

명세서

발명의 명칭: 항 PD-1 항체 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 개시내용은 프로그램된 세포사멸-1 (programmed cell death-1; PD-1) 단백질에 결합하는 항체, 그의 항원-결합 단편 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 본 항목의 설명은 본 개시내용에 대한 배경기술 정보를 제공할 뿐이며, 선행 기술을 본질적으로 구성하는 것이 아니다.
- [3] 프로그램된 세포사멸-1 (Programmed cell death-1; Programmed death-1; PD-1; CD279로도 명명됨)은 T-세포, B-세포, 단핵세포, 자연살해(NK)세포 및 수지상 세포와 같은 면역세포에서 빈번하게 확인되는 세포 표면 단백질로서, 면역 체계를 하향조절하여 면역 체계의 반응을 조절하고, T 세포 염증 활성을 억제함으로써 자기 내성(self-tolerance)을 촉진한다. 이는 자가 면역질환을 예방하기도 하지만, 면역체계가 암세포를 죽이는 것을 방해할 수 있다(Syn et al., 2017 Lancet Oncol 18(12): e731-e741.)
- [4] 최근, 면역체계를 타겟으로 하여 면역력을 회복, 촉진시키는 면역항암제의 개발이 활발히 진행되고 있다. 면역 체크포인트 단백질의 하나인 PD-1/PD-L1 경로는 임상적으로 암 면역요법의 표적이 될 수 있음이 확인되었다(Patsoukis et al., 2020 Sci. Adv. 6: eabd2712). 따라서, PD-1을 차단하고 면역 체계를 활성화하여 종양을 공격하고 특정 유형의 암을 치료하기 위한 PD-1 억제제가 개발되고 있다.
- [5] 또한, PD-1 신호전달의 상향 조절은 인간의 바이러스 감염 및 확장으로도 이어진다. 유행성 간염 바이러스 HBV 및 HCV는 간세포에서 PD-1 리간드의 과발현을 유도하고 효과 T세포에서 PD-1 신호전달을 활성화하여, 바이러스 감염에 대한 T-세포 고갈 및 관용을 야기한다 (Golden-Mason et al., 2008 J Immunol 180:3637-3641). 마찬가지로, HIV 감염은 유사한 기작으로 인간 면역 시스템을 빈번하게 회피한다. 길항 분자에 의해 PD-1 신호전달을 치료적으로 조절하여 관용으로부터 면역세포를 회복할 수 있고, 재활성시켜 암 및 만성 바이러스 감염을 제거할 수 있다고 보고된 바 있다(Okazaki et al., 2007 Int Immunol 19:813-824).
- [6] 한편, 항 PD-1 효능제 항체를 류마티스 관절염과 같은 자가면역 장애의 치료, 이식된 세포/조직의 거부를 감소시키기 위한 용도의 개발도 진행중이다 (Grebinoski and Vignali, 2020 Curr Opin Immunol 67:1-9).
- [7] 또한, IFN γ 의존적 전신성 면역반응(systemic immune response)이 알츠하이머병 및 신경염증성 요소(neuroinflammatory component)들을 공유하는 다른 중추신경계 병리들의 치료에 유익하다는 것이 제안되었고, 국제 공개특허

WO2015/136541에서 항 PD-1 항체를 사용한 알츠하이머병 치료 용도가 개시되었다. 국제 공개특허 WO2017/220990에는 PD-1/PD-L1 억제성 면역 체크포인트 경로의 차단은 IFN γ 생산 세포에 의한 IFN γ 의 분비를 높이며, 증가된 IFN γ 활성화는 뇌의 맥락막망(choroid plexus)이 선택적인 백혈구 수송, T-세포 및 단핵구의 손상된 중추신경계로의 침투, 면역세포의 신경퇴행성 병리 및 신경염증 부위로의 귀소(homing)를 허용하도록 하고, 환경을 덜 유해하게 하고 독성 물질의 제거, 신경세포의 구제, 재생 및 수리를 더 잘 하도록 한다는 것이 기재되었다.

- [8] 항 PD-1 항체 제제의 개발이 활발하나, 여전히 보다 다양한 적응증이나 특성을 가지는 다양한 항 PD-1 항체의 개발이 절실하다. 또한, 항 PD-1 항체 제제나 이를 포함하는 복합제를 효율적으로 개발하기 위해서는 인간 PD-1 뿐만 아니라 마우스 PD-1에도 결합할 수 있어 전임상 단계에서 항체의 효능, 약동력학적 특성, 독성 등을 마우스에서 확인할 수 있는 항체의 중요성이 큰데, 상용화된 항체들의 대부분은 인간 PD-1에만 결합하는 것들이므로, 교차반응성이 있는 새로운 항 PD-1 항체의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 개시내용의 일 목적은 PD-1에 결합하는 신규한 PD-1 단백질 결합제를 제공하는 것이다.
- [10] 본 개시내용의 일 목적은 PD-1에 결합하는 신규한 항 PD-1 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공하는 것이다.
- [11] 본 개시내용의 다른 일 목적은 인간 PD-1 및 마우스 PD-1에 모두 결합하는 교차 반응성인(cross-reactive) 신규한 단백질 결합제, 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공하는 것이다.
- [12] 본 개시내용의 다른 일 목적은 신규한 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 및 그의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 개시내용의 또 다른 일 목적은 신규한 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 및 그의 항원-결합 단편의 용도를 제공하는 것이다.

[14]

- [15] 그러나 본 개시내용이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 출원의 발명자들은 다수의 실험 후, 새로운 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 및 그의 항원-결합 단편을 개발하였다.
- [17] 본 개시내용은 일 측면에서, PD-1 단백질에 결합하는 항-PD-1 항체 및 그의 항원-결합 단편을 개시하며, 상기 항체 및 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역

- 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [18] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하고;
- [19] 경쇄 가변 영역은 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함한다.
- [20] 본 개시내용은 일 측면에서, PD-1 단백질에 결합하는 항-PD-1 항체 및 이의 항원-결합 단편을 개시하며, 항체는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [21] 중쇄 가변 영역은 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하고;
- [22] 경쇄 가변 영역은 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함한다.
- [23] 본 개시내용은 일 측면에서, 인간 PD-1 단백질(서열번호 62)의 P130, L128 및 I126을 포함하는 PD-1의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 상기 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 62의 N66, Y68, K78, A129 및 A132로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 추가의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [24] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하는, 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [25] 본 개시내용은 일 측면에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함하는, 단리된

면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.

- [26] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [27] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [28] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [29] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [30] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [31] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [32] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하며, 프레임워크 영역(framework region) 및 불변영역(constant region)을 포함하는, 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [33] 본 개시내용은 일 측면에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함하며, 프레임워크 영역 및 불변영역을 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄

폴리펩티드를 제공한다.

- [34] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하는, 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [35] 본 개시내용은 일 측면에서 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하는, 단리된 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [36] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [37] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, 단리된 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [38] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [39] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [40] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 항체 접합체, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 가변영역 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변영역 폴리펩티드를 포함하는, PD-1 단백질 결합제(binding agent)를 제공한다.
- [41] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 PD-1 단백질 결합제가 낙타화 단일 도메인 항체, 디아바디, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, scFv 이합체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, ds 디아바디, 나노바디, 미니바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, dAb 및 단쇄 결합 폴리펩티드로부터 선택된 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 PD-1 단백질 결합제를 제공한다.
- [42] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄

폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

- [43] 본 개시내용은 다른 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [44] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [45] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [46] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공한다.
- [47] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 유전자 도입 동물을 제공한다.
- [48] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 상기 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 발현시키는 방법을 제공한다.
- [49] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역

폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드와 시험 대상 물질을 반응시키는 단계 및 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 PD-1 유사 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

- [50] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드와 시험 대상 물질을 반응시키는 단계 및 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 PD-1 유사 물질을 스크리닝하는 방법에 의하여 스크리닝된 PD-1 유사 물질을 제공한다.
- [51] 본 개시내용은 일 측면에서, PD-1 녹아웃 마우스를 PD-1 항원으로 면역화시킨 후, 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, myeloma 세포와 융합하여 얻은 하이브리도마 세포 중에서 PD-1 항원과 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하는 것을 포함하는 항 PD-1 항체의 생산 방법을 제공한다.
- [52] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 항체 생산 방법에 의하여 선별된 PD-1 항원과 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [53] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 제공한다.
- [54] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 및 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [55] 상기 약학적 조성물은 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물일 수 있다.
- [56] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 약학적 조성물에 제2 치료제를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [57] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원

결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 치료용, 진단용 또는 검출용 키트를 제공한다.

- [58] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [59] 본 개시내용은 또한 일 측면에서, 개체에 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 투여하는 것을 포함하는 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다.
- [60] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료제를 제조하는데 사용하는 용도를 제공한다.
- [61] 본 개시내용은 또한 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 종양세포의 성장을 억제하기 위하여 치료학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 종양세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.
- [62] 다른 양태는 본원의 상세한 설명 및 당업계의 기술상식으로부터 분명할 것이다.

발명의 효과

- [63] 본 개시내용에 따른 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스는 인간 PD-1 단백질에 결합하여 면역 반응의 조절을 위하여 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 PD-1을 발현하는 T 세포를 표적화하고 PD-1 활성을 조절하는데 유용하다. 예를 들어 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환(neurodegenerative disease) 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.
- [64] 또한 본 개시내용에 따른 상기 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 인간 PD-1 뿐만 아니라 마우스 PD-1에도 결합할 수 있어 전임상 단계에서 항체의 효능, 약동력학적 특성, 독성 등을 마우스에서 확인할 수 있어, 항체 제제나 이를 포함하는 복합제제의 효율적인 개발에 중요한 역할을 할 수 있다.
- [65] 본 개시내용의 효과는 이런 문언적 기재에만 한정되지 않고, 통상의 기술자가 본 개시내용을 통해 유추할 수 있는 것까지 모두 포함한다.
- 도면의 간단한 설명**
- [66] 도 1은 ELISA를 사용하여, 본 개시내용에 따른 하이브리도마 1G1 항체의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다.
- [67] 도 2는 flow cytometry를 사용하여, 본 개시내용에 따른 하이브리도마 1G1 항체의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다.
- [68] 도 3은 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 각각 인간 PD-L1 또는 마우스 PD-L1 결합에 대하여, ELISA를 사용하여 본 개시내용의 하이브리도마 1G1 항체의 차단(blocking) 테스트를 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [69] 도 4는 세포 표면 인간 또는 마우스 PD-1에 대한 각각 인간 PD-L1 또는 마우스 PD-L1 결합에 대하여, flow cytometry를 사용하여 본 개시내용의 하이브리도마 1G1 항체의 차단 테스트를 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [70] 도 5는 정제된 하이브리도마 1G1 항체 및 키메라 1G1 항체(1G1 chimeric)를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.
- [71] 도 6은 ELISA를 사용하여, 정제된 하이브리도마 1G1 항체의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다.
- [72] 도 7은 본 개시내용의 단일클론세포(하이브리도마) 1G1 항체의 인간 T 세포

- 표면 면역 체크포인트들에 대한 선택적 결합 여부를 ELISA로 시험한 결과이다.
- [73] 도 8은 인간화 1G1 항체 3종(인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70) 각각의 중쇄 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL의 형태로 표시되었다.
- [74] 도 9는 인간화 1G1 항체 3종(인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70) 각각의 경쇄 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL의 형태로 표시되었다.
- [75] 도 10a는 인간화 항체 1G1-h61의 중쇄 핵산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL-종결 코돈(*이탤릭체*)의 형태로 표시되었다.
- [76] 도 10b는 인간화 항체 1G1-h68의 중쇄 핵산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL-종결 코돈(*이탤릭체*)의 형태로 표시되었다.
- [77] 도 10c는 인간화 항체 1G1-h70의 중쇄 핵산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL-종결 코돈(*이탤릭체*)의 형태로 표시되었다.
- [78] 도 11은 인간화 1G1 항체 3종(인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70) 각각의 경쇄 핵산 서열을 나타낸 것이다. 상기 서열은 리더 서열(leader sequence)-**VH/VL(볼드체 및 밑줄표시)**-hIgG4CH/hIgkappaCL-종결 코돈(*이탤릭체*)의 형태로 표시되었다.
- [79] 도 12a는 본 개시내용에 따른 인간화 1G1 항체의 인간 PD-1에 대한 결합 동역학을 나타낸 것이다.
- [80] 도 12b는 본 개시내용에 따른 인간화 1G1 항체의 인간 PD-1에 대한 친화도를 ka값(Kon), kd값(Koff), KD값을 통해 나타낸 것이다.
- [81] 도 13은 ELISA를 사용하여, 인간, 마우스, 토끼, 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이 및 래트 각각의 세포외 도메인 PD-1 항원에 대한 본 개시내용에 따른 1G1 항체(키메라 1G1 항체, 인간화 1G1 항체)의 선택적 결합 여부(cross-reactivity)를 시험한 결과의 그래프이다.
- [82] 도 14는 1G1 항체의 항암 효과 확인을 위한 동물 실험 스케줄을 도시한 것이다.
- [83] 도 15는 마우스 흑색종 모델에서 1G1 항체 투여에 의한 시간에 따른 종양 크기 변화를 나타낸 그래프이다.
- [84] 도 16은 마우스 흑색종 모델에서 1G1 항체 투여에 의한 시간에 따른 생존율을 나타낸 그래프이다.
- [85] 도 17은 MC38 대장암 syngeneic 마우스 모델에서 1G1 항체 투여에 의한 시간에 따른 상대적 종양 크기 변화와 종양성장억제율을 나타낸 것이다.
- [86] 도 18은 인간화 1G1 항체, 키트루다 및 옵디보의 인간 PD-1에의 결합 영역을 도시한 것이다.
- [87] 도 19a는 본 개시내용에 따른 인간화 1G1 항체의 pH 6.0에서의 인간 PD-1에

대한 결합 동역학을 나타낸 것이다.

- [88] 도 19b는 본 개시내용에 따른 인간화 1G1 항체의 pH 6.0에서의 인간 PD-1에 대한 친화도를 k_a 값(Kon), k_d 값(Koff), KD값을 통해 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [89] 본 개시내용을 기재하기 전에, 본 개시내용은 특정 방법 및 기재된 실험 조건이 가변적일 수 있으므로, 이러한 방법 및 조건에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어는, 본 개시내용의 범위가 단지 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 단지 특정 양태들을 기재하기 위한 것이며, 청구범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [90] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시내용이 속하는 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 개시내용의 실행 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 문헌은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [91]
- [92] 본 개시내용의 용어 "프로그래밍된 세포사멸-1", "PD-1", "PD-1 단백질"은 상호교환적으로 사용되고, 변이체, 동형, 인간 PD-1의 중 상동체, 및 적어도 하나의 PD-1와의 공통적인 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. PD-1은 CD279로도 공지된 T-세포 공-억제제이다.
- [93] 본 개시내용의 용어 "결합 분자" 또는 "결합제"는 항체, 그의 항원-결합 단편, 이들의 다른 분자와의 접합체인 것을 포함한다.
- [94] 본 개시내용의 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원-결합 단편(즉, "항원-결합 부분(portion)") 또는 이의 단일쇄를 포함한다. "항체"는 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 상호-연결된 적어도 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함하는 단백질, 또는 이의 항원-결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 추가로, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 불리는 과변이성(hypervariability)의 영역으로 세분화될 수 있으며, 이는 보다 보존적인, 프레임워크 영역(framework regions)(FR)으로 불리는 영역 사이에 배치되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 이루어지며, 아미노-말단에서 카복시-말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.
- [95] 본 개시내용에서 "항체"는 면역글로불린 또는 이의 단편 또는 유도체를 지칭하고, 이것이 시험관 내에서 생산되든지 또는 생체 내에서 생산되든지와

