

명세서

발명의 명칭: 항-LILRB1 항체 및 그의 용도

기술분야

- [1] 관련 출원들과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2019년 12월 23일자 대한민국 특허출원 제10-2019-0173414호 및 2020년 5월 22일자 대한민국 특허출원 제10-2020-0061907호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 본 출원은 항-LILRB1 항체 및 그의 용도와 관련된 것으로, 구체적으로, 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 그의 암 치료 용도에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1 (LILRB1, 또는 ILT2, CD85j, LIR-1)은 B 세포, T 세포, NK 세포, 수지상 세포, 대식 세포 및 기타 면역 세포 등에 발현되는 활성억제 수용체 (inhibitory receptor)이다. LILRB1은 classical 및 non-classical MHC class-I과 결합하여, 면역세포의 활성을 억제시키는 신호 전달 기작을 가진다.
- [6] 한편, 다양한 암세포들은 면역 회피를 위해, HLA-G 등의 MHC class I을 과발현하는 것으로 알려져 있다. LILRB1과 MHC Class I의 결합을 저해할 경우, 억제된 면역세포의 활성을 회복시켜 항암효능을 보일 것으로 예상된다.
- [7] 따라서, LILRB1에 결합하여 LILRB1이 MHC Class I에 결합하는 것을 저해하거나 및/또는 LILRB1과 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 물질의 개발이 요구된다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] LILRB1에 결합하고, LILRB1을 발현하는 면역 세포에 작용하여 면역 세포의 활성을 조절하여 항암효능을 보이는 항체 및 그의 암 치료 용도가 제공된다.
- [10] 일 예는 LILRB1에 결합하는 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 상기 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 LILRB1의 MHC Class I와의 결합을 저해하는 활성 및/또는 LILRB1과 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 활성을 가질 수 있다. 상기 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 암세포들의 면역 회피를 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 우수한 항암 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 암은 표면에 MHC Class I을 발현 또는 과발현하는 것일 수 있다.
- [11] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약학

암의 치료 및/또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

- [12] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 LILRB1의 MHC Class I와의 결합 저해용 약학 조성물 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간의 상호작용 저해용 약학 조성물을 제공한다.

- [13] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암세포의 면역 회피 저해용 약학 조성물을 제공한다.

[14]

과제 해결 수단

- [15] 일 예는 LILRB1에 결합하는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 LILRB1의 MHC Class I와의 결합을 저해하거나 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암세포들의 면역 회피를 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 우수한 항암 활성을 갖는 것일 수 있다.

- [16] 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 상보성결정영역(CDR)을 포함하는 것일 수 있다:

- [17] (1) Kabat numbering에 따른 CDR 정의(Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242; <http://www.abysis.org/>)를 기준으로,

- [18] 서열번호 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 또는 115의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,

- [19] 서열번호 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 또는 116의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2,

- [20] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 또는 117의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3,

- [21] 서열번호 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 또는 118의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,

- [22] 서열번호 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 또는 119의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및

- [23] 서열번호 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 또는 120의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3

- [24] 를 포함하거나,

- [25] (2) IMGT numbering에 따른 CDR 정의(<http://www.imgt.org/>)를 기준으로,

- [26] 서열번호 121, 126, 131, 136, 141, 146, 151, 156, 161, 166, 171, 176, 181, 186, 191, 196, 201, 206, 211, 또는 216의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,

- [27] 서열번호 122, 127, 132, 137, 142, 147, 152, 157, 162, 167, 172, 177, 182, 187, 192,

- 197, 202, 207, 212, 또는 217의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2,
- [28] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 또는 117의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3,
- [29] 서열번호 123, 128, 133, 138, 143, 148, 153, 158, 163, 168, 173, 178, 183, 188, 193, 198, 203, 208, 213, 또는 218의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [30] 서열번호 124, 129, 134, 139, 144, 149, 154, 159, 164, 169, 174, 179, 184, 189, 194, 199, 204, 209, 214, 또는 219의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [31] 서열번호 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 또는 220의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3
- [32] 를 포함하는 것일 수 있다.
- [33] 일 구체예에서, 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 포함 가능한 6개 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)의 조합을 아래의 표 1에 예시하였다:

[34] [Table 1]

	CDR	아미노산 서열 (N→C) (Kabat)	서열 번호	아미노산 서열 (N→C) (IMGT)	서열 번호
E3/E3.1	CDR-L1	QGDSLRFYAS	1	SLRFY	121
	CDR-L2	GKNNRPS	2	GKN	122
	CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3	NSRDSSGSHLTGV	3
	CDR-H1	SYAMS	4	GFTFSSYA	123
	CDR-H2	AISGSGGSTYYADSV KG	5	ISGSGGST	124
	CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6	ARDTTYYGSGRSN AFDI	125
B3	CDR-L1	QASQDISNYLN	7	QDISNY	126
	CDR-L2	DASNLET	8	DAS	127
	CDR-L3	QQYDNLP	9	QQYDNLP	9
	CDR-H1	DYAMH	10	GFTFDDYA	128
	CDR-H2	GISWNSGSIGYADSVK G	11	ISWNSGSI	129
	CDR-H3	VGDSSGWSDAFDI	12	ARVGDSSGWSDAF DI	130
A10	CDR-L1	RASQSVSSNLA	13	QSVSSN	131
	CDR-L2	GASTRAT	14	GAS	132
	CDR-L3	QQYGSSPRMYT	15	QQYGSSPRMYT	15
	CDR-H1	SYAIS	16	GGTFSSYA	133
	CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQ G	17	IPIFGTA	134
	CDR-H3	GGLGELDNWFDP	18	ARGGLGELDNWF DP	135

G1	CDR-L1	SGYKLGDRYVS	19	KLGDY	136
	CDR-L2	KDSQRPS	20	KDS	137
	CDR-L3	QAWDSGTGV	21	QAWDSGTGV	21
	CDR-H1	SYGIS	22	GGTFSSYG	138
	CDR-H2	WISAYNGNTNYAQEL QG	23	ISAYNGNT	139
	CDR-H3	VGVAGKLDY	24	ARVGVAGKLDY	140
G9	CDR-L1	TGSSSDVGGYNYVS	25	SSDVGGYNY	141
	CDR-L2	DVSNRPS	26	DVS	142
	CDR-L3	SSYTGSTLDVL	27	SSYTGSTLDVL	27
	CDR-H1	SYWIG	28	GYSFTSYW	143
	CDR-H2	IIPGDS TRYSPSFQG	29	IYPGSDT	144
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	30	ASQYYDGGYYMD V	145
H2	CDR-L1	QGDSLRNYAS	31	SLRNY	146
	CDR-L2	GNNKRPS	32	GNN	147
	CDR-L3	NSLDSTYNHPI	33	NSLDSTYNHPI	33
	CDR-H1	SYDIH	34	GYTFTSYD	148
	CDR-H2	WISAYNGNTNYAQKL QG	35	ISAYNGNT	149
	CDR-H3	DGGDAFDI	36	ARDGGDAFDI	150
H11	CDR-L1	QGDSLRSYYAS	37	SLRSYY	151
	CDR-L2	GRNNRPS	38	GRN	152
	CDR-L3	KSRDSSGNHYV	39	KSRDSSGNHYV	39
	CDR-H1	SYMH	40	GYTFTSY	153
	CDR-H2	IINPSGGSTSYAQKFQ G	41	INPSGGST	154
	CDR-H3	DAGSSSDY	42	ARDAGSSSDY	155

F12	CDR-L1	AGTSSDIGDYDYVS	43	SSDIGDYDY	156
	CDR-L2	DVSRPS	44	DVS	157
	CDR-L3	ASYTSSSVVV	45	ASYTSSSVVV	45
	CDR-H1	SYWIG	46	GYSFTSYW	158
	CDR-H2	IIYPGSDTRYSPSFQG	47	IYPGSDT	159
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	48	ASQYYDGGYYMD V	160
B9	CDR-L1	RASQISRYLN	49	QSISRY	161
	CDR-L2	GASSLQS	50	GAS	162
	CDR-L3	QQAYGFPLT	51	QQAYGFPLT	51
	CDR-H1	SYAIS	52	GGTFSSYA	163
	CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQ G	53	IPIFGTA	164
	CDR-H3	GEIAVAQNWDYYGM DV	54	ARGEIAVAQNWD YYGMDV	165
G11	CDR-L1	TGTSSDVGGYNYVS	55	SSDVGGYNY	166
	CDR-L2	DVSKRPS	56	DVS	167
	CDR-L3	SSYSSSTLVV	57	SSYSSSTLVV	57
	CDR-H1	SYWIG	58	GYSFTSYW	168
	CDR-H2	IIYPGSDTRYSPSFQG	59	IYPGSDT	169
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	60	ASQYYDGGYYMD V	170
G6	CDR-L1	QGDSLRRYYAT	61	SLRRYY	171
	CDR-L2	GQNYRPS	62	GQN	172
	CDR-L3	NSRDSSGNHVV	63	NSRDSSGNHVV	63
	CDR-H1	SYMH	64	GYTFTSYY	173
	CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQ G	65	IPIFGTA	174
	CDR-H3	GWGYSSSFY	66	ARGWGYSSSFY	175

F11	CDR-L1	SGSSSNIGTNTVN	67	SSNIGTNT	176
	CDR-L2	SNDQRPS	68	SND	177
	CDR-L3	ETWDDSLKGPV	69	ETWDDSLKGPV	69
	CDR-H1	SYAMS	70	GFTFSSYA	178
	CDR-H2	TISGSGDSTYYADSVK G	71	ISGSGDST	179
	CDR-H3	EWELGDAFDI	72	AREWELGDAFDI	180
D3	CDR-L1	RASQSISSYLN	73	QSISSY	181
	CDR-L2	AASSLQS	74	AAS	182
	CDR-L3	QQSYSTRWT	75	QQSYSTRWT	75
	CDR-H1	SYAMS	76	GSTFSSYA	183
	CDR-H2	AISGSGGSTYYADSV KG	77	ISGSGGST	184
	CDR-H3	DRGSYGYYYGMDV	78	AKDRGSYGYYYG MDV	185
B12	CDR-L1	RASQSISSYLN	79	QSISSY	186
	CDR-L2	AASSLQS	80	AAS	187
	CDR-L3	QQSYSTLRT	81	QQSYSTLRT	81
	CDR-H1	GYYMH	82	GYTFTGY	188
	CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKF QG	83	INPNSGGT	189
	CDR-H3	AGASIVGATALDY	84	TRAGASIVGATAL DY	190
E4	CDR-L1	TRSSGSIASNYVQ	85	SGSIASNY	191
	CDR-L2	EDNQRPS	86	EDN	192
	CDR-L3	QSYDTGNRNYV	87	QSYDTGNRNYV	87
	CDR-H1	SYTIS	88	GGTFSSYT	193
	CDR-H2	RIIPILGIANYAQKFQG	89	IIPILGIA	194
	CDR-H3	GPSLNYAGYFDN	90	VRGPSLNYAGYFD N	195

E12	CDR-L1	QGDSLRSYYAS	91	SLRSYY	196
	CDR-L2	GKEKRPS	92	GKE	197
	CDR-L3	NSRGSTTDYMV	93	NSRGSTTDYMV	93
	CDR-H1	SYAMH	94	GFTFSSYA	198
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSV KG	95	ISYDGSNK	199
	CDR-H3	ERGSMDV	96	ARERGSMDV	200
D1	CDR-L1	KASQDIDDDMN	97	QDIDDD	201
	CDR-L2	EASTLVP	98	EAS	202
	CDR-L3	LQHDKFPYT	99	LQHDKFPYT	99
	CDR-H1	SYGIS	100	GYTFTSYG	203
	CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKF QG	101	INPNSGGT	204
	CDR-H3	RGVDEGDY	102	ASRGVDEGDY	205
E6	CDR-L1	TGSSGNIASNYVQ	103	SGNIASNY	206
	CDR-L2	RDDQRPS	104	RDD	207
	CDR-L3	QSYDSSSWV	105	QSYDSSSWV	105
	CDR-H1	TYDIT	106	GYTFTTYD	208
	CDR-H2	WMNPNSGNSRSAQKF QG	107	MNPNSGNS	209
	CDR-H3	GDYSGVVLATALDY	108	ATGDYSGVVLAT ALDY	210
E9	CDR-L1	SGSSNIGNNYVY	109	SSNIGNNY	211
	CDR-L2	RNNQRPS	110	RNN	212
	CDR-L3	AAWDDSLSGWV	111	AAWDDSLSGWV	111
	CDR-H1	SYGMH	112	GFTFSSYG	213
	CDR-H2	NIKQDGSEKYYVDSV KG	113	IKQDGSEK	214
	CDR-H3	EDRIAAAGMRELDY	114	AREDRIAAAGMRE LDY	215

A11	CDR-L1	RSSQSLHLSNGYNYL D	115	QSLHLSNGYNY	216
	CDR-L2	LGSNRAS	116	LGS	217
	CDR-L3	MQGTHWPPYT	117	MQGTHWPPYT	117
	CDR-H1	SYAMT	118	GFSFTSYA	218
	CDR-H2	GISSDGTTTTYADSVR G	119	ISSDGTTT	219
	CDR-H3	DQLLGWDALNV	120	ARDQLLGWDALN V	220

