들어 WO 98/42752; WO 00/37504; 미국 특허 번호 6,207,156; 문헌 [Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); 및 Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304]에 개시된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CTLA-4 항체는 인간 CTLA-4에 5 x 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하거나, 인간 CTLA-4에 1 x 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하거나, 또는 인간 CTLA-4에 5 x 10^{-9} M 이하의 K_D로 결합하거나, 인간 CTLA-4에 1 x 10^{-8} M 내지 1 x 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합한다.

[0211] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 LAG-3 항체 및 PD-1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 과다증식성 질환 (예를 들어, 암)을 치료하는 방법을 제공한다. 추가 실시양태에서, 항-LAG-3 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 항-PD-1 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 또는 둘 다 치료 용량 미만으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-LAG-3 항체 및 치료 용량 미만의 항-PD-1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 면역자극제를 이용한 과다증식성 질환의 치료와 연관된 유해 사례를 변경시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 인간 서열 모노클로날 항체이고, 항-LAG-3 항체는 인간 서열 모노클로날 항체, 예컨대 본원에 기재된 LAG3.5이다. 인간 서열 항-PD-1 항체의 예는 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 및 4A11을 포함하고, 이들은 PCT 공개 WO 06/121168에 기재되어 있다. 다른 항-PD-1 항체는, 예를 들어 람브롤리주맙 (WO2008/156712), 및 AMP514 (WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2010/098788)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 인간 PD-1에 5 x 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하거나, 인간 PD-1에 1 x 10^{-8} M 이하의 KD로 결합하거나, 인간 PD-1에 5 x 10^{-9} M 이하의 K_D로 결합하거나, 또는 인간 PD-1에 1 x 10^{-8} M 내지 1 x 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합한다.

[0212] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 LAG-3 항체 및 PD-L1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 과다증식성 질환 (예를 들어, 암)을 치료하는 방법을 제공한다. 추가 실시양태에서, 항-LAG-3 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 항-PD-L1 항체가 치료 용량 미만으로 투여되거나, 또는 둘 다 치료 용량 미만으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-LAG-3 항체 및 치료 용량 미만의 항-PD-L1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 면역자극제를 이용한 과다증식성 질환의 치료와 연관된 유해 사례를 변경시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간 서열 모노클로날 항체이고, 항-LAG-3 항체는 인간 서열 모노클로날 항체, 예컨대 본원에 기재된 LAG3.5이다. 인간 서열 항-PD-L1 항체의 예는 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 및 13G4를 포함하고, 이들은 PCT 공개 WO 07/005874에 기재되어 있다. 다른 항-PD-1 항체는, 예를 들어 MPDL3280A (RG7446) (WO2010/077634), MEDI4736 (WO2011/066389) 및 MDX1105 (WO2007/005874)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간 PD-L1에 5 x 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하거나, 인간 PD-L1에 1 x 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하거나, 인간 PD-L1에 5 x 10^{-9} M

이하의 K_D로 결합하거나, 또는 인간 PD-L1에 1 x 10^{-8} M 내지 1 x 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합한다.

[0213] 항체에 의한 LAG-3 및 하나 이상의 제2 표적 항원, 예컨대 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1의 차단은 환자에서 암성 세포에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 본 개시내용의 항체를 사용하여 성장이 억제될 수 있는 암은 면역요법에 전형적으로 반응성인 암을 포함한다. 본 개시내용의 조합 요법을 이용한 치료에 대한 암의 대표적인 예는 항-LAG-3 항체를 이용한 단독요법의 논의에서 상기 구체적으로 나열된 암을 포함한다.

[0214] 특정 실시양태에서, 본원에 논의된 치료 항체들의 조합물은 제약상 허용되는 담체 중의 단일 조성물로서 동시에 투여될 수 있거나, 또는 제약상 허용되는 담체 중의 각각의 항체를 갖는 별개의 조성물로서 동시에 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 치료 항체의 조합물은 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-CTLA-4 항체 및 항-LAG-3 항체는 순차적으로 투여될 수 있고, 예컨대 항-CTLA-4 항체가 먼저 투여되고 항-LAG-3 항체가 두 번째로 투여되거나, 또는 항-LAG-3 항체가 먼저 투여되고 항-CTLA-4 항체가 두 번째로 투여될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항-PD-1 항체 및 항-LAG-3 항체는 순차적으로 투여될 수 있고, 예컨대 항-PD-1 항체가 먼저 투여되고 항-LAG-3 항체가 두 번째로 투여되거나, 또는 항-LAG-3 항체가 먼저 투여되고 항-PD-1 항체가 두 번째로 투여될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항-PD-L1 항체 및 항-LAG-3 항체는 순차적으로 투여될 수 있고, 예컨대 항-PD-L1 항체가 먼저 투여되고 항-LAG-3 항체가 두 번째로 투여되거나, 항-LAG-3 항체가 먼저 투여되고 항-PD-L1 항체가 두 번째로 투여될 수 있다.

[0215] 또한, 1회 초과 용량의 조합 요법이 순차적으로 투여되는 경우에, 순차적 투여의 순서는 각각의 투여 시점에서 역전되거나 또는 동일한 순서로 지켜질 수 있거나, 순차적 투여가 동시 투여와 조합될 수 있거나, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 조합물 항-CTLA-4 항체 및 항-LAG-3 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 먼저 항-CTLA-4 및 두 번째로 항-LAG-3을 이용하여 순차적일 수 있고, 제3 투여는 먼저 항-LAG-3 및 두 번째로 항-CTLA-4를 이용하는 식으로 순차적일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합물 항-PD-1 항체 및 항-LAG-3 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 먼저 항-PD-1 및 두 번째로 항-LAG-3을 이용하여 순차적일 수 있고, 제3 투여는 먼저 항-LAG-3 및 두 번째로 항-PD-1을 이용하는 식으로 순차적일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합물 항-PD-L1 항체 및 항-LAG-3 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 먼저 항-PD-L1 및 두 번째로 항-LAG-3을 이용하여 순차적일 수 있고, 제3 투여는 먼저 항-LAG-3 및 두 번째로 항-PD-L1을 이용하는 식으로 순차적일 수 있다. 또 다른 대표적인 투여 계획은 먼저 항-LAG-3 및 두 번째로 항-CTLA-4 (및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1)을 이용하여 순차적인 제1 투여를 포함할 수 있고, 후속적인 투여는 동시일 수 있다.

[0216] 임의로, 항-LAG-3 및 하나 이상의 추가의 항체 (예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체)의 조합물은 면역원성 작용제, 예컨대 암성 세포, 정제된 종양 항원 (재조합 단백질, 펩티드 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극 시토카인을 코딩하는 유전자로 형질감염된 세포와 추가로 조합될 수 있다 (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). 사용될 수 있는 종양 백신의 비제한적인 예는 흑색종 항원의 펩티드, 예컨대 gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드, 또는 시토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포를 포함한다 (하기에 추가로 논의됨). 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단은 항-LAG-3 항체를 이용한 단독요법에 관하여 상기 상세히 논의된 임의의 백신접종 프로토콜과 같은 백신접종 프로토콜과 추가로 조합될 수 있다.

[0217] 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단은 또한 표준 암 치료와 추가로 조합될 수 있다. 예를 들어, 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단은 화학치료 요법과 효과적으로 조합될 수 있다. 이들 경우에, 본 개시내용의 조합물과 함께 투여되는 다른 화학치료 시약의 용량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). 이러한 조합물의 예는 흑색종의 치료를 위한 데카르바진과 추가로 조합한 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 조합물이다. 또 다른 예는 흑색종의 치료를 위한 인터류킨-2 (IL-2)와 추가로 조합한 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 조합물이다. LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단과 화학요법제의 조합된 사용을 위한 과학적인 근거는 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과인 세포 사멸이 항원 제시 경로 내의 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 세포 사멸을 통해 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단과 상승작용을 유발할 수 있는 다른 조합 요법은 방사선요법, 수술 또는 호르몬 박탈을 포함한다. 각각의 이들 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성시킨다. 또한, 혈관신생 억제제가 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단과 조합될 수 있다. 혈관신생의 억제는 종양 항원을 숙주 항원 제시 경로 내로 공급하는 공급원일 수 있는 종양 세포 사멸을 유발한다.

[0218] LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단 항체의 조합물은 또한 Fcα 또는 Fcγ 수용체-발현 이펙터 세포를 종양 세포에 대해 표적화하는 이중특이적 항체와 조합하여 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,922,845 및 5,837,243 참조). 이중특이적 항체는 2개의 별개의 항원을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 이들 반응의 T 세포 아암은 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단의 사용에 의해 증가될 것이다.