- 상관없이, 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩티드를 아우른다. 상기 용어는 다클론성, 단일클론성, 단일특이성, 다특이성, 비-특이성, 인간화, 단일-쇄, 키메라, 합성의, 재조합, 잡종(hybrid), 돌연변이된, 및 그래프트(grafted) 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 용어 "항체"는 또한 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fd, dAb, 및 항원-결합 기능, 즉, PD-1에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 다른 항체 단편을 포함한다. 전형적으로, 이러한 단편은 항원-결합 단편을 포함할 것이다.
- [96] 본 개시내용의 용어 "항원-결합 단편", "항원-결합 도메인", 및 "결합 단편"은 항체와 항원 사이의 특이적 결합의 원인인 아미노산을 포함하는 항체 분자의 일부를 지칭한다. 예를 들어, 항원이 큰 경우에, 항원-결합 단편은 단지 항원의 일부에만 결합할 수 있다. 항원 분자의 항원-결합 단편과의 특이적 상호작용의 원인이 되는 부분을 "에피토프" 또는 "항원 결정인자(antigenic determinant)"로 지칭한다.
- [97] 항원-결합 단편은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함할 수 있지만, 필수적으로 둘 다 포함해야 하는 것은 아니다. 예를 들어, 소위 Fd 항체 단편은 오직 VH 도메인으로만 구성되지만, 여전히 온전한 항체의 항원-결합 기능을 약간 유지한다.
- [98] 용어 "에피토프"는 항원 결정인자를 정의하며, 이는 상기에 정의된 바와 같이 결합 단편에 의해 특이적으로 결합/동정된다. 결합 단편은, 표적 구조, 예를 들어, 인간 및 설치류 PD-1에 대해 고유한 구조적인 에피토프 또는 연속적인 에피토프와 특이적으로 결합/상호작용할 수 있다. 구조적인 또는 비연속적인 에피토프는, 1차 서열에서 분리되지만 폴리펩티드가 천연 단백질(native protein)/항원으로 접힐 때 분자의 표면 상에 합쳐지는, 두 개 이상의 불연속의 아미노산 잔기의 존재에 의해 폴리펩티드 항원으로 특징지어진다. 에피토프에 기여하는 두 개 이상의 불연속의 아미노산 잔기는 하나 이상의 폴리펩티드 쇄(들)의 단리된 구획 상에 존재한다. 이 잔기들은 폴리펩티드 쇄(들)이 3-차원 구조로 접혀 에피토프를 구성할 때 분자의 표면 상에 합쳐진다. 대조적으로, 연속적인 또는 선형 에피토프는 폴리펩티드 쇄의 단일 선형 세그먼트(segment) 내에 존재하는, 두 개 이상의 연속의 아미노산 잔기로 구성된다.
- [99] 용어 "PD-1의 에피토프에 결합한다"는 항체가 PD-1의 특정한 에피토프에 대해 특이적 결합을 갖는다는 것을 지칭하며, 이 에피토프는 선형 아미노산 서열, 또는 PD-1 폴리펩티드의 일부 상의 3원, 즉, 3차원의 구조에 의해 정의될 수 있다. 특이적 결합은 PD-1의 부분에 대한 항체 친화성이 다른 관련된 폴리펩티드들에 대한 그들의 친화성보다 실질적으로 더 크다는 것을 의미한다.
- [100] 용어 "높은 친화성"은 다른 관련된 폴리펩티드들에 대한 친화성과 비교하여, PD-1의 부분에 대한 친화성에 있어서 측정 가능한 증가가 있음을 의미한다. 바람직하게는, 상기 친화성은 다른 단백질에 대하여 보다, PD-1의 특정한 부분에 대하여 적어도 1.5배, 2배, 5배, 10배, 100배, 10²배, 10³배, 10⁴배, 10⁵배, 10⁶배

이상이다. 결합 친화성은 효소-결합 면역 흡착측정법(ELISA)에 의해, 또는 형광 활성화 세포 분류 분석법(FACS) 또는 표면 플라즈마 공명(SPR)에 의해 결정될 수 있다.

- [101] 본 개시내용의 용어 "교차-반응성(cross-reactivity)"은 본원에 기재된 항원 단편의, 인간 및 설치류(마우스 또는 랫트)에서의 동일한 표적 분자로의 결합을 지칭한다. 그러므로, "교차-반응성"은 상이한 종에서 발견되는 동일한 분자 X에 대한, 그러나 X 이외의 다른 분자에 대하여는 아닌, 종간 반응성(interspecies reactivity)으로서 이해되어야 한다. 예를 들어 인간 PD-1을 인식하는 단일클론성 항체의 설치류(마우스 또는 랫트) PD-1으로의 교차-종 특이성은, 예를 들어 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [102] 본 개시내용의, "개체", "대상"은 질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하며, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 랫트, 마우스, 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [103] 본 개시내용의, "치료"는 본 개시내용에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 치료에는 예방도 포함된다. 치료가 필요한 것은 이미 특정한 의학적 장애를 갖고 있는 개체 뿐만 아니라, 결국 장애를 얻게 될 개체를 포함한다.
- [104] 본 개시내용의 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [105]
- [106] 이하에서는 본 개시내용을 실시하기 위한 내용을 구체적 실시예를 첨부한 도면을 참조하여 자세히 설명한다. 종래기술과 다르지 않은 부분으로서 본 개시내용의 기술적 사상을 이해하는데 필요하지 않은 사항은 설명에서 제외한다.
- [107]
- [108] **예시적인 항 PD-1 항체 및 PD-1 결합제 등**
- [109] 본 개시내용은 일 측면에서, PD-1 단백질에 결합하는 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 개시하며, 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [110] 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하고;
- [111] 경쇄 가변 영역은 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는

LCDR 변이체(들)을 포함한다.

- [112] 일부 구현예에서, 상기 기재된 "3개 이하의 아미노산 돌연변이(들)"는 3, 2, 1, 또는 0개의 아미노산 돌연변이(들)를 의미한다.
- [113] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 PD-1과 마우스 PD-1에 동등한 수준의 결합력을 가지는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [114] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 KD 값 10^{-7} M 이하로 PD-1에 결합하고; 일부 구현예에서, KD 값 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 또는 10^{-11} M 이하로 PD-1에 결합한다.
- [115] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 낮은 pH 환경에서도 KD 값 10^{-9} M 이하, 바람직하게는 KD 값 10^{-10} M 이하, 더욱 바람직하게는 KD 값 10^{-11} M 이하로 PD-1에 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 pH 6.0에서 9×10^{-10} M 이하의 KD로 PD-1에 결합한다.
- [116] 본 개시내용은 일 측면에서, PD-1 단백질에 결합하는 항 PD-1 항체 및 이의 항원-결합 단편을 개시하며, 항체는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [117] 중쇄 가변 영역은 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함하고;
- [118] 경쇄 가변 영역은 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 변이체를 포함한다.
- [119] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하는, 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [120] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함하는, 단리된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [121] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산

돌연변이(들)를 갖는 변이체를 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.

- [122] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이(들)을 갖는 변이체를 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [123] 본 개시내용에서 "단리된" 은 천연 환경의 성분으로부터 분리된 것을 말한다.
- [124] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [125] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [126] 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 통상적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 다양한 치환, 결실 및 다른 변형에 할당된 유사성 척도를 사용하여 유사한 서열을 매칭한다. 예를 들면, GCG 소프트웨어는 상이한 종의 유기체 기원의 동족의 폴리펩티드와 같은 밀접하게 관련된 폴리펩티드들 간의 또는 야생형 단백질 및 이의 뮤테인(mutagen) 간의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하기 위한 디폴트 파라미터(default parameter)와 함께 사용될 수 있는 GAP 및 BESTFIT과 같은 프로그램을 함유한다. 예를 들면, GCG 버전 6.1을 참조한다. 폴리펩티드 서열을 또한 디폴트 또는 권장된 파라미터를 갖는 FASTA를 사용하여 비교할 수 있으며, GCG 버전 6.1. FASTA(예: FASTA2 및 FASTA3)의 프로그램은 쿼리(query) 및 검색 서열 간의 최적의 중첩 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다. 본 개시내용의 서열을 상이한 유기체 기원의 다수의 서열들을 함유하는 데이터베이스와 비교하는 경우 또 다른 바람직한 알고리즘은 디폴트 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들면, 각각이 본원에 참고로 포함된 문헌(참조: Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 and (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)을 참조한다.
- [127] 동일하지 않은 잔기 위치들은 예를 들어 보존적 아미노산 치환에 의해 상이할 수 있다.
- [128] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.

- [129] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열에 대하여 1 내지 10개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다.
- [130] "보존적 아미노산 치환"이란 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R 그룹)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우에, 유사율 또는 유사도는 치환의 보존적 성질에 대해 보정되도록 상향으로 조정될 수 있다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 참조로 포함되어 있는, 문헌(참조: Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331)을 참조한다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파테이트 및 글루타메이트, 및 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 포함한다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 대체는 본원에 참조로 포함된 문헌(참조: Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45)에 개시된 PAM250 로그-가능성 매트릭스(log-likelihood matrix)에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "중간정도 (moderately) 보존적" 대체는 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 비-음의(nonnegative) 값을 갖는 임의의 변화이다.
- [131] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 HCDR 변이체(들)을 포함하며, 프레임워크 영역(framework region) 및 불변영역(constant region)을 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [132] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 보존적 아미노산 치환 또는 3개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는 LCDR 변이체(들)을 포함하며, 프레임워크 영역 및 불변영역을 포함하는, PD-1에 결합하는 단리된 면역글로불린 경쇄

폴리펩티드를 제공한다.

- [133] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이(들)를 갖는 변이체를 포함하는, 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [134] 본 개시내용은 일 측면에서 서열번호 15, 55, 57 또는 59로 표시된 바와 같은 서열을 포함하거나, 이들 서열과 비교하여 1 내지 10개 이하의 아미노산 돌연변이(들)를 갖는 변이체를 포함하는, 단리된 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [135] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [136] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 아미노산 서열을 갖는, 단리된 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [137] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열에 대하여 하나 내지 열개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [138] 본 개시내용은 일 측면에서, 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열에 대하여 하나 내지 열개의 아미노산의 추가, 결실, 보존적 아미노산 치환 또는 이것들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, PD-1에 결합하는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 제공한다.
- [139] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 재조합 항체, 바람직하게는 무린(murine) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 또는 인간화(humanized) 항체일 수 있다.
- [140] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 키메릭 또는 인간화 항 PD-1 항체의 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래되고, 경쇄 불변 영역은 인간 카파, 람다 사슬 또는 이의 돌연변이체 서열(들)로부터 유래될 수 있다.
- [141] 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 키메라 항체이고, 항체의 불변 영역(constant region)은 인간 항체의 불변영역 또는 그의 돌연변이체로부터 유래된다.
- [142] 본 개시내용의 항 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체이고, 항체의 경쇄 프레임워크 영역(FR; framework region) 및 중쇄 프레임워크 영역은 각각 인간 생식선(germline) 경쇄 및 중쇄 또는 이의

돌연변이체 서열(들)로부터 유래된다.

- [143] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 항체 접합체, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 가변영역 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변영역 폴리펩티드를 포함하는, PD-1 단백질 결합제(binding agent)를 제공한다.
- [144] 상기 PD-1 단백질 결합제는 예를 들어, 항체, 항체 접합체, 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있으며, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [145] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 PD-1에의 결합을 위해 상기 기재된 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드와 경쟁하거나 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 동일한 PD-1 에피토프에 결합하는 단리된 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [146]
- [147] **항원 결합 단편**
- [148] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 PD-1 단백질 결합제는 낙타화 단일 도메인 항체, 디아바디, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, scFV 이합체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, ds 디아바디, 나노바디, 미니바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, dAb 및 단쇄 결합 폴리펩티드로부터 선택된 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있으며, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [149] 달리 구체적으로 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "항체"는 2개의 면역글로불린 중쇄 및 2개의 면역글로불린 경쇄를 포함하는 항체 분자(즉, "완전 항체 분자")뿐만 아니라 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 본원에 사용된 용어 항체의 "항원-결합 부위", 항체의 "항원-결합 단편" 등은 항원과 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 천연 발생, 효소적으로 수득가능한, 합성의 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 본원에 사용된 용어 항체의 "항원-결합 단편" 또는 "항체 단편"은 PD-1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 나타낸다. 항체 단편은 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, dAb 단편, CDR을 함유하는 단편, 또는 단리된 CDR을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 용어 "항원-결합 단편"은 다중-특이적 항원-결합 분자의 폴리펩티드 단편을 나타낸다. 항체의 항원-결합 단편은, 예를 들면, 항체 가변 및 (임의로) 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 단백질분해 소화 또는 제조합 유전적 조작 기술과 같은 임의의 적합한 표준 기술을 사용하여 완전 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나 예를 들면, 상업적 공급원, DNA 라이브러리(예를 들면, 파지-항체 라이브러리를 포함)로부터 용이하게 이용가능하거나 합성될 수 있다. DNA는,

예를 들면, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 입체배치로 배열하거나 코돈을 도입하거나, 시스테인 잔기를 생성하거나, 아미노산을 변형, 첨가 또는 결실시키는 등을 위해 서열분석되고 화학적으로 또는 분자 생물학 기술을 사용함으로써 조작될 수 있다.

- [150] 항원-결합 단편의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fd, dAb, 및 항체의 초가변(hypervariable) 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위(예: 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들면, CDR3 펩타이드) 또는 속박된 FR3-CDR3-FR4 펩타이드를 포함한다. 다른 조작된 분자, 예를 들면, 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 결실된 항체, 키메라 항체, CDR-그래프팅된 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetradobody), 미니바디(minibody), 나노바디(nanobody)(예: 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈 면역 약제(small modular immunopharmaceuticals: SMIPs), 및 샤크 가변(shark variable) IgNAR 도메인도 또한 본원에 사용된 표현 "항원-결합 단편" 내에 포함된다.
- [151] 항체의 항원-결합 단편은 통상적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있으며 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 하나 이상의 프레임워크 서열과 프레임(frame) 내에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. VL 도메인과 결합된 VH 도메인을 갖는 항원-결합 단편에서, VH 및 VL 도메인은 서로에 대해 임의의 적합한 배열로 위치될 수 있다. 예를 들면, 가변 영역은 이량체일 수 있고, VH-VH, VH-VL 또는 VL-VL 이량체를 함유한다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체 VH 또는 VL 도메인을 함유할 수 있다.
- [152] 특정 양태에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적이고, 예시적인 입체배치는 (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; 및 (xiv) VL-CL을 포함한다. 상기 열거된 예시적인 입체배치 중 어느 것을 포함하는, 가변 및 불변 도메인의 임의의 입체배치에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접적으로 연결될 수 있거나 완전 또는 부분적 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩티드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 간의 가요성 또는 반-가요성 연결을 초래하는 적어도 2개(예: 5, 10, 15, 20, 40, 60개 이상)의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 더욱이, 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체 VH 또는 VL 도메인과 비-공유 결합 또는 공유 결합으로(예를 들면, 이황화 결합(들)에 의해) 상기 열거된 가변 및 불변 도메인 입체배치 중 어느 것의 호모-다имер 또는

헤테로-다이머(또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다. 완전 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일특이적 또는 다중-특이적(예: 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중-특이적 항원-결합 단편은 통상적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별개의 항원에 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 개시된 예시적인 이중특이적 항체 포맷을 포함하는, 임의의 다중-특이적 항체 포맷은 당해 분야에서 사용 가능한 일상적인 기술을 사용하여 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에서의 사용에 맞춰질 수 있다.

[153]

[154] 예시적인 항 PD-1 항체 및 결합제 등을 암호화하는 핵산

[155] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[156] 본 개시내용은 다른 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[157] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 또는 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[158]

[159] 예시적인 항 PD-1 항체 및 결합제 등의 제조

[160] 본 개시내용의 일 측면에서, PD-1 녹아웃 마우스를 PD-1 항원으로 면역화시킨 후, 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, myeloma 세포와 융합하여 얻은 하이브리도마 세포 중에서 인간 PD-1 항원과 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하는 것을 포함하는 항체의 생산 방법을 제공한다.

[161] 또한, 본 개시내용의 일 측면에서, 상기 항체 생산 방법에 의해 제조된 하이브리도마를 제공한다.

[162] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[163] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역

폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공한다.