- [35] 일 예에서, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 상기한 바와 같은,
- [36] CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄가변영역, 및
- [37] CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄가변영역
- [38] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [39] 구체예에서, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
- [40] 서열번호 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 또는 345의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역, 및
- [41] 서열번호 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 또는 260의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역
- [42] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [43] 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 포함 가능한 경쇄가변영역 및 중쇄가변영역의 조합을 아래의 표 2에 예시하였다:

[44] [Table 2]

	가변 영역	아미노산 서열(N→C)	서열 번호
E3	경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKS GQAPVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPAAA	221
	중쇄가 변영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMISLRAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQG TLVTVSS	222
B3	경쇄가 변영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPE DIATYYCQQYDNLPGGGTKVDIKRTAAA	223
	중쇄가 변영역	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGDSSGWSDAFDIWGQGT MVTVSS	224
A1 0	경쇄가 변영역	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYCQQYGSSPRMYTFGQGTKVDIKRTAAA	225
	중쇄가 변영역	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSISTA YMELSSLRSED TAVYYCARGGLGELDNWFDWPWGQGT LVTVSS	226
G1	경쇄가 변영역	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGDYVSWYQQKTG QSPVVVIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQAM DEADYYCQAWDSGTGVFGGGKLTVLGQPAAA	227
	중쇄가 변영역	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQ APGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARVGVAGKLDYWGQGT LVTVSS	228

G9	경쇄가 변영역	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNMASLTISGL QAEDEADYYCSSYTGSSSTLDVLFGGGTKLTVLGQPAAA	233
	중쇄가 변영역	QVQLVQPGAIEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTL TVSS	234
H2	경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRLNYYASWYQQKP GQAPILVISGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQAE EADYYCNSLDSTYNHPIFGGGTKVTVLGQPAAA	235
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDIHWVR QATGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTST TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGGDAFDIWGQGTLV TVSS	236
H1 1	경쇄가 변영역	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKP GQAPVVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQAE DEADYYCKSRDSSGNHYVFGTGKLTVLGQPAAA	231
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVWR QAPGQGLEWMGIIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTST TVYMELSSLRSED TAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLVTV SS	232
F12	경쇄가 변영역	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDYVSWYQQ HPGKTPKLMYDVSRRPSGVDPDRFSGSKSGNTASLTISGL QTEDEADYYCASYTSSSVVFGGGTKLTVLGQPAAA	237
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTL TVSS	238
B9	경쇄가 변영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISRYLNWYQQKP GKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYHCQQA YGFPLTLGGGTKVEIKRTAAA	229
	중쇄가 변영역	QVQLVESGAIEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARGEIAVAQNWDDYGMVWG QGTLVTVSS	230

G1 1	경쇄가 변영역	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSLSSSTLVVFGGGKLTVLGQPAAA	239
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTL VTVSS	240
G6	경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQKP GQAPVLVIYQGNRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQAE DEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPAAA	241
	중쇄가 변영역	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHVVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARGWGYSSSFYWGQGTTVT VSS	242
F11	경쇄가 변영역	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLP GTAPKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAA	243
	중쇄가 변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRR APGKGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNNLRAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTLVT VSS	244
D3	경쇄가 변영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTRWTFGQGTKVEIKRTAAA	245
	중쇄가 변영역	EVQLLES GGGVVPGRSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGSYGYYGMDVWGQG TMVTVSS	246
B12	경쇄가 변영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTRWTFGQGTKVEIKRTAAA	247
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVR RQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRAGASIVGATALDYWGQ GTLVTVSS	248

E4	경쇄가 변영역	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQR PGSSPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQSYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAA	249
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYTISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTDT AYMELSSLTYDDTAVYFCVRGPSLNYAGYFDNWGQGTL VTVSS	250
E12	경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKS GQAPVLVIYGKEKRPSPGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARAE DEADYYCNSRGSTTDYMFVGGGTQLTVLGQPAAA	251
	중쇄가 변영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERGSMDVWGQGT LVT VSS	252
D1	경쇄가 변영역	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQK PGEAAISIIQEASTLVP GIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESED AAYYFCLQHDKFPYTFGQGTKLEIKRTAAA	253
	중쇄가 변영역	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCASRGVDEGDYWGQGTMTVT VSS	254
E6	경쇄가 변영역	NFMLTQPHSVSESPGKTVTL SCTGSSGNIASNYVQWYQH RPGSAPTTVIYRDDQRPSPGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGL RPEDEADYYCQSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAA	255
	중쇄가 변영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYDITWVR QAPGQGLEWMGWMNPNSGNSRSAQKFQGRVSM TSDSSI STAYMELSSLRSED TAVYYCATGDYSGVVL TATALDYW GQGT LVTVSS	256
E9	경쇄가 변영역	QSELTQLPSA SETPGQRTISCSGSSSNIGNNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQPAAA	257
	중쇄가 변영역	QVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDRIAAAGMRELDYW GQGT LVTVSS	258

A1 1	경쇄가 변영역	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQGTHWPPYTFGQGTKVEIKRTAAA	259
	중쇄가 변영역	EVQLLESGGGLEQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQ APGKGLEWVSGISSDGTITTYADSVRGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRDEDTAVYYCARDQLLGWDALNVWGQGTMT VTVSS	260
E3. 1	경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKS GQAPVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGTSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVL	345
	중쇄가 변영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMISLR AEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQG TLVTVSS	222

- [45] 본 명세서에서, 항체 또는 이의 항원결합단편(예컨대, CDR, 가변영역, 또는 중쇄/경쇄)가 "특정 아미노산 서열을 포함한다 또는 특정 아미노산 서열로 표현되거나 이루어진다" 함은 상기 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 경우, 및 상기 아미노산 서열에 항체 활성에 영향이 없는 무의미한 변이(예컨대, 아미노산 잔기의 치환, 결실, 및/또는 추가)가 도입된 경우를 모두 의미하는 것일 수 있다.
- [46] 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 LILRB1 (예컨대, 인간 LILRB1)에 대한 결합 친화도 (K_D)는, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 (Surface plasmon resonance, SPR)으로 측정된 경우를 기준으로, 10mM 이하, 5 mM 이하, 1mM 이하, 0.5mM 이하, 0.2mM, 또는 0.15mM 이하일 수 있으며, 예를 들어 0.001nM 내지 10mM, 0.005nM 내지 10mM, 0.01nM 내지 10mM, 0.05nM 내지 10mM, 0.1nM 내지 10mM, 0.5nM 내지 10mM, 1nM 내지 10mM, 0.001nM 내지 5mM, 0.005nM 내지 5mM, 0.01nM 내지 5mM, 0.05nM 내지 5mM, 0.1nM 내지 5mM, 0.5nM 내지 5mM, 1nM 내지 5mM, 0.001nM 내지 1mM, 0.005nM 내지 1mM, 0.01nM 내지 1mM, 0.05nM 내지 1mM, 0.1nM 내지 1mM, 0.5nM 내지 1mM, 1nM 내지 1mM, 0.001nM 내지 0.5mM, 0.005nM 내지 0.5mM, 0.01nM 내지 0.5mM, 0.05nM 내지 0.5mM, 0.1nM 내지 0.5mM, 0.5nM 내지 0.5mM, 1nM 내지 0.5mM, 0.001nM 내지 0.2mM, 0.005nM 내지 0.2mM, 0.01nM 내지 0.2mM, 0.05nM 내지 0.2mM, 0.1nM 내지 0.2mM, 0.5nM 내지 0.2mM, 1nM 내지 0.2mM, 0.001nM 내지 0.15mM, 0.005nM 내지 0.15mM, 0.01nM 내지 0.15mM, 0.05nM 내지 0.15mM, 0.1nM 내지 0.15mM, 0.5nM 내지 0.15mM, 또는 1nM 내지 0.15mM일 수 있다.

- [47] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 예를 들어, 상기 약학 조성물은 암의 치료 및/또는 예방을 위한 약학 조성물일 수 있다. 상기 약학 조성물은 LILRB1의 MHC Class I와의 결합 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 암은 LILRB1 및 MHC Class I 간의 상호작용과 관련된 암일 수 있다. 일 예에서, 상기 약학 조성물은 암세포들의 면역 회피를 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 암세포는 표면에 MHC Class I를 발현 또는 과발현하는 것일 수 있다.
- [48] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 LILRB1의 MHC Class I와의 결합 저해용 조성물 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용 저해용 조성물을 제공한다.
- [49] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암세포의 면역 회피 저해용 조성물을 제공한다.
- [50] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 약학적 유효량을 암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상 (예컨대, 인간을 포함하는 포유류)에게 투여 (경구 또는 비경구 투여)하는 단계를 포함하는, 암을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [51] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 약학적 유효량을 LILRB1의 MHC Class I와의 결합 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용 저해를 필요로 하는 대상 (예컨대, 인간을 포함하는 포유류)에게 투여 (경구 또는 비경구 투여)하는 단계를 포함하는, LILRB1의 MHC Class I와의 결합을 저해하는 방법 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 방법을 제공한다.
- [52] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 약학적 유효량을 암세포의 면역 회피 저해를 필요로 하는 대상 (예컨대, 인간을 포함하는 포유류)에게 투여 (경구 또는 비경구 투여)하는 단계를 포함하는, 암세포의 면역 회피를 저해하는 방법을 제공한다.
- [53] 본 명세서에서 제공되는 방법은, 상기 투여하는 단계 이전에, 암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상, LILRB1의 MHC Class I와의 결합 저해 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용 저해를 필요로 하는 대상, 및/또는 암세포의 면역 회피 저해를 필요로 하는 대상을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [54] 다른 예는 상기한 항-LILRB1 항체의 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, 또는 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3의 조합, 또는 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3의 조합); CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변영역; CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변영역; 상기 경쇄가변영역을 포함하는 경쇄; 및 상기 중쇄가변영역을 포함하는 중쇄로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자 (폴리뉴클레오타이드)를 제공한다.

- [55] 다른 예는 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 일 예에서, 상기 재조합 벡터는 상기 경쇄 가변영역 또는 경쇄 암호화 핵산 분자 및 상기 중쇄 가변영역 또는 중쇄 암호화 핵산 분자를 (예컨대, 두 개의 벡터에) 각각 포함하거나, (예컨대, 하나의 벡터에) 함께 포함하는 것일 수 있다. 상기 재조합 벡터는 발현 벡터로 사용될 수 있다.
- [56] 다른 예는 상기 핵산 분자 또는 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.
- [57] 다른 예는 상기 핵산 분자를 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다. 상기 핵산 분자를 발현시키는 단계는 상기 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [58] 본 명세서에 기재된 바로서, 항-LILRB1 항체의 항원 결합 단편은 상기 항-LILRB1 항체에서 유래하고 항원 (LILRB1)에 대한 결합력을 보유하는 단편을 의미하는 것으로, 상기한 항-LILRB1 항체의 6개의 CDR을 포함하는 임의의 폴리펩타이드, 예를 들어 scFv, scFv-Fc, scFv-Ck(카파 불변영역), scFv-Cλ(람다 불변영역), (scFv)₂, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 예에서, 상기 항원 결합 단편은 scFv, 또는 scFv가 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)의 Fc 부위와 융합된 융합 폴리펩타이드 (scFv-Fc) 또는 경쇄의 불변 영역 (예컨대, 카파 또는 람다)와 융합된 융합 폴리펩타이드 (scFv-Ck 또는 scFv-Cλ)일 수 있다.
- [59] 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 LILRB1 단백질에 대하여 조절 작용, 예컨대, 길항작용 (antagonism) 또는 작용(agonism)을 하는 것일 수 있다. 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 LILRB1의 MHC Class I와의 결합 및/또는 LILRB1와 MHC Class I 간 상호작용을 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암세포들의 면역 회피를 저해하는 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 우수한 항암 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [60] 본 명세서에서 제공되는 항체 또는 항원결합단편의 항원으로 작용하는 LILRB1은 포유류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대 인간 유래 LILRB1 (예컨대, GenBank accession numbers AAH15731.1 (서열번호 348), NP_001265328.2, NP_001265327.2, NP_001075108.2, NP_001075107.2, NP_001075106.2, NP_006660.4, NM_001081637.2, NM_001081638.3, NM_001081639.3, NM_001278398.2, NM_001278399.2 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본 명세서에 기재된 MHC Class I는 major histocompatibility complex (MHC) 분자의 한 분류이다. 일 예에서, 상기 MHC Class I는 인간 유래의 것일 수 있고, HLA(human leukocyte antigen)-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, 및 HLA-G로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [62] 본 명세서에서 "항체"라 함은, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 단백질을 총칭하는 것으로서, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 단백질 또는 이를 화학적 합성 또는 재조합적으로 제조한 단백질일 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 상기 항체는 비자연적으로 생성된 것, 예컨대, 재조합적 또는 합성적으로 생성된 것일 수 있다. 상기 항체는 동물 항체 (예컨대, 마우스 항체 등), 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 상기 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다.
- [63] 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 앞서 정의한 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR 부위, 또는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 제외한 나머지 부위는 모든 서브타입의 면역글로불린(예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgM, 등)으로부터 유래한 것일 수 있고, 예컨대, 상기 모든 서브타입의 면역글로불린의 프레임워크 부위, 및/또는 경쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 불변 영역으로부터 유래한 것일 수 있다. 일 예에서, 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체는 인간 IgG형 항체, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 형태의 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 완전한 항체(예컨대, IgG형)는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 또는 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [65] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [66] 용어, "CDR(complementarity determining region)"은 항체의 가변 부위 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미하는 것으로, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.
- [67] 본 명세서에서 항체는, 특별한 언급이 없는 한, 완전한 항체 뿐 아니라 항원

- 결합능을 보유하는 항체의 항원결합단편을 포함하는 것으로 이해될 수 있다.
- [68] 용어, "항원 결합 단편"은 항원이 결합할 수 있는 부분(예컨대, 본 명세서에서 정의된 6개의 CDR)을 포함하는 모든 형태의 폴리펩타이드를 의미한다. 예를 들어, 항체의 scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 앞서 설명한 바와 같이, 상기 항원 결합 단편은 scFv, 또는 scFv가 면역글로불린 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)의 Fc 부위 또는 경쇄의 불변 영역 (예컨대, 카파 또는 람다)와 융합된 융합 폴리펩타이드일 수 있다.
- [69] 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조이다.
- [70] Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다.
- [71] F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [72] 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다.
- [73] 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [74] 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, CH1 및 CH2 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)을 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다.
- [75] 상기 항-LILRB1 항체는 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 당 업계에 널리 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 또는, 항-LILRB1 항체는 통상의 방법에 의하여 마우스 유래의 단클론 항체로 제조될 수 있다.
- [76] 한편, 전형적인 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 포맷을 이용하여 LILRB1와의 결합능에 기초하여 개별 단클론 항체들을 스크리닝할 수 있다. 결합체들에 대해 분자적 상호작용을 검정하기 위한 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA)와 같은 기능성 분석 또는 세포-기반 분석(cell-based assay)과 같은 기능성 분석을 통해 저해 활성에 대해 검정할 수 있다. 그런 다음 강한 저해 활성에 기초하여 선택된 단클론항체 멤버들에 대해 LILRB1에 대한 각각의 친화도(Kd

values)를 검정할 수 있다.