[0219] 또 다른 예에서, 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 조합물은 항신생물질 항체, 예컨대 리툭산(Rituxan)® (리툭시맙), 헤르셉틴(Herceptin)® (트라스트주맙), 벡사르(Bexxar)® (토시투모맙), 제발린(Zevalin)® (이브리투모맙), 캄파트(Campath)® (알렘투주맙), 림포사이드(Lymphocide)® (에프르투주맙), 아바스틴(Avastin)® (베바시주맙) 및 타르세바(Tarceva)® (에를로티닙) 등과 함께 사용될 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만 예로서, 항암 항체 또는 독소에 접합된 항암 항체를 이용한 치료는 암 세포 사멸 (예를 들어, 종양 세포)를 유발할 수 있고, 이는 CTLA-4, PD-1, PD-L1 또는 LAG-3에 의해 매개되는 면역 반응을 증강시킬 것이다. 예시적 실시양태에서, 과다증식성 질환 (예를 들어, 암 종양)의 치료는 항암 항체를 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체와 조합하여, 공동으로 또는 순차적으로 또는 그의 임의의 조합으로 포함할 수 있고, 이는 숙주에 의한 항종양 면역 반응을 증강시킬 수 있다.

[0220] 종양은 매우 다양한 메카니즘에 의해 숙주 면역 감시를 피한다. 많은 이들 메카니즘은 종양에 의해 발현되고 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은 특히 TGF-β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), 및 Fas 리간드 (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)를 포함한다. 또 다른 예에서, 각각의 이들 물질에 대한 항체는 면역억제제의 효과를 상쇄하고 숙주에 의한 항종양 면역 반응에 도움을 주기 위해 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체 조합물과 추가로 조합될 수 있다.

[0221] 숙주 면역 반응성을 활성화시키기 위해 사용될 수 있는 다른 항체가 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체 조합물과 조합하여 추가로 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능 및 항원 제시를 활성화시키는 수지상 세포의 표면 상의 분자를 포함한다. 항-CD40 항체 (상기 문헌 [Ridge et al.])가 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 조합물과 함께 사용될 수 있다 (상기 문헌 [Ito et al.]). T 세포 공동자극 분자 (상기 문헌 [Weinberg et al., Melero et al., Hutloff et al.])에 대한 다른 활성화 항체도 증가된 수준의 T 세포 활성화를 제공할 수 있다.

[0222] 상기 논의된 바와 같이, 골수 이식은 조혈계 기원의 다양한 종양의 치료를 위해 현재 사용되고 있다. 공여자의 이식된 종양 특이적 T 세포의 유효성을 증가시키기 위해 조합된 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단이 사용될 수 있다.

[0223] 몇몇 실험적 치료 프로토콜은 항원 특이적 T 세포의 생체외 활성화 및 팽창, 및 종양에 대한 항원-특이적 T 세포를 위한 이들 세포의 수용자 내로의 입양 전달을 포함한다 (상기 문헌 [Greenberg & Riddell]). 또한, 이들 방법은 감염원, 예컨대 CMV에 대한 T 세포 반응을 활성화시키기 위해 사용될 수 있다. 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체의 존재 하의 생체외 활성화는 입양 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을 증가시킬 것으로 예상될 수 있다.

[0224] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항-LAG-3 항체 및 치료 용량 미만의 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 면역자극제를 이용한 과다증식성 질환 (예를 들어, 암)의 치료와 연관된 유해 사례를 변경시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 비-흡수성 스테로이드를 환자에게 투여함으로써 면역자극 치료 항체-유도된 결장염 또는 설사의 발생률을 감소시키는 방법을 제공한다. 면역자극 치료 항체를 받을 임의의 환자가 이러한 항체에 의해 유도되는 결장염 또는 설사가 발생할 위험이 있기 때문에, 상기 전체 환자 집단은 본 발명의 방법에 따른 요법에 적합하다. 스테로이드는 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하고 IBD의 악화를 예방하기 위해 투여되었지만, IBD로 진단되지 않은 환자에서 IBD를 예방하기 (그의 발생률을 감소시키기) 위해 사용되지는 않았다. 스테로이드, 심지어 비-흡수성 스테로이드는 그와 연관된 유의한 부작용으로 인해 예방적 용도로 사용되지 않았다.

[0225] 추가 실시양태에서, 조합물 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단 (즉, 면역자극 치료 항체 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체)은 임의의 비-흡수성 스테로이드의 사용과 추가로 조합될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "비-흡수성 스테로이드"는 광범위한 일차 통과 대사를 나타내어, 간에서 대사 후에 스테로이드의 생체이용률이 낮은, 즉 약 20% 미만인 글루코코르티코이드이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 비-흡수성 스테로이드는 부데소니드이다. 부데소니드는 국소-작용성 글루코코르티코스테로이

드이고, 이것은 경구 투여 후에 주로 간에 의해 광범위하게 대사된다. 엔토코르트 이씨(ENTOCORT EC)® (아스트라-제네카(Astra-Zeneca))는 회장으로 및 결장 전체로의 약물 전달을 최적화하기 위해 개발된 부데소니드의 pH- 및 시간-의존적 경구 제제다. 엔토코르트 이씨®는 회장 및/또는 상행 결장을 포함하는 경증 내지 중등도 크론병의 치료를 위해 미국에서 승인받았다. 크론병의 치료를 위한 엔토코르트 이씨®의 통상의 경구 투여량은 6 내지 9 mg/일이다. 엔토코르트 이씨®는 장에서 방출된 후, 소화관 점막에서 흡수되고 유지된다. 일단 소화관 점막 표적 조직을 통과하면, 엔토코르트 이씨®는 간에서 시토크롬 P450 시스템에 의해 무시가능한 글루코코르티코이드 활성을 갖는 대사물질로 광범위하게 대사된다. 따라서, 생체이용률은 낮다 (약 10%). 부데소니드의 낮은 생체이용률로 인해, 덜 광범위한 일차 통과 대사를 갖는 다른 글루코코르티코이드에 비해 치료가능 비가 개선된다. 부데소니드는 전신-작용성 코르티코스테로이드보다 적은 시상하부-뇌하수체 억제를 비롯하여 부작용이 보다 적다. 그러나, 엔토코르트 이씨®의 만성 투여는 과다부신호르몬증 (hypercorticism) 및 부신 억제와 같은 전신 글루코코르티코이드 효과를 일으킬 수 있다. 문헌 [PDR 58th ed. 2004; 608-610]을 참조한다.

[0226] 추가 실시양태에서, 비-흡수성 스테로이드와 함께 조합물 LAG-3 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 차단 (즉, 면역자극 치료 항체 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체)은 살리실레이트와 추가로 조합될 수 있다. 살리실레이트는 5-ASA 작용제, 예컨대 예를 들어: 술파살라진 (아줄피딘(AZULFIDINE)®, 파마시아 & 업존(Pharmacia & UpJohn)); 올살라진 (디펜툼(DIPENTUM)®, 파마시아 & 업존); 발살라지드 (콜라잘(COLAZAL)®, 살릭스 파마슈티칼스, 인크.(Salix Pharmaceuticals, Inc.)); 및 메살라민 (아사콜(ASACOL)®, 프록터 & 갬블 파마슈티칼스(Procter & Gamble Pharmaceuticals); 펜타사(PENTASA)®, 샤이어 유에스(Shire US); 카나사(CANASA)®, 액스칸 스캔디팜, 인크.(Axcan Scandipharm, Inc.); 로와사(ROWASA)®, 솔베이(Solvay))을 포함한다.

[0227] 본 발명의 방법에 따라, 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체와 조합하여 투여된 살리실레이트, 및 비-흡수성 스테로이드는 면역자극 항체에 의해 유도되는 결장염의 발생률을 감소시키기 위해 살리실레이트 및 비-흡수성 스테로이드의 임의의 겹치는 또는 순차적 투여를 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어 본 발명에 따른 면역자극 항체에 의해 유도되는 결장염의 발생률을 감소시키는 방법은 살리실레이트 및 비-흡수성을 공동으로 또는 순차적으로 (예를 들어, 살리실레이트는 비-흡수성 스테로이드 후 6시간째에 투여됨), 또는 그의 임의의 조합으로 투여하는 것을 포함한다. 추가로, 본 발명에 따르면, 살리실레이트 및 비-흡수성 스테로이드는 동일한 경로에 의해 (예를 들어, 둘 다 경구로 투여됨), 또는 상이한 경로에 의해 (예를 들어, 살리실레이트는 경구로 투여되고, 비-흡수성 스테로이드는 직장으로 투여됨) 투여될 수 있고, 이는 항-LAG-3 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 항체를 투여하기 위해 사용된 경로(들)와 상이할 수 있다.