- [164] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 본 개시내용에 따른 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 또는 (2) 본 개시내용에 따른 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 1 벡터, 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 2 벡터를 포함한다(예를 들면, 이들 벡터로 형질전환되었다).
- [165] 한 실시양태에서, 상기에서 제공된 바와 같은, PD-1에 결합하는 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건하에서 배양하고, 선택적으로 항체를 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 것을 포함하는, 항-PD1 항체의 제조 방법이 제공된다.
- [166] 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포로는 원핵 또는 진핵 세포가 포함된다. 예를 들면, 항체는, 특히 글리코실화 및 Fc 작동인자 기능이 필요하지 않은 경우, 세균에서 생성될 수 있다. 세균에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들면, US 5,648,237 호, US 5,789,199 호 및 US 5,840,523 호를 참조할 수 있다. 또한 이. 콜라이에서 항체 단편의 발현을 기술하고 있는 문헌 [Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo B.K.C.(ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254]을 참조할 수 있다. 항체는 발현 후에 가용성 분획중 세균 세포 페이스트로부터 단리될 수 있으며 더 정제될 수 있다. 원핵세포 이외에, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생성을 야기하는 진균 및 효모 균주를 포함하여, 사상균 또는 효모와 같은 진핵 미생물도 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다(문헌 [Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; and Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215] 참조).
- [167] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 특히 스포도프테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 많은 바칼로바이러스 균주가 동정되었다. 식물 세포 배양물도 또한 숙주로 사용될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 호(유전자이식 식물에서 항체를 생성하기 위한 플랜티바디즈 (PLANTIBODIES)TM 기술을 설명하고 있음) 참조).
- [168] 척추동물 세포도 또한 숙주로 사용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하기에 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7);

인간 태아 신장 세포주(예를 들면, 문헌 [Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74]에 기술된 바와 같은 293 또는 293 세포); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포(예를 들면, 문헌 [Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 초록 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 버팔로 래트 간세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간세포(Hep G2); 마우스 유방종양 세포(MMT 060562); 예를 들면, 문헌 [Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68]에 기술된 바와 같은 TRI 세포; MRC5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주로는 DHFR - CHO 세포[Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220]를 포함한 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예를 들면, Y0, NS0 및 Sp2/0가 포함된다. 항체 생성에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들면, 문헌 [Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C.(ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268]을 참조할 수 있다.

- [169] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 유전자를 도입 동물을 제공한다. 상기 동물은 예를 들어, 마우스, 랫트 등과 같은 설치류일 수 있다.
- [170] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 상기 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 발현시키는 방법을 제공한다.
- [171] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드와 시험 대상 물질을 반응시키는 단계 및 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 PD-1 유사 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [172] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질

결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드와 시험 대상 물질을 반응시키는 단계 및 결합 여부를 측정하는 단계를 포함하는 PD-1 유사 물질을 스크리닝하는 방법에 의하여 스크리닝된 PD-1 유사 물질을 제공한다.

[173]

[174] 다중특이적 항원 결합 분자, 면역접합체

[175] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 또는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 제공한다.

[176] 항체의 다중 특이적(예를 들어 이중 특이적) 항원-결합 분자는 통상적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별개의 항원에 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 이중특이적 항체 포맷을 포함하는, 임의의 다중-특이적 항체 포맷은 당해 분야에서 사용 가능한 일상적인 기술을 사용하여 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에서의 사용에 맞춰질 수 있다.

[177] 한 측면에서, 본 개시내용은 다중-특이적 항원-결합 분자 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 면역글로불린의 하나의 특이성은 PD-1의 세포외 도메인 또는 이의 단편에 특이적이고, 면역글로불린의 다른 특이성은 PD-1의 세포외 도메인 이외의 도메인의 결합, 또는 제2 치료 표적에 특이적이거나 치료적 모이어티에 접합된다. 면역글로불린의 다른 특이성은 제2 표적 항원에 특이적일 수 있다. 상기 제2 표적 항원은 PD-1과 동일한 세포 또는 상이한 세포 상에 존재할 수 있다. 한 양태에서, 제2 표적 세포는 B-세포, 항원-전달 세포, 단핵구, 대식세포 또는 수지상 세포와 같은 T-세포 이외의 면역 세포 상에 있다. 일부 양태에서, 제2 표적 항원은 종양 세포 또는 자가면역 조직 세포 또는 바이러스 감염된 세포 상에 존재할 수 있다.

[178] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 PD-1에 결합하는 제1 항원-결합 특이성, 및 T-세포 수용체, B-세포 수용체 또는 Fc 수용체에 결합하는 제2 항원-결합 특이성을 포함하는 다중-특이적 항원-결합 분자 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 관련된 측면에서, 본 개시내용은 PD-1에 결합하는 제1 항원-결합 특이성, 및 LAG-3, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, TIM3, LAIR1, ICOS 및 CD160과 같은 상이한 T-세포 공-억제제에 결합하는 제2 항원-결합 특이성을 포함하는 다중-특이적 항원-결합 분자 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[179] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 PD-1에 결합하는 제1 항원-결합 특이성, 및

자가면역 조직-특이적 항원에 결합하는 제2 항원-결합 특이성을 포함하는 다중-특이적 항원-결합 분자 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 양태에서, 상기 항체는 활성화 또는 작용제 항체일 수 있다.

- [180] 본 개시내용의 다중-특이적 항원-결합 분자 중 어느 것, 또는 이의 변이체는 당업자에게 공지된 바와 같은 표준 분자 생물학적 기술(예: 재조합 DNA 및 단백질 발현 기술)을 사용하여 작제될 수 있다.
- [181] 일부 양태에서, PD-1-특이적 항체는 PD-1의 상이한 도메인에 결합하는 가변 영역이 함께 연결되어 단일 결합 분자 내에서 이중-도메인 특이성을 제공하는 이중특이적 포맷("이중특이적")으로 생성된다. 적절하게 디자인된 이중특이적 항체는 특이성 및 결합 활성(binding avidity) 둘 모두를 증가시킴으로써 전반적인 PD-1 억제 효능을 증진시킬 수 있다. 하나의 도메인 내의 상이한 영역들에 결합할 수 있거나 개개의 도메인들(예: N-말단 도메인의 분절들)에 대한 특이성을 갖는 가변 영역들은 각각의 영역을 별개의 에피토프들에 또는 하나의 도메인 내의 상이한 영역들에 동시에 결합시키는 구조적 프레임워크에서 쌍을 이룬다.
- [182] 이중특이적 항체에 대한 하나의 예로, 중쇄 가변 영역(VH)에 대한 최초의 특이성을 파괴하지 않으면서 최초의 VH와 쌍을 이룰 수 있는 비-동족(non-cognate) VL 파트너를 식별하도록 하나의 도메인에 대한 특이성을 갖는 결합체로부터의 VH는 제2 도메인에 대한 특이성을 갖는 일련의 결합체로부터의 경쇄 가변 영역(VL)과 재조합된다. 이러한 방식으로, 단일 VL 분절(예: VL1)은 2개의 상이한 VH 도메인(예: VH1 및 VH2)과 조합하여 2개의 결합 "아암(arm)"(VH1-VL1 및 VH2-VL1)으로 구성된 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. 단일 VL 분절의 사용은 상기 시스템의 복잡성을 감소시키므로 이중특이적 항체를 생성하는데 사용되는 클로닝, 발현 및 정제 공정에서 효율을 증가시킨다(예를 들면, US13/022759 및 US2010/0331527 참조).
- [183] 대안적으로, 1개 이상의 도메인 및 제2 표적과 결합하는 항체, 예를 들면, 비제한적으로, 제2 상이한 항-PD-1 항체는 본원에 기재된 기술 또는 당업자에게 공지된 다른 기술을 사용하여 이중특이적 포맷으로 제조될 수 있다. 상이한 영역에 결합하는 항체 가변 영역을, 예를 들면, PD-1의 세포외 도메인 상의 관련 부위에 결합하는 가변 영역과 함께 연결하여 단일 결합 분자 내에 이중-항원 특이성을 제공할 수 있다. 이러한 특성의 적절하게 디자인된 이중특이적 항체는 이중 기능을 한다. 세포외 도메인에 대한 특이성을 갖는 가변 영역은 세포외 도메인 이외의 도메인에 대한 특이성을 갖는 가변 영역과 조합되고 각각의 가변 영역을 별개의 항원에 결합시키는 구조적 프레임워크에서 쌍을 이룬다.
- [184] 본 개시내용의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 이중특이적 항체 포맷은 제1 면역글로불린(Ig) CH3 도메인 및 제2-Ig CH3 도메인의 사용을 수반하며, 여기서 상기 제1 및 제2 Ig CH3 도메인은 서로 적어도 하나의 아미노산에 의해 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중특이적

- 항체와 비교하여 단백질 A에 대한 이중특이적 항체의 결합을 감소시킨다.
- [185] 한 양태에서, 상기 제1 Ig CH3 도메인은 단백질 A와 결합하고, 상기 제2 Ig CH3 도메인은 H95R 변형(IMG T 엑손 넘버링(numbering)에 의해; EU 넘버링에 의해서는 H435R)과 같이 단백질 A 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이를 함유한다. 상기 제2 CH3은 Y96F 변형(IMG T에 의해; EU 넘버링에 의해서는 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 제2 CH3 내에서 발견될 수 있는 추가의 변형은 IgG1 항체의 경우에 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMG T에 의해; EU 넘버링에 의해서는 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 항체의 경우에 N44S, K52N 및 V82I(IMG T; EU 넘버링에 의해서는 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 항체의 경우에 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMG T에 의해; EU 넘버링에 의해서는 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)를 포함한다. 상기 기재된 이중특이적 항체 포맷에 대한 변형도 본 개시내용의 범위 내에서 고려된다.
- [186] 본 개시내용의 맥락에서 사용될 수 있는 다른 예시적인 이중특이적 포맷은, 예를 들면, scFv-기반 또는 디아바디 이중특이적 포맷, IgG-scFv 융합물, 이중가변 도메인(DVD)-Ig, 쿼드로마(Quadroma), 낚스-인투-홀즈(knobs into-holes), 통상적인 경쇄(예: 낚스-인투-홀즈를 갖는 통상적인 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, 류신 지퍼(zipper), 듀오바디(Duobody), IgG1/IgG2, 이중작용 Fab (DAF)-IgG, 및 Mab 2 이중특이적 포맷(상기 포맷의 검토를 위해, 예를 들면, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, 및 본원에 인용된 참조문헌을 참조한다)을 제한 없이 포함한다. 이중특이적 항체는 또한 펩타이드/핵산 접합을 사용하여 작제될 수 있으며, 예를 들면, 여기서 직교 화학적 반응성(orthogonal chemical reactivity)을 갖는 비천연 아미노산은 부위-특이적 항체-올리고뉴클레오티드 접합체를 생성하고 이어서 정의된 조성, 원자가(valency) 및 기하학을 갖는 다량체 복합체로 자가조립하는데 사용된다(참조: 예를 들면, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).
- [187] 본 개시내용은 암을 치료하는 화학요법제 또는 세포독소와 같은 치료적 모이어티에 접합된 사람 항-PD-1 모노클로날 항체("면역접합체")를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체"는 세포독소, 방사능제, 사이토카인, 인터페론, 표적 또는 리포터 모이어티, 효소, 독소, 펩타이드 또는 단백질 또는 치료제에 화학적으로 또는 생물학적으로 연결된 항체를 나타낸다. 상기 항체는 이의 표적과 결합할 수 있는 한 분자를 따라 어느 위치에서든 세포독소, 방사능제, 사이토카인, 인터페론, 표적 또는 리포터 모이어티, 효소, 독소, 펩타이드 또는 치료제에 연결될 수 있다. 면역접합체의 예는 항체 약물 접합체 및 항체-독소 융합 단백질을 포함한다.
- [188] 항-PD-1 항체에 접합될 수 있는 치료적 모이어티의 유형은 치료될 병태 및 달성될 목적하는 치료 효과를 고려할 것이다. 면역접합체를 형성하기에 적합한 물질의 예는 당해 분야에 공지되어 있으며; 예를 들면, WO 05/103081을

참조한다.

[189]

[190] 치료적 투여 및 제형

[191] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 및 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[192] 상기 약학적 조성물은 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물일 수 있다.

[193] 본 개시내용은 일 측면에서, 상기 약학적 조성물에 제2 치료제를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[194] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환을 예방, 개선 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

[195] 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스는, 특히, PD-1 발현, 시그널링 또는 활성과 관련되거나 이에 의해 매개되거나, 또는 PD-1과 PD1 리간드(예: PD-L1 또는 PD-L2) 간의 상호작용을 차단하거나 그 밖에 PD-1 활성 및/또는 시그널링을 억제함으로써 치료가능한 임의의 질환 또는 장애, 병태의 치료, 예방 및/또는 개선에 유용하다.

[196] 상기 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 PD-1과 연관된 상태를 예방, 치료 또는 개선하기 위한 것일 수 있다.

[197] 상기 PD-1과 연관된 상태는 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계질환, 신경퇴행성 질환 또는 감염성 질환일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

- [198] 상기 PD-1과 연관된 상태는 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포 암, 신장암, 간암, 골암, 피부암, 결장암, 직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 균상 식육종, 메르켈 세포 암, 및 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구-풍부 B-세포 림프종, 엡스타인-바르 바이러스(EBV)-양성 및 -음성 이식후 림프종식성 질환 (PTLD), 또는 EBV-연관 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 형질모세포 림프종, 외부 NK/T-세포 림프종, 비인두 암종, 또는 인간 헤르페스 바이러스 8 (HHV8)-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종을 포함하는 다른 혈액암, 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종을 포함하는 중추 신경계의 신생물일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.
- [199] 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 암의 초기 단계 또는 후기-단계 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 한 양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 단편은 전이암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 고체 종양 및 혈액암(blood cancer) 둘 모두의 종양 성장을 감소시키거나 억제하거나 수축시키는데 유용하다. 특정 양태에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물의 처리는 피험자에서 종양의 50% 이상의 감소, 60% 이상의 감소, 70% 이상의 감소, 80% 이상의 감소, 90% 이상의 감소를 야기한다. 특정 양태에서, 상기 약학적 조성물은 종양의 재발을 예방하는데 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 상기 약학적 조성물은 암을 갖는 피험자에서 전체 생존을 연장하는데 유용하다. 일부 양태에서, 상기 약학적 조성물은 암을 앓고 있는 환자에서 장기간 생존을 유지하면서 화학요법 또는 방사선요법으로 인한 독성을 감소시키는데 유용하다.
- [200] 상기 PD-1과 연관된 상태인 자가면역 질환은, 예를 들어 루푸스, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군(Sjogren's Syndrome), 관절염, 류머티스성 관절염, 천식, COPD, 골반내 염증성 질환, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease), 염증성 장질환, 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 페이로니병(Peyronie's Disease), 셀리악병(coeliac disease), 담낭질환, 모소병(Pilonidal disease), 복막염, 건선, 건선성 관절염, 혈관염, 수술 후 유착(surgical adhesions), 뇌졸중, 제1형 당뇨병, 라임병(Lyme disease), 수막뇌염, 자가면역성 포도막염, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barr syndrome), 아토피성 피부염, 자가면역성 간염, 섬유화성 폐포염, 그레이브스병(Grave's disease), IgA 신장병, 특발성 혈소판감소성 자반병, 메니에르병(Meniere's disease), 천포창, 원발성 담즙성 간경변, 사르코이도시스, 경피증, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 다른 자가면역질환, 췌장염, 트라우마(수술), 이식편대숙주질환, 이식거부반응, 심근경색 및 아테롬성 동맥경화증과 같은 허혈성 질환을 포함한 심장병, 혈관내 응고, 골흡수, 골다공증, 골관절염, 치주염 및 저염산증, 태아-모체간 관용의 결여와 관련된 불임증(infertility related to lack of fetal-maternal tolerance), 백반증, 중증근무력증

또는 전신성 경화증일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

- [201] IFN γ -의존적 전신성 면역반응(systemic immune response)이 알츠하이머병 및 신경염증성 요소(neuroinflammatory component)들을 공유하는 다른 중추신경계 병리들의 치료에 유익하다는 것이 제안되었고, 국제 공개특허 WO2015/136541에서 항 PD-1 항체를 사용한 알츠하이머병 치료 용도가 개시되었다. 국제 공개특허 WO2017/220990에는 PD-1/PD-L1 억제성 면역 체크포인트 경로의 차단은 IFN γ -생산 세포에 의한 IFN γ 의 분비를 높이며, 증가된 IFN γ 활성은 뇌의 맥락막망(choroid plexus)이 선택적인 백혈구 수송, T-세포 및 단핵구의 손상된 중추신경계로의 침투, 면역세포의 신경퇴행성 병리 및 신경염증 부위로의 귀소(homing)를 허용하도록 하고, 환경을 덜 유해하게 하고 독성 물질의 제거, 신경세포의 구제, 재생 및 수리를 더 잘 하도록 한다는 것이 기재되었다.
- [202] PD-1은 중추신경계에서 인지 기능(cognitive function), 학습, 기억 뿐만 아니라, 뇌종양, 알츠하이머병, 뇌졸중(stroke), 척수 손상(spinal cord injury), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 통증(pain)과 같은 중추 신경계 장애와 관련이 있는 것으로 공지되었다(Zunli Zao 등, "Emerging role of PD-1 in the central nervous system and brain diseases", *Neurosci. Bull.* 2021.04.20, online published). 또한, PD-1은 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성경화증, 근위축성 측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 등 신경퇴행성 질환에서 감퇴(degeneration)되는 것으로 알려진 망막절세포(retinal ganglion cell)와 연관이 있다는 것이 보고되었다(Ling Chen 등, Role of the Immune Modulator Programmed Cell Death-1 during Development and Apoptosis of Mouse Retinal Ganglion Cells, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, Vol. 50, No. 10, 4941-4948). 항 PD-1 항체는 알츠하이머병 모델 마우스 5XFAD 및 치매 모델 마우스에서 인지장애 및 병리학적 특징들을 개선하여 신경퇴행성 질환에 사용될 수 있다는 것이 공지되었으며(Michal Schwartz 등, "Potential immunotherapy for Alzheimer disease and age-related dementia", *Dialogues in clinical neuroscience*, 21(1), 21, 2019), 항 PD-1 항체 니볼루맵은 학습 및 기억을 향상시킨 것으로 보고되었다(Ru-Rong Ji 등, "Anti-PD-1 treatment as a neurotherapy to enhance neuronal excitability, synaptic plasticity and memory," *BioRxiv*, 2019. 12. 10. <https://doi.org/10.1101.870600>).
- [203] 본 개시내용의 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 PD-1과 연관된 상태인 신경계 질환 및 신경퇴행성 질환, 예를 들어 인지 장애, 뇌종양, 알츠하이머병, 치매, 뇌졸중(stroke), 척수 손상(spinal cord injury), 근위축성 측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 파킨슨병, 헌팅톤병, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 통증(pain), 기억 감퇴의 예방, 개선, 치료에 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.
- [204] 본 개시내용의 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 만성

바이러스 감염을 앓고 있는 피험자를 치료하는데 유용하다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 숙주에서 바이러스 역가(viral titer)를 감소시키고/시키거나 고갈된 T-세포를 되찾는 데 유용하다.