- [77] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 유효성분 (항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편)에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [78] 상기 약학 조성물, 또는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 유효량은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 또는 병변부위 국소 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포(예컨대, 암세포)로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [79] 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약학적 유효량으로 상기 약학 조성물 내에 포함되거나 환자에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서 “약학적 유효량”은 상기 유효성분 (항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편)이 목적하는 효과(예컨대, 항암효과)를 발휘할 수 있는 유효성분의 양을 의미할 수 있다. 상기 약학적 유효량은 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 배설 속도, 반응 감응성, 제제화 방법, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 투여 방식 등의 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 1일 투여량은 0.005 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 75mg/kg, 0.005 ug/kg 내지 50mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 75mg/kg, 0.01 ug/kg 내지 50mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 1000mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 500mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 250mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 100mg/kg, 0.05 ug/kg 내지 75mg/kg, 또는 0.05 ug/kg 내지 50mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

- [80] 상기 약학 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [81] 본 발명의 적용 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.
- [82] 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 이에 제한되지 않지만, 폐암 (예컨대, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐선암, 폐편평상피암 등), 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 백혈병 (예컨대, 만성 또는 급성 백혈병), 림프종, 간세포암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신세포암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담도암, 담낭암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 상기 암은 표면에 MHC Class I이 발현 또는 과발현된 것일 수 있으며, 예컨대, 대장암 (colon adenocarcinoma), 소세포암 (small cell lung carcinoma), 유방암 (breast cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 피부암 (malignant melanoma), 골육종 (bone osteosarcoma), 신세포암 (renal cell carcinoma), 위암 (gastric cancer)일 수 있다. 상기 MHC Class I의 과발현은, 정상 세포, 또는 면역 치료, 예컨대, T-세포 (e.g., cytotoxic T-cell) 매개 면역 치료에 항암 효과가 나타나지 않는 (상기 면역치료를 반응성이 없거나 저항성이 있는) 암세포와 비교하여, 상기 항체 적용 대상 암세포에서 과발현된 것을 의미할 수 있다.
- [83] 본 명세서에서 암의 치료는 암세포의 증식 저해, 암세포 사멸, 전이 억제 등과 같이 암의 증상의 악화를 방지하거나 완화 또는 호전시키거나, 암을 부분적 또는 전부 소멸시키는 모든 항암 작용을 의미하는 것일 수 있다.
- [84] 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편은 다른 약물, 예컨대, 통상적으로 사용 가능한 면역치료제, 항암제, 세포독성 제제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상과 병용될 수 있다. 따라서, 일 예는 (1) 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편, 및 (2) 면역치료제, 항암제, 세포독성 제제 등으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 약물을 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 1) 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편, 및 (2) 면역치료제, 항암제, 세포독성 제제 등으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 약물을 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 상기 면역치료제, 항암제 및 세포독성 제제는 통상적으로 암 치료에 사용되거나, 및/또는 세포 독성 활성을 갖는 모든 약물을 포괄하는 것으로, 항체 등의 단백질, siRNA 등의 핵산 분자, 및/또는 파클리탁셀, 도세탁셀 등의 소분자 화합물 중에서 1종 이상 선택될 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

- [85] 다른 예에서, 앞서 설명한 항-LILRB1 항체의 중쇄 상보성 결정 부위 (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, 또는 이들의 조합), 경쇄 상보성 결정 부위 (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, 또는 이들의 조합), 또는 이들의 조합; 또는 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 폴리펩타이드 분자가 제공된다. 상기 폴리펩타이드 분자는 항체의 전구체로서 항체 제작에 사용될 수 있을 뿐 아니라 항체와 유사한 구조를 갖는 단백질 골격체 (protein scaffold; 예컨대 펩티바디), 이중 특이 항체, 다중 특이 항체의 구성 성분으로 포함될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 폴리펩타이드 분자는 CAR-T 등의 표적 세포치료제에서 표적 (항원) 인지부, 분비되는 항체, 상기 항-LILRB1 항체를 분비하도록 제작된 세포 치료제 등으로서 사용 가능하다.
- [86] 다른 예는 항-LILRB1 항체의 중쇄 상보성 결정 부위(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, 또는 이들의 조합), 중쇄 가변영역 또는 중쇄를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [87] 다른 예는 항-LILRB1 항체의 경쇄 상보성 결정 부위 (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, 또는 이들의 조합), 경쇄 가변영역 또는 경쇄를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [88] 다른 예는 상기 항-LILRB1 항체의 중쇄 상보성 결정 부위, 중쇄 가변영역 또는 중쇄를 암호화하는 핵산 분자 및 항-LILRB1 항체의 경쇄 상보성 결정 부위, 경쇄 가변영역 또는 경쇄를 암호화하는 핵산 분자를 하나의 벡터에 함께 포함하거나 각각 별개의 벡터에 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [89] 다른 예는 상기 핵산 분자 또는 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.
- [90] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [91] 상기 재조합 벡터에서 상기 핵산 분자는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오타이드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

- [92] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [93] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL⁺ 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아테노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아테노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터 등)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [94] 상기 재조합 세포는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110 등의 대장균, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, CHO S, CHO DXB11, CHO GS-KO, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [95] 상기 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [96] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기

항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

- [97] 다른 예는 상기 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편의 제조 방법을 제공한다. 상기 발현시키는 단계는 상기 핵산 분자 (예컨대 재조합 벡터에 포함됨)를 포함하는 재조합 세포를 상기 핵산 분자의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 것에 의하여 수행될 수 있다. 상기 제조 방법은 상기 발현시키는 단계 또는 배양하는 단계 이후에, 배양 배지로부터 항체 또는 항원결합단편을 분리 및/또는 정제하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[98]

발명의 효과

- [99] 본 명세서에서 제공되는 항-LILRB1 항체 또는 이의 항원결합단편은 암세포의 면역회피기전을 저해하여 면역세포의 항암 효능이 저해되지 않고 잘 발휘될 수 있도록 함으로써, 우수한 항암활성을 나타낼 수 있다.

[100]

도면의 간단한 설명

- [101] 도 1은 일 실시예에서 정제된 항-LILRB1 항체의 SDS-PAGE 젤 분석 결과를 보여주는 전기영동 사진이다.
- [102] 도 2는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 B3에 대한 SPR(surface plasmon resonance) sensorgram 결과를 보여준다.
- [103] 도 3은 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3에 대한 SPR sensorgram 결과를 보여준다.
- [104] 도 4a는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 A10의 인간 자연살해 세포인 KHYG-1 세포에 대한 결합력을 보여주는 그래프이고, 도 4b는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3의 인간 자연살해 세포인 KHYG-1 세포에 대한 결합력을 보여주는 그래프이고, 도 4c는 human IgG4 isotype control 항체의 인간 자연살해 세포인 KHYG-1 세포에 대한 결합력을 보여주는 그래프이다.
- [105] 도 5는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 및 human IgG4 isotype control 항체를 각각 처리시의 재조합 LILRB1-Fc 단백질의 HLA-G 과발현 세포 표면에 대한 결합 정도를 iQue screener로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [106] 도 6은 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3 및 B3의 in vivo 항종양 효과를 보여주는 그래프이다.
- [107] 도 7a 내지 7d는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3.1이 다양한 human LILR family 과발현 세포에 결합함을 보여주는 flow cytometry diagram이다.
- [108] 도 8a 내지 8d는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 H11이 다양한 human LILR family 과발현 세포에 결합함을 보여주는 flow cytometry diagram이다.
- [109] 도 9는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3.1 또는 H11의 처리시의 인간

자연살해 세포인 KHYG-1 세포에서의 그랜자임 B 분비량을 대조항체(human IgG4 isotype)와 비교하여 보여주는 그래프이다.

[110] 도 10은 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3.1 또는 H11의 처리시의 인간 자연살해 세포인 KHYG-1 세포에서의 퍼포린 분비량을 대조항체(human IgG4 isotype)와 비교하여 보여주는 그래프이다.

[111] 도 11은 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3.1 또는 H11의 LILRB1 신호전달 저해능 평가를 위한 luciferase reporter assay 결과를 보여주는 그래프이다.

[112] 도 12는 일 실시예에 따른 항-LILRB1 항체 E3.1 또는 H11의 in vivo 항종양 효과를 보여주는 그래프이다.

[113]

발명의 실시를 위한 형태

[114] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

[115]

[116] 실시예 1: LILRB1에 대한 인간 항체의 생산

[117] 1.1. 파지디스플레이(phage display)를 이용한 LILRB1에 대한 인간 항체의 선별

[118] 인간 LILRB1을 특이적으로 인식하는 항체를 선별하기 위하여, 인간 scFv 항체로 이루어진 라이브러리를 이용하여 파지디스플레이 선별법을 수행하였다. 항원은 RnD systems 사의 human LILRB1-His (Cat. No. 8989-T2)와 human LILRB1-Fc (Cat. No. 2017-T2)를 각각 사용하였다. 또한 각 항원은 EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin kit (ThermoFisher Scientific)을 이용하여 biotin을 conjugation하였다.

[119] 파지 디스플레이 선별은 고체상 (solid-phase)과 액체상 (solution-phase) 선별법을 통해 총 4가지 형태의 LILRB1 항원 (LILRB1-His, LILRB1-Fc, LILRB1-His-Biotin, LILRB1-Fc-Biotin)을 이용하여 수행하였다. 추가적인 선별은 사용하는 항원의 농도를 점차 줄이거나, LILRB1에 대한 control 항체를 이용하여 경쟁적으로 용출하거나, LILRB1-Fc가 항원으로 사용되었을 경우 Fc에 대한 음성 선별을 실시하는 등의 방법으로 수행하였다. 선별된 산출물은 다클론 파지 ELISA를 통하여 항원에 대한 결합을 확인하였다.

[120]

[121] 1.2. 단클론 soluble scFv 스크리닝 및 분석

[122] 상기 실시예 1.1에서 항원에 대한 결합이 확인된 scFv들을 코딩하는 유전자를 PCR로 증폭하여 발현 벡터를 제작하였다. 각 선별 군에 대한 스크리닝을 위해, 일정 수의 transformant를 96 well culture plate에 옮겼다. Autoinduction media

(Studier, F.W. (2005) Protein Expression and Purification 41, 207-34)를 이용하여 scFv 형태의 항체를 발현 후, DELFIA immune assay (PerkinElmer)를 수행하여 항원에 대한 결합을 확인하였다. 또한, 표면에 일정한 양의 scFv 항체가 코팅되도록 한 후, 항원에 대한 DELFIA를 수행하여 항원-항체 결합력에 대한 순위를 결정하였다.

[123]

[124] **1.3. 선별된 scFv 항체의 IgG 항체로의 변환**

[125] 상기 실시예 1.2에서 항원에 대한 결합이 확인된 클론 가운데 총 376개를 선별하고, 상기 선별된 scFv를 코딩하는 유전자의 핵산 서열을 일반적인 DNA 서열분석 방법으로 분석하여 중복되는 클론을 제거하였다. 또한 상기 실시예 1.2에서 결정된 항원-항체 결합력에 대한 순위를 바탕으로 총 93개의 클론을 선별하였다. 상기 선별된 scFv를 코딩하는 유전자로부터 각각의 중쇄가변영역(VH)과 경쇄가변영역(VL)에 해당하는 서열을 PCR로 증폭하여 IgG4 형태의 인간 항체 (IgG4 Fc: 서열번호 341, Kappa 불변영역: 서열번호 342, Lambda 불변영역: 서열번호 343)를 코딩하도록 제작된 발현벡터 (pTRIOZ-hIgG4; InvivoGen, 이 외에도 CMV promoter, 또는 CMV/CHO beta-actin 융합 프로모터 (KR10-1038126B1)를 가지고 human IgG4의 heavy chain constant region과 kappa 또는 lambda light chain의 constant region 서열을 포함하는 벡터 중 어느 것을 사용하여도 무방함)에 삽입하였다. 상기 발현벡터는 sequencing을 통해 그의 DNA 서열을 확인하였다.