[0228] 본 개시내용은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 추가로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원 전반에 걸쳐 인용되는 모든 도면 및 모든 참고문헌, 진뱅크 서열, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 명확하게 본원에 참조로 포함된다. 특히, PCT 공개 WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546 및 WO 09/054863의 개시내용은 명확하게 본원에 참조로 포함된다.

[0229] 실시예

[0230] 실시예 1: LAG3.1 (항체 25F7)의 변이체의 설계

[0231] LAG3.1로서 본원에 언급된, 이전에 기재된 항-LAG-3 항체 25F7의 항체 변이체를, 먼저 분해의 잠재적 부위에 대해 항체의 아미노산 서열을 분석함으로써 생성하였다. 퀵체인지(QuikChange) II XL® 부위-지정 돌연변이유발 키트 (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies))를 사용하여 LAG3.1 V_H 영역의 부위-지정 돌연변이유발의 발현을 수행하였다. 이어서, 변경된 V_H 영역을 인간 IgG4-S228P 불변 영역을 함유하는 UCOE® (EMD 밀리포어 (EMD Millipore)) 벡터 내로 서브클로닝하였다. 다양한 중쇄 벡터를 CHO-S 세포 내로 LAG3.1 카파 쇄를 발현하는 벡터와 함께 각각 공-형질감염시키고, 발현에 대해 안정한 풀을 선택하였다.

[0232] 5개의 잠재적 탈아미드화 모티프를 가변 영역 중쇄 CDR2 내에서 확인하였다. 이들 부위는 LAG3.1의 중쇄 가변 영역 (서열 2)의 위치 52, 54, 56, 58 및 60에 위치하였다 (도 1a 참조). 특히, VH CDR2 (서열 6) 내의 "NG" 서열의 탈아미드화 뿐만 아니라 서열의 추가의 이성질체화가 모든 조건 하에서 관찰되었다. 출발 물질의 탈아미드화는 약 10%였다. 또한, 상기 "NG" 서열은 배선 서열에 상응하지 않는 것으로 밝혀졌다 (도 3 참조). 그러나, 컨센서스 배선 서열은 잠재적 글리코실화 부위였고, 따라서 항체 변이체 중에 포함되지 않았다.

[0233] 도 3에 나타낸 바와 같이, 잠재적 탈아미드화 모티프 중 2개 (위치 54 및 56)를 다루는 4개의 변이체 (LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 및 LAG3.8로서 본원에 언급됨)를 설계하였다. 이들 변이체를 하기 표 1에 요약된 바와 같은 조

건의 행렬에 적용하고, 하기 특징을 분석하였다: (a) 화학적 및 열 안정성 (물리적 안정성); (b) 크기 배제 크로마토그래피 (응집); (c) 등전 포커싱 겔 (IEF) (전하 불균일성); (d) 비아코어 분석에 의한 활성 (결합 및 기능적 활성); 및 (e) 질량-분광측정법에 의한 펩티드 맵핑 (화학적 변형/분자 안정성).

[0234] 표 1

완충제	아세테이트(100nM NaCl, 3% w/v 만니톨, 0.03% 트윈-20)	시트레이트(100nM NaCl, 3% w/v 만니톨, 0.03% 트윈-20)
pH	5.5, 6.0, 6.5, 7.0	5.5, 6.0, 6.5, 7.0
온도	4°C 및 37°C	4°C 및 37°C
시간	0, 4, 8, 12주	0, 4, 8, 12주

[0235]

[0236] 실시예 2: LAG-3 변이체의 특성화

[0237] 1. 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포 결합

[0238] 활성화된 인간 T 세포의 표면 상의 천연 인간 LAG-3에 결합하는 항체 변이체의 능력을 시험하기 위해, 정상의 건강한 공여자 말초 혈액 단핵 세포를 용액 중 각각 5 μg/mL 및 3 μg/mL로 존재하는 항-CD3 (이바이오사이언스(eBioscience), 카탈로그 번호 16-0037-85) 및 항-CD28 (BD 바이오사이언스(BD Bioscience), 카탈로그 번호 555725) 항체의 조합물에 의해 2x10e6개 세포/mL의 밀도로 15 cm 조직 배양 플레이트에서 자극시켰다. 3일의 자극 후에 세포를 수확하고, 1x PFAE 완충제 (1x PBS + 2% FBS, 0.02% 아지드화나트륨, 2mM Na EDTA)로 1회 세척하고, 염색을 위해 1x PFAE 완충제 중에 재현탁시켰다.

[0239] 결합 반응을 위해, LAG3.1 변이체를 차가운 1x PFAE 완충제로 연속 희석한 다음, 50 μl의 희석된 항체 용액을 1x PFAE 완충제 중에 1:16으로 희석한 50 μl의 Fitc-표지된 항-인간 CD4 (BD 바이오사이언스, 카탈로그 번호 555346)와 혼합하였다. 결합 반응을 위해, 100 μl의 상기 희석된 항체 혼합물을 2 x 10^5개 세포에 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 1x PFAE 완충제로 2회 세척하였다. PE-표지된 염소 항-인간 Fcγ-특이적 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 카탈로그 번호 109-116-170)의 1:200 희석물을 첨가하고, 혼합물을 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 차가운 1x PFAE 완충제로 2회 세척하였다. 최종 세척 후에, 150 μl의 차가운 1x PFAE를 각각의 용액에 첨가하고, 팩스칸토(FACSCanto) 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언스)를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 항체 결합의 분석을 수행하였다.

[0240] 유동 세포측정법 분석의 결과를 활성화된 인간 CD4+ T 세포에 대한 항체 결합에 대한 EC_{50}을 나타내는 그래프인 도 4a에 요약하였다. 도 4b는 비아코어에 의해 가용성 인간 LAG-3/Fc 항원에 대한 항체 결합을 나타내는 그래프이다. 나타낸 바와 같이, LAG3.5 및 LAG3.8의 결합 친화도는 LAG3.1과 비교하여 약간 더 낮았지만, 그들의 오프-레이트 상수는 LAG3.1과 비교하여 약간 더 높았다.

[0241] 2. 물리적 안정성

[0242] 변이체의 열 안정성 및 열 변성을 마이크로칼(Microcal) VP-DSC를 사용하여 시험하였다. 구체적으로, 각각의 변이체를 PBS (미디어테크(Mediatech) 카탈로그 번호 21-040-CV 로트 번호 21040139)로 희석하였다. PBS로 희석한 후에 샘플의 최종 농도는 250 μg/mL였다. 샘플을 74℃로 스캐닝하고, 25℃로 냉각시키고, 74℃로 재가열하였다. PBS 완충제를 블랭크 대조군으로서 사용하였다. 오리진(Origin) 소프트웨어에 의해 수행된 비-2-스테이트 모델 및 곡선 적합에 데이터를 적합시켰다.

[0243] 표 2에 요약하고 도 5에 나타낸 바와 같이, LAG3.5는 LAG3.1보다 높은 용융 온도 TM2를 가졌고, 이는 더 큰 전체 안정성을 가리킨다.

[0244] 표 2

MAb	Tm1 (°C) CH2 및/또는 Fab 도메인에 상응함	Tm2 (°C) CH3 및/또는 Fab 도메인에 상응함
LAG3.1	70.7	75.7
LAG3.5	70.5	76.3
LAG3.6	67.8	70.8
LAG3.7	69.4	73.5
LAG3.8	70.3	75.4

[0245]

[0246] 변성 후 항체 재폴딩은 장기 응집 잠재력의 반비례 척도이다. 따라서, LAG-3 변이체를 또한 열 안정성에 관하여 시험하고 비교하였다. 구체적으로, 항체를 74℃로 가열하고, 실온으로 냉각시킨 후, 74℃로 다시 가열하였다. 제1 온도기록도에 대한 제2 온도기록도의 곡선하 면적의 비는 열 가역성의 추정치를 제공하고, 이는 입체 형태 가역성의 정비례 척도이다.