- [205] 상기 PD-1과 연관된 상태의 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염의 바이러스 감염, 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, HIV, 시토메갈로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 유형 1, 단순 헤르페스 바이러스 유형 2, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스 전염과 연관된 카포시 웨스트 육종, 얇은 고리 바이러스 (토르케테노바이러스), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)JC 바이러스 또는 BK 바이러스 감염을 포함하는 만성 바이러스 감염일 수 있다.
- [206] 일 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물은 사이노몰구스와 같은 원숭이 피험자에서 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)에 의한 감염을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [207] 일 양태에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 상태를 완화하거나 예방하거나 이의 중증도를 감소시키도록 투여될 수 있다. 암, 자가면역 질환 및 만성 바이러스 감염과 같은 질환 또는 장애의 발병 위험에 있는 환자에서 본 개시내용에 따른 약학적 조성물을 예방적으로 사용하는 것이 본원에 또한 고려된다.
- [208] 본 개시내용의 또 다른 양태에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 암, 자가면역 질환 또는 바이러스 감염의 치료에 유용한 당업자에게 공지된 임의의 다른 제제 또는 임의의 다른 요법과 함께 보조 요법으로 사용될 수 있다.
- [209] 본 개시내용에 따르는 약학적 조성물은 적합한 담체, 부형제, 및 향상된 운반, 전달, 내성 등을 제공하도록 제형 내에 포함되는 다른 제제와 함께 투여될 수 있다. 다수의 적절한 제형은 모든 약제 화학자(pharmaceutical chemist)에게 공지된 처방집(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA)에서 확인될 수 있다. 이들 제형은, 예를 들면, 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 액체, 액체(양이온 또는 음이온) 함유 소포(vesicle)(예: 리포펙틴(LIPOFECTIN™)), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀전, 에멀전 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다(참조: Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311).
- [210] 항체의 용량은 투여될 피험자의 연령 및 사이즈, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 가변적일 수 있다. 본 개시내용의 항체가 성인 환자에서 질환 또는 장애의 치료에 또는 이러한 질환의 예방에 사용되는 경우, 본 개시내용의 항체를 통상적으로 체중 1kg당 약 0.1 내지 약 60mg, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 60mg, 약 10 내지 약 50mg, 또는 약 20 내지 약 50mg의 단일 용량으로 투여하는 것이 유리하다. 병태의 중증도에 따라, 치료 빈도 및 치료 지속시간을 조절할 수 있다.

특정 양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 적어도 약 0.1mg 내지 약 800mg, 약 1 내지 약 500mg, 약 5 내지 약 300mg, 또는 약 10 내지 약 200mg, 내지 약 100mg까지, 또는 내지 약 50mg까지의 초기 용량으로 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 상기 초기 용량은 초기 용량과 대략 동일하거나 이보다 적을 수 있는 양의 제2 또는 다수의 차후 용량의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여로 이어질 수 있으며, 여기서 상기 차후 용량은 적어도 1일 내지 3일; 적어도 1주, 적어도 2주; 적어도 3주; 적어도 4 주; 적어도 5주; 적어도 6주; 적어도 7주; 적어도 8주; 적어도 9주; 적어도 10주; 적어도 12주; 또는 적어도 14 주만큼 떨어진다.

- [211] 본 개시내용의 약학적 조성물은 다양한 전달 시스템, 예를 들면, 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 마이크로캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현시킬 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 엔도시토시스(endocytosis)로 투여될 수 있다(참조: 예를 들면, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). 도입 방법은 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. 상기 조성물은 임의의 통상적인 경로에 의해, 예를 들면, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막 피부 내층(lining)(예: 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여될 수 있다.
- [212] 본 개시내용의 약학적 조성물은 또한 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다(참조: 예를 들면, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533). 본 개시내용의 항체를 전달하는 나노입자의 사용 또한 고려될 수 있다. 항체-접합된 나노입자는 치료 및 진단 용도 둘 모두를 위해 사용될 수 있다. 항체-접합된 나노입자 및 제조 방법 및 용도는 본원에 참조로 포함된 문헌(참조: Arruebo, M., et al. 2009, "Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389)에 상세히 기재되어 있다. 나노입자를 개발하고, 약학적 조성물에 함유된 항체에 접합시켜 종양 세포 또는 자가면역 조직 세포 또는 바이러스 감염된 세포를 표적화할 수 있다. 약물 전달을 위한 나노입자는 또한, 예를 들면, 각각 전문이 본원에 포함된, US 8257740 또는 US 8246995에 기재되어 있다.
- [213] 특정 상황에서, 본 개시내용의 약학적 조성물은 제어된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 제어된 방출 시스템은 조성물의 표적 인근에 배치되어 전신 용량의 일부만을 필요로 하게 할 수 있다. 주사가 가능한 제제는 정맥내, 피하, 피내, 두개내, 복강내 및 근육내 주사, 점적 주입(drip infusion) 등을 위한 투여형을 포함할 수 있다. 이들 주사가 가능한 제제는 공식적으로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 주사가 가능한 제제는, 예를 들면, 상기 기재된 항체 또는 이의 염을 멸균 수성 배지 또는 주사를 위해 통상적으로 사용되는 유성 배지 중에 용해시키거나 현탁시키거나 유화시킴으로써 제조될

수 있다. 주사용 수성 배지로서, 적절한 가용화제, 예를 들면, 알코올(예: 에탄올), 다가알코올(예: 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 계면활성제[예: 폴리소르베이트 80, 수소화된 피마자유의 HCO-50(폴리옥시에틸렌(50mol) 첨가물)] 등과 함께 사용될 수 있는, 예를 들면, 생리식염수, 글루코스를 함유하는 등장성 용액 및 다른 보조제 등이 있다. 유성 배지로서, 가용화제, 예를 들면, 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 함께 사용될 수 있는, 예를 들면, 참깨유, 대두유 등이 이용될 수 있다. 이에 따라 제조된 주사액은 바람직하게는 적절한 앰플에 채워진다.

- [214] 본 개시내용의 약학적 조성물은 표준 니들(standard needle) 및 시린지에 의해 피하로 또는 정맥내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달에 대해, 펜 전달 장치(pen delivery device)가 본 개시내용의 약학적 조성물을 전달하는 데 손쉽게 사용된다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약학적 조성물을 함유하는 교체가능한 카트리지를 이용한다. 카트리지 내의 모든 약학적 조성물이 투여되고 카트리지가 비게 되면, 빈 카트리지는 손쉽게 폐기되고 약학적 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 교체될 수 있다. 펜 전달 장치는 이후 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서는, 교체가능한 카트리가 없다. 그 대신, 일회용 펜 전달 장치는 상기 장치 내의 저장소에 수용된 약학적 조성물로 미리 충전된다. 상기 저장소에 약학적 조성물이 고갈되면, 전체 장치를 폐기한다. 다수의 재사용가능한 펜 및 자기주사기(autoinjector) 전달 장치는 본 개시내용의 약학적 조성물의 피하 전달에 사용된다. 예를 들어, 오토펜(AUTOPEN™, Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), 디세트로닉(DISETRONIC™) 펜(Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), 휴말로그 믹스(HUMALOG MIX) 75/25™ 펜, 휴말로그(HUMALOG™) 펜, 휴말린(HUMALIN) 70/30™ 펜(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), 노보펜(NOVOPEN™) I, II 및 III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), 노보펜 주니어(NOVOPEN JUNIOR™, Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ 펜(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 옵티펜(OPTIPEN™), 옵티펜 프로(OPTIPEN PRO™), 옵티펜 스타렛(OPTIPEN STARLET™), 및 옵티클릭(OPTICLIK™, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany)을 포함하지만, 반드시 이들에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 약학적 조성물의 피하 전달에 사용되는 일회용 펜 전달 장치는 예를 들어 솔로스타(SOLOSTAR™) 펜(Sanofi-Aventis), 플렉스펜(FLEXPEN™, Novo Nordisk), 및 크윅펜(KWIKPEN™, Eli Lilly), 수레클릭(SURECLICK™) 자기주사기(Amgen, Thousand Oaks, CA), 펜렛(PENLET™, Haselmeier, Stuttgart, Germany), 에피펜(EPIPEN, Dey, L.P.) 및 휴미라(HUMIRA™) 펜(Abbott Labs, Abbott Park, IL)을 포함하지만, 반드시 이들에 제한되지 않는다.

- [215] 유리하게는, 상기 기재된 경구 또는 비경구 사용을 위한 약학적 조성물은 활성 성분의 용량을 맞추기에 적합한 단위 용량의 투여형으로 제조된다. 이러한 단위

용량의 투여형은, 예를 들면, 정제, 알약, 캡슐, 주사액(앰플), 좌제 등을 포함한다. 함유된 항체의 양은 일반적으로 단위 용량; 특히 주사 형태의 투여형당 약 5 내지 약 500mg이며, 항체가 약 5 내지 약 100mg 및 다른 투여형에 대해 약 10 내지 약 250mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

- [216] 본 개시내용은 또한 일 측면에서, 개체에 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 투여하는 것을 포함하는 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다.
- [217] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 종양, 암, 전이성 종양, 전이성 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성질환 또는 감염성 질환의 예방, 개선 또는 치료제를 제조하는데 사용하는 용도를 제공한다.
- [218] 본 개시내용은 또한 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 종양세포의 성장을 억제하기 위하여 치료학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 종양세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.
- [219]
- [220] **병용투여**
- [221] 본 개시내용의 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 제2 치료제를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [222] 다양한 양태에서, 제2 치료제로는 PD-L1에 대한 항체, PD-1에 대한 제2 항체(예: 니볼루맵), LAG-3 억제제, CTLA-4 억제제(예: 이플리무맵), TIM3 억제제, BTLA 억제제, TIGIT 억제제, CD47 억제제, 또 다른 T-세포 공-억제제 또는 리간드의 길항제(예: CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 또는 VISTA에 대한 항체), 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 억제제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제[예: "VEGF-Trap" 예를 들면, US 7,087,411에 기재된 아플리베르셉트 또는 다른 VEGF-억제 융합 단백질, 또는 항-VEGF 항체 또는

이의 항원-결합 단편(예: 베바시주맵 또는 라니비주맵) 또는 VEGF 수용체의 소분자 키나제 억제제(예: 수니티닙, 소라페닙 또는 파조파닙)], Ang2 억제제(예: 네스바쿠맵), 형질전환 성장 인자 베타(TGFβ) 억제제, 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제(예: 에를로티닙, 세툽시맵), 공-자극 수용체에 대한 작용제(예: 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질에 대한 작용제), 종양-특이적 항원에 대한 항체(예: CA9, CA125, 흑색종-관련된 항원3(MAGE3), 암배아 항원(CEA), 비멘틴, 종양-M2-PK, 전립선-특이적 항원(PSA), 뮤신-1, MART-1 및 CA19-9), 백신(예: 바실러스 칼메트-게랭(Bacillus Calmette-Guerin), 암 백신), 항원 전달을 증가시키는 애쥬번트(예: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자), 이중특이적 항체(예: CD3xCD20 이중특이적 항체, PSMAxCD3 이중특이적 항체), 세포독소, 화학요법제(예: 다카르바진, 테모졸로마이드, 사이클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 다우노루비신, 시스플라틴, 카보플라틴, 겐시타빈, 메토트렉세이트, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀 및 빈크리스틴), 사이클로포스파미드, 방사선요법, IL-6R 억제제(예: 사렐루맵), IL-4R 억제제(예: 두필루맵), IL-10 억제제, 사이토카인, 예를 들면, IL-2, IL-7, IL-21 및 IL-15, 항체-약물 접합체(ADC)(예: 항-CD19-DM4 ADC 및 항-DS6-DM4 ADC), 항염증 약물(예: 코르티코스테로이드 및 비-스테로이드 항염증 약물), 식이 보충제, 예를 들면, 항산화제 또는 암 치료를 위한 임의의 완화 치료(palliative care)와 함께 사용될 수 있다.

- [223] 특정 양태에서, 상기 제2 치료제는 항-종양 반응을 증가시키기 위한 수지상 세포 백신, 종양용해(oncolytic) 바이러스, 종양 세포 백신 등을 포함하는 암 백신일 수 있다. 암 백신의 예는 흑색종 및 방광암을 위한 MAGE3 백신, 유방암을 위한 MUC1 백신, 뇌암(다형성 교모세포종 포함)을 위한 EGFRv3(예: 린도페피무트), 또는 (CEA+ 암을 위한) ALVAC-CEA를 포함할 수 있다.

[224]

[225] 진단 및 검출을 위한 방법, 키트

- [226] 본 개시내용은 일 측면에서, 본 개시내용에 따른 임의의 PD-1 단백질 결합제, 항 PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 질병의 치료용, 진단용 또는 검출용 키트를 제공한다.

- [227] 본 개시내용의 항-PD-1 항체는, 예를 들면, 진단 목적을 위해 샘플에서 PD-1을 검출하고/하거나 측정하는데 사용될 수 있다. 일부 양태는 암, 자가면역 질환 또는 만성 바이러스 감염과 같은 질환 또는 장애를 검출하는 검정에서 본 개시내용의 하나 이상의 항체의 사용을 고려한다. PD-1에 대한 예시적인 진단 검정은, 예를 들면, 환자로 부터 수득된 샘플을 본 개시내용의 항-PD-1 항체와

접촉시킴을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 항-PD-1 항체는 검출가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지되거나 환자 샘플로부터 PD-1을 선택적으로 분리하는 포획 리간드로서 사용된다.

