

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

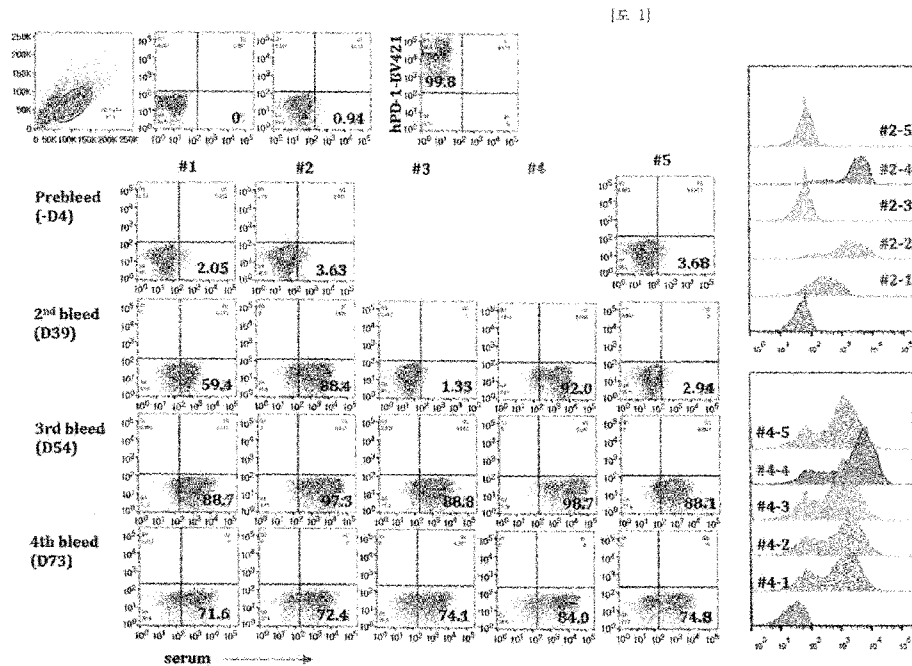
(43) 국제공개일  
2022년 6월 16일 (16.06.2022) WIPO | PCT

WO 2022/124866 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/018799
- (22) 국제출원일: 2021년 12월 10일 (10.12.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 63/123,705 2020년 12월 10일 (10.12.2020) US
- (71) 출원인: 주식회사 유틸렉스 (EUTILEX CO.,LTD.) [KR/KR]; 08591 서울특별시 금천구 가산디지털1로 58, 408, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 권병세 (KWON, Byoung Se); 14256 경기도 광명시 오리로 801, 204-2101, Gyeonggi-do (KR). 황선희 (HWANG, Sun Hee); 10391 경기도 고양시 일산서구 킨텍스로 240, 101-404, Gyeonggi-do (KR). 손현태 (SON, Hyun Tae); 16825 경기도 용인시 수지구 고기로 3, 101-2202, Gyeonggi-do (KR). 박혁준 (PARK, Hyeok Jun); 08584 서울특별시 금천구 두산로14길 14-10, 413, Seoul (KR). 유은혜 (YOO, Eun Hye); 08586 서울특별시 금천구 범안로15길 22-4, 602, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

(54) Title: ANTI-PD-1 ANTIBODY AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항-PD-1 항체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a programmed cell death protein 1 (anti-PD-1) antibody or an antigen-binding fragment thereof; a nucleic acid encoding same; a recombinant expression vector containing the nucleic acid; host cells transfected with the recombinant expression vector; a method for preparing the antibody or the antigen-binding fragment thereof; a bispecific or multispecific antibody comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof; an immune cell engaging bispecific or multispecific antibody comprising at least one scFv of the antibody and at least one scFv of an antibody binding to an immune cell activating antigen; an antibody-drug conjugate (ADC) in which the antibody or the antigen-binding fragment thereof is bound to a drug; a chimeric antigen receptor (CAR) comprising the scFv of the anti-PD-1 antibody as an antigen-binding site of an extracellular domain; immune cells into