[0247] 표 3에 요약하고 도 6에 나타낸 바와 같이, LAG3.5는 다른 모든 변이체보다 실질적으로 높은 열 가역성을 가졌다. 특히, LAG3.5에 대한 가역성 퍼센트 (47%)는 LAG3.1의 것 (20%)의 2배 초과였다. 열 가역성은 장기 응집 잠재력과 강하게 상호관련된다. 보다 낮은 가역성은 보다 높은 잠재적 응집에 상응한다. 상기 관찰에 기초하여, LAG3.1은 LAG3.5와 비교하여, 시간이 지남에 따라 실질적으로 더 높은 응집을 잠재적으로 나타낼 것이다. 유사하게, 다른 모든 변이체는 LAG3.5와 비교하여, 시간이 지남에 따라 실질적으로 더 높은 응집을 잠재적으로 나타낼 수 있다.

[0248] 표 3

MAb	**열 가역성 (%)**
LAG3.1	**20**
LAG3.5	**47**
LAG3.6	**0**
LAG3.7	**11**
LAG3.8	**26**

[0249]

[0250] 3. 응집

[0251] 변이체를 또한 하기 프로토콜에 따라 표준 크기 배제 HPLC (SEC-HPLC)를 사용하여 단백질 응집의 척도로서의 안정성에 대해 시험하였다: 항체 시험 샘플을 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 1.0 mg/ml로 희석하고, 10 μL를 HPLC (워터스(Waters), 모델 2795)에 적용하였다. 0.1M 인산나트륨, 0.15M 염화나트륨, 0.1M 황산나트륨, pH 7.2의 이동상을 사용하여 겔 여과 칼럼 (도소 바이오사이언스(TOSOH Bioscience), TSK겔(TSKgel) G3000 SWxl, 7.8mm x 300mm, 제품 번호08541) 상에서 분리를 달성하였다. 280nm에서 UV 흡광도를 모니터링함으로써 분석물을 검출하였고, 엠파워(Empower) 소프트웨어를 사용하여 항체 피크 면적 퍼센트 조성을 결정하였다. 표 4에 나타낸 바와 같이, LAG3.5는 LAG3.1과 비교하여 실질적으로 감소된 응집을 나타냈다.

[0252] 표 4

샘플	**IgG 단량체 (피크 면적%)**	**IgG 응집체 (피크 면적%)**
LAG3.1	**90**	**10**
LAG3.5	**96**	**4**
LAG3.6	**96**	**4**
LAG3.7	**95**	**5**
LAG3.8	**95**	**5**

[0253]

[0254] 실시예 3: 변이체 선택

[0255] 상기 기재된 연구에 기초하여, 항체 변이체 LAG3.5를, 그의 비변형된 형태 (LAG3.1)와 비교하여 유의하게 개선된 그의 물리적 및 화학적 안정성, 특히 입체형태 재폴딩 (열 가역성)에 대한 그의 높은 능력에 비추어, 추가의 분석을 위해 선택하였다. 상기 분석은 (a) 가속화된 스트레스, (b) 이후의 12주 실시간 안정성 평가의 2단계 접근법을 포함하였다. 구체적으로, pH 8.0, 50 mM 중탄산암모늄 중 1.0 mg/ml의 LAG3.5를 40℃에서 5일 동안 인큐베이션하였다. 5일 후의 변형 정도 뿐만 아니라 활성 및 안정성에 대한 효과를 분석하였다. 이어서, LAG3.5 변이체를 12주의 지속시간 동안 PBS 중의 실시간 안정성에 적용하였고, 후속적으로 분석하였다. 이들 연구의 결과를 하기에 기재하였다.

[0256] 1. 항원 결합

[0257] 도 7 (및 표 5)에 나타낸 바와 같이, 5일 후에 항원 결합에서의 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 또한, 도 10a 및 b에 나타낸 바와 같이, LAG3.5는 12주 후에 항원 결합 또는 물리적 안정성에서의 변화를 나타내지 않았다. 특히, LAG3.5는 4℃ 및 40℃ 둘 다에서 전체 12주의 기간에 걸쳐 LAG3.8보다 높은 친화도를 유지하였다.

[0258] 표 5

[0259]

클론 ID	항원	K_D x 10^{-9} (M)	k_{on} x 10^4 (1/Ms)	K_{off} x 10^{-4} (1/s)
Lag3.1	PBS	0.21	166	3.44
	pH8	0.20	184	3.61
Lag3.5	PBS	0.25	130	3.22
	pH8	0.20	148	2.98
Lag3.8	PBS	0.25	147	3.68
	pH8	0.25	162	4.02

[0260] 2. 화학적 변형/분자 안정성

[0261] 질량 분광측정법에 의한 펩티드 맵핑을 사용하여 LAG3.1과 비교한 LAG3.5의 화학적/분자 안정성을 분석하였다. 구체적으로, 정제된 항체를 환원시키고, 알킬화하고, 투석하고, 트립신 (프로메가(Promega) 카탈로그 V5111) 및 GluC (로슈(Roche) 카탈로그 11047817001)에 의해 소화시켰다. 나노-LC MSMS 질량 분광측정법 (써모 피셔 LTQ 오르비트랩(Thermo Fisher LTQ Orbitrap))에 의해 소화물을 분석하였다.

[0262] 도 8에 나타낸 바와 같이, 아스파라긴 잔기를 탈아미드화시키는, 보다 높은 pH에서의 가속화된 안정성에 적용시켰을 때 (단계 1), LAG3.1은 LAG3.5와 비교하여 증가된 V_H에서의 불균일성을 나타냈다. 이성질체화에 기인한 질량에서의 변화는 현재의 실험 조건 하에서는 검출할 수 없었다. 모 피크에 대한 조합된 모든 변화의 비로서 변화 백분율을 나타냈다.

[0263] 또한, 도 11에 나타낸 바와 같이, 4℃ 및 40 ℃ 둘 다에서 12주의 장기간 실시간 안정성에 적용시켰을 때 (단계 2), LAG3.1은 LAG3.5와 비교하여 증가된 V_H에서의 불균일성을 나타냈다.

[0264] 3. 물리적 안정성

[0265] 열 가역성을 PBS 중에서 및 pH 8.0에서 측정하였다. 둘 다의 조건 하에서, LAG3.5는 LAG3.1과 비교하여 대략 2배의 재폴딩 수준을 다시 나타냈다. 구체적으로, 표 6-8에 나타낸 바와 같이, LAG3.5는 PBS 중에서 LAG3.1에 대한 18%와 비교하여 43%의 재폴딩을 나타냈다. LAG3.5는 또한 pH 8.0에서 LAG3.1에 대한 29%의 재폴딩과 비교하여 48%의 재폴딩을 나타냈다.

[0266] 표 6 - DSC:용융

[0267]

MAb	조건	Tm1	Tm2
Lag3.1	PBS	70.7	75.7
Lag3.1	pH8	70.4	75.6
Lag3.5	PBS	70.8	76.4
Lag3.5	pH8	70.5	76.3

[0268] 표 7 - 플루오로로그-2:재폴딩

Mab/돌연변이체	중간점(M)	융점(M)
Lag3.1 PBS	1.99	_
Lag3.1 pH8	2.08	_
Lag3.5 PBS	1.86	_
Lag3.5 pH8	2.00	_

[0269]

[0270] 표 8: DSC:재폴딩

MAb	가역성% PBS	가역성% pH8
Lag3.1	18	29
Lag3.5	43	48

[0271]

[0272] 4. 전하 불균일성

[0273] 전하 불균일성을 평가하기 위해, pI 5.5 및 pI 10.0의 표준 마커를 갖는 등전포커싱 (IEF)을 사용하여 변이체를 LAG3.1과 비교하여 분석하였다. 간략하게, 1 mm 두께 IEF pI 3-7 사전-제조 겔 (인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 번호 EC6648BOX) 상에 pI 3-10 마커 (세르바(SERVA), 카탈로그 번호 39212)와 함께 항체 용액을 적용하였다. IEF 3-7 캐소드 완충제 (인비트로젠, 카탈로그 번호 LC5370) 및 IEF 애노드 완충제 (인비트로젠, 카탈로그 번호 LC5300)를 사용하고, 1시간 동안 100 V 정전압, 1시간 동안 200 V 정전압, 및 30분 동안 500 V 정전압의 순서로 전류를 인가하여 전기영동을 수행하였다. IEF 겔을 쿠마시 블루로 염색하여 단백질 밴드를 검출하고, 메탄올-아세트산 용액으로 탈색하였다. 이어서, IEF 겔을 이미지퀀트 TL(ImageQuant TL) 소프트웨어에 의해 분석하였다. 이 분석 (데이터는 나타내지 않음)에 기초할 때, LAG3.5는 LAG3.1과 비교하여 유의하게 더 적은 불균일성을 나타냈다.