- [228] 대안적으로, 표지되지 않은 항-PD-1 항체는 그 자체로 검출가능하게 표지되는 2차 항체와 함께 진단 용도로 사용될 수 있다. 검출가능한 표지 또는 리포터 분자는 방사성동위원소, 예를 들면, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S 또는 ¹²⁵I; 플루오레세인 이소티오시아네이트 또는 로다민과 같은 형광성 또는 화학발광 모이어티; 또는 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 또는 루시페라제와 같은 효소일 수 있다.
- [229] 샘플에서 PD-1을 검출하거나 측정하는데 사용될 수 있는 구체적인 예시적인 어세이로 효소-결합 면역흡착어세이(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 방사면역측정법(RIA), 및 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting; FACS)를 포함한다.
- [230] 본 개시내용에 따르는 PD-1 진단 어세이에 사용될 수 있는 샘플은 환자로부터 수득가능한 임의의 조직 또는 유체 샘플을 포함하며, 이는 정상 또는 병적 상태 하에 검출가능한 양의 PD-1 단백질 또는 이의 단편을 함유한다. 일반적으로, 건강한 환자(예: 암 또는 자가면역 질환에 걸리지 않은 환자)로부터 수득된 특정 샘플에서의 PD-1 수준을 측정하여 PD-1의 기저선 또는 표준 수준을 초기에 확립한다. 이후, 이러한 PD-1의 기저선 수준을 암 관련된 병태, 또는 이러한 병태와 관련된 증상을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 샘플에서 측정된 PD-1의 수준과 비교할 수 있다.
- [231] PD-1에 특이적인 본 개시내용에 따른 폴리펩티드, PD-1 결합제, 항체 등은 추가의 표지 또는 모이어티를 함유하지 않을 수 있거나, N-말단 또는 C-말단 표지 또는 모이어티를 함유할 수 있다. 한 양태에서, 상기 표지 또는 모이어티는 비오틴이다. 결합 검정에서, 표지(존재하는 경우)의 위치는 펩티드가 결합되는 표면에 대한 펩티드의 배향을 결정할 수 있다. 예를 들면, 표면이 아비딘으로 코팅되는 경우, N-말단 비오틴을 함유하는 펩티드는 상기 펩티드의 C-말단 부분이 표면에서 먼 쪽에 위치되도록 배향될 것이다.
- [232] 본 개시내용의 일 측면은 환자에서 암 또는 자가면역 장애의 예후를 예측하기 위한 마커로서의 개시된 항체의 용도에 관한 것이다. 본 개시내용에 따른 폴리펩티드, PD-1 결합제, 항체등은 환자에서 암의 예후를 평가하고 생존을 예측하기 위한 진단 검정에 사용될 수 있다.
- [233]
- [234] 아래에서는 발명의 구체적인 구현예에 따른 항체의 생산 방법에 대해 보다 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이는 발명의 하나의 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니며, 발명의 권리범위 내에서 구현예에 대한 다양한 변형이 가능함은 당업자에게 자명하다.
- [235]

- [236] 실시예
- [237] 실시예 1. 면역원의 준비 및 세포주의 확립
- [238] 단백질 항원
- [239] 인간 PD-1의 cDNA가 포함된 pCMV3-C-FLAG 벡터(Sino)로부터 extracellular domain을 PCR로 합성하여 pEM.CMV-SF-IRES-EGFP 벡터에 삽입하였다. 제작한 벡터를 CHOS 세포주에 형질감염시키고, 인간 PD-1 단백질 세포외 도메인을 생성하는 세포를 EGFP 발현을 기준으로 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 선별하였다. 세포 배양액에서 FLAG 태그 affinity chromatography 방법을 사용하여 인간 PD-1 단백질을 정제하고 정량화하였다.
- [240]
- [241] 세포주 항원
- [242] 인간 PD-1의 cDNA가 포함된 pCMV3-C-FLAG 벡터(Sino)를 BALB/c 마우스 colon cancer 유래 CT26 세포주에 형질감염시켰다. APC-cy7 항 인간 PD-1 항체를 이용하여 인간 PD-1을 발현하는 세포를 flow cytometry를 통해 선별하였다. 96-well plate에서 limiting-dilution하여 단일 클론을 확보하였다.
- [243]
- [244] 대조군(키트루다, 옵디보)의 입수
- [245] 대조군 항체인 키트루다(인간 IgG4(S228P) isotype, cat.No. hpd1pe-mab14)는 인비보젠(InvivoGen)에서 제조한 제품, 또는 MSD의 임상용 제품을 구입하여 사용하였다. 옵디보는 BMS의 임상용 제품을 구입하여 사용하였다.
- [246]
- [247] 세포주의 확립
- [248] 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1의 cDNA가 포함된 pCMV3-C-FLAG 벡터(Sino)를 CHOS 세포주에 형질감염시켰다. APC-cy7 항 인간 PD-1 항체 또는 APC-cy7 항 마우스 PD-1 항체를 이용하여 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1을 발현하는 세포를 flow cytometry를 통해 선별하였다. 96-well plate에서 limiting-dilution하여 단일 클론을 확보하였다.
- [249]
- [250] 실시예 2. PD-1 녹아웃 마우스의 제작
- [251] PD-1 녹아웃 마우스는 마우스(C57BL/6N)에서 CRISPR-CAS 시스템을 이용하여 제작하였다. 마우스 PD-1 유전자 서열에 특이적인 guide RNA를 제작하여 in vitro에서 마우스 PD-1 DNA를 분해할 수 있는지 확인한 후, guide RNA와 Cas9 단백질을 zygote에 microinjection 하였다. Guide RNA가 주입된 수정란 중 생존한 것을 선별하여 대리모 난관에 이식하였고, 이식 후 태어나서 2주 정도 되는 마우스에서 꼬리를 잘라 genomic DNA를 추출하여 PCR 방법으로 마우스 PD-1 유전자 결손 여부를 확인하였다.
- [252]
- [253] 실시예 3. 항체 하이브리도마의 생성

- [254] **마우스의 면역화**
- [255] 8주령 암컷 PD-1 녹아웃 마우스에 인간 PD-1 항원을 면역화하여 항체 생성을 유도하였다. 면역화용 항원으로는 정제된 인간 PD-1 단백질 항원과 CT26 유래 인간 PD-1 세포주 항원을 이용하였다.
- [256] 단백질 항원 면역화는 마우스 당 50 μ g의 항원 단백질을 Titermax gold adjuvant 50 μ g과 혼합하여 마우스 좌,우측 등 부위에 피하(subcutaneous; s.c.)로 주사하였다. 세포주 항원 면역화는 면역화 1일 전 세포주 항원에 X-선 조사(irradiation)를 실시하여 세포 성장(cell growth)을 억제하고, 마우스 당 1x10⁶ 세포를 복강내(intraperitoneal; i.p.)로 투여하였다. 면역화는 3주 간격으로 실시하였으며 면역화 10일 뒤에 각각의 마우스 개체에서 submandibular bleeding으로 혈액을 채취하였다. 혈액에서 분리한 혈청(serum)을 이용하여 생성된 항체의 역가를 ELISA로 측정하였다.
- [257]
- [258] **세포 융합 및 단일클론세포(하이브리도마)의 생성**
- [259] 인간 PD-1 면역화 마우스에서 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, 배양한 myeloma 세포(sp2/0)와 융합하였다. 융합된 세포를 hypoxanthin, aminopterin, thymidine이 첨가되어 있는 배지 (HAT medium)에서 배양하여 myeloma와 B 림프구만이 융합된 세포(hybridoma)를 선택적으로 선별하여 배양하였다.
- [260] 얻어진 하이브리도마(hybridoma) 세포 중에서 인간 PD-1 항원과 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 protein-based ELISA 분석을 수행하여 확인하였다. 인간 PD-1 항원과 반응하는 하이브리도마를 한계희석법(limiting dilution method)을 이용하여 클로닝을 반복하여 인간 PD-1 항원에 반응하는 항체를 생산하는 단일클론세포(하이브리도마)(1G1)를 생산하였다.
- [261]
- [262] **실시예 4. 하이브리도마 1G1의 PD-1에 대한 결합(binding) 테스트**
- [263] 실시예 3에서 제조된 단일클론세포(하이브리도마)(1G1)와 세포 표면에 발현되는 구조적 PD-1 단백질과의 결합 확인을 위해, cell-based ELISA와 flow cytometry 분석을 수행하였다. 항 hPD-1 항체 대조군은 키트루다(Invivogen)를 사용하였다.
- [264] ELISA 분석을 요약하면, 콜라겐 코팅된 96-well plate(ThermoFisher)에 인간 또는 마우스 PD-1을 발현하는 CHO-S 세포 10,000개를 37°C에서 밤새도록 코팅하였다. 코팅된 세포는 8%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 상온에서 15분간 고정시켰다. 차단 및 세척 후, 키트루다 또는 하이브리도마 배양 상등액을 코팅된 플레이트에 첨가하고 상온에서 2시간 인큐베이션하였다. 세척 후 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 2차 항체로는 키트루다 첨가 well에는 마우스 항 인간 IgG Fc HRP(GenScript)를 사용하고, 하이브리도마 상등액 첨가 well에는 염소 항 마우스 IgG Fc HRP(ThermoFisher)를

사용하였다. 세척 후, TMB 기질(abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450/650 nm에서의 흡광도를 확인하였다.

- [265] 유세포분석(Flow cytometry)을 요약하면, 인간 또는 마우스 PD-1을 발현하는 CHO-S 세포를 1×10^6 세포/well의 밀도로 96-well V-bottom plate(Corning)로 로딩하고, 키트루다 또는 하이브리도마 배양 상등액을 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 1XPBS/2%BSA로 세척 후, 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 세포와 함께 인큐베이션 하였다. 2차 항체는 키트루다 첨가 well에는 PE 항 인간 IgG Fc(Biolegend)를 사용하고, 하이브리도마 배양 상등액 첨가 well에는 AF647 염소 항 마우스 IgG(H+L)(ThermoFisher)를 사용하였다. 이후에, 세포를 세척 후 1XPBS/2%BSA에 재현탁하여 유세포 분석(BD) 및 플로우 조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다.
- [266] 도 1은 ELISA를 사용하여, 실시예 3에서 제조한 하이브리도마 항체 1G1의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다. 도 2는 flow cytometry를 사용하여, 실시예 3에서 제조한 하이브리도마 항체의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다. 1G1 항체는 인간 PD-1 및 마우스 PD-1에 높은 친화도로 결합하였다.
- [267] 한편, 대조군으로 사용된 키트루다(Keytruda)는 세포 표면 인간 PD-1에만 결합하는 반면, 실시예 3에서 제조한 1G1 하이브리도마 항체는 세포 표면 인간 PD-1 및 마우스 PD-1 모두에 결합하여 교차 반응성을 보였다.
- [268]
- [269] **실시예 5. 하이브리도마 1G1 항체의 리간드 차단(blocking) 테스트**
- [270] 실시예 3에서 제조된 단일클론세포(하이브리도마) 1G1이 세포 표면 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 차단하는지 여부를 확인하기 위하여, cell-based ELISA와 flow cytometry 분석을 수행하였다. 항 hPD-1 항체 대조군은 키트루다(Invivogen)를 사용하였다.
- [271] ELISA 분석을 요약하면, 콜라겐 코팅된 96-well plate에 인간 또는 마우스 PD-1을 발현하는 CHO-S 세포 10,000개를 37°C에서 밤새도록 코팅하였다. 코팅된 세포는 8%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 상온에서 15분간 고정시켰다. 차단 및 세척 후, 인간 PD-1 CHO-S 세포 코팅 well에는 인간 PD-L1 라마 Fc 단백질을 첨가하고 마우스 PD-1 CHO-S 세포 코팅 well에는 마우스 PD-L1 인간 Fc 단백질을 첨가하고 상온에서 20분 인큐베이션 하였다. 키트루다 또는 하이브리도마 배양 상등액을 첨가하고 상온에서 1시간 20분 인큐베이션 하였다.
- [272] 세척 후 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 밤새도록 인큐베이션 하였다. 2차 항체로는 인간 PD-L1 라마 Fc 단백질 첨가 well에는 마우스 항 라마 IgG2/IgG3 HRP(antibody online)를 사용하고, 마우스 PD-L1 인간 Fc 단백질 첨가 well에는

마우스 항 인간 IgG Fc HRP(Genscript)를 사용하였다. 세척 후, TMB 기질(abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450/650 nm에서의 흡광도를 확인하였다.

- [273] Flow cytometry 분석을 요약하면, 인간 또는 마우스 PD-1을 발현하는 CHO-S 세포를 1×10^6 세포/well의 밀도로 96-well V-bottom plate(Corning)로 로딩하고 PD-L1 단백질과 키트루다 또는 하이브리도마 배양 상등액의 혼합액을 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인간 PD-1 CHO-S 세포 로딩 well에는 인간 PD-L1 라마 Fc 단백질과 항체 혼합액을 첨가하였고, 마우스 PD-1 CHO-S 세포 로딩 well에는 마우스 PD-L1 인간 Fc 단백질과 항체 혼합액을 첨가하였다. 1XPBS/2%BSA로 세척 후, 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [274] 2차 항체로는 인간 PD-L1 라마 Fc 단백질과 항체 혼합액 첨가 well에는 FITC 염소 항 라마 IgG(abcam)를 사용하였고, 마우스 PD-L1 인간 Fc 단백질과 항체 혼합액 첨가 well에는 PE 항 인간 IgG Fc(Biolegend)를 사용하였다. 세포를 세척 후 1XPBS/2%BSA에 제현탁하여 유세포 분석(BD) 및 플로우 조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다.
- [275] 도 3은 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 각각 인간 PD-L1 또는 마우스 PD-L1 결합에 대하여, 실시예 3에서 제조된 단일클론세포(하이브리도마) 1G1 항체의 차단 테스트를 ELISA를 사용하여 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [276] 도 4는 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 각각 인간 PD-L1 또는 마우스 PD-L1 결합에 대하여, 실시예 3에서 제조된 단일클론세포(하이브리도마) 1G1 항체의 차단 테스트 flow cytometry를 사용하여 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [277] 대조군인 키트루다(Keytruda)는 세포 표면 인간 PD-1과 PD-L1의 결합만을 차단하는 반면, 1G1 하이브리도마 항체는 인간 PD-1/PD-L1 및 마우스 PD-1/PD-L1 결합 모두를 차단하였다.
- [278]
- [279] **실시예 6. 정제된 하이브리도마 1G1 항체의 PD-1에 대한 결합 테스트 (ELISA)**
- [280] 하이브리도마에서 항체를 생산하기 위하여 하이브리도마를 3% low-IgG FBS (Gibco)가 포함된 DMEM (HyClone, Cytiva) 배지에서 1주일 동안 배양하고, 원심분리 한 후 $0.22 \mu\text{m}$ filter (Millipore)를 이용하여 여과한 후 세포배양액을 회수하였다.
- [281] 하이브리도마 세포 배양액에서 affinity chromatography 방법을 이용하여 항체 단백질을 분리하였다. 하이브리도마 세포 배양액을 Protein G bead (Cytiva)가 포함된 크로마토그래피 컬럼(Bio Rad)에 로딩하고, IgG Elution Buffer (Thermo scientific)로 elution 하였다. 낮은 pH의 IgG Elution Buffer (pH 2.5-3.0)로 인해

단백질이 손상되는 것을 최소화하고자 1 M Tris-HCL 용액(pH 8.0)이 담긴 tube에 항체를 elution 하고, pH-indicator strip을 이용하여 중화된 단백질의 pH를 측정하였다.

- [282] 정제된 항체는 Amicon 100K centrifugal filter (Merck)를 이용하여 농축하고 쿠마시블루 염색(Coomassie blue staining) 및 BCA assay (Thermo scientific)을 통해 단백질 확인 및 정량을 수행하였다(도 5).
- [283] 정제된 항체 1G1과 세포 표면에 발현되는 정상적인 구조의 PD-1 단백질과의 결합 친화도 확인을 위해, cell-based ELISA를 수행하였다. 항 hPD-1 항체 대조군은 키트루다(Keytruda, MSD)와 옵디보(Opdivo, BMS)를 사용하였다.
- [284] ELISA 분석을 요약하면, 콜라겐 코팅된 96-well plate(Thermo scientific)에 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1을 발현하는 CHO-S 세포 10,000개를 37°C incubator에서 밤새도록 코팅하였다. 코팅된 세포는 8%의 파라포름알데히드로 상온에서 15분간 고정시켰다. 차단 및 세척 후, 키트루다, 옵디보, 정제된 하이브리도마 항 PD-1 항체를 코팅된 플레이트에 첨가하고 상온에서 2시간 인큐베이션하였다.
- [285] 세척 후 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 밤새도록 인큐베이션 하였다. 2차 항체로는 키트루다 또는 옵디보 첨가 well에는 마우스 항 인간 IgG Fc HRP(GenScript)를 사용하고, 정제된 하이브리도마 항PD-1 항체 첨가 well에는 염소 항 마우스 IgG Fc HRP(ThermoFisher)를 사용하였다. 세척 후, TMB 기질(abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450/650 nm에서의 흡광도를 확인하였다.
- [286] 도 6은 ELISA를 사용하여, 정제된 하이브리도마 1G1 항체의 세포 표면 인간 PD-1 또는 마우스 PD-1에 대한 결합 테스트를 실시한 결과의 그래프이다. 이의 실험결과로부터 정제된 마우스 1G1 항체 및 대조군(키트루다, 옵디보)의 항원에 대한 EC50를 산출하였다.
- [287] 정제된 하이브리도마 항-PD-1 항체(1G1)는 키트루다(153.52 pM)와 옵디보(157.27 pM) 대비, 인간 PD-1 항원에 약 5배 향상된 결합력(28.13 pM)을 보였다. 또한 정제된 하이브리도마 항-PD-1 항체(1G1)는 마우스 PD-1 항원에 대해서도 인간 PD-1 항원과 비슷한 결합력(31.72 pM)을 보임을 확인하였다.