WO 2022/124866 A1

MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

which the chimeric antigen receptor is introduced; a composition for combination therapy comprising the immune cells; a composition for combination therapy comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof; a composition for the treatment of cancer; and a method for treating cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 항-PD-1 (Programmed cell death protein 1) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 제조합 발현벡터, 상기 제조합 발현벡터로 형질 감염된 숙주세포, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 또는 다중 특이적 항체, 상기 항체의 scFv 및 면역세포 활성화 항원에 결합하는 항체의 scFv를 하나 이상 포함하는, 면역세포 인계이징 (immune cell engage) 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체(ADC), 상기 항-PD-1 항체의 scFv를 세포 외 도메인의 항원 결합 부위로 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR), 상기 키메라 항원 수용체가 도입되어 있는 면역세포, 상기 면역세포를 포함하는 병용 치료용 조성물, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 병용 치료용 조성물, 암 치료용 조성물, 암 치료방법에 관한 것이다.

# 명세서

## 발명의 명칭: 항-PD-1 항체 및 이의 용도

### 기술분야

- [1] 본 발명은 항-PD-1 (Programmed cell death protein 1) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질 감염된 숙주세포, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 또는 다중 특이적 항체, 상기 항체의 scFv 및 면역세포 활성화 항원에 결합하는 항체의 scFv를 하나 이상 포함하는, 면역세포 인게이징 (immune cell engage) 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체(ADC), 상기 항-PD-1 항체의 scFv를 세포 외 도메인의 항원 결합 부위로 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR), 상기 키메라 항원 수용체가 도입되어 있는 면역세포, 상기 면역세포를 포함하는 병용 치료용 조성물, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 병용 치료용 조성물, 암 치료용 조성물, 암 치료방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] PD-1은 면역 조절 및 말초 관용의 유지에서 중요한 역할을 하는 것으로서 인식된다. 활성화된 T 및 B 세포 상에서 주로 발현되는 면역저해 수용체인 세포예정사 수용체 1(Programmed Cell Death Receptor 1: PD-1; 세포예정사 수용체 1, 세포예정사 단백질 1, CD279)는 CD28 및 세포독성 T-림프구 연관 단백질-4(CTLA-4, CD152)와 관련된 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원으로, PD-1은 리간드에 결합하는 세포외 Ig 가변-유형(V-형) 및 신호전달 분자에 결합하는 세포질 꼬리를 함유하는 I형 막관통 당단백질이다. T, B 및 NKT 세포 상에서 중간 정도로 발현되고, 림프구, 단핵구 및 골수 세포 상에서 T/B 세포 수용체 신호전달에 의해 상향-조절된다 (Sharpe et al., The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nature Immunology (2007); 8:239-245).
- [3] PD-1은 PD-L1(CD274, B7-H1) 및/또는 PD-L2 (CD273, B7-DC)에 의해 결합될 때 T-세포 반응을 약화시킨다. PD-1에 대한 이들 리간드의 결합은 T-세포 증식, 사이토카인 생산 및 세포용해 기능을 저해하는 신호를 전달한다. PD-1에 대한 PD-L1 결합 차단은 종양-특이적 CD8+ T-세포 면역을 향상시켜, 면역계에 의한 종양 세포의 제거를 용이하게 한다.
- [4] PD-1에 대한 리간드인 PD-L1(CD274, B7-H1) 및/또는 PD-L2 (CD273, B7-DC)는 다양한 조직에서 발생하는 인간 암에서 발현된다. 예를 들어, 난소암, 신암, 결장직장암, 췌장암, 간암 및 흑색종의 대형 샘플 세트에서, PD-L1 발현은 후속 치료에 관계없이 불량한 예후와 상관되고 전체 생존을 감소시킨다.