[0274] 5. HIC-HPLC

[0275] 가용성을 평가하기 위해, 변이체를 하기 프로토콜에 따라 표준 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC-HPLC)를 사용하여 분석하였다: 2M 황산암모늄 50 μL를 1 mg/ml의 항체 시험 샘플 50 μL에 첨가하였다. 이어서, 시험 샘플 80 μL를 HIC 칼럼 (도소 바이오사이언스, 에테르-5PW TSK-겔, 7.5mm x 75mm, 제품 번호07573)에 인라인 연결된 HPLC (워터스, 모델 2795)에 적용시켰다. 샘플을 100% 완충제 A (2M 황산암모늄, 0.1M 인산나트륨, pH 7.0)에서 100% 완충제 B (0.1M 인산나트륨, pH 7.0)의 구배로 50분에 걸쳐 1.0 ml/분의 유량으로 용리시켰다. 280nm에서 UV 흡광도를 모니터링함으로써 항체를 검출하였고, 엠파워 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이, LAG3.5의 친수성은 높은 농도의 황산암모늄에서 가용성을 나타냈다.

[0276] 실시예 4: T-세포 매개 면역 반응 억제의 역전

[0277] 항원-특이적 마우스 T 세포 하이브리도마 (3A9)를 이용하는 기능 검정에 의해 LAG3.5의 활성을 결정하였다. 하이브리도마 3A9는 계란 리소자임 (HEL48-62)으로부터의 펩티드에 특이적인 T 세포 수용체를 발현하고, 펩티드-펄스 MHC-매칭된 항원 제시 세포 (LK35.2)와 공-배양한 경우 IL-2를 분비한다. huLAG-3-Fc는 MHC 클래스 II-양성 마우스 B 세포주에 결합할 수 있으므로, 3A9 주에서의 huLAG-3의 발현은 뮤린 제시 주 상의 클래스 II와의 결합을 통해 억제 효과를 발휘할 수 있다. 3A9 모의 펩티드 반응 프로파일과, MHC-매칭된 항원 제시 세포와 공-배양한 인간 LAG-3-형질도입된 3A9 세포의 것의 비교는 인간 LAG-3의 발현이 대조 3A9 세포와 비교하여 펩티드 반응성을 억제하였음을 입증하였다. 상기 억제는 LAG3.5를 사용한 LAG-3 차단에 의해 역전되었다. 따라서, LAG-3-매개된 억제의 차단이 LAG3.5에 대해 입증되었다.

[0278] 실시예 5: LAG3.5에 의한 T-세포 활성화

[0279] 초항원 SEB에 의해 자극시킨 인간 PBMC 배양물을 사용하여 일차 T 세포에 대한 LAG3.5의 기능적 활성을 평가하였다. 전체 PBMC를 18명의 인간 공여자의 혈액으로부터 단리하고, 2가지 검정 포맷: (i) 고정된 양의 항체 (20 μg/mL) 및 SEB의 연속 희석물, 또는 (ii) 고정된 양의 SEB (85 ng/mL) 및 항체의 연속 희석물 중 어느 하나로 72시간 동안 자극시켰다. 분비된 IL-2를 T 세포 활성의 척도로서 ELISA에 의해 모니터링하였다. 항체 항-PD-1 항체 및 이필리무맙을 양성 대조군으로서 사용하였고, 항-PD-1 또는 항-CTLA-4와 조합된 LAG3.5의 활성을 또한 공여자의 하위세트에 대해 평가하였다.

[0280] 이소형 대조 항체 처리와 비교하여, LAG3.5 단독으로 처리한 18명의 공여자 중 15명으로부터 다양한 SEB 농도에

걸쳐 증진된 IL-2 분비가 관찰되었다. 대부분의 경우에서, 자극은 항-PD-1 또는 이필리무맙으로의 처리에 대해 관찰된 것보다 작았다. LAG3.5에 관하여, 2가지 검정 포맷 (상기에 기재됨)의 결과는 서로 일치하였다. 또한, 시험된 6명의 공여자 중 5명에서, LAG3.5를 항-PD-1 또는 이필리무맙과 조합한 것은 항-PD-1 또는 이필리무맙과 조합된 이소형 대조 항체에 대해 관찰된 것보다 높은 수준의 자극을 나타냈다. 이들 데이터는 LAG3.5가 정상 인간 T 세포 검정에서 기능을 할 수 있고, PD-1 및 CTLA-4 기능의 억제에 의해 매개되는 반응을 추가로 활성화시킬 수 있음을 드러냈다.

[0281] 서열 목록의 개요

서열 번호	설명	서열
1	V_H n.a. 25F7 (LAG3.1)	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_NT

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTGGAA
CTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAA
TCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTA
TCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCG
CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTA
CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

2	V_H a.a. 25F7	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_AA

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINH
NGNTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNW
FDPWGQGTLVTVSS

3	V_K n.a. 25F7	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_NT

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTG
GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT
ACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCT
GGAGATCAAA

4	V_K a.a. 25F7	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_AA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

5	V_H CDR1 a.a. 25F7	DYYWN
6	V_H CDR2 a.a. 25F7	EINHNGNTNSNPSLKS
7	V_H CDR3 a.a. 25F7	GYSDYEYNWFDP
8	V_K CDR1 a.a. 25F7	RASQSISSYLA
9	V_K CDR2 a.a. 25F7	DASNRAT
10	V_K CDR3 a.a. 25F7	QQRSNWPLT
11	V_H n.a. LAG3.5	

[0282]

V_H n.a. LAG3.5

caggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggtgggtc
cttcagtgattactactggaactggatccgccagccccccagggaaggggctggagtggattggggaaatcaatcatcgtggaa
gcaccaactccaacccgtccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgaggt
ctgtgaccgccgcggacacggctgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtacaactggttcgacccctggggcc
agggaaccctggtcaccgtctcctca

12	V_H a.a. LAG3.5	

V_H a.a. LAG3.5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
INHRGSTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
DYEYNWFDPWGQGTLVTVSS

13	V_K n.a. LAG3.5	

V_K n.a. LAG3.5

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagt

attagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccact

ggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgca

gtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaa

14	V_K a.a. LAG3.5	

V_K a.a. LAG3.5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
GTNLEIK

15	V_H CDR1 a.a. LAG3.5	**DYYWN**
16	V_H CDR2 a.a. LAG3.5	**EINHRGSTNSNPSLKS**
17	V_H CDR3 a.a. LAG3.5	GYSDYEYNWFDP
18	V_K CDR1 a.a. LAG3.5	RASQSISSYLA
19	V_K CDR2 a.a. LAG3.5	DASNRAT
20	V_K CDR3 a.a. LAG3.5	**QQRSNWPLT**
21	LAG-3 에피토프	PGHPLAPG
22	LAG-3 에피토프	HPAAPSSW
23	LAG-3 에피토프	PAAPSSWG
24	V_H CDR2 a.a. LAG3.6	**EIIHSGSTNSNPSLKS**
25	V_H CDR2 a.a. LAG3.7	**EINHGGGTNSNPSLKS**
26	V_H CDR2 a.a. LAG3.8	**EINHIGNTNSNPSLKS**
27	V_H CDR2 a.a. 인간 배선	GEINHSGSTNY
28		$(Gly_4\text{-}Ser)_3$

[0283]

29	인간 LAG-3 a.a.	

인간 LAG-3 a.a. 서열
MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDL
SLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGP
GGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALS
CRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPV
RESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPL
TVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLE
DVSQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPVSG
QERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTE
LSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLTLGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRF
SALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL*

30	V_H CDR2 a.a. LAG3.2	**VIWYDGSNKYYADSVKG**
31	V_H LAG3.1 n.a.	

LAG3.1HC
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTGGAA
CTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAA
TCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTA
TCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCG
CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTA
CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT
AGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC
CATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCT
GTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC
TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC
TCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC
AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAT
GA

32	V_H LAG3.1 a.a.	

TRANSLATION\OF\LAG3.1HC
QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINH
NGNTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNW

[0284]

FDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK*

33	V_L LAG3.1 n.a.	

LAG3.1LC
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTG
GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT
ACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCT
GGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

34	V_L LAG3.1 a.a.	

TRANSLATION\OF\LAG3.1LC
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

35	V_H LAG3.5 a.a.	

LAG3.5 중쇄 서열 – 완전한 것
QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
INHRGSTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
DYEYNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*

36	V_H LAG3.5 n.a.	

LAG3.5 중쇄 서열 – 완전한 것
caggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggtgggtc
cttcagtgattactactggaactggatccgccagcccccagggaaggggctggagtggattggggaaatcaatcatcgtggaa
gcaccaactccaacccgtccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgaggt
ctgtgaccgccgcggacacggctgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtacaactggttcgacccctggggcc
agggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatccgtcttcccccctggcgccctgctccaggagcacctcc