[126]

[127] **1.4. 선별된 항체의 제조**

[128] 상기 실시예 1.3에서 구축된 벡터는 Plasmid Plus Maxi kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. 이와 같이 정제된 벡터를 ExpiCHO-S™ 세포 또는 Expi293™ 세포를 이용하여 항체 발현에 사용하였다.

[129] 구체적으로, 상기 실시예 1.3에서 구축된 벡터를 ExpiCHO-S™ 세포(Gibco) (1.5×10^8 cells/Culture Volume 25 mL)에 ExpiFectamine™ CHO reagent (Thermo Fisher)를 $80\mu\text{L}$ 첨가하여 트랜스펙션 (transfection)하였다. Transfection 1 일 후, ExpiCHO™ Enhancer (Thermo Fisher) $150\mu\text{L}$ 와 ExpiCHO™ Feed (Thermo Fisher) 4 mL을 첨가하였다. 5일차에 ExpiCHO™ Feed 4 mL을 첨가하였다. 트랜스펙션한 세포는 32°C , 5% CO_2 조건 하에서 총 7~11일 동안 배양하였다.

[130] 또한, 상기 실시예 1.3에서 구축된 벡터를 Expi293F™ 세포(Gibco) (3×10^8 cells/Culture Volume 100 mL)에 ExpiFectamine™ 293 Reagent (Gibco)를 $320\mu\text{L}$ 첨가하여 제조사의 설명서에 따라 트랜스펙션하였다. Transfection 1일 후, ExpiFectamine™ 293 Enhancer 1 (Thermo Fisher)을 Culture Volume 100 mL 당 0.6 mL, ExpiFectamine™ Enhancer 2 (Thermo Fisher)를 Culture Volume 100 mL 당 6 mL, glucose를 1 리터 당 3.6g 씩 첨가하였다. 트랜스펙션한 세포는 36.5°C , 5% CO_2 조건 하에서 총 5 일 동안 배양하였다.

- [131] 상기 배양된 두 가지 세포를 4°C에서 4000 rpm으로 20 분간 원심분리 후, 0.22 μm 의 bottle-top filter system (Corning)을 사용하여 여과하였다. 회수한 배양액을 AKTA Pure L (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다. AKTA Pure L에 Hitrap MabSelectSure 1mL 컬럼 (GE healthcare)을 장착하고 배양액을 1 mL/min의 유속으로 흘려준 후, 1X PBS로 20 column volume (CV) 씻어주었다. 용출 버퍼 (0.1 M sodium citrate pH 3.4 buffer)를 흘려주어 목적 단백질을 용출 시켰다. 용출액은 Amicon Ultra Filter Device (MWCO 10K, Merck)와 원심분리기를 이용하여 농축을 수행한 후 1xPBS 완충용액으로 버퍼교환을 실시하였다.
- [132] 정제한 항체 시료는 1X PBS로 희석하여 약 1 mg/mL이 되도록 준비하였다. Reducing Loading Buffer (3X) 또는 Non-reducing Loading Buffer (3X) 10 μL 와 정제한 항체 시료 20 μL 를 혼합한 후, 95°C heating bath에 2분간 방치한 후 꺼내어 냉각시켰다. SDS-PAGE Gradient Gel (4-20% 또는 4-12%)을 전기영동 장치에 장착한 후, well 당 10 μg 의 시료를 주입하고 gel을 전개하였다. 시료의 분자량 분석을 위해 Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD)를 별도의 well에 주입하였다. Coomassie staining solution으로 gel을 staining하고 destaining 한 후 gel 사진을 촬영하였다.
- [133] 이들 93개의 항체 중에서 A10, B3, E3, G1, G9 및 H2 항체의 겔 전기영동 사진을 대표로 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 이항화 결합을 갖는 항체의 생성을 확인할 수 있다.
- [134]
- [135] **1.5. 선별된 항체의 결합 친화도 분석**
- [136] 상기 실시예 1.3에서 선별된 93 종의 항체의 LILRB1 항원에 대한 친화력을 Biacore T200 (GE healthcare)를 사용하여 측정하였다. Series S Sensor Chip CM5 (GE healthcare, Cat. No. BR-1005-30) 상에 Amine Coupling Kit (GE healthcare, Cat. No. BR-1000-508)을 이용하여 anti-human IgG (Fc) 항체 (GE healthcare, Cat. No. BR-1008-39, 최종 농도 25 $\mu\text{g/mL}$)를 5 $\mu\text{L/min}$ 으로 360초 동안 흘려 약 5000-7000 RU로 고정시켰다. 항원인 인간 LILRB1 단백질 (LILRB1-His, RnD systems Cat. No. 8989-T2)을 3.13 nM부터 1600 nM까지의 농도 범위 내에서 서로 다른 4-9개의 농도로 30 $\mu\text{L/min}$ 의 속도로 주입하여, 하기 표와 같이 k_a 과 k_d 값을 구하고, 이로부터 K_D 값을 계산하였다.
- [137] 상기 93종의 항체 중, 우수한 결합력 (K_D 값)을 나타낸 20종의 항체를 선별하여, 그 결과를 하기의 표 3에 기재하고, 이 중에서 LILRB1 항원에 대하여 약 99.8 nM의 결합력을 보인 B3 및 LILRB1 항원에 대하여 약 101.2 nM의 결합력을 보인 E3의 SPR sensorgram을 각각 도 2 및 도 3에 나타내었다 (도 2: B3에 대한 SPR sensorgram, 도 3: E3에 대한 SPR sensorgram)

[138] [Table 3]

LILRB1 항체의 항원 결합력 (K_D)

Clone name	k_a ($\times 10^5$) (1/Ms)	k_d ($\times 10^{-4}$) (1/s)	K_D (nM)
A10	0.504	76.5	152
A11	0.001801	9.814	5448
B3	0.149	14.87	99.8
B9	0.09324	6.16	66.1
B12	1.84	14.42	7.84
D1	1.165	57.44	49.33
D3	0.0311	5.58	180
E3	0.3460	35.00	101.2
E4	0.1065	7.73	72.55
E6	0.2679	16.27	60.73
E9	0.105	10.48	99.86
E12	2.331	102.6	44.01
F11	2.72	6.15	2.26
F12	2.811	9.731	3.462
G1	4.33	14.19	3.28
G6	2.58	152.4	59.06
G9	1.43	4.36	3.05
G11	0.454	20.53	45.23
H2	5.865	95	16.20
H11	2.962	22.57	7.621

[139]

[140] **1.6. 선별된 항체의 서열 분석**

[141] 상기 실시예 1.5에서 항원에 대한 결합력이 확인된 20종의 항체의 Kabat numbering에 기초한 CDR definition에 따라 정의된 CDR과 경쇄가변영역, 중쇄가변영역, 경쇄, 및 중쇄의 아미노산 서열과 상기 경쇄가변영역 및 중쇄가변영역의 암호화 유전자의 핵산 서열을 일반적인 아미노산 서열분석 및 DNA 서열분석 방법으로 분석하여, 하기 표 4 내지 표 23에 정리하였다:

[142] [Table 4]
항체 클론 E3

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRFYAS	1
CDR-L2	GKNNRPS	2
CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3
CDR-H1	SYAMS	4
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	5
CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6
경쇄가변 영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQAPVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPA AA	221
경쇄가변 영역 유전자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAACTTTTATGCAAGCTGGTACCAGCA GAAGTCAGGACAGGCCCCAGTTCTTGTCATGTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCAT CACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTA CTGTA ACTCCCGGGACAGCAGTGGTAGCCATTTGACGGCGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA GGTCAGCCCGCGGCCGCA	261
중쇄가변 영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMISLRAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIW GQGLVTVSS	222
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGATTAGCCT	262

	GAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG AGATACGTATTACTATGGTTCGGGGAGAAGTAATGCT TTTGATATATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRNFYASWYQQK SGQAPVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGA QAEDEADYYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPA AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	301
중쇄	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMISLRAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	302

[143] [Table 5]
항체 클론 B3

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QASQDISNYLN	7
CDR-L2	DASNLET	8
CDR-L3	QQYDNLP	9
CDR-H1	DYAMH	10
CDR-H2	GISWNSGSIGYADSVKG	11
CDR-H3	VGDSGWSDAFDI	12
경쇄가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFITISLQP EDIATYYCQQYDNLPFGGGTKVDIKRTAAA	223
경쇄가변 영역유전 자	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCG AGTCAGGACATTAGCAACTATTTGAATTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTACGA TGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTT AGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTAC TGTCAACAGTATGATAATCTCCCTTTCGGCGGAGGGAC CAAAGTGGATATCAAACGTACCGCGGCCGCA	263
중쇄가변 영역	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGDSGWSDAFDIWGQ GTMVTVSS	224
중쇄가변 영역유전 자	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCG GCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT ATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTACGCAGACT CCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGTCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTG GGGATAGCAGTGGCTGGTCCGATGCTTTTGATATCTGG	264

	GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYCQQYDNLPGGGTKVDIKRTAAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKLYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	303
중쇄	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGDSSGWSDAFDIWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	304

[144] [Table 6]
항체 클론 A10

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSVSSNLA	13
CDR-L2	GASTRAT	14
CDR-L3	QQYGSSPRMYT	15
CDR-H1	SYAIS	16
CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQG	17
CDR-H3	GGLGELDNWFDP	18
경쇄가변 영역	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYGSSPRMYTFGQGTKVDIKRTAAA	225
경쇄가변 영역유전 자	GATATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCACCAGGGCCACCGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGATGTACACTTTT GGCCAGGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACCGCGG CCGCA	265
중쇄가변 영역	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSIST AYMELSSLRSEDNAVYYCARGGLGELDNWFDPWGQGT LVTVSS	226
중쇄가변 영역유전 자	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGC GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGG GATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATC CATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCG	266

	GCCTCGGGGAGTTGGACAACCTGGTTCGACCCCTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYGSSPRMYTFGQGTKVDIKRTAAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKLYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	305
중쇄	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSIST AYMELSSLRSEDYAVYYCARGGLGELDNWFDPWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPDSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK	306

[145] [Table 7]
항체 클론 G1

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGYKLGDRYVS	19
CDR-L2	KDSQRPS	20
CDR-L3	QAWDSGTGV	21
CDR-H1	SYGIS	22
CDR-H2	WISAYNGNTNYAQELQG	23
CDR-H3	VG VAGKLDY	24
경쇄가변 영역	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGDRYVSWYQQKT GQSPVVVIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQAWDSGTGVFGGGTKLTVLGQPAAA	227
경쇄가변 영역 유전자	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCACTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCAGGATAT AAACTGGGAGATAGATATGTTTCCTGGTATCAGCAGA AGACAGGCCAGTCCCCTGTGGTGGTCATCTATAAAGA TAGCCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAACGATTCTCTG GCTCCA ACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAG CGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGT CAGGCGTGGGACAGCGGCACTGGGGTATTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGC A	267
중쇄가변 영역	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQ APGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARVGVAGKLDYWGQGT LTVSS	228
중쇄가변 영역 유전자	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGAGGCACCTTCAGCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATG GATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAG GAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACAT CCACGAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGGAGCCTGAG ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTA	268

	GGGGTGGCTGGTAAACTTGACTACTGGGGCCAAGGAA CCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGDRYVSWYQQKT GQSPVVVIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQAWDSGTGVFGGGTKLTVLGQPAAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKEDSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS	307
중쇄	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQ APGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARVGVAGKLDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	308

[146] [Table 8]
항체 클론 G9

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGSSSDVGGYNYVS	25
CDR-L2	DVSNRPS	26
CDR-L3	SSYTGSSSTLDVL	27
CDR-H1	SYWIG	28
CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	29
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	30
경쇄가변 영역	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSNRPSGVSDRFGSKSGNMASTISG LQAEDEADYYCSSYTGSSSTLDVLFGGGKLTVLGQPAA A	233
경쇄가변 영역유전 자	CAGTCTGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAGCA GCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTAC CAGCAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATTT ATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGC TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACATGGCCTCCCTGAC CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATT ACTGCAGCTCATATACAGGAAGCAGCACTCTCGACGT GCTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT CAGCCCGCGGCCGCA	269
중쇄가변 영역	QVQLVQPGAIEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYCASQYYDGGYYMDVWGQGT LTVSS	234
중쇄가변 영역유전 자	CAGGTGCAGCTGGTGCAGCCTGGAGCAGAGGTGAAAA AGCCGGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC TGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGC GCCAGATGCCCCGGAAGGGCCTGGAGTGGATGGGGAT CATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGT CCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTC CATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAG	270

	GCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCAATA TTACGATGGGGGTACTACATGGACGTCTGGGGCCAG GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFGSKSGNMASTISG LQAEDEADYYCSSYTGSSSTLDVLFGGGTKLTVLGQPAA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	309
중쇄	QVQLVQPGAIEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	310