- [5] PD-L1 발현 종양 세포는 PD-1 발현 T 세포와 상호작용하여 T 세포 활성화를 감소시키고 면역 감시를 회피하여, 그에 따라 종양에 대한 손상된 면역 반응에 기여한다.
- [6] PD-1 억제 항체로 머크 (Merck)사에서 개발한 Keytruda (성분명 pembrolizumab) 또는 BMS사의 Opdivo (성분명 nivolumab)가 시판중이다. 그러나, 이러한 약물들은 종양세포를 공격해 암을 사멸시키는 T 림프구를 활성화시켜야 약효가 나타나는데 활성화 정도가 미미하게 발현된다는 등의 문제가 있다. 따라서, 종양 또는 암 성장 억제에 효과적인 정도의 T 림프구 활성화를 위한 기존의 항체와 구별되는 신규 항-PD-1 항체 개발이 요구된다.
- [7] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 신규 항-PD-1 항체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 우수한 항체의 특성 및 효능 등을 확인하고, 목적하는 암 치료에 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 PD-1 (Programmed cell death protein 1)에 대한 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터 또는 상기 재조합 발현벡터로 형질감염된 숙주세포를 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체를 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 면역세포 인게이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공하는 데 있다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공하는 데 있다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 상기 항-PD-1 항체의 scFv를 세포외도메인의 항원 결합 부위로 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR), 상기 키메라 항원 수용체가 도입되어 있는 면역세포, 상기 면역세포를 포함하는 병용 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 면역세포 인게이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하는 병용 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [17] 본 발명의 다른 목적은 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의



항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 암 치료용 조성물 또는 암 치료방법을 제공하는 데 있다.

### 과제 해결 수단

- [18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음을 포함하는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 제공한다:
- [19] 서열번호 1, 8 및 14로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
- [20] 서열번호 2, 9 및 15로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
- [21] 서열번호 3, 4, 10, 16 및 56으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
- [22] 서열번호 5, 11, 17, 57 및 58로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
- [23] 서열번호 6, 12 및 18로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및
- [24] 서열번호 7, 13 및 19으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3.
- [25] 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [27] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현벡터로 형질감염된 숙주세포를 제공한다.
- [28] 본 발명은 또한, 숙주세포를 배양하여 항체를 생성하는 단계; 및 생성된 항체를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편의 제조방법을 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체를 제공한다.
- [30] 본 발명은 또한, 상기 항체의 scFv 및 면역세포 활성화 항원에 결합하는 항체의 scFv를 하나 이상 포함하는, 면역세포 인계이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공한다.
- [31] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다.
- [32] 본 발명은 또한, 항원 결합 부위를 포함하는 세포외도메인, 트랜스 멤브레인 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로, 상기 세포외도메인의 항원 결합 부위는 상기 항체의 scFv인 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [33] 본 발명은 또한, 상기 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포를

제공한다.

- [34] 본 발명은 또한, 상기 면역세포 및 항-PD-1 항체 이외의 약물을 포함하는 병용 치료용 조성물을 제공한다.
- [35] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편과 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물을 제공한다:
- [36] (i) 면역세포;
- [37] (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv 단편을 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
- [38] (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [39] 본 발명은 또한, 상기 이중특이적 또는 다중특이적 항체 및 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물을 제공한다:
- [40] (i) 면역세포;
- [41] (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv 단편을 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
- [42] (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [43] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체가 도입되어 있는 면역세포를 포함하는, 암 치료용 조성물을 제공한다.
- [44] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 항체-약물 접합체, 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포 또는 이중특이적 면역세포 결합체를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [45] 본 발명에 따른 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합단편은 PD-1에 대한 우수한 결합력을 나타내며, 목적하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 면역 마우스(immunized mice) 스크리닝을 보여준다. cDNA와 rhprotein의 immunization 동안 각 mouse의 serum을 분리하여 PD-1 antibody 형성을 확인하였다. 2회의 cDNA vaccination 후에 #2, 4 mouse에서 PD-1 antibody가 형성되었으며, protein boosting 후에는 모든 mouse에서 PD-1 antibody가 형성되는 것을 확인하였다. Hybridoma development는 #2, 4 mouse의 spleens을 사용하여 Fusion 진행하였다.
- [47] 도 2는 ELISA에 의한 Hybridoma screening을 보여준다. Fusion 약 2주정도에서 충분한 hybridoma clones이 형성되었으며 그 supernatants를 사용하여 ELISA