[0285]

gagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctg
accagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaa
atatggtcccccatgcccaccatgcccagcacctgagttcctggggggaccatcagtcttcctgttccccccaaaacccaagga
cactctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaact
ggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtca
gcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctc
catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggaga
tgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtgg
acaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagag
cctctccctgtctctgggtaaatga

37	V_L LAG3.5 a.a.	

LAG3.5 카파 쇄 서열 – 완전한 것
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
GTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC*

38	V_L LAG3.5 n.a.	

LAG3.5 - 카파 쇄 서열 – 완전한 것

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagt
attagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccact
ggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgca
gtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaacgtacggtggctgca
ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccca
gagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagc
aaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaa
gtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

[0286]

도면

도면1a

```
LAG3.1 - 항-LAG3 25F7 VH

   V 절편:      4-34
   D 절편:      5-12
   J 절편:      JH5b

        Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L
1       CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                                        CDR1
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   D   Y   Y   W   N   W
55      TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TAC TGG AAC TGG

                                                            CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   E   I   N   H   N
109     ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AAT

                 CDR2
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        G   N   T   N   S   N   P   S   L   K   S   R   V   T   L   S   L   D
163     GGA AAC ACC AAC TCC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC CTA TCA CTA GAC

        T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   R   S   V   T   A   A   D   T
217     ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                                CDR3
                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        A   V   Y   Y   C   A   F   G   Y   S   D   Y   E   Y   N   W   F   D
271     GCT GTG TAT TAC TGT GCG TTT GGA TAT AGT GAC TAC GAG TAC AAC TGG TTC GAC

        CDR3
        ~~~
        P   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325     CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면1b

LAG3.1 - 항-LAG3 25F7 VK

V 절편: L6
J 절편: JK2

```
     E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E  R
1    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                           CDR1
                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     A  T  L  S  C  R  A  S  Q  S  I  S  S  Y  L  A  W  Y
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                                  CDR2
                                       ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q  Q  K  P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  N  R
109  CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

     CDR2
     ~~~~~~~
     A  T  G  I  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                                        CDR3
                                                        ~~~~~~~
     L  T  I  S  S  L  E  P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

           CDR3
           ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R  S  N  W  P  L  T  F  G  Q  G  T  N  L  E  I  K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA
```

도면2a

LAG3.5 - 항-LAG VH

```
  Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L

                                        CDR1
                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
  S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  D  Y  Y  W  N  W

                                                 CDR2

  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  N  H  R

            CDR2
  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
  G  S  T  N  S  N  P  S  L  K  S  R  V  T  L  S  L  D


  T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  R  S  V  T  A  A  D  T

                                  CDR3
                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
  A  V  Y  Y  C  A  F  G  Y  S  D  Y  E  Y  N  W  F  D

CDR3
~~~
  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
```

도면2b

LAG3.5 - 항 - LAG3 VK

V 절편 : L6
J 절편 : JK2

```
     E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E  R
1    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                              CDR1
                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     A  T  L  S  C  R  A  S  Q  S  I  S  S  Y  L  A  W  Y
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

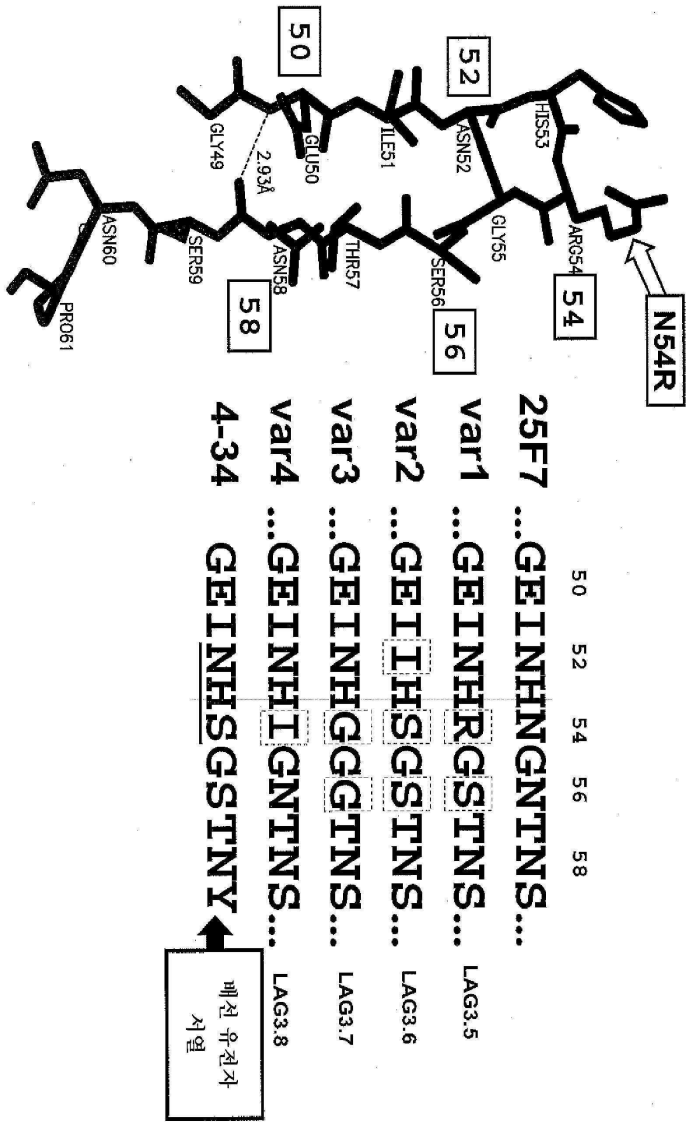
                                                    CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q  Q  K  P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  N  R
109  CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

     CDR2
     ~~~~~~~
     A  T  G  I  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

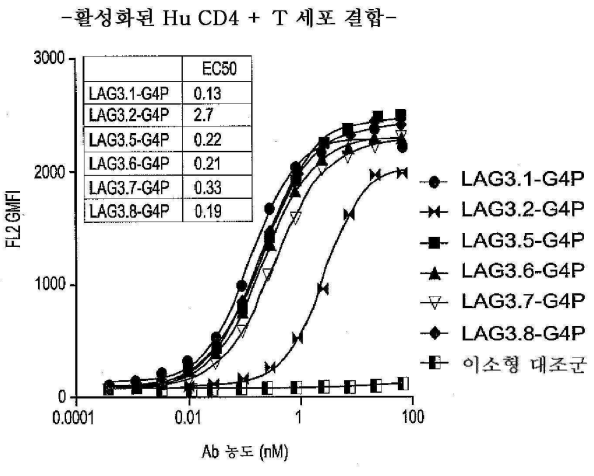
                                                         CDR3
                                                         ~~~~~~~
     L  T  I  S  S  L  E  P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

          CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R  S  N  W  P  L  T  F  G  Q  G  T  N  L  E  I  K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA
```

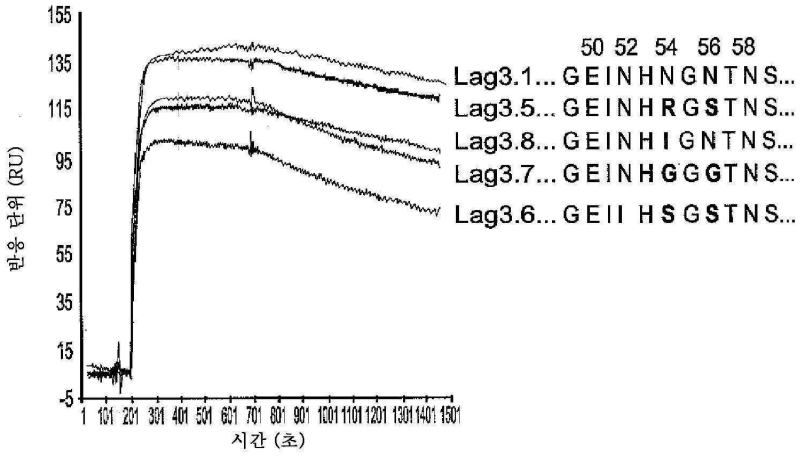
도면3


50
52
54
56
58
N54R
GLY49
GLU50
ILE51
ASN52
HIS53
GLY55
ARG54
SER56
THR57
ASN58
SER59
ASN60
PRO61
2.93Å
25F7 ...GEINHNGNTNS...
var1 ...GEINHRGSTNS... LAG3.5
var2 ...GEITHSGSTNS... LAG3.6
var3 ...GEINHGGGTNS... LAG3.7
var4 ...GEINHIGNTNS... LAG3.8
4-34 GEINHSGSTNY
50 52 54 56 58
배선 유전자 서열