[147] [Table 9]
항체 클론 H2

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRNYYAS	31
CDR-L2	GNNKRPS	32
CDR-L3	NSLDSTYNHPI	33
CDR-H1	SYDIH	34
CDR-H2	WISAYNGNTNYAQKLQG	35
CDR-H3	DGGDAFDI	36
경쇄가변 영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRNYYASWYQQK PGQAPILVISGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQA EDEADYYCNSLDSTYNHPIFGGGTKVTVLGQPAAA	235
경쇄가변 영역유전 자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGGTGGC CTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGAC AGCCTCAGAACTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTATTCTTGTCTCTCTGGTAAC AACAAACGGCCCTCGGGGATCCCAGACCGATTCTCTG GCTCCAGCTCAGGAGACACAGCTTCCTTGACCATCTCT GGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCCCTAGACAGCACTTATAACCATCCGATATTCGGC GGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGG CCGCA	271
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDIHWVR QATGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDT TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGGDAFDIWGQGLV TVSS	236
중쇄가변 영역유전 자	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGATACACCTTCACCAGTTATGATATCCACTGGGTGCG ACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG ATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGA AGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATG	272

	GGGGTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACCT GGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRYASWYQQK PGQAPILVISGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQA EDEADYYCNSLDSTYNHPIFGGGTKVTVLGQPAAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	311
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIHWVR QATGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTST TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGGDAFDIWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	312

[148] [Table 10]

항체 클론 H11

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRSYYAS	37
CDR-L2	GRNNRPS	38
CDR-L3	KSRDSSGNHYV	39
CDR-H1	SYVMH	40
CDR-H2	IINPSGGSTSYAQKFQG	41
CDR-H3	DAGSSSDY	42
경쇄가변 영역	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQK PGQAPVVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQ AEDEADYYCKSRDSSGNHYVFGTGTKLTVLGQPAAA	231
경쇄가변 영역유전 자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCTGCTGCGTCTGTGGC CTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGAC AGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTGTAGTTGTCATCTATGGTAG AAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAGACACAGCTTCCTTGACCATCA CTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTG TAAGTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATTATGTCTTCG GAACTGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGC GGCCGCA	273
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTST STVYMELSSLRSEDYAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLVT VSS	232
중쇄가변 영역유전 자	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATC TGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAG AAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGT CCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT	274

	GCCGGCAGCTCGTCCGATTACTGGGGCCGTGGCACCC TGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQK PGQAPVVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQ AEDEADYYCKSRDSSGNHYVFGTGTKLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	313
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVW RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDYAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK	314

[149] [Table 11]
항체 클론 F12

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	AGTSSDIGDYDYVS	43
CDR-L2	DVSRRPS	44
CDR-L3	ASYTSSSVVV	45
CDR-H1	SYWIG	46
CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	47
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	48
경쇄가변 영역	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDYVSWYQQ HPGKTPKLMYDVSRRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QTEDEADYYCASYTSSSVVVFGGGTKLTVLGQPAAA	237
경쇄가변 영역 유전자	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCGCTGGAACCA GCAGTGACATTGGTGATTATGACTATGTCTCCTGGTAC CAACAGCACCCAGGCAAGACTCCCAAACATCATGATT ATGATGTCAGTAGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCG CTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA CCATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGACGAGGCTGATTA TTACTGCGCCTCATATACAAGCAGCAGCGTCGTGGTCT TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCC CGCGGCCGCA	275
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGT LTVSS	238
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAA AGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCT GGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGC GCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGAT CATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGT CCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTC CATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAG GCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCAATA	276

	TTACGATGGGGGTTACTACATGGACGTCTGGGGCCAG GGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDYVSWYQQ HPGKTPKLMIYDVSRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QTEDEADYYCASYTSSSVVVFSGGKLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	315
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	316

[150] [Table 12]
항체 클론 B9

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQISIRYLN	49
CDR-L2	GASSLQS	50
CDR-L3	QQAYGFPLT	51
CDR-H1	SYAIS	52
CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQG	53
CDR-H3	GEIAVAQNWDYYGMDV	54
경쇄가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQISIRYLNWYQQKP GKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYHCQQAYGFPLTLGGGTKVEIKRTAAA	229
경쇄가변 영역유전 자	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGGTATTTAAATTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATGG TGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACCATTG TCAACAGGCTTACGGTTTCCCCCTCACTCTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	277
중쇄가변 영역	QVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDYAVYYCARGEIAVAQNWDYYGMDVWG QGTLLTVSS	230
중쇄가변 영역유전 자	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGG GATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATC CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGG AAATAGCAGTGGCTCAAACCTGGGACTACTACGGTAT	278

	GGACGTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCG AGT	
경쇄 (Kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQISRYLNWYQQKP GKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYHCQQAYGFPLTLGGGKVEIKRTAAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	317
중쇄	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDNAVYYCARGEIAVAQNWDYYGMDVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	318

[151] [Table 13]

항체 클론 G11

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGTSSDVGGYNYVS	55
CDR-L2	DVSKRPS	56
CDR-L3	SSYSSSSTLVV	57
CDR-H1	SYWIG	58
CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	59
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	60
경쇄가변 영역	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYC SSYSSSSTLVVFVGGGTKLTVLGQPAAA	239
경쇄가변 영역 유전자	CAGTCTGCGCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTC TCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCA GCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTAC CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATTT ATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCG CTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA CAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA TTACTGCAGCTCATATTCAAGCAGCAGCACTCTCGTGG TTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCA GCCCCGCGGCCGCA	279
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGT LTVSS	240
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAA AGCCGGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC TGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGC GCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGAT CATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGT CCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTC CATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAG GCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCAATA	280

	TTACGATGGGGGTTACTACATGGACGTCTGGGGCCAG GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYSSSSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	319
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	320

[152] [Table 14]
항체 클론 G6

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRRYYAT	61
CDR-L2	GQNYRPS	62
CDR-L3	NSRDSSGNHVV	63
CDR-H1	SYVMH	64
CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQG	65
CDR-H3	GWGYSSSFY	66
경쇄가변 영역	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQK PGQAPVLVIYGQNYRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQ AEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGQAAA	241
경쇄가변 영역유전 자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGTGGC CTTGGGACAGACAGTCACGATCACATGCCAAGGAGAC AGCCTCAGAAGGTATTATGCAACCTGGTACCAGCAGA AGCCAGGACAGGCCCTGTCTTGTCTATGGTCAA AACTACCGGCCCTCGGGGATCCCAGACCGATTCTCTG GCTCCAACTCAGGAACACAGCTTCCTTGACCATCACT GGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGG CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCG GCCGCA	281
중쇄가변 영역	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDYAVYYCARGWGYSSSFYWGQGTTV TVSS	242
중쇄가변 영역유전 자	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATC TGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGG GATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATC CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGGGT	282

	GGGGGTATAGCAGCTCGTTTGACTACTGGGGGCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQK PGQAPVLVIYGQNYRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQ AEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	321
중쇄	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWV RQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDYAVYYCARGWGYSSSFYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	322

[153] [Table 15]
항체 클론 F11

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGSSSNIGTNTVN	67
CDR-L2	SNDQRPS	68
CDR-L3	ETWDDSLKGPV	69
CDR-H1	SYAMS	70
CDR-H2	TISGSGDSTYYADSVKG	71
CDR-H3	EWELGDAFDI	72
경쇄가변 영역	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLP GTAPKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAA	243
경쇄가변 영역 유전자	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAACGTCTGGGAC CCCCGGGCAGACGTTCTCCATTTTTTGTCTGGAAGCA GTTTCGAACATCGGAACATACTGTTAATTGGTACCAG CAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATA GTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATT CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA TCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC TGTGAAACATGGGATGACAGCCTGAAAGGCCCGGTGT TCGGCGGGGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGCC CGCGGCCGCA	283
중쇄가변 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVR RAPGKGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNNLRAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTL VTVSS	244
중쇄가변 영역 유전자	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCC AGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCGTCT GGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCG CCGGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACT ATTAGTGGTAGTGGTGATAGCACATACTACGCAGACT CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGAAT	284

	GGGAAGTAGGCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCGTGG CACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLP GTAPKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	323
중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVR RAPGKGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNNLRAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	324

[154] [Table 16]
항체 클론 D3

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSISSYLN	73
CDR-L2	AASSLQS	74
CDR-L3	QSYSTRWT	75
CDR-H1	SYAMS	76
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	77
CDR-H3	DRGSYGYYYGMDV	78
경쇄가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTRWTFGQGTKVEIKRTAA	245
경쇄가변 영역유전 자	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTG TCAACAGAGTTACAGTACCCGGTGGACGTTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACCGCGGCCGCA	285
중쇄가변 영역	EVQLLESGGGVVQPRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGSYGYYYGMDVWG QGTMTVSS	246
중쇄가변 영역유전 자	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCC AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACT CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACA GAGGCAGCTATGGTTACTACTACGGTATGGACGTCTG	286

	GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPE DFATYYCQQSYSTRWTFGQGTKVEIKRTAAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS	325
중쇄	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGSYGYYYGMDVWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	326

[155] [Table 17]

항체 클론 B12

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSISSYLN	79
CDR-L2	AASSLQS	80
CDR-L3	QSYSTLRT	81
CDR-H1	GYMH	82
CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	83
CDR-H3	AGASIVGATALDY	84
경쇄가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTLRTFGQGKVEIKRTAAA	247
경쇄가변 영역유전 자	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTG TCAACAGAGTTACAGTACCCTCCGGACGTTCCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	287
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRAGASIVGATALDYWG QGTLVTVSS	248
중쇄가변 영역유전 자	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCG ACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG ATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACACTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATC CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACGAGAGCCG GTGCTTCTATAGTGGGAGCTACCGCGCTTGACTACTGG	288

	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTLRFTFGQGTKVEIKRTAAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	327
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRAGASIVGATALDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	328

[156] [Table 18]
항체 클론 E4

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TRSSGSIASNYVQ	85
CDR-L2	EDNQRPS	86
CDR-L3	QSYDTGNRNYV	87
CDR-H1	SYTIS	88
CDR-H2	RIIPILGIANYAQKFQG	89
CDR-H3	GPSLNYAGYFDN	90
경쇄가변 영역	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQR PGSSPTTVIYEDNQRPSPGVDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQSYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAA	249
경쇄가변 영역 유전자	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTC TCCGGGAAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGC AGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACC AGCAGCGCCCGGGCAGTTCCCCCACTGTGATCTAT GAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCC CTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTG ACTACTACTGTCACTTTATGATACCGGCAATCGGAAT TATGTCTTCGGAAGTGGGACCCAGCTCACCGTCCTAGG TCAGCCCGCGGCCGCA	289
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYTISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTDT AYMELSSLTYDDTAVYFCVRGPSLNYAGYFDNHWGQGLT VTVSS	250
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGAGGCACCTTCAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGC GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAG GATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACCTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACATGTC CACAGACACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGACA TATGATGACACGGCCGTATATTTTTGTGTGAGAGGCCC	290

	TAGTCTTAATTATGCCGGCTATTTTGACAACTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQR PGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQSYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEIQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	329
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYTISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTD AYMELSSLTYDDTAVYFCVRGPSLNYAGYFDNWGQGLT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	330

[157] [Table 19]
항체 클론 E12

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRSYYAS	91
CDR-L2	GKEKRPS	92
CDR-L3	NSRGSTTDYMV	93
CDR-H1	SYAMH	94
CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	95
CDR-H3	ERGSMDV	96
경쇄가변 영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKSGQAPVLVIYGKEKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARA EDEADYYCNSRGSTTDYMFVGGGTQLTVLGQPAAA	251
경쇄가변 영역 유전자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAGTCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAGAAAAGCGCCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCGGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCCCGGGGACAGCACTACTGACTATATGGTGTTCGGCGGGGGGACCCAGCTCACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	291
중쇄가변 영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERGSMDVWGQGTLVTVSS	252
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAC	292

	GGGGAAGTGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCT GGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQK SGQAPVLVIYGKEKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARA EDEADYYCNSRGSTTDYMFVGGGTQLTVLGQPAAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	331
중쇄	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERGSMDVWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	332

[158] [Table 20]
항체 클론 D1

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	KASQDIDDDMN	97
CDR-L2	EASTLVP	98
CDR-L3	LQHDKFPYT	99
CDR-H1	SYGIS	100
CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	101
CDR-H3	RGVDEGDY	102
경쇄가변 영역	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQ KPGEAAISIIQEASTLVPGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESE DAAYYFCLQHDKFPYTFGQGTKLEIKRTAAA	253
경쇄가변 영역유전 자	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTTCATGTCAG CGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGCAAAGC CAGCCAAGACATTGATGATGATATGAACTGGTACCAA CAGAAACCAGGAGAAGCTGCTATTTCCATTATTCAAG AAGCTAGTACTCTCGTTCCTGGAATCCCACCTCGATTC AGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAA TTAATAACATAGAATCTGAGGATGCTGCATATTACTTC TGTCTACAACATGATAAGTTCCCGTACACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	293
중쇄가변 영역	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCASRGVDEGDYWGQGTMTV TVSS	254
중쇄가변 영역유전 자	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCG ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG ATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAGA AGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTC CATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCGGG	294

	GGGTTGATGAGGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACAAT GGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQ KPGEAAISIIQEASTLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESE DAAYYFCLQHDKFPYTFGQGTKLEIKRTAAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTH QGLSSPVTKSFNREGC	333
중쇄	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCASRGVDEGDYWGQGTMV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	334