[288]

	키트루다	옵디보	정제 하이브리도마 1G1
EC ₅₀ : hPD-1 (pM)	153.52	157.27	28.13
EC ₅₀ : mPD-1 (pM)	ND	ND	31.72

ND: Not Detected

[289] **실시예 7. 인간 면역 체크포인트들에 대한 교차-반응성**

- [290] 실시예 3에서 제조된 단일클론세포(하이브리도마) 1G1이 인간 T세포 표면에 존재하는 PD-1에 특이적으로 결합하는 지를 확인하기 위해 protein-based ELISA 분석으로 다른 면역 체크포인트들에 대한 교차-반응성 시험을 수행하였다. 항 hPD-1 항체 대조군은 키트루다(Invivogen)를 사용하였다.

- [291] 인간 PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS 또는 BTLA 단백질을 96-well 플레이트(Nunc)에 4°C에서 밤새도록 코팅하였다. 차단 및 세척 후, 키트루다 또는 하이브리도마 배양 상등액을 코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 인큐베이션 하였다. 세척 후 2차 항체를 첨가하고 37°C에서 2시간 인큐베이션 하였다. 2차 항체는 키트루다 첨가 well에는 마우스 항 인간 IgG Fc HRP(Genscript)를 사용하고, 하이브리도마 배양 상등액 첨가 well에는 염소 항 마우스 IgG Fc HRP(ThermoFisher)를 사용하였다. 세척 후, TMB 기질(abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450/650 nm에서의 흡광도를 확인하였다.
- [292] 도 7은 인간 T 세포 표면 면역체크포인트들에 대한 결합 여부를 ELISA로 시험한 결과이다. 1G1 하이브리도마 항체는 대조군(Keytruda)와 마찬가지로 인간 PD-1에만 특이적으로 결합하였다.
- [293]
- [294] **실시예 8. 항체 하이브리도마 세포 시퀀싱**
- [295] 실시예 3에서 제조된 1G1 하이브리도마 세포에서 RNA를 트리졸 시약으로 추출하였다. RNA에서 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA에서 항체의 VH 및 VL 서열을 다음과 같이 증폭하였다.
- [296] 서열 증폭을 위한 프라이머는 다음과 같다.
- [297] [표1]

		Primer	Sequence (5'→ 3')
VH	Forward	MH1	AATTTGCTAGCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC(SEQ ID NO. 33)
	Forward	MH2	AATTTGCTAGCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG(SEQ ID NO. 34)
	Reverse	IgG1	AATTTGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTT TGGC(SEQ ID NO. 35)
VL	Forward	MK	AATTGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG(SEQ ID NO. 36)
	Reverse	CK	AATTTGCGGCCGCGGATACAGTTGGTGCAGCAT C (SEQ ID NO.37)

- [298] PCR 반응은 다음과 같이 이루어졌다.

[299] [표2]

반응계 (50 μ l)		반응조건		
cDNA	1 μ l	95°C	5min	1 cycle
10 x Taq buffer	5 μ l	95°C	1min	30 cycles
dNTP (2.5mM)	4 μ l	45°C	1min	
forward Primer (100pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	1min	
Reverse primer (100pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	5min	1 cycle
Taq (5U/ μ l)	0.25 μ l			
TDW	37.75 μ l			

[300] 수득되는 PCR 생산물(10 μ L)을 pCMV3 벡터로 결찰시키고,

T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 및

pCMV3_F(5'-CGAGGAGGATTTGATATTCAC-3') 프라이머를 이용한

서열분석으로 하이브리도마 항체의 VH와 VL 서열을 확인하였다.

[301] 확인한 VH와 VL 서열은 다음과 같으며, VH와 VL 모두에서 Kabat 시스템에 따라 FR1-4 및 CDR1-3 서열을 확인하였다.

[302] [표3]

Heavy (Kabat system)	
HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO. 17)
CDR-H1	GYWMH (SEQ ID NO. 1)
HFR2	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO. 19)
CDR-H2	MIHPNSDTTTYNEKFKN (SEQ ID NO. 3)
HFR3	RATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCT G (SEQ ID NO. 21)
CDR-H3	TDQAAWFAF (SEQ ID NO. 5)
HFR4	WGQGTLLTVSA (SEQ ID NO. 23)
Kappa (Kabat system)	
LFR1	DIVLTQTPLSLPVS LGDQASISC (SEQ ID NO. 25)
CDR-L1	RSSQNIVHSNGDTYLE (SEQ ID NO. 7)
LFR2	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO. 27)
CDR-L2	KVSKRFS (SEQ ID NO. 9)
LFR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO. 29)
CDR-L3	FQGSHVPWT (SEQ ID NO. 11)
LFR4	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO. 31)

[303]

[304] 실시예 9. 키메릭(chimeric) 항체의 제작, 발현 및 정제

[305] 하이브리도마에서 생산한 마우스 항 PD-1 항체의 불변영역(constant region)을 인간 항체의 불변영역으로 교체하는 키메릭 항체를 제작하였다.

시그널펩티드(signal peptide)와 항체의 VH 또는 VL 서열을 overlapping PCR로 연결하여 인간 IgG4 constant region(S228P)(서열번호 38 ~ 41)을 발현하는 pTRIOZ-hIgG4 벡터(invivogen)로 결찰시켰다.

[306] 항체의 VH와 VL 서열이 포함된 pTRIOZ-hIgG4 벡터를 ExpiCHO™ expression system(Thermo scientific)에 도입하여 항체를 발현시켰다. pTRIOZ-hIgG4 벡터를 ExpiCHO-S cell에 트랜스펙션(transfection) 시킨 후 FBS가 포함되지 않은 ExpiCHO™ Expression Medium에 배양하여 cell viability를 관찰하고, 트랜스펙션 후 7-10일 사이에 viability 70% 이상 되는 세포를 원심분리 한 후, 0.22 μ m filter

(Millipore)로 여과하여 세포배양액을 회수하였다. 세포배양액을 Protein A bead (Thermo scientific)가 포함된 크로마토그래피 컬럼 (Bio Rad)에 로딩하고, IgG Elution Buffer (Thermo scientific)로 elution 하였다. 낮은 pH의 IgG Elution Buffer (pH 2.5-3.0)로 인해 단백질이 손상되는 것을 최소화하고자 1 M Tris-HCL 용액(pH 8.0)이 담긴 tube에 항체를 elution 하고, pH-indicator strip을 이용하여 중화된 단백질의 pH를 측정하였다. 정제된 항체는 Amicon 50K centrifugal filter (Merck)를 이용하여 농축하고 Coomassie blue staining 및 BCA assay (Thermo scientific)을 통해 단백질 확인 및 정량을 수행하였다. 도 5는 정제된 마우스 1G1 항체(1G1 parental) 및 키메라 1G1 항체(1G1 Chimeric)를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.

[307]

[308] **실시예 10. 키메라 1G1 항체의 PD-1에 대한 결합 테스트 (SPR)**

[309] 실시예 9에서 제조된 키메라 1G1 항체의 인간 PD-1에 대한 결합 동역학을 Biacore 8K(Cytiva)를 이용한 SPR(Surface Plasma Resonance) 분석을 통해 측정하였다. 항 인간 IgG 항체를 CM5 칩(Cytiva)에 아민 연결(coupling)을 통해 고정시켰다. 정제된 항체(키트루다, 옵디보, 키메라 1G1 항체)를 센서 칩 위로 흘려보내어 항 인간 IgG 항체에 의해 캡처 하였다. 인간 PD-1 및 0-100nM (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100nM) 농도의 러닝 버퍼를 유속 30 μ l/분으로, 회합(association) 단계의 120s 동안 센서칩으로 흘려보내고 900s의 해리(dissociation)가 이어졌다. 칩은 각각의 실험 후 pH1.5의 글리신(glycine)으로 재생성되었다. Cytiva evaluation 소프트웨어를 이용하여 회합 및 해리 곡선을 그리고, 동역학 및 친화도 값을 결정하였다.

[310] 아래 표는 SPR 분석으로 시험된, 인간 PD-1에 대한 키메라 1G1 항체의 결합 친화성의 결과를 나타낸다.

[311]

	키트루다	옵디보	키메라 1G1
Kon (1/Ms)	$4.96e^{+5}$	$2.04e^{+5}$	$2.23e^{+5}$
Koff (1/s)	$3.14e^{-3}$	$2.14e^{-3}$	$7.49e^{-4}$
KD (M)	$6.33e^{-9}$	$1.05e^{-8}$	$3.35e^{-9}$

[312] 키메라 항-PD-1 항체(1G1)은 인간 PD-1에 대해, 키트루다($6.33e^{-9}$) 및 옵디보($1.05e^{-8}$)대비 약 2-3배 우수한 결합력(KD, $3.35e^{-9}$)을 가짐을 확인하였다. 이는 1G1 키메라 항-PD-1 항체가 회합(Kon, $2.23e^{+5}$)면에서는 키트루다($4.96e^{+5}$)와 옵디보($2.04e^{+5}$)와 유사하지만(0.9-2.2배), 해리(Koff, $7.49e^{-4}$)면에서는 키트루다($3.14e^{-3}$) 및 옵디보($2.14e^{-3}$)대비 2.9-4.2배 해리가 되지 않는 향상된 결합특성을 가지고 있기 때문이다.

[313]

[314] **실시예 11. 1G1 항체의 에피토프 맵핑**

[315] 1G1-chimeric(hIgG4(S228P)) 항체의 human PD-1 항원(서열번호 62)에 대한 epitope mapping(alanine scanning)을 실시하여 상기 항체가 인지하는 human PD-1 항원 에피토프를 확인하였다. PCR 돌연변이유발을 이용하여 PD-1의 아미노산

잔기들을 알라닌으로 돌연변이시켰다. 돌연변이된 단백질을 발현시키고, 1G1 키메릭 항체와의 결합에 대해 high-throughput flow cytometry로 분석하였다.

- [316] 그 결과, 아미노산의 돌연변이 항원에 대한 결합력이 야생형 항원에 대한 결합력에 비해 50% 이하로 저하되는 epitope 3개(P130, L128 및 I126)를 결정하였다. 이들 아미노산은 모두 mouse PD-1에서도 보존되는 아미노산이며, 이는 1G1 항체가 human과 mouse PD-1에 교차 반응성을 가지는 현상을 뒷받침한다.

[317]

[318] **실시예 12. 1G1 항체의 인간화(humanization)**

- [319] 마우스 유래 1G1 항체의 면역원성을 제거하여 인간 체내에서 안정적인 항체 효능을 확보하기 위해 복귀 돌연변이 라이브러리(back mutation library) 방법을 이용하여 1G1 항체의 인간화를 진행하였다. 항체의 상보적 결정 영역(CDR) 서열을 제외한 framework(FR) 서열을 인간 항체 서열로 치환한 1G1 인간화 항체 3종(인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70)을 제작하고 단백질을 A 친화도 크로마토그래피로 정제하였다.

- [320] 수득한 3종의 1G1 인간화 항체(인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70)의 인간 PD-1 항원에 대한 결합 친화성을 Biacore 8K(Cytiva)를 이용한 SPR(Surface Plasma Resonance) 분석을 통해 실시하였다. 수득한 3종의 인간화 1G1 항체는 모두 1G1-chimeric 항체와 유사 수준의 항원 결합력을 나타낸 것으로 확인되었다.

- [321] 수득한 3종의 인간화 1G1 항체 각각의 서열을 분석하여 도 8 내지 11에 도시하였다. 구체적으로, 인간화 항체 1G1-h61의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 각각 서열번호 54 및 55의 아미노산 서열을 갖는다. 인간화 항체 1G1-h68의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 각각 서열번호 56 및 57의 아미노산 서열을 갖는다. 인간화 항체 1G1-h70의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 각각 서열번호 58 및 59의 아미노산 서열을 갖는다.

[322]

[323] **실시예 13. 인간화 1G1 항체의 PD-1 항원에 대한 결합 동역학(kinetics)의 비교 평가**

- [324] Biacore 8K(Cytiva)를 이용한 SPR(Surface Plasma Resonance) 분석을 통해 각 항체의 인간 PD-1에의 결합 동역학을 측정하고, 항체간 항원에 대한 결합력을 비교하였다.

- [325] 항 인간 PD-1 항체 대조군인 키트루다(Keytruda, MSD (Lot #T020031))와 오펜디보(Opdivo, BMS (Lot #043 FB))는 인체용 의약품으로 신원약품에서 구매하였다.

- [326] 대조군 항체(키트루다, 오펜디보)와 1G1 항체(키메릭 항체 1G1-chimeric, 인간화 항체 1G1-h61, 1G1-h68, 1G1-h70)를 Protein A 칩(Cytiva) 위로 흘려보내어 캡처하였다. 7개의 농도(0-100M)의 인간 PD-1을 유속 30 μ L/분으로 회합(association)

단계의 120s 동안 센서칩으로 흘려보내고, 1800s의 해리(dissociation)가 이어졌다. 칩은 각각의 실험 후 pH1.5의 glycine으로 재생성되었다. Cytiva evaluation 소프트웨어를 이용하여 회합 및 해리 곡선을 그리고, 동역학 및 친화도 값을 측정하였다. GraphPad Prism 프로그램의 one-way ANOVA with Tukey test를 이용하여 항체간 동역학 및 친화도 값 사이의 유의함을 판단하였다(****, $P < 0.0001$).

- [327] 도 12a 및 도 12b는 인간 PD-1에 대한 결합 동역학 및 친화도를 K_{on} (ka 값), K_{off} (kd 값), KD값을 통해 보여준다. 결론적으로 인간화 항 PD-1 항체(1G1)는 평균적으로 인간 PD-1에 대해, 키트루다($7.06e^{-9}$) 및 옵디보($7.54e^{-9}$)와 유사수준의 결합력(KD, $7.26e^{-9}$)을 가짐을 확인하였다. 이는 1G1 인간화 항 PD-1 항체가 회합(K_{on} , $5.45e^{+4}$)면에서는 키트루다($4.18e^{+5}$)와 옵디보($1.41e^{+5}$) 대비 2.6-7.7배 천천히 결합하나, 해리(K_{off} , $3.87e^{-4}$)면에서는 키트루다($2.95e^{-3}$) 및 옵디보(1.06^{-3}) 대비 2.7-7.6배 해리가 되지 않는 향상된 결합 특성을 가지고 있기 때문이다. 항 PD-1 항체의 작용 기작을 고려하였을 때, 1G1 인간화 항 PD-1 항체는 해리가 되지 않는 결합 특성으로 인하여 향상된 항암 활성을 나타낸다.

[328]

[329] **실시예 14. PD-1 항원에 대한 cross-reactivity 비교 평가**

- [330] PD-1 항원에 대한 항체의 cross-reactivity 확인을 위해, protein-based ELISA를 수행하였다. ELISA 분석을 요약하면 96-well plate(Thermo scientific)에 human, mouse, rabbit, cynomolgus, rat의 extracellular domain(ECD) PD-1 단백질 10ng을 4°C에서 밤새도록 코팅하였다. 차단 및 세척 후, 대조군 항체(키트루다, 옵디보)와 1G1 항체(키메라 항체, 인간화 항체) 1 μ g/ml를 코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C에서 2시간 인큐베이션 하였다. 세척 후 2차 항체(항 인간 IgG 항체)를 첨가하고 37°C에서 2시간 인큐베이션 하였다. 세척 후, TMB 기질(abcam)을 첨가하였고 STOP 용액(abcam)으로 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더기(ThermoFisher)를 이용하여 450/650 nm에서의 흡광도를 확인하였다.

- [331] 도 13은 PD-1 항원에 대한 항체의 cross-reactivity 측정 결과를 보여준다. 키트루다, 옵디보, 1G1 항체 모두 human PD-1 및 cynomolgus PD-1 항원에 cross-reactivity를 가진다. 1G1 항체는 mouse PD-1 항원에 추가적으로 cross-reactivity를 보임을 확인하였다.