도면4a


-활성화된 Hu CD4 + T 세포 결합-
EC50
LAG3.1-G4P 0.13
LAG3.2-G4P 2.7
LAG3.5-G4P 0.22
LAG3.6-G4P 0.21
LAG3.7-G4P 0.33
LAG3.8-G4P 0.19
FL2 GMFI
3000
2000
1000
0
0.0001
0.01
1
100
Ab 농도 (nM)
LAG3.1-G4P
LAG3.2-G4P
LAG3.5-G4P
LAG3.6-G4P
LAG3.7-G4P
LAG3.8-G4P
이소형 대조군

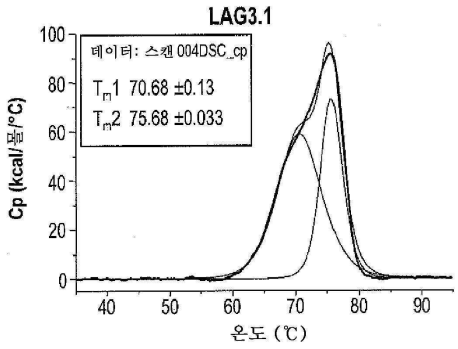
도면4b



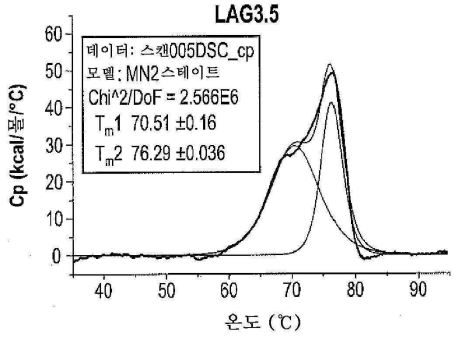
Ag: D1D4 구축물

클론 ID	K_D x 10^{-9} (M)	k_{on} x 10^4 (1/Ms)	k_{off} x 10^{-4} (1/s)
LAG3.1	0.27	102	2.79
LAG3.5	0.27	122	3.27
LAG3.6	0.66	118	7.77
LAG3.7	0.61	104	6.36
LAG3.8	0.30	130	3.36