- 스크리닝을 진행하였다. 그 결과 #2 mouse의 fusion에서 12 clones, #4 mouse의 fusion에서 7 clones, total 19개의 positive clones을 selection하였고, 이 중 OD=450 값이 1.0 이상인 clones은 11개였다.
- [48] 도 3은 Q-ELISA에 의한 hPD-1 antibody hybridoma screening을 보여준다. 각 clone은 1x10<sup>6</sup> hybridoma를 24hr 배양한 후 그 supernatant를 사용하여 ELISA를 진행함으로써 항체 생산량을 정량적으로 비교하여 선별하였다. 그 결과, 2-2B3, 2-3C3, 2-5F1, 2-7C5, 2-9A9, 및 4-8D4, 4-8H11, 4-9D12, 4-9F10의 9 clones을 선별하였다.
- [49] 도 4a 내지 도 4c는 hPD-1 hybridoma antibodies의 특성을 보여준다. Purified antibodies는 SDS-PAGE stain (도 4a), SEC-HPLC (도 4b), SPR (도 4c)에 의해 그 특성을 분석하였다. 8 clones에서 recombinant human PD-1-His protein (ECD)과의 결합력에서 유사한 binding affinity를 보였으며, 그 중 4-9D12, 4-9F10이 조금 더 높은 binding affinity를 가진다.
- [50] 도 5는 flow cytometry에 의한 hPD-1 antibodies와 hPD-1 expressing cells간의 Binding test를 보여준다. PD-1/PD-L1 blocking assay에서 사용된 PD-1 expressing effector cells의 일부를 사용하여 PD-1에 대한 항체의 binding effect를 flow cytometry 분석한 결과, 2-2B3 (49.9%), 2-7C5 (50.4%), 4-8D4 (23.5%)를 확인하였다.
- [51] 도 6은 hPD-1 hybridoma antibodies에 대한 hPD-1/PD-L1 blocking functional assay를 보여준다. 분석은 두 개의 genetically engineered cell lines, PD-1 effector cells and PD-L1 aAPC cells을 co-culture하였을 때, PD-1/PD-L1 interaction은 TCR-mediated luminescence를 억제하였다. 반면에 PD-1/PD-L1 interaction을 선별된 항체의 function에 의해 disruption되면 TCR activation에 의해 luminescence가 유도되는 원리이다. PD-1/PD-L1 co-culture에 선별된 항체를 5ug부터 2-fold serial dilution하여 그 blocking effect를 확인한 결과, 3개의 clones, 2-2B3, 2-7C5, 4-8D4 항체에서 control anti-PD-1 antibody와 유사한 blocking effect를 나타냈다.
- [52] 도 7a 내지 도 7c은 선별된 3 clones 항체의 인간화(humanization)를 보여준다. Keytruda와 비교하여 항체의 특성을 분석하였고 선별된 항체에서 결합력은 2~8배 정도 낮았다. hPD-1 expressing에 있어 인간화 PD-1 항체들의 SDS-PAGE & Q-ELISA (도 7a), SEC-HPLC & SPR (도 7b) 및 Binding effect 결과 (도 7c)를 나타내었다.
- [53] 도 8a는 본 발명의 인간화 후보 항체의 In vivo 효능 분석을 위해 tumor size를 분석한 결과를 보여준다. 도 8b는 본 발명의 인간화 후보 항체의 간독성 테스트 결과를 보여준다.
- [54] 도 9a 내지 9c는 각 후보 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키기 위한 gene engineering 결과를 보여준다. 도 9a는 2B3W의 친화도를 개선한 5 clones의 항체, 도 9b는 7C5의 친화도를 개선한 5 clones의 항체, 도 9c는 8D4의 친화도를 개선한

2 clones의 항체, 도 9d는 경쟁사 항체 Keytruda(9nM)와 비교하여 친화도가 더 높은 T14-05(5.8nM)와 친화도가 유사한 T15-01(9.7nM) 항체를 선별한 결과를 보여준다.