[332]

[333] **실시예 15. *in vivo* 항암 효능 평가**

- [334] 마우스 흑색종 모델을 이용한 1G1 항체의 항암 효능 평가실험을 도 14와 같이 진행하였다. 마우스 흑색종 세포 (B16F11/OT.EGFP)를 배양하여 3×10^6 개의 세포를 8주령 C57BL/6 암컷 마우스 오른쪽 등 피부에 이식하였다. 종양 세포 이식 6일후 암 결절의 크기를 측정하여 5그룹으로 나눈 후, 이식 7일째부터 3일 간격으로 1G1-parental 항체를 5회 복강 투여하였으며, 3일 간격으로 종양 크기를

측정하였다. 종양 크기는 다음 수식을 이용하여 계산하였다.

[335]

$$L \times W^2 / 2$$

(L: 장축 길이, W: 단축 길이)

[336]

생존율은 종양의 부피가 1000 mm³을 초과하거나, 종양 궤양, 마우스 폐사가 발생한 날로 기록하였다. GraphPad Prism 프로그램의 Two-way ANOVA with Bonferroni test를 이용하여 종양성장억제율 사이의 유의함을 판단하였으며, Log-rank (Mantel-Cox) test를 이용하여 생존율 값 사이의 유의함을 판단하였다 (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, 생존율 분석 end point: 700 mm³).

[337]

도 15는 시간에 따른 종양 성장 및 1G1-parental 항체 투여 농도에 따른 종양 성장 억제율을 보여준다. 1G1 1 mg/kg 투여군은 isotype 대조군과 유사한 종양 성장을 보였지만, 1G1 2.5 ~ 10 mg/kg 투여군에서는 19일에 약 90~100%, 22일에 94~112%, 25일에 86~94%의 종양 성장 억제율을 나타냈으며 (도 15; Day 22), 약 20%의 생존율 증가가 관찰되었다(도 16). 이 결과들을 바탕으로 1G1-parental 항체가 우수한 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.

[338]

[339]

실시예 16. 대장암 실험모델에서의 in vivo 항암 효능 평가

[340]

MC38 대장암 syngeneic 모델에서 1G1 항체의 항암 효능을 평가하였다. 7-8주령의 C57BL/6 암컷 마우스의 좌측 옆구리에 5×10^5 개의 MC38 마우스 대장암 세포를 피하 주입하였다. 주입 후, 평균 종양 크기가 50 내지 150 mm³에 도달하였을 때, 종양 부피에 따라 4그룹(각각 n = 13)으로 나누고, 인간 hIgG4, 래트 rIgG2a, 1G1-h70 항체 및 RMP1-14 (마우스 PD-1) 항체를 각각 10 mg/kg씩 3일 간격으로 총 5번 투여하였다. 각 그룹에 대해 동물의 체중과 종양의 크기를 매주 3회 측정하여 평가하였다. 최종 체중과 최종 종양의 크기는 연구가 종말점에 도달한 날에 측정하였다. 종말점은 대조 그룹의 평균 종양 크기가 1500 mm³에 도달하는 때로 정하였다. 종양성장억제율(%TGI)은 초기(i) 및 최종(f) 종양 측정치를 사용하여 처리 그룹(T) 대 대조 그룹(C)에 대해서 아래 방정식을 사용하여 측정하였다.

[341]

$$\%TGI = 1 - (Tf - Ti) / (Cf - Ci) * 100$$

[342]

각 그룹의 시간에 따른 상대적 종양 크기 변화와 종양성장억제율을 도 17에 나타내었다. 1G1-h70 항체는 마우스 PD-1 항체인 RMP1-14 항체에 비해 현저히 우수한 종양 성장 억제율을 나타내었다. MC38 대장암 syngeneic 모델은 항 PD-1 요법에 잘 반응하지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 1G1-h70 항체에 의한 우수한 종양 성장 억제 효과는 예상치 못한 것이다. 한편, 각 그룹의 처리로 인한 마우스의 체중에는 통계적으로 유의미한 변화는 없었다(테이터는 도시하지 않음).

[343]

[344]

실시예 17. Crystallography를 이용한 1G1 항체의 에피토프 맵핑

[345] 1G1-h70 인간화 항체의 인간 PD-1 항원(서열번호 62)에 대한 에피토프 맵핑(X-선 결정학적 방법)을 실시하여 상기 항체가 인지하는 인간 PD-1 항원의 에피토프를 확인하였다. 1G1-h70 항체의 Fab와 PD-1의 결합복합체를 20 °C에서 결정화 용액을 이용하여 hanging drop vapor diffusion method (drop volume = protein 0.8 μl + reservoir 0.8 μl , reservoir volume 400 μl)로 결정화하였다. 생성된 단결정에 대해 X-선 회절 실험을 수행하여 2.30 Å 해상도의 데이터를 획득하였다. 하기 표 4는 X-선 회절 data collection 및 structure refinement에 대한 정보를 정리한 것이다.

[346] [표4]

Data collection and refinement statistics

Data Collection	
X-ray source	PLS 5C
Space group	$P22_12_1$
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	70.580, 78.490, 4.220
Resolution (Å)	2.30 (2.37–2.30) *
R_{sym} (%)	8.2 (65.5)
$I/\sigma I$	14.8 (3.6)
Completeness (%)	99.9 (99.9)
Redundancy	6.7
Refinement	
Resolution (Å)	2.30
No. reflections	28744
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	19.4/23.9
No. atoms	
Protein	4069
Water	95
Average B factor (Å ²)	58.2
R.m.s. deviation	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	0.993
Ramachandran	
Favored (%)	98.64
Allowed (%)	1.36
Outlier (%)	0

* Values in parentheses are for the outer resolution shell.

[347]

[348] 1G1-h70 Fab와 PD-1의 상호작용에서, 1G1-h70 항체는 PD-1 단백질 항원(서열 62)상의 N66, Y68, K78, A129, P130 및 A132 잔기와 수소결합을 형성하는 것으로 확인되었다. 이들 중, Y68, K78, N66은 side chain이 수소결합에 관여한다.

- [349] 또한, 1G1-h70 Fab와 PD-1의 상호작용에서, 1G1-h70 항체는 PD-1 단백질 항원(서열 62)상의 I126, L128, A129, P130 및 A132 잔기와 소수성결합을 형성하는 것으로 관찰되었다. 상기 실시예 11의 Ala scanning 실험을 통해서도 확인된 바 있듯이, 1G1 항체와의 결합에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 3가지 아미노산 잔기(P130, L128, I126)는 PD-1의 FG loop region에 위치하며, 이들에 의한 소수성 상호작용이 synergy를 발휘하여 결합 친화도에 크게 기여하는 것으로 보인다.
- [350] 실제 PD-1 분자는 loop region들이 매우 flexible하며 결합하는 파트너에 따라 결합에 적절한 conformation을 취하는 것으로 알려져 있다. 도 18은 PD-1 내에서 1G1 항체와의 결합에 중요한 역할을 하는 FG loop, 키트루다와의 결합에 중요한 C'D loop, 오피디보와의 결합에 중요한 N-terminal region의 구조적 차이를 보여준다. 이러한 구조 변화의 차이는 PD-1 interactome들과의 결합 양상에 차이를 줄 것이고 각 항체에 따른 항암면역 양상이 달라질 수 있다.
- [351]
- [352] **실시예 18. 1G1 항체의 pH에 따른 결합력**
- [353] 혈액(pH 7.4)과 종양 미세환경(tumor microenvironment)(pH 5.0~7.0)은 pH 차이가 있다고 알려져 있다. 따라서 항체 결합력의 pH dependent 여부에 따라 면역항암 항체의 치료적 효능에 영향을 받을 수 있다. 일반적으로 pH 차이에 의한 결합력에 가장 민감한 잔기가 히스티딘(histidine)인데, 종래 PD-1 항체인 키트루다(Keytruda)와 오피디보(Opdivo)의 경우 결합에 관여하는 잔기들 중에 히스티딘이 존재하지 않는다. 그에 반해 1G1 항체는 CDR 영역(Kabat system)에서 중쇄 CDR2의 H52 잔기와 같이 PD-1 단백질 항원과 수소결합 또는 소수성결합에 관여하는 히스티딘 잔기를 가지고 있으므로 낮은 pH를 가지는 종양 미세환경에서도 PD-1과의 결합에 기여할 것으로 예상된다. 이에 1G1-h70 항체의 PD-1 결합력이 pH에 의존적인지 여부를 키트루다, 오피디보와 함께 조사하였다.
- [354] Biacore 8K(Cytiva)를 이용한 SPR(Surface Plasma Resonance) 분석을 통해 각 항체의 인간 PD-1에의 결합 동역학을 측정하고, 항체간 항원에 대한 결합력을 비교하였다. 항 인간 PD-1 항체 대조군인 키트루다(Keytruda, MSD (Lot #T020031))와 오피디보(Opdivo, BMS (Lot #043 FB))는 인체용 의약품으로 신원약품에서 구매하였다. 또한 씨스톤 파마슈티컬즈(CStone Pharmaceuticals)의 WO 2018/053709로부터의 2E5 클론에 따라 2E5 항체를 제작하였다. 2E5 항체는 인간 PD-1 및 마우스 PD-1에 모두 결합할 수 있으며 그의 에피토프 분석 결과는 PD-1의 FG 고리상에 위치해 있다고 개시되어 있다.
- [355] 대조군 항체(키트루다, 오피디보)와 2E5 항체 및 1G1 항체(1G1-h70)를 Protein A 칩(Cytiva) 위로 흘려보내어 캡처 하였다. 7개의 농도(0-100M)의 인간 PD-1을 유속 30 μ L/분으로 회합(association) 단계의 120s 동안 센서칩으로 흘려보내고, 1800s의 해리(dissociation)가 이어졌다. 캡처, 회합(association),

해리(dissociation)는 pH 6.0의 HBS-EP+ buffer에서 이루어졌다. 칩은 각각의 실험 후 pH 1.5의 glycine으로 재생성되었다. Cytiva evaluation 소프트웨어를 이용하여 회합 및 해리 곡선을 그리고, 동역학 및 친화도 값을 측정하였다. GraphPad Prism 프로그램의 one-way ANOVA with Tukey test를 이용하여 항체간 동역학 및 친화도 값 사이의 유의함을 판단하였다(****, $P < 0.0001$).

- [356] 도 19a 및 19b는 인간 PD-1에 대한 결합 동역학 및 친화도를 Kon(ka 값), Koff(kd 값), KD값을 통해 보여준다. pH 7.4 (혈액)에서, 1G1-h70 항체 (KD = 5.4 nM)는 인간 PD-1에 대해 키트루다 (KD = 6.6 nM), 옵디보 (KD = 7.1 nM), 및 2E5 항체 (KD = 12.6 nM)에 필적하는 유사한 수준의 결합력을 나타내었다. 그러나 pH 6.0 (종양 미세환경)에서는 1G1-h70 항체 (KD = 0.9 nM)가 키트루다 (KD = 4.2 nM), 옵디보 (KD = 3.1 nM), 및 2E5 항체 (KD = 4.5 nM)에 비해 인간 PD-1에 대해 훨씬 강한 결합 친화도를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 1G1-h70 항체가 pH 6.0에서도 해리(Koff) 측면에서 키트루다, 옵디보 및 2E5 항체에 비해 해리가 되지 않는 향상된 결합 특성을 가지고 있기 때문이다. 면역항암 항체를 비롯한 항암 약물의 종양에 대한 항암 효능은 종양 미세환경의 낮은 pH에 의해 영향을 받는다는 점에서, 종양 미세환경의 낮은 pH에서도 강한 인간 PD-1 결합력을 나타내는 1G1-h70 항체는 생체내 종양 미세환경에서 현저히 우수한 항암 활성을 나타내는 근거가 된다.

[357]

[358] **실시예 19. 친화도 성숙 (Affinity Maturation)**

- [359] 1G1-h70 항체의 인간 PD-1에 대한 친화도를 증가시키기 위해 친화도 성숙화를 진행하였다. 1G1-h70 항체의 CDR 영역의 각 아미노산 잔기를 *E. coli*에 대한 최적 코돈을 사용하여 다른 19개의 아미노산으로 돌연변이시켰다. 마이크로어레이 상에서 DNA 올리고뉴클레오타이드 라이브러리를 합성하고, 클론을 선택하여 *E. coli*에서의 발현시켰다.

- [360] 배지에 분비된 crude protein을 BSA 및 인간 PD-1 단백질에 대해 ELISA로 분석하여 발현 및 결합 친화도를 분석하였다. 향상된 값을 갖는 클론들을 선택하여 서열을 분석하였다. SPR에 의한 친화도 순위에 따라 "이로운 돌연변이(beneficial mutant)"를 확인하였다. Biacore T200 상에서 해리 속도(off-rate) 스크리닝을 수행하였다. 러닝 버퍼는 HBS-EP(10mM HEPES, 500mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 7.4)이었다. 배양 배지에 분비된 선택된 클론의 Fab-SASA는 SASA 포획 바이오 센서에 포획되었다. 평형 후, 항원을 120초(association phase)간 주입한 후 420초(dissociation phase)간 러닝 버퍼를 주입하였다. 다른 선택된 클론을 주입하기 전에 표면을 재생하고, 이 공정을 모든 샘플을 분석할 때까지 반복하였다. Fab-SASA 클론의 해리 속도는 Biacore T200 평가 소프트웨어를 사용하여 실험 데이터를 로컬로 1:1 상호 작용 모델에 적합하여 얻었다. 선택한 돌연변이들을 그들의 해리 상수(off-rates, kd)에 의해 순위를 매겼다.

- [361] "이로운 돌연변이"가 확인되면, 이들 돌연변이의 무작위 조합으로 이루어진 조합 라이브러리(combinational library)를 PCR에 의해 구성하였다. 조합 클론을 ELISA로 분석하고 DNA 서열분석과 친화도 순위 지정 작업을 수행하였다. 발현이 저하되지 않으면서 가장 높은 친화도 증가를 일으키는 "이로운 돌연변이"의 상위 조합들을 최종 선정하여 항체 친화도를 측정하였다.
- [362] 친화도 성숙 후, 총 13개의 인간화 PD-1 항체(AHF16556, AHF16557, AHF16558, AHF16559, AHF16560, AHF16561, AHF16563, AHF16564, AHF16565, AHF16566, AHF16568, AHF16569 및 AHF16570)를 수득하였다. 이들 항체는 1G1-h70 모 항체(WT)에 비해 세 개의 CDR 영역(VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1)에서 하기 표 6과 같은 아미노산 치환을 가졌다.
- [363] [표5]

NO.	Sequence ID	VH					VL
		59	62	102	105	106	
	WT	T	E	A	F	A	H
1	AHF16556	V	W	E	A	.	R
2	AHF16557	V	W	.	A	G	.
3	AHF16558	.	.	E	H	.	R
4	AHF16559	V	.	.	H	.	.
5	AHF16560	I	.	E	H	G	R
6	AHF16561	I	.	.	A	G	R
7	AHF16563	V	W	E	M	G	.
8	AHF16564	.	.	E	A	G	R
9	AHF16565	V	W	E	H	G	R
10	AHF16566	V	W	.	A	.	.
11	AHF16568	I	W	E	M	G	R
12	AHF16569	I	W	E	A	.	R
13	AHF16570	I	W	.	A	G	R

- [364] 이들 항체의 인간 PD-1에 대한 결합 동역학 데이터를 하기 표 6에 나타내었다.