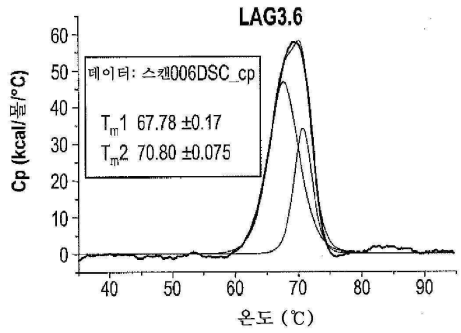
도면5a



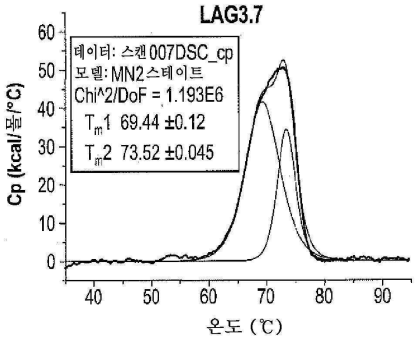
도면5b



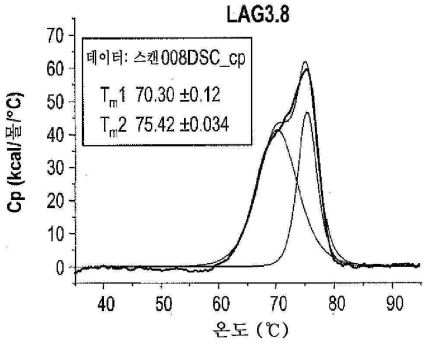
도면5c



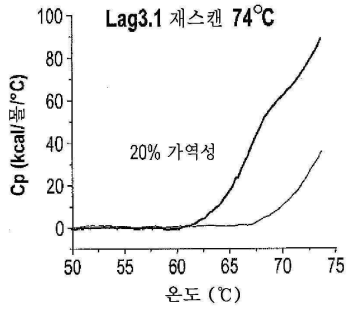
도면5d



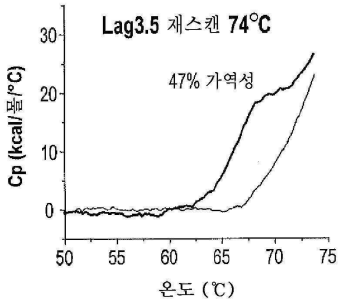
도면5e



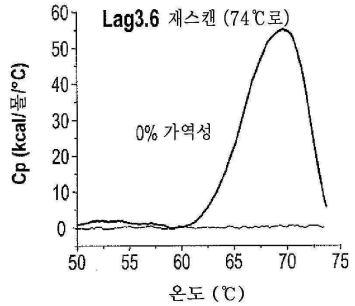
도면6a



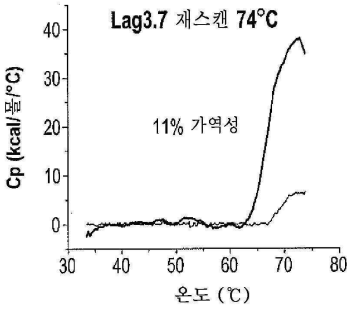
도면6b



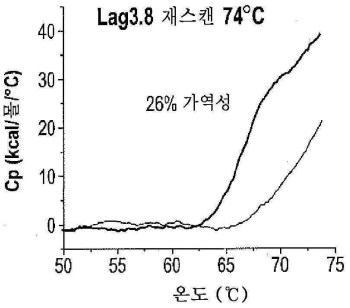
도면6c



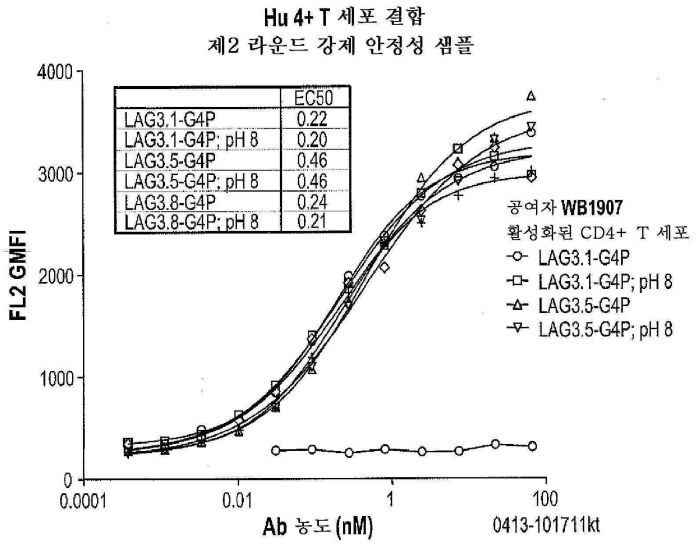
도면6d



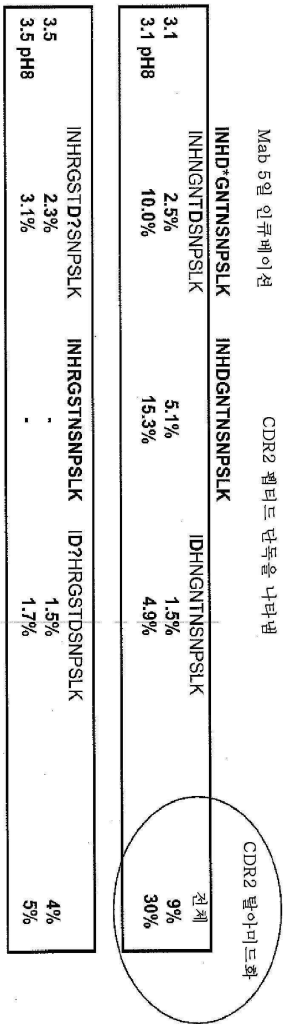
도면6e



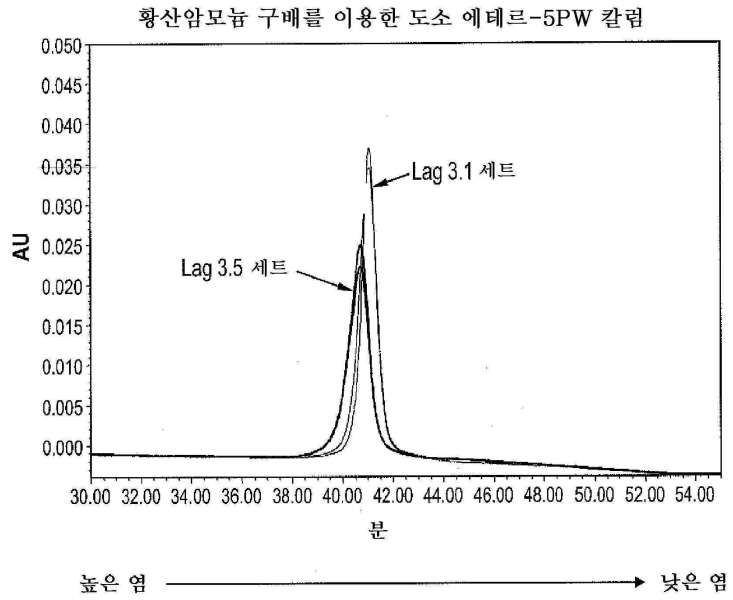
도면7


Hu 4+ T 세포 결합
제2 라운드 강제 안정성 샘플
EC50
LAG3.1-G4P 0.22
LAG3.1-G4P; pH 8 0.20
LAG3.5-G4P 0.46
LAG3.5-G4P; pH 8 0.46
LAG3.8-G4P 0.24
LAG3.8-G4P; pH 8 0.21
공여자 WB1907
활성화된 CD4+ T 세포
LAG3.1-G4P
LAG3.1-G4P; pH 8
LAG3.5-G4P
LAG3.5-G4P; pH 8
FL2 GMFI
4000
3000
2000
1000
0
0.0001
0.01
1
100
Ab 농도 (nM)
0413-101711kt

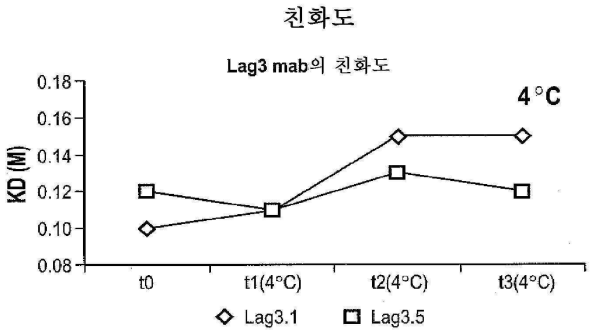
도면8


Mab 5일 인큐베이션
CDR2 펩티드 단독을 나타냄
INHD*GNTNSNPSLK
INHNGNTDSNPSLK
INHDGNTNSNPSLK
IDHNGNTNSNPSLK
3.1
2.5%
10.0%
5.1%
15.3%
1.5%
4.9%
3.1 pH8
전체
9%
30%
CDR2 탈아미드화
INHRGSTD?SNPSLK
INHRGSTNSNPSLK
ID?HRGSTDSNPSLK
3.5
2.3%
3.1%
-
-
1.5%
1.7%
3.5 pH8
4%
5%

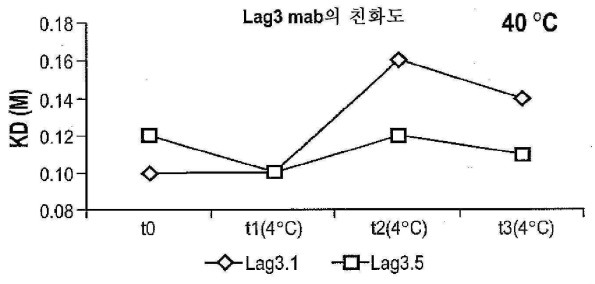
도면9



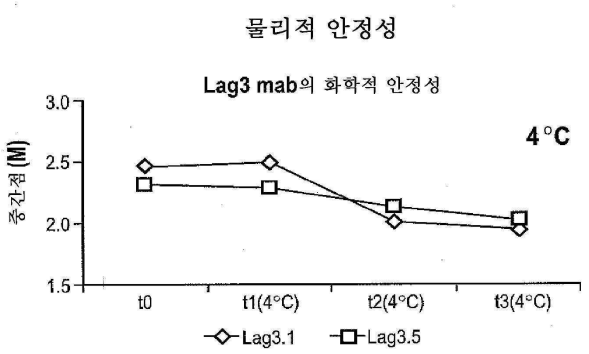
도면10a



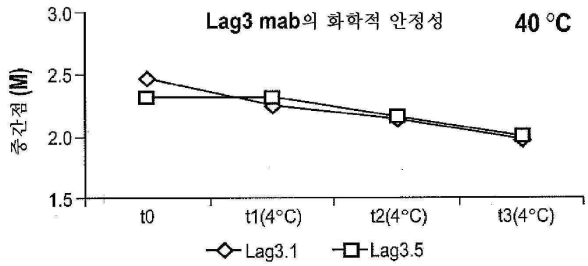
도면10b



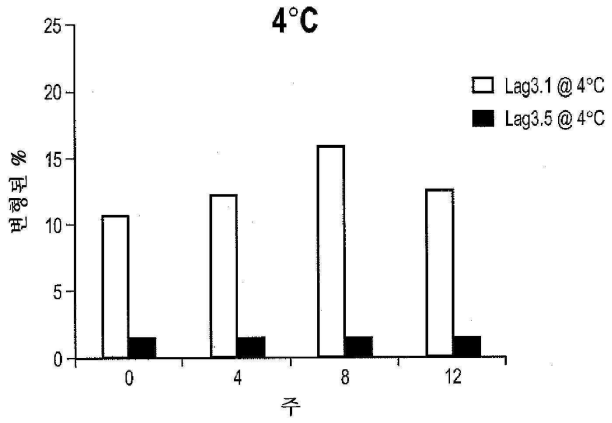
도면10c



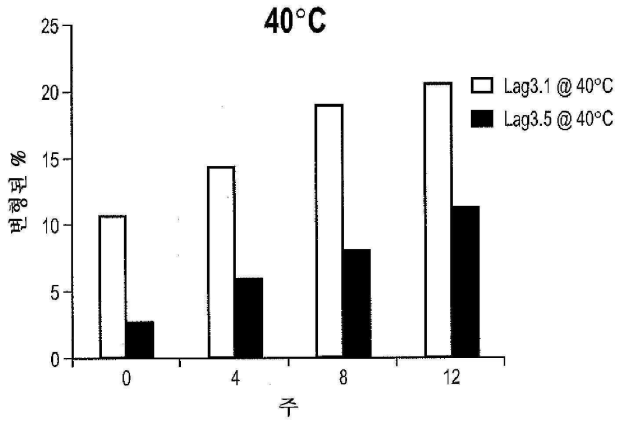
도면10d



도면11a



도면11b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> OPTIMIZATION OF ANTIBODIES THAT BIND LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3 (LAG-3), AND USES THEREOF

<130> 11911-WO-PCT

<140> PCT/US2013/048999

<141> 2013-07-02

<150> 61/667,058

<151> 2012-07-02

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 1

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48

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

1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt gat tac 96

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

20 25 30

tac tgg aac tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

ggg gaa atc aat cat aat gga aac acc aac tcc aac ccg tcc ctc aag 192

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

agt cga gtc acc cta tca cta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

aag ctg agg tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288

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

85 90 95

ttt gga tat agt gac tac gag tac aac tgg ttc gac ccc tgg ggc cag 336

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

100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

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

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

<210> 3
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"
<220><221> CDS

<222> (1)..(321)
<400> 3
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 5

<211> 5

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Asp Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

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

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210

> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 11

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 11

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300

gactacgagt acaactggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 13

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa 321

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Asp Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210>

16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

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

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp

1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 29

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile

35 40 45

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

50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu

65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro

85 90 95

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

100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln

115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro

165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser

180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln

195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser

210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly

225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn

245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala

260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val

275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300
Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
325 330 335
Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350
Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365
Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385 390 395 400
Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415
Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430
Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460
Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480
Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495
Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 30

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223
> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 31

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300

gactacgagt acaactggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660

aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccaggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320

ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 32

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

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

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

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

435 440 445

<210> 33

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 33

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttggccag 300

gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 35

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 35

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

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 36

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 36

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300

gactacgagt acaactggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660

aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320

ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

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

<210> 38
<211> 645
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 38
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttggccag 300
gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 39

Pro Val Gly Val Val

1 5

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 40

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 41

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 42

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

Gly Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Isomerized residue

<400> 46

Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Ile Asp His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Isomerized residue

<400> 50

Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Isomerized residue

<400> 52

Ile Asp His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10