- [55] 도 10a는 각 후보 항체의 친화도 개선을 위하여 선별된 항체들의 hPD-1을 과발현하는 세포에 대한 결합력을 flow cytometry로 분석한 결과를 보여준다. 도 10b는 인간 혈액으로부터 분리한 activated hCD8 T 세포에서 후보 항체의 결합력을 flow cytometry로 분석한 결과를 보여준다.
- [56] 도 11a는 각 후보 항체의 hPD-1을 발현하는 effector 세포와 그 receptor인 hPD-L1을 발현하는 APC 세포와의 결합을 저해할 수 있는 효능을 세포 수준에서 분석한 결과를 보여준다. 도 11b는 T14-05와 T15-01 항체의 양성 대조군인 keytruda와 비교한 결과를 보여준다.
- [57] 도 12a는 선별된 2B3W 후보 항체 및 이의 엔지니어링된 클론 항체들의 VH와 VL 및 CDR region 시퀀스 분석 결과를 보여준다. 도 12b는 선별된 7C5 후보 항체 및 이의 엔지니어링된 클론 항체들의 VH와 VL 및 CDR region 시퀀스 분석 결과를 보여준다. 도 12c는 선별된 8D4 후보 항체 및 이의 엔지니어링된 클론 항체들의 VH와 VL 및 CDR region 시퀀스 분석 결과를 보여준다. 도 12d는 선별된 최종 후보 항체들의 서열을 양성 대조군인 keytruda 아미노산 서열과 비교한 결과를 보여준다.
- [58] 도 13은 선별된 최종 후보 항체의 중간 Cross-Reactivity 분석 결과를 보여준다.
- [59] 도 14a 내지 14c는 최종 후보 항체의 *In vivo* 효능 분석 결과를 보여준다. 도 14a는 항체 투여에 따른 각 그룹의 개체별 tumor size 분석 결과를 보여준다. 도 14b는 각 그룹의 종양 크기 평균값을 그래프화 결과를 보여준다. 도 14c는 각 그룹의 CD4와 CD8 T 세포의 분포 결과를 보여준다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [60] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[61]

[62] 항-PD-1 항체

- [63] Balb/c Mouse를 이용하여 full length human PD-1 gene에 의한 vaccination, recombinant human PD-1 protein의 boosting으로 immunization한 후, 그 spleen을 mouse myeloma cells, sp2/o와 fusion시켰다. Anti-hPD-1 antibody를 생산하는 hybridoma를 screening하여 clones selection하였다. Selected clones을 purification하여 그 특성을 분석하고 hPD-1/PD-L1의 결합을 blocking할 수 있는 기능을 가지는 hybridoma antibodies를 선별하였다. 선별된 anti-hPD-1 antibodies의 cDNA cloning하여 chimeric PD-1 antibodies 및 최종적으로 humanized

PD-1 antibody를 개발하였다.

- [64] 본 발명은 일 관점에서, 다음을 포함하는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다: 서열번호 1, 8 및 14로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2, 9 및 15로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3, 4, 10, 16 및 56으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 서열번호 5, 11, 17, 57 및 58로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 6, 12 및 18로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 7, 13 및 19으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3.
- [65] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항-PD-1 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 PD-1에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [66] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다.
- [67] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [68] 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG의 아형(subtype)을 포함하며, 특히 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 중쇄 불변영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.
- [69] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge-region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub>는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다.
- [70] Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각에 해당한다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로

펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용하거나 (예를 들어, 완전한 형태의 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub>를 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 이용하여 제작할 수 있다.

- [71] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 결합된 이량체이다.
- [72] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인(CH1)을 포함한다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 일반적으로 Fab' 단편 C-말단에 존재하는 힌지 영역의 시스테인에 의해 공유적으로 연결된 한 쌍의 Fab' 단편을 포함한다.
- [73] "단일쇄 Fv (scFv)" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄로 이루어진 구조체이다. scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 폴리펩티드 링커를 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 추가로 포함할 수 있다.
- [74] 하나의 실시예에서, 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, scFv, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 다이설파이드-결합 Fvs (sdFv) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 상기 중쇄 불변영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 또는 엡실론( $\epsilon$ ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1 (IgG1), 감마 2 (IgG2), 감마 3 (IgG3) 또는 감마 4 (IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [76] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.
- [77] "에피토프(epitope)"는 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위(determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는 점에서 구별된다.
- [78] 상기 "인간화" 형태의 비-인간(예: 마우스) 항체는 비-인간

면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가변영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다.