[365] [표6]

NO.	Ligand	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Ratio(kd)	Ratio(kD)
1	AHF16556	1.48E+05	6.31E-05	4.27E-10	6.45	5.27
2	AHF16557	2.04E+05	8.68E-05	4.25E-10	4.69	5.29
3	AHF16558	2.48E+05	7.69E-05	3.10E-10	5.29	7.26
4	AHF16559	2.06E+05	7.62E-05	3.71E-10	5.34	6.06
5	AHF16560	2.04E+05	6.74E-05	3.31E-10	6.04	6.80
6	AHF16561	1.83E+05	5.53E-05	3.02E-10	7.36	7.45
7	AHF16563	2.18E+05	3.60E-05	1.65E-10	11.31	13.64
8	AHF16564	2.30E+05	3.68E-05	1.60E-10	11.06	14.06
9	AHF16565	1.30E+05	1.18E-04	9.13E-10	3.45	2.46
10	AHF16566	2.15E+05	7.53E-05	3.49E-10	5.41	6.45
11	AHF16568	1.46E+05	3.52E-05	2.41E-10	11.56	9.34
12	AHF16569	1.99E+05	6.74E-05	3.39E-10	6.04	6.64
13	AHF16570	1.64E+05	3.29E-05	2.00E-10	12.37	11.25
	U299-WT1	1.74E+05	4.02E-04	2.32E-09		
	U299-WT2	1.90E+05	4.12E-04	2.17E-09		

[366] 서열 리스트

[367] [367]

Seq ID No.		Sequences
1	HCDR1 amino acids	GYWMH
2	HCDR1 nucleotides	GGCTACTGGATGCAC
3	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTTYNEKFKN
4	HCDR2 nucleotides	ATGATTCATCCTAACAGTGATACTACTACCTACAA TGAGAAGTTCAAAAAC
5	HCDR3 amino acids	TDQAAWFAF
6	HCDR3 nucleotides	ACAGATCAGGCCGCTGGTTTGCTTTC
7	LCDR1 amino acids	RSSQNIVHSNGDTYLE
8	LCDR1 nucleotides	agatctagtcagaacattgtacatagtaatggagacacctatttagaa
9	LCDR2 amino acids	KVSKRFS
10	LCDR2 nucleotides	aaagttccaagcgattttct
11	LCDR3 amino acids	FQGSHPWT
12	LCDR3 nucleotides	ttcaaggtcacatgtccgtggacg
13	HCVR amino acids	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTGYWMH WVKQRPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRATL TVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTGTDQAAWF AFWGQGTLVTVSA
14	HCVR nucleotides	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGG TTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG GCTTCTGGCTACACTTTCACCGGCTACTGGATGCA

		CTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAG TGGATTGGAATGATTCATCCTAACAGTGATACTAC TACCTACAATGAGAAGTTCAAAAACAGGGCCACA CTGACTGTAGACAAATCCTCCGGCACAGCCTACAT GCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCG GTCTATTACTGTACAGGGACAGATCAGGCCGCCTG GTTTGCTTTC TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
15	LCVR amino acids	DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGDTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVS KRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLE IK
16	LCVR nucleotides	GATATTGTGCTGACACAAACTCCActctccctgcctgcagt cttgagatcaagcctccatctctgcagatctagtcagaacattgtacatagtaag gagacacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccagctctcaaagctcctg atctacaaagttccaagcgattttctgggggtccagacaggttcagtgagtgga tcaggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggag tttattactgcttcaaggtcacatgtccgtggacgttcggtggaggcaccaagct ggaaatcaaa
17	HFR1 amino acids	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT
18	HFR1 nucleotides	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGG TTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG GCTTCTGGCTACACTTTCACC
19	HFR2 amino acids	WVKQRPGQGLEWIG
20	HFR2 nucleotides	TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT GGATTGGA
21	HFR3 amino acids	RATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTG
22	HFR3 nucleotides	AGGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCGGCA CAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGA GGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAGGG
23	HFR4 amino acids	WGQGTLLVTVSA

24	HFR4 nucleotides	TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
25	LFR1 amino acids	DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISC
26	LFR1 nucleotides	GATATTGTGCTGACACAACTCCActctccctgcctgtcagt cttgagatcaagcctccatctcttgc
27	LFR2 amino acids	WYLQKPGQSPKLLIY
28	LFR2 nucleotides	tggtacctgcagaaaccaggccagctctccaaagctcctgatctac
29	LFR3 amino acids	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
30	LFR3 nucleotides	ggggtcccagacaggttcagtgaggatcaggacagattcacactcaaga tcagcagagtgaggctgaggatctgggagtttattactgc
31	LFR4 amino acids	FGGGTKLEIK
32	LFR4 nucleotides	ttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaa
33	MH1 primer	AATTTGCTAGCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
34	MH2 primer	AATTTGCTAGCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
35	IgG1 primer	AATTTGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTT GGC
36	MK primer	AATTGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
37	CK primer	AATTTGCGGCCGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC
38	Human IgG4(S228P) constant region, heavy chain nucleotides	GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCC GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCCGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCCTCCAGCAGCTTGGGACGAAGACCTA CACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC CCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCCTG

		GGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACC CAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
39	Human IgG4(S228P) constant region, heavy chain amino acids	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
40	Human IgG4(S228P) constant region, kappa chain nucleotides	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA

		GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT
41	Human IgG4(S228P) constant region, kappa chain amino acids	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	Humanized antibody, 1G1-h61 heavy chain nucleotides	CAAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAG CCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTG ACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCCTCCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAG ACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTC TGATGGCAGCTTCTTTCTGTATTCCAGGCTGACCG TGGATAAGTCTCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTT CAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCATAATC ACTATACTCAGAAAAGTCTGTCACTGTCACTGGGA AAGTGATAA
43	Humanized antibody, 1G1-h61 heavy chain amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLGLK
44	Humanized antibody, 1G1-h68 heavy chain nucleotides	CAAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAG CCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTG ACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCCTCCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAG ACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTC TGATGGCAGCTTCTTTCTGTATTCCAGGCTGACCG TGGATAAGTCTCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTT

		CAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCATAATC ACTATACTCAGAAAAGTCTGTCACTGTCACTGGGA AAGTGATAA
45	Humanized antibody, 1G1-h68 heavy chain amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTTYNEKFKNRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTGTDQAAW FAFWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK
46	Humanized antibody, 1G1-h70 heavy chain nucleotides	CAAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAG CCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTG ACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCCTCCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAG ACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTC TGATGGCAGCTTCTTTCTGTATTCCAGGTGACCG TGGATAAGTCTCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTT CAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCATAATC ACTATACTCAGAAAAGTCTGTCACTGTCACTGGGA AAGTGATAA
47	Humanized antibody, 1G1-h70 heavy chain amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTTYNEKFKNRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAW FAFWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP

		VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK
48	Humanized antibody, 1G1-h61 light chain nucleotides	GATATCGTTATGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGTC CGTGACCCCAAGGCAACCTGCCTCTATCAGCTGTA GAAGCAGCCAGAACATCGTGACAGCAACGGCGA CACCTACCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCTGGA CAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCA AGCGGTTTTCCGGCGTGCCTGATAGATTCAGCGGA TCTGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGAAGATTTC TAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTAC TGCTTCCAGGGCAGCCACGTGCCCTGGACATTCGG CGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGAGGACAGT GGCCGCCCCAAGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTTCCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCA AGGTCCAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTGCAGTC TGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGAC TCTAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGCACCT GACACTGAGCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAAG GTGTATGCCTGTGAAGTCACCCATCAGGGGCTGTC ATCACCCGTCACTAAGTCATTCAATCGCGGAGAAT GCTGATAA
49	Humanized antibody, 1G1-h61 light chain amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
50	Humanized antibody, 1G1-h68 light chain nucleotides	GATATCGTTATGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGTC CGTGACCCCAAGGCAACCTGCCTCTATCAGCTGTA GAAGCAGCCAGAACATCGTGACAGCAACGGCGA CACCTACCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCTGGA CAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCA AGCGGTTTTCCGGCGTGCCTGATAGATTCAGCGGA TCTGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGAAGATTTC TAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTAC

		TGCTTCCAGGGCAGCCACGTGCCCTGGACATTCGG CGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGAGGACAGT GGCCGCCCCAAGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTTCCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCA AGGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTGCAGTC TGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGAC TCTAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGCACCT GACACTGAGCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAG GTGTATGCCTGTGAAGTCACCCATCAGGGGCTGTC ATCACCCGTCCTAAGTCATTCAATCGCGGAGAAT GCTGATAA
51	Humanized antibody, 1G1-h68 light chain amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTYL EWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSVGPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVWTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
52	Humanized antibody, 1G1-h70 light chain nucleotides	GATATCGTTATGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGTC CGTGACCCCAAGGCCAACCTGCCTCTATCAGCTGTA GAAGCAGCCAGAACATCGTGACAGCCAGGGCGA CACCTACCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCTGGA CAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCA AGCGGTTTTCCGGCGTGCCTGATAGATTCAGCGGA TCTGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGAAGATTTC TAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTAC TGCTTCCAGGGCAGCCACGTGCCCTGGACATTCGG CGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGAGGACAGT GGCCGCCCCAAGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTTCCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCA AGGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTGCAGTC TGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGAC TCTAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGCACCT GACACTGAGCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAG GTGTATGCCTGTGAAGTCACCCATCAGGGGCTGTC

		ATCACCCGTCACCTAAGTCATTCAATCGCGGAGAAT GCTGATAA
53	Humanized antibody, 1G1-h70 light chain amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDITYL EWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
54	Humanized antibody, 1G1-h61 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWMGMHPNSDTTTYNEKFKNRV TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAA WFAFWGQGTTTVTVSS
55	Humanized antibody, 1G1-h61 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDITYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV EIK
56	Humanized antibody, 1G1-h68 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMHPNSDTTTYNEKFKNRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTGTDQAAW FAFWGQGTTTVTVSS
57	Humanized antibody, 1G1-h68 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDITYL EWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV EIK
58	Humanized antibody, 1G1-h70 VH amino acids	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM HWVRQAPGQGLEWIGMHPNSDTTTYNEKFKNRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAW FAFWGQGTTTVTVSS
59	Humanized antibody, 1G1-h70 VL amino acids	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDITYL EWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV EIK
60	LCDR1 amino acids	RSSQNIVHSQGDITYLE
61	LCDR1	agaagcagccagaacatcgtgcacagccagggcgacacctacctggaa

	nucleotides	
62	Human PD-1 protein, full amino acids	<u>MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWF</u><u>LDSPDRPWN</u><u>PPT</u> <u>ESPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPS</u> <u>NOTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHM</u> <u>SVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAOIKESLRAELRVT</u> <u>ERRAEVPTAHPSPPRPAQGFOTLVVGVVGGLLGS</u> VLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVP VFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFP SGMGTTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL 이 텔릭체 부분은 신호서열을 나타낸다. 밀줄친 부분은 ECD(세포외 도메인) 부분을 나타낸다.
63	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTVYNEKFKN
64	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTIYNEKFKN
65	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTTYNWKFKN
66	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTVYNWKFKN
67	HCDR2 amino acids	MIHPNSDTTIYNWKFKN
68	HCDR3 amino acids	TDQEAWF
69	HCDR3 amino acids	TDQAAWAF
70	HCDR3 amino acids	TDQAAWMAF
71	HCDR3 amino acids	TDQAAWHAF
72	HCDR3 amino acids	TDQAAWFGF
73	HCDR3 amino acids	TDQEAWAF
74	HCDR3 amino acids	TDQEAWMAF

75	HCDR3 amino acids	TDQEAWHAF
76	HCDR3 amino acids	TDQEAWFGF
77	HCDR3 amino acids	TDQAAWAGF
78	HCDR3 amino acids	TDQAAWMGF
79	HCDR3 amino acids	TDQAAWHGF
80	HCDR3 amino acids	TDQEAWAGF
81	HCDR3 amino acids	TDQEAWMGF
82	HCDR3 amino acids	TDQEAWHGF
83	LCDR1 amino acids	RSSQNIVRSNGDTYLE
84	LCDR1 amino acids	RSSQNIVRSQGDITLE

- [368] 이상에서는 본 개시내용을 설명하였으나, 본 개시내용은 개시된 실시예 및 첨부된 도면에 의하여 한정되지 않으며 본 개시내용의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 통상의 기술자에 의하여 다양하게 변형될 수 있다. 또한 본 개시내용의 실시예에서 설명한 기술적 사상은, 각각 독립적으로 실시될 수도 있고, 둘 이상이 서로 조합되어 실시될 수도 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 62의 P130, L128 및 I126 아미노산을 포함하는 프로그램된 세포사멸-1(PD-1) 단백질의 에피토프(epitope)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 62의 N66, Y68, K78, A129 및 A132로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 추가의 에피토프에 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 PD-1 및 마우스 PD-1에 동등한 수준의 결합력을 가지는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 pH 6.0에서 9E-10 M 이하의 KD로 인간 PD-1에 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 5] PD-1 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 3, 63, 64, 65, 66 또는 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 5 및 68 내지 82로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 7, 60, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 항체는 무린(murine) 항체, 키메라(chimeric) 항체, 또는 인간화(humanized) 항체인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 7] PD-1 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 8] PD-1 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 13, 54, 56 또는 58의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 15, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

- [청구항 9] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자.
- [청구항 10] 제9항의 핵산 분자를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터.
- [청구항 11] 제10항의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [청구항 12] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법.
- [청구항 13] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 낙타화 단일 도메인 항체, 디아바디, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, scFv 이합체, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv 단편, ds 디아바디, 나노바디, 미니바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, dAb 및 단쇄 결합 폴리펩티드로부터 선택되는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [청구항 14] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현하도록 조작된 유전자 도입 동물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 동물은 설치류인 유전자 도입 동물.
- [청구항 16] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스.
- [청구항 17] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 포함하는, PD-1과 연관된 상태를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, PD-1과 연관된 상태가 종양, 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성 질환 또는 감염성 질환인 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, PD-1과 연관된 상태인 종양 또는 암이 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포 암, 신장암, 간암, 골암, 피부암, 결장암, 직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종,

백혈병, 림프종, 골수종, 균상 식육종, 메르켈 세포 암, 및 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 중격 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구-풍부 B-세포 림프종, 엡스타인-바르 바이러스(EBV)-양성 및 -음성 이식후 림프증식성 질환(PTLD), 및 EBV-연관 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 외부 NK/T-세포 림프종, 비인두 암종, 및 인간 헤르페스 바이러스 8(HHV8)-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종을 포함하는 다른 혈액암, 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종을 포함하는 중추 신경계의 신생물로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

- [청구항 20] 제18항에 있어서, PD-1과 연관된 상태인 자가면역 질환이 루푸스, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군(Sjogren's Syndrome), 관절염, 류머티스성 관절염, 천식, COPD, 골반내 염증성 질환, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease), 염증성 장질환, 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 페이로니병(Peyronie's Disease), 셀리악병(coeliac disease), 담낭질환, 모소병(Pilonidal disease), 복막염, 건선, 건선성 관절염, 혈관염, 수술 후 유착(surgical adhesions), 뇌졸중, 제1형 당뇨병, 라임병(Lyme disease), 수막뇌염, 자가면역성 포도막염, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barr syndrome), 아토피성 피부염, 자가면역성 간염, 섬유화성 폐포염, 그레이브스병(Grave's disease), IgA 신장병, 특발성 혈소판감소성 자반병, 메니에르병(Meniere's disease), 천포창, 원발성 담즙성 간경변, 사르코이도시스, 경피증, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 다른 자가면역질환, 채식염, 트라우마(수술), 이식편대숙주질환, 이식거부반응, 심근경색 및 아테롬성 동맥경화증과 같은 허혈성 질환을 포함한 심장병, 혈관내 응고, 골흡수, 골다공증, 골관절염, 치주염 및 저염산증, 태아-모체간 관용의 결여와 관련된 불임증(related to lack of fetal-maternal tolerance), 백반증, 중증근무력증 및 전신성 경화증으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 21] 제18항에 있어서, PD-1과 연관된 상태인 신경계 질환 또는 신경퇴행성 질환이 인지 장애, 뇌종양, 알츠하이머병, 치매, 뇌졸중(stroke), 척수 손상(spinal cord injury), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 파킨슨병, 헌팅톤병, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 통증(pain), 및 기억 감퇴로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 22] 제18항에 있어서, PD-1과 연관된 상태인 감염성 질환이 B형 간염, C형 간염의 바이러스 감염, 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, HIV, 시토크로마비루스, 단순 헤르페스 바이러스 유형 I, 단순 헤르페스 바이러스 유형 2, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스 전염과 연관된 카포시 웨스트 육종, 얇은 고리

- 바이러스(토르퀘테노바이러스), JC 바이러스 또는 BK 바이러스 감염을 포함하는 만성 바이러스 감염으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 23] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 및 종양 사멸 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양, 암, 자가면역 질환, 신경계 질환, 신경퇴행성 질환 또는 감염성 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 24] 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이를 포함하는 다중 특이적 항원 결합 분자, 면역접합체, 키메라 항원 수용체, 제작된 T 세포 수용체 또는 종양 사멸 바이러스를 포함하는, 암을 갖는 대상체에서 면역 반응을 증가시키기 위한 약학적 조성물.
- [청구항 25] PD-1 녹아웃 마우스를 PD-1 항원으로 면역화시킨 후, 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, myeloma 세포와 융합하여 얻은 하이브리도마 세포 중에서 인간 PD-1 항원과 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하는 것을 포함하는, 제1항, 제2항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편의 생산 방법.
- [청구항 26] 제25항에 따른 방법에 의해 제조된 하이브리도마.