[159] [Table 21]
항체 클론 E6

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGSSGNIASNYVQ	103
CDR-L2	RDDQRPS	104
CDR-L3	QSYDSSSWV	105
CDR-H1	TYDIT	106
CDR-H2	WMNPNSGNSRSAQKFQG	107
CDR-H3	GDYSGVVLATALDY	108
경쇄가변 영역	NFMLTQPHSVSESPGKTVTLSTGSSGNIASNYVQWYQH RPGSAPTTVIYRDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG LRPEDEADYYCQSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAA	255
경쇄가변 영역 유전자	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTC TCCGGGGAAGACGGTTACCCTCTCCTGCACCGGCAGC AGCGGCAACATTGCCAGTAACTATGTGCAGTGGTACC AGCACCGCCCCGGGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTA CCGGGATGACCAAAGACCCTCTGGAGTCCCTGATCGC TTCTCTGGCTCCATCGACAGTTCATCCAACCTCTGCCTC CCTCACGATCTCTGGACTGAGGCCTGAGGACGAGGCT GACTATTACTGTGAGTCTTATGATAGCAGCTCTTGGGT GTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAG CCCGCGGCCGCA	295
중쇄가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYDITWVR QAPGQGLEWMGMNPNSGNSRSAQKFQGRVSMSTSDSS ISTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGDYSGVVLATALDY WGQGTLVTVSS	256
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTCCAGCTTGTGTCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGATACACCTTCACCACTTATGATATCACCTGGGTGCG ACAGGCCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGATGG ATGAACCCGAACAGTGGTAACTCACGCTCTGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCAGCATGACCAGTGAATCCTC CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGGAG	296

	ACTACTCGGGTGTGGTACTAACTGCAACAGCACTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTLSTGSSGNIASNYVQWYQH RPGSAPTTVIYRDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG LRPEDEADYYCQSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	335
중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYDITWVR QAPGQGLEWMGWMNPNSGNSRSAQKFQGRVSM TSDSS ISTAYMELSSLRSED TAVYYCATGDYSGV VLTATALDY WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGP PCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK	336

[160] [Table 22]
항체 클론 E9

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGSSSNIGNNYVY	109
CDR-L2	RNNQRPS	110
CDR-L3	AAWDDSLSGWV	111
CDR-H1	SYGMH	112
CDR-H2	NIKQDGSEKYYVDSVKG	113
CDR-H3	EDRIAAAGMRELDY	114
경쇄가변 영역	QSELTQLPSASETPGQRTVISCSSSSNIGNNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQPAAA	257
경쇄가변 영역 유전자	CAGTCTGAGCTGACTCAGCTACCCTCAGCGTCTGAGAC CCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGC AGCTCCAACATCGGAAATAATTATGTATACTGGTACC AGCAACTCCCCGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTAT AGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGAT TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT ACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGT GTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAG CCCGCGGCCGCA	297
중쇄가변 영역	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDRIAAAGMRELDYW GQGTLVTVSS	258
중쇄가변 영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT GGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAC ATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACT CTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACACGCTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAGA GCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG	298

	ACCGTATAGCAGCAGCTGGGATGCGGGAGTTGGACTA CTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	QSELTQLPSASETPGQRTISCSGSSSNIGNNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQPAAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	337
중쇄	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDRIAAAGMRELDYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	338

[161] [Table 23]

항체 클론 A11

	Amino acid sequence (N→C) / Nucleic acid sequence (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RSSQSLLHSNGYNYLD	115
CDR-L2	LGSNRAS	116
CDR-L3	MQGTHWPPYT	117
CDR-H1	SYAMT	118
CDR-H2	GISSDGTTTYADSVRG	119
CDR-H3	DQLLGWDALNV	120
경쇄가변 영역	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPYTFGQGTKVEIKRTAAA	259
경쇄가변 영역유전 자	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGT CACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTA GTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACCTATTTG GATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGC TCCTGATCTATTTGGGTTCTAACCAGGCCTCCGGGGTC CCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATT TTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGT TGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTC CGTACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAA ACGTACCGCGGCCGCA	299
중쇄가변 영역	EVQLLESQGGLEQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQ APGKGLEWVSGISSDGTTTYADSVRGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRDEDTAVYYCARDQLLGWDALNVWGQGT MVTVSS	260
중쇄가변 영역유전 자	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGAAC AGCCTGGGGGGTTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCTCCTTTACCAGCTACCCATGACCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGT ATTAGTAGTGATGGGACCACTACAACCTACGCGGACT CCGTGAGGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACACGGTGTATCTCCAAATGAACAGTCTGAGA	300

	GACGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCAAGAGATC AATTGTTGGGCTGGGATGCTCTGAATGTCTGGGGCCA AGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Kappa)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPYTFGQGTKVEIKRTAAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK LYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	339
중쇄	EVQLLESGGLEGQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQ APGKGLEWVSGISSDGTITTYADSVRGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLRDEDTAVYYCARDQLLGWDALNVWGQGT MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK	340

[162]

[163] 실시예 2: 선별된 항체의 인 비트로 (in vitro) 생물학적 활성 분석

[164] **2.1. 자연살해 세포 표면 결합 분석 (NK cell surface binding assay)**

[165] 상기 실시예 1.4에서 선별된 93 종 항체들이 면역세포 표면에 발현된 LILRB1과도 결합하는지 여부를 확인하기 위해, 자연살해세포 표면 결합 분석 (NK cell surface binding assay)를 수행하였다. 인간 자연살해 세포인 KHYG-1 세포 (JCRB)를 10%(w/v)의 FBS (Gibco)와 100 U/mL interleukin-2 (Novartis)를 포함하는 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 배양하였다. KHYG-1 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 U-bottom 96-well tissue culture plate (BD Falcon)에 분주하였다. 각 well 당 최종 농도가 50 μ g/mL의 시험항체를 가하고, 4°C에서 1 시간 동안 두었다.

[166] LILRB1에 특이적인 결합을 보기 위해, human IgG4 isotype control 항체 (Biolegend)도 동일하게 처리하였다. FACS buffer로 washing 한 후, 각 well에 anti-human Fc-biotin 항체 (life technologies)를 가하고, 4°C에서 1 시간 동안 두었다. FACS buffer로 washing 한 후, 각 well에 streptavidin PE (BD Pharmingen)를 가하고 4°C에서 30 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing한 후, 현탁하여 iQue

screener (Sartorius)에서 분석하였다.

- [167] 상기 얻어진 결과들 중 대표적으로 A10, E3, E4, F12, G1, G9, G11, H2, 및 H11의 결과를 human IgG4 isotype (control)과 비교하여 표 24에 나타내고, A10, E3 및 human IgG4 isotype (control)의 flow cytometry diagram을 각각 도 4a (A10), 4b (E3), 및 4c (isotype IgG4)에 나타내었다:

- [168] [Table 24]

	Mean Fluorescence Intensity	% of population 2
human IgG4 isotype control	142917.2	2.95
A10	222660.2	28.68
E3	268702.2	40.22
E4	272295.5	43.25
F12	262012.7	38.02
G1	321051.7	56.23
G9	263079.3	41.32
G11	262771.9	40.11
H2	238570.9	29.00
H11	244818.2	32.59

- [169] 표 24 및 도 4a~4c에 나타난 것과 같이, 시험된 항체들은 human IgG4 isotype control 항체에 비해, 인간 자연살해 세포(표면)에 대한 높은 결합 정도를 나타내었다.

- [170]

[171] **2.2. 선별된 항체의 LILRB1/HLA-G 결합 저해능 분석**

- [172] 상기 실시예 1.5에서 선택된 항체들이 LILRB1과 이의 리간드인 HLA-G의 결합을 저해하는지 여부를 확인하기 위하여, LILRB1/HLA-G 결합 저해능 분석을 수행하였다.

- [173] 이를 위하여 HLA-G를 과발현하는 것으로 알려진 JEG-3 (ATCC cat# HTB-36)을 이용하였다. JEG-3는 10%(v/v)의 FBS (Gibco) 및 1%(v/v)의 pen-strep (Gibco)을 포함하는 MEM 배지 (Gibco)에서 배양하였다. JEG-3 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 U-bottom 96-well tissue culture plate (BD Falcon)에 분주하였다. 상기 웰 플레이트를 1X PBS buffer로 washing하였다. FACS buffer (1X PBS + 1% BSA + 1 mM EDTA)에 상기 실시예 1.5에서 선별된 시험 항체(A10, E3, F12, G1, G9, H2, H11)와 LILRB1-Fc (RnD systems)를 각각 최종 농도가 $10 \mu\text{g/mL}$, $5 \mu\text{g/mL}$ 이 되도록 혼합하여 well 당 $100 \mu\text{L}$ 를 세포에 처리한 후 ice에서 2 시간 동안 두었다. 양성 대조군으로서 anti-LILRB1 항체 (clone HP-F1, Abcam), 음성 대조군으로서 anti-lysozyme IgG4 항체 (clone D1.3)를 상기와 동일하게 처리하여 준비하였다.

FACS buffer로 2회 washing한 후, 각 well에 PE-anti-huIgG-Fc 항체 (Biolegend, 10 μ g/mL)를 가하고, ice에서 1 시간 동안 두었다. FACS buffer로 2회 washing한 후, 동일 buffer 100 μ l에 현탁하여 iQue screener (Sartorius)에서 분석하였다.

- [174] 상기 얻어진 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보여지는 바와 같이, 시험된 항체 A10, E3, F12, G1, G9, H2, 및 H11 모두 LILRB1-Fc가 HLA-G 과발현 세포주에 결합하는 것을 효과적으로 저해하였다.

[175]

[176] **2.3. 자연살해세포에 의한 암세포 사멸능 분석**

- [177] 선별된 항체들이 자연살해세포에 의한 암세포 사멸능을 증가시키는지 여부를 확인하기 위하여, 자연살해세포 KHYG-1에 의한 HLA-G 과발현 HEK293 세포의 사멸률을 분석하였다. KHYG-1 세포 (JCRB)를 2x10⁴ cells/well (4x10⁴ cells/mL, 총 부피 50 μ l)이 되도록 96-well tissue culture plate (BD Falcon)에 분주하였다. 시험 항체 (표 25)를 각 well 당 최종 농도가 20 μ g/mL이 되도록 가하고, 37°C에서 1 시간 동안 두었다.

- [178] 음성 대조군으로서 human IgG4 isotype control 항체 (Biolegend)도 각각 동일하게 처리하였다.

- [179] HLA-G 과발현 HEK293 세포(HEK293 세포 (American Type Culture Collection)를 HLA-G1을 발현하도록 제작된 lentivirus로 transduction하여 HLA-G 과발현 세포주를 제작함)를 IncuCyte CytoLight Rapid Red Reagent (Sartorius)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 염색하였다. 1 시간 후, HLA-G 과발현 HEK293 세포를 1x10⁴ cells/well (2x10⁴ cells/mL, 총 부피 50 μ l)이 되도록 상기 plate에 가하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 배양기에 설치된 IncuCyte S3(Sartorius)에 넣고 72 시간 동안 이미지를 촬영하고, 살아있는 HLA-G 과발현 HEK293의 밀집도를 나타내는 Red area confluence를 측정하여, 세포 생존률을 구하였다. 세포 생존률을 하기의 표 25 (대조 항체를 1로 하여 상대값으로 나타냄)에 나타내었다:

- [180]
$$\text{Relative cell viability (IgG4 Isotype} = 1) = \frac{\text{각 항체의 Normalized red area confluence 값}}{\text{IgG4 Isotype의 Normalized red area confluence 값}}$$

[181] [Table 25]

Antibody	Relative cell viability (IgG4 Isotype=1)
human IgG4 Isotype control	1.00
A10	0.70
B9	0.81
D3	0.83
E1	0.82
E3	0.64
F12	0.81
G1	0.64
G6	0.78
G9	0.77
G11	0.82
H2	0.78
H11	0.60

[182] 표 25에서 보여지는 바와 같이, 시험항체 A10, B9, D3, E1, E3, F12, G1, G6, G9, G11, H2, H11은 human IgG4 isotype control에 비해 KHYG-1에 의한 HLA-G 과발현 HEK293 세포의 사멸을 증가시켰다.

[183]

[184] 실시예 3: 선별된 항체의 인 비보 (in vivo) 생물학적 활성 분석

[185] 상기 실시예 1.5에서 선별된 항체 중, 2종 시험 항체 (E3, B3)의 항암 효능 개선 여부를 생체 내에서 확인하였다. 이를 위하여, Bioware Brite Cell Line HCT116 Red-Fluc 대장암 세포 (PerkinElmer) 및 THP-1 유래 대식세포 (THP-1 derived macrophage)와, 항체를 투여한 이중 이식 대장암 마우스 동물 모델을 대상으로 인 비보 (in vivo)에서 상기 2종의 항체의 투여에 의하여 종양의 크기가 감소되는지 여부를 확인하였다. 음성 대조군으로서 human IgG1 isotype control 항체 (BioXcell, Cat. No. BP0297)를 상기와 동일하게 투여한 이중 이식 대장암 마우스 동물 모델을 준비하였다. 이하, 상기 과정을 보다 구체적으로 기재한다:

[186] THP-1 유래 대식세포 (THP-1 derived macrophage)의 준비

[187] 상기 사용된 THP-1 유래 대식세포는 THP-1 세포(ATCC)에 150 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) 및 20 ng/mL interferon gamma (Peprotech), 10 pg/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma)를 가하여 분화시켜 준비하였다.

[188] 마우스 동물 모델에서의 항암 효능 분석

[189] 5 주령의 자성 CIEA NOG Mouse [NOG 면역부전 마우스] (일본

실험동물중앙연구소)에 3×10^6 개의 HCT116 Red-Fluc 대장암 세포와 3×10^6 개의 THP-1 유래 대식세포, 및 2 종의 시험 항체(E3 또는 B3 항체; 마리 당 $20 \mu\text{g}$ 투여) 각각의 혼합물을 피하주사하여 사용하였다. 종양 이식 후 4일째부터, 항체를 복강주사에 의해 5mg/kg 의 농도로 주 2회 투여하고, 이식된 종양의 크기(mm^3)를 측정하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 나타낸 바와 같이, HCT116 대장암 및 THP-1 유래 대식세포를 이식한 마우스 동물 모델에서 시험된 모든 항체, 특히 E3 항체가 통계적으로 유의미한 정도의 확연한 종양 성장 억제 효능을 보였다.

[190]

[191] 실시예 4: 항-LILRB1 항체 (E3.1)의 제작

[192] 상기 실시예 3에서 특히 우수한 효과가 확인된 E3 항체의 중쇄 (서열번호 302)에 해당하는 전체 핵산 서열을 PCR 증폭하고, E3 항체의 경쇄가변영역(VL) (서열번호: 221)의 Ser1에서부터 Leu110에 해당하는 핵산 서열을 PCR 증폭한 후, Lambda 불변영역 (Lambda CL.1, 서열번호 344) 핵산 서열과 연결하여 Lambda 경쇄영역 암호화 핵산 서열을 PCR 증폭하였다. 증폭된 서열은 IgG4 형태의 인간 항체를 코딩하도록 제작된 발현벡터 (pTRIOZ-hIgG4; InvivoGen, 이 외에도 CMV promoter, 또는 CMV/CHO beta-actin 융합 프로모터 (KR10-1038126B1)를 가지고 human IgG4의 heavy chain constant region과 lambda light chain의 constant region을 암호화하는 서열을 포함하는 벡터 중 어느 것을 사용하여도 무방함)에 삽입하였다. 상기 발현벡터는 sequencing을 통해 그의 DNA 서열을 확인하였다.

[193] 상기 구축된 발현벡터를 이용하여 실시예 1.4를 참조하여 항체 (E3.1)를 제작하고, 실시예 1.6을 참조하여 항체의 서열을 분석하여, 그 결과를 표 26에 나타내었다:

[194] [Table 26]
항체 클론 E3.1

	아미노산 서열 (N→C) / 핵산 서열 (5'→3')	서열 번호
CDR-L1	QGDSLRFYAS	1
CDR-L2	GKNNRPS	2
CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3
CDR-H1	SYAMS	4
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	5
CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6
경쇄가 변영역	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQ APVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEA DYVCNSRDSSGSHLTGVFGGGKVTVL	345
경쇄가 변영역 유전자	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTT GGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCT CAGAACTTTTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGA CAGGCCCCAGTTCTTGTCATGTATGGTAAAAACAACCGGC CCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGG AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAA GATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTG GTAGCCATTTGACGGGCGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGT CACCGTCCTA	346
중쇄가 변영역	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MISLRAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGLVTVS S	222
중쇄가 변영역 유전자	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT	262

	CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTAT CTGCAAATGATTAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGATACGTATTACTATGGTTCGGGGAG AAGTAATGCTTTTGATATATGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCGAGT	
경쇄 (Lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRN FYASWYQQKSGQ APVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEA DYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETT KPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS	347
중쇄	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MISLRAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGT LTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK	302

[195]

[196] 실시예 5: Human LILR을 과발현하는 세포주의 제작

[197] 인간 LILR family 단백질의 전체 서열 (하기 표 27 참조)을 암호화하는 핵산서열을 PCR로 증폭하고, 증폭된 서열을 코딩하도록 제작된 발현벡터 (pTRIOZ-hIgG4; InvivoGen, 이 외에도 CMV promoter, 또는 CMV/CHO beta-actin 융합 프로모터 (KR10-1038126B1)를 가지고 human IgG4의 heavy chain constant region과 lambda light chain의 constant region 서열을 포함하는 벡터 중 어느 것을 사용하여도 무방함)에 삽입하였다. 상기 발현벡터는 sequencing을 통해 그 서열을 확인하였다. 구축된 벡터는 CHO 세포에 트랜스펙션 (Transfection) 하고, 각 LILR 단백질을 세포 표면에 과발현하는 11종의 안정적인 세포주를 제작하였다.

[198] [Table 27]

Protein	Genbank Accession No.	아미노산 서열 (N→C)	서열 번호	항체
LILRB 1	AAH1573 1	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTL WAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLY REKKTAPWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEH AGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGA YIKPTLSAQSPVVNSGGNVTLCDSQVAF DGFILCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIF SVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLP SDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEETL TLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGA QPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGA HNLSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVLSLVQ PGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKE GAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTS AHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVV SGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDP QSGLGRLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLFLIL RHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEP TDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQP EDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRP RREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD TEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPP PSQEGPSPAVPSIYATLAIH	348	Human LILRB 1 antibod y (ab1857 96, Abcam)
LILRB 2	AAH3682 7	MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTL WAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLY REKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEH TGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAY PKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFG GFILCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFS VGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPS DLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESL TLQCVSDVG YDRFVLYKEGERDLRQLPGR QPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGA YNLSSEWSAPSDPLDILITGQIHGTPFISVQP	349	Human LILRB 2/CD85 d/ILT4 antibod y (MAB2 078, R&D Systems)

		GPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAG AADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVSAH AGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLELVVSG PSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQ SGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLLFLIL RHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEP TDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQP EDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTL RRKATEPPPSQEGEPPAEPsiyatLAIH		
LILRB 3	XP_00672 6377	MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPKPT LWAEPGSVISWGSPVTIWCQGSLEAQEYRL DKEGSPEPLDRNNPLEPKNKARFSIPSMTEH HAGRYRCHYYSSAGWSEPSDPLELVMGTG YNKPTLSALPSPVVASGGNMTLRCSQKG YHHFVLMKEGEHQLPRTLDSQQLHSGGFQ ALFPVGPVNPSHRWRFTCYYYMNTQP WSHPSDPLEILPSGVSRLKPSLLTLQGPVLAP GQSLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDFLQ RPGQQPQAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRC YGAHNLSSEWSAPSDPLNILMAGQIYDTS LSAQPGPTVASGENVTLLCQSWWQFDTFL LTKEGAAHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPM PVTSAHAGTYRCYGSYSSNPILLSFPSEPLE LMVSGHSGGSSLPTGPPSTPGLGRYLEVLI GVSVAFVLLLFLLLFLLLRRQRHSHKRTSD QRKTDFQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAA DVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHD EDPQAVTYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGE FLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVT YAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPsiy ATLAIH	350	Human LILRB 3/CD85 a/ILT5 antibod y (MAB1 806, R&D Systems)
LILRB 4	NP_00126 5355	MIPTFTALLCLGLSLGPRTHMQAGPLPKPTL WAEPGSVISWGNSVTIWCQGTLEAREYRL DKEESPAPWDRQNPLEPKNKARFSIPSMTE DYAGRYRCYRSPVGWSQPSDPLELVMGTG AYSKPTLSALPSPVLTSGKSVTLLCQSRSPM DTFLLIKERAHPHLLRSEHGAQQHQAEP	351	Human LILRB 4/CD85 k/ILT3 antibod y

		PMSPVTSVHGGTYRCFSSHGFSHYLLSHPS DPLELIVSGSLEGPRSPTRSVSTAAGPEDQ PLMPTGSVPHSGLRRHWEVLIGVLVVSILL LSLLLFLLLQHWRQGKHRTLAQRQADFQR PPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFC AAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVT YAKVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDR QAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYARLHSF TLRQKATEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH		(MAB2 4251, R&D Systems)
LILRB 5	NP_00683 1	MTLTLSVLICLGLSVGPRTCQAGTLPKPTL WAEPASVIARGKPVTLWCQGPLETEEYRL DKEGLPWARKRQNPLEPGAKAKFHIPSTVY DSAGRYRCYYETPAGWSEPSDPLELVATGF YAEPTLLALPSPVVASGGNVTLQCDTLDGL LTFVLVEEEQKLPRTLYSQKLPKGPSQALFP VGPVTPSCRWRFRCCYYRKNPQVWSNPS DLLEILVPGVSRKPSLLIPQGSVVARGGSLT LQCRSDVGYDIFVLYKEGEHDLVQGGGQQ PQAGLSQANFTLGPVSRSHGGQYRCYGAH NLSPRWSAPSDPLDILIAGLIPDIPALSVQPG PKVASGENVTLLCQSWHQIDTFFLTKEGAA HPPLCLKSKYQSYRHQAEFSMSPVTSAGG TYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVVSQPSG DPSLSPTGSTPTPGPEDQPLTPTGLDPQSG GRHLGVVTGVSVAFVLLLFLLLFLLLRHRH QSKHRTSAHFYRPAGAAGPEPKDQGLQKR ASPVADIQEEILNAAVKDTQPKDGVEMDA RAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPP SQEREPPAEPSIYAPLAIH	352	Human LILRB 5/CD85 c/LIR-8 antibod y (MAB3 065, R&D Systems)
LILRA 1	NP_00685 4	MTPIVTVLICLRLSLGPRTHVQAGTLPKPTL WAEPGSVITQGSVTLWCQGILETQEYRLY REKKTAPWITRIPQEIVKKKGQFPIPSITWEHT GRYRCFYGSHTAGWSEPSDPLELVVTGAYI KPTLSALPSPVVTSGGNVTLHCVSQVAFGS FILCKEGEDEHPQCLNSQPRTHGWSRAIFSV GPVSPSRRWSYRCYAYDSNSPHVWSLPSDL LELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPGESLTQ	353	Human LILRA 1/LILR B1 antibod y (MAB3 0851,

		CVSDVSYDRFVLYKEGERDFLQLPGPQQA GLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCSGAYNLSS EWSAPSDPLDILIAQQFRGRPFISVHPGPTV ASGENVTLLCQSWGPFHTFLLTKAGAADA PLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTSAHSGTYR CYGSLSSNPYLLSHPSDSLELMVSGAAETLS PPQNKSDSKAGAANTLSPSQNKTAHPQDYL TVENLIRMGIAGLVLVVLGILLFEAQHSQRS L		R&D Systems)
LILRA 2	AAH1741 2	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTL WAEPGSVIIQGSPTLRCQGSQAEEYHLY RENKSASWVRRIQEPGKNGQFPISITWEH AGRYHCQYYSHNHSSEYSDPLELVVTGAY SKPTLSALPSPVVTGNGVTLQCVSQVAFD GFILCKEGEDEHPQRLNSHSHARGWSWAIF SVGPVSPSRWSYRCYAYDSNSPYVWSLPS DLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPMVAPGESL TLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDFLQRPGW QPQAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCYSA HNLSSEWSAPSDPLDILITGQFYDRPSLSVQ PVPTVAPGKNVTLLCQSRGQFHTFLLTKEG AGHPPLHLRSEHQAQQNQAEFRMGVPTSA HVGTYRCYSSSLSSNPYLLSLPSDPLELVVSA SLGQHPQDYLTVENLIRMGVAGLVVLVVLGIL LFEAQHSQRSLSQDAAGR	354	Human LILRA 2/CD85 h/ILT1 antibod y (MAB6 364, R&D Systems)
LILRA 3	AAH2820 8	MTSILTVLICLGLSLDPRTHVQAGPLPKPTL WAEPGSVITQGSPTLRCQGSLETQEYHLY REKKTALWITRIPQELVKKGQFPILSITWEH AGRYCCYGSHTVGLSESSDPLELVVTGAY SKPTLSALPSPVVTSGGNVTIQCDQSQVAFD GFILCKEGEDEHPQCLNSHSHARGSSRAIFS VGPVSPSRWSYRCYGYDSRAPYVWSLPS DLLGLLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGEKL TFQCGSDAGYDRFVLYKEWGRDFLQRPGR QPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYTCGA YNLSSEWSAPSDPLDILITGQIRARPFLSVRP GPTVASGENVTLLCQSQGGMHTFLLTKEG	355	Human LILRA 3/CD85 e antibod y (PA5-4 7349, Invitrog en)

		AADSPLRLKSKRQSHKYQAEFPMSPV TSAH AGTYRCYGSLSNPYLLTHPSDPLELVVSG AAETLSPPQNKSDSKAGE		
LILRA 4	NP_03640 8	MTLILTSLLFFGLSLGPRTRVQAENLPKPIL WAEPGPVITWHNPVTIWCQGTLEAQGYRL DKEGNSMSRHILKTLESENKVKLSIPSMW EHAGRYHCYYQSPAGWSEPSDPLELVVTA YSRPTLSALPSPVVTSGVNVTLRCASRLGL GRFTLIEEGDHRLSWTLNSHQHNHGKFQAL FPMGPLTFSNRGTFRCYGYENNTPYVWSEP SDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPVVTGEN LTLQCGSDVG YIRYTYKEGADGLPQRGR QPQAGLSQANFTLSPVSRSYGGQYRCYGA HNVSSEWSAPSDPLDILIAGQISDRPSLSVQP GPTVTSGEKVTLCCQSWDPMFTFLLTKEGA AHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMSPV TSAH AGTYRCYGSRSSNPYLLSHPSDPLELVVSG ATETLNPAQKSDSKTAPHLQDYTVENLIR MGVAGLVLLFLGILLFEAQHSQRSPRCSQ EANSRKDNAPFRVVEPWEQI	356	CD85g (ILT7) antibod y (16-517 9-82, Invitrog en)
LILRA 5	NP_06707 3	MAPWSHPSAQLQPVGDAVSPALMVLLCL GLSLGPRTHVQAGNLSKATLWAEPGSVISR GNSVTIRCQGTLEAQEYRLVKEGSPEPWDT QNPLEPKNKARFSIPSMTEHHAGRYRCYYY SPAGWSEPSDPLELVVTGFYNKPTLSALPSP VVTSGENVTLQCGSRLRFDRFILTEEGDHK LSWTLDSQLTPSGQFQALFPVGPVTPSHRW MLRCYGSRRHILQVWSEPSDLLEIPVSGAA DNLSPSQNKSDSGTASHLQDYAVENLIRMG MAGLILVVLGILIFQDWHWSQRSPQAAAGR	357	Human LILRA 5/CD85 f antibod y (MAB6 754, R&D Systems)
LILRA 6	NP_00134 7096	MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPKPT LWAEPGSVISWGSPVTIWCQGSLEAQEYQL DKEGSPEPLDRNNPLEPKNKARFSIPSMQ HHAGRYRCHYYSSAGWSEPSDPLELVMTG FYNKPTLSALPSPVVASGGNMTLRCSQKG YHHFVLMKEGEHQLPRTLDSQQLHSGGFQ	358	Human LILRA 6/CD85 b antibod y

	ALFPVGPVTPSHRWRFTCYYYTNTNTPRVW SHPSDPLEILPSGVSRKPSLLTLQGPVLAPG QSLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDFLQRP GQQPQAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCY GAHNLSSEWSAPSDPLNILMAGQIYDTVSL SAQPGPTVASGENVTLLCQSRGYFDTFLLT KEGAAHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMSPV TSAHAGTYRCYGSYSSNPHELLSFPSEPLEL MVSGHSGGSSLPPTGPPSTPASHAKDYTVE NLIRMGMAGLVLVFLGILLFEAQHSQRNPQ DAAGR	(MAB8 656, R&D Systems)
--	---	--------------------------------------

[199]

[200] 실시예 6: 선별된 항체의 **LILRB1** 과발현 세포 표면 결합에 대한 EC₅₀ 측정

[201] 상기 실시예 1 및 4에서 준비된 항체들의 human LILRB1 과발현 세포주 결합에 대한 EC₅₀ 값을 측정하기 위해, 세포 표면 결합 분석 (cell surface binding assay)을 수행하였다. 상기 준비된 항체들을 대표하여 E3.1 및 H11 항체의 EC₅₀ 값을 측정하였다. 실시예 5에서 준비된 LILRB1을 세포 표면에 과발현시킨 CHO 세포를 1x10⁵ cells/well이 되도록 U-bottom 96-well tissue culture plate (BD Falcon)에 분주하였다. 각 well당 최종 농도가 E3.1은 600 ug/mL부터 1/3 씩, H11은 27 ug/mL부터 1/3 씩 연속적인 희석을 한 뒤 세포에 처리하고, 4°C에서 60 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing 한 후, anti-human Fc-biotin 항체 (Invitrogen)를 세포에 처리하고, 4°C에서 30 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing 한 후, PE 형광이 표지된 streptavidin (BD Pharmingen)을 세포에 처리하고 4°C에서 30 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing한 후, 세포를 현탁하여 iQue screener (Sartorius)에서 분석하였다. EC₅₀은 GraphPad Prism software의 nonlinear regression 식을 사용하여 계산하였고, 얻어진 결과를 표 28에 나타내었다:

[202] [Table 28]

	E3.1	H11
EC ₅₀ (nM)	7.154	0.376

[203]

[204] 실시예 7: 선별된 항체의 **Human LILR family** 과발현 세포주에 대한 cross-reactivity 평가

[205] 선별된 항체들이 LILRB1 이외의 다른 human LILR family와도 결합하는지 여부를 확인하기 위해 세포 표면 결합 분석 (cell surface binding assay)을 수행하였다. 실시예 5에서 준비된 다양한 LILR 계열 단백질을 세포 표면에 과발현시킨 CHO 세포를 각각 1x10⁵ cells/well이 되도록 U-bottom 96-well tissue

culture plate (BD Falcon)에 분주하였다. 최종 농도 20 ug/mL의 항체를 각 well의 세포에 처리하고, 4°C에서 60 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing 한 후, anti-human Fc-biotin 항체 (Invitrogen)를 세포에 처리하고, 4°C에서 30 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing 한 후, PE 또는 FITC 형광이 표지된 streptavidin (BD Pharmingen)을 세포에 처리하고 4°C에서 30 분 동안 두었다. FACS buffer로 washing한 후, 현탁하여 iQue screener (Sartorius)에서 분석하였다. 각 LILR 단백질에 특이적인 항체(표 27 참조)를 처리한 세포는 positive control로, human IgG4 isotype control 항체 (Biolegend)를 처리한 세포는 negative control로 사용하였다.

- [206] E3.1항체를 사용하여 얻어진 결과를 도 7a 내지 7d에 나타내고 (E3.1: red; LILR-specific antibody: blue; Isotype (hIgG4) control: gray), H11 항체를 사용하여 얻어진 결과를 도 8a 내지 8d에 나타내었다 (H11: red; LILR-specific antibody: blue; Isotype (hIgG4) control: gray). 도 7a 내지 7d 및 도 8a 내지 8d에 나타난 바와 같이, 시험된 E3.1 및 H11 항체 모두 LILRB1 이외의 다른 LILRs에는 전혀 결합하지 않거나 거의 결합하지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본원 실시예에서 제공된 항체들이 LILRB1에 대하여 특이적 결합능을 가짐을 보여준다.
- [207]
- [208] **실시예 8: 고착화효소항체법(ELISPOT, the enzyme-linked immune absorbent spot)에 의한 그랜자임 (Granzyme B) 및 퍼포린 (Perforin) 분비 측정**
- [209] E3.1과 H11 항체가 자연살해세포의 세포독성능을 증가시키는지 확인하기 위해, 고착화효소항체법 (ELISPOT)을 수행하였다. 상기 세포독성능은 자연살해세포에서의 세포독성 물질인 그랜자임(granzyme B)과 퍼포린(perforin)의 발현량으로 확인하였다.
- [210] LILRB1을 발현하는 KHYG-1 세포주(JCRB) 5×10^3 개를 U-bottom 96-well tissue culture plate 에서 5×10^3 개의 HLA-G를 과발현 시킨 K562 세포 (K562 세포 (American Type Culture Collection)를 HLA-G를 발현하도록 제작된 lentivirus로 transduction하여 HLA-G 과발현 세포주를 제작함)와 동시배양 하였다. 이 때 각 well 당 최종 농도가 50 ug/mL 이 되도록 E3.1, H11, human IgG4 isotype control 항체를 각각 가하고, 37°C에서 30분 동안 배양하였다. Anti-perforin 항체 및 anti-granzyme B 항체가 각각 coating 된 ELISPOT 용 96 well plate (Immunospot, Cat. HGZBPFN-2M) (PVDF membrane)에 동시 배양하던 세포를 옮겨서 추가적으로 37°C에서 8시간 동안 배양하였다. Washing 용액(0.05% tween 20 in PBS)으로 PVDF membrane 을 세척한 뒤 anti-granzyme B-HRP 와 anti-perforin-biotin 을 순차적으로 가하고 이후 제조사의 매뉴얼에 따라 detection 과정을 진행하였다. PVDF membrane 을 상온에서 24 시간 건조시킨 뒤 Immunospot 사의 ELISPOT analyzer 를 이용하여 그랜자임 B와 퍼포린 spot 의 개수를 측정하였다.

- [211] 상기 얻어진 결과를 도 9 (granzyme b; Gzmb) 및 도 10 (perforin; Prf)에 각각 나타내었다 (Y축은 총 spot 개수를 나타냄). 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, 그랜자임 B와 퍼포린의 경우 모두, human IgG4 isotype control 항체 처리시와 비교하여, E3.1 또는 H11 항체 처리시에 분비량이 통계적으로 유의하게 증가함을 확인할 수 있다. 통계 분석은 unpaired T-test 로 진행하였으며, 실험의 신뢰성을 위하여 모든 실험은 동일 조건에서 3회 수행하고, 결과는 평균값으로 나타내었다.
- [212]
- [213] **실시예 9: Chimeric GHI/75 항체의 제조**
- [214] 본 실시예에서 제공된 항체들의 기존 항체 대비 우수한 효능을 확인하기 위하여, 마우스에서 유래한 anti-human LILRB1 항체인 GHI/75 항체(Biolegend, cat# 333721)의 가변영역과 인간 유래 항체 불변 영역을 가지는 chimeric GHI/75를 제작하였다.
- [215] 구체적으로, Peptide mapping을 통하여 GHI/75 항체의 아미노산 서열을 분석한 후, 마우스 GHI/75 항체 가변 영역 (VH, VL domain)에 해당하는 핵산 서열을 인간 IgG4 항체의 가변 영역 (VH, VL domain) 핵산 서열에 치환한 벡터를 제작하였다. 인간 IgG4의 upper hinge에 해당하는 부분은 인간 IgG1 upper hinge의 아미노산 서열(EPKSCDKTHT; 서열번호 359)로 치환하였다. 해당 벡터를 실시예 1.4와 같은 과정을 통해 발현, 정제하여 얻어진 항체를 하기 시험에서 비교 항체로 사용하였다.
- [216]
- [217] **실시예 10: IL-2 promoter luciferase assay를 이용한 선별된 항체의 LILRB1 signaling 저해능 측정**
- [218] 실시예 1 및 4에서 제작된 항체들이 LILRB1에 의한 신호전달을 저해하는지 확인하기 위해 luciferase reporter assay를 수행하였다. 실시예 1 및 4에서 제작된 항체들 중 대표적으로 E3.1 및 H11 항체에 대하여 시험을 수행하였으며, 비교 항체로서 실시예 9에서 준비된 chimeric GHI/75 항체를 사용하였다. LILRB1과 interleukin 2 (IL-2) promoter luciferase를 발현하는 Jurkat 세포주(Jurkat 세포주 (American Type Culture Collection)에 IL-2 promoter luciferase vector (Promega)를 삽입한 후, LILRB1을 발현하도록 제작된 lentivirus를 transduction하여 제작함)와 HLA-G를 과발현 하는 K562 세포주를 이용하였다. 96-well plate에 anti-CD3 항체(Biolegend)를 가한 후, 4°C에서 밤새 두어 코팅하였다. 다음날, U-bottom 96-well plate에 LILRB1과 IL-2 promoter luciferase를 발현하는 Jurkat 세포 1x10⁵ 개/well로 가하고, 최종 농도가 20 ug/mL이 되도록 E3.1, H11, chimeric GHI/75, 및 human IgG4 isotype (대조군) 항체를 각각 처리한 후, 37°C에서 1시간 동안 두었다. 이후 이 plate에 1x10⁵ 개의 HLA-G 를 과발현 시킨 K562 세포를 가하고, 37°C에서 30분 동안 두었다. 이후 이 현탁액을 anti-CD3로 coating된 plate로 옮기고 anti-CD28 항체(Biolegend)를 최종 농도가 10 ug/mL이 되도록 가하였다.

이 plate를 37°C에서 6시간 동안 둔 후, 각 well에 Steady-Glo® (Promega) 용액을 가한 후 luminometer (Envision, PerkinElmer)를 사용하여 분석하였다.

[219] 상기 얻어진 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11에 나타난 바와 같이, 본원 실시예에 따른 E3.1 항체와 H11 항체는, human IgG4 isotype control 항체 및 chimeric GHI/75 비교 항체 대비, 현저하게 증가된 LILRB1 signaling 저해 활성을 나타내었다.

[220]

[221] **실시예 11: 선별된 항체의 마우스 동물 모델에서의 항암 효능 분석**

[222] 선별된 항체의 항암 효능 분석을 위하여, 실시예 3을 참조하여, 5 주령의 자성 CIEA NOG Mouse (NOG 면역부전 마우스, 일본 실험동물중앙연구소)에 3×10^6 개의 HCT116 Red-Fluc 대장암 세포와 3×10^6 개의 THP-1 유래 대식세포 및 2 종의 시험 항체 (마리 당 20 ug 투여)를 피하주사하여, 마우스 동물 모델을 준비하였다. 사용된 시험 항체는 E3.1, H11이고, 비교를 위하여 human IgG4 isotype 대조항체를 사용하였다. 종양 세포 이식 후 4일째부터, 상기 항체를 각각 5 mg/kg의 용량으로 복강 주사로 주 2회 투여하고, 종양 부피를 측정하여, 그 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에 나타난 바와 같이, HCT116 대장암 세포 및 THP-1 유래 대식세포를 이식한 마우스 동물 모델에서 E3.1 및 H11 항체 모두 대조항체 대비 우수한 종양 성장 억제 효능을 나타내었다.