- [79] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [80] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [81] 본 발명에서 사용된 항체의 "가변영역"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉 CDR1, CDR2, 및 CDR3) 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 의미한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 의미한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 의미한다.
- [82] "상보성 결정 영역(complement determining region, CDR)"은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 의미한다. 각 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3로 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [83] 본 발명에 따른 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합단편은 예를 들어, 다음을 포함할 수 있다:
- [84] (i) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [85] (ii) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 4의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [86] (iii) 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 11의 경쇄 CDR1, 서열번호 12의 경쇄 CDR2 및 서열번호 13의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [87] (iv) 서열번호 14의 중쇄 CDR1, 서열번호 15의 중쇄 CDR2 및 서열번호 16의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 17의 경쇄 CDR1, 서열번호 18의 경쇄 CDR2 및 서열번호 19의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [88] (v) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 56의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 57의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의

- 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
- [89] (vi) 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 58의 경쇄 CDR1, 서열번호 12의 경쇄 CDR2 및 서열번호 13의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [90] "골격 영역(FR)"은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4의 4개의 FR을 갖는다.
- [91] 항-PD-1 항체의 PD-1에 대한 결합 친화성은  $10^{-5}$ M 내지  $10^{-12}$  M 범위 내에 있다. 예를 들어, 항-PD-1 항체의 PD-1에 대한 결합 친화성은  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-12}$  M,  $10^{-7}$  M 내지  $10^{-12}$  M,  $10^{-8}$  M 내지  $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M 내지  $10^{-12}$  M,  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-7}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-8}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M 내지  $10^{-11}$  M,  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-10}$  M,  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-10}$  M,  $10^{-7}$  M 내지  $10^{-10}$  M,  $10^{-8}$  M 내지  $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M 내지  $10^{-10}$  M,  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-9}$  M,  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M 내지  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M 내지  $10^{-9}$  M,  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-8}$  M,  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M 내지  $10^{-8}$  M,  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-7}$  M 또는  $10^{-5}$  M 내지  $10^{-6}$  M이다.
- [92] 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 48 및 50으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 22, 24, 26, 29, 31, 33, 49, 51, 54 및 55로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [93] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 다음을 포함할 수 있다:
- [94] 서열번호 20의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;
- [95] 서열번호 21의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;
- [96] 서열번호 23의 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 경쇄 가변영역;
- [97] 서열번호 25의 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 경쇄 가변영역;
- [98] 서열번호 27의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;
- [99] 서열번호 28의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;
- [100] 서열번호 30의 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변영역;
- [101] 서열번호 32의 중쇄 가변영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변영역;
- [102] 서열번호 48의 중쇄 가변영역 및 서열번호 49의 경쇄 가변영역;
- [103] 서열번호 50의 중쇄 가변영역 및 서열번호 51의 경쇄 가변영역;
- [104] 서열번호 52의 중쇄 가변영역 및 서열번호 53의 경쇄 가변영역; 또는
- [105] 서열번호 54의 중쇄 가변영역 및 서열번호 55의 경쇄 가변영역.
- [106]
- [107] scFv
- [108] scFv는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄로 이루어진 구조체로, 항체 단편이다. scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수



있도록 하는 폴리펩티드 링커를 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 추가로 포함할 수 있다.

- [109] 하나의 실시예에서, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 단일쇄 Fv (scFv)에서 VH 및 VL 도메인은 링커를 통해 연결될 수 있다. 서열번호 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 48 및 50로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역은 링커를 통해 서열번호 22, 24, 26, 29, 31, 33, 49, 51, 54 및 55로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역과 연결될 수 있다.
- [110] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 다음을 포함할 수 있다:
- [111] 서열번호 20의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;
- [112] 서열번호 21의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;
- [113] 서열번호 23의 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 경쇄 가변영역;
- [114] 서열번호 25의 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 경쇄 가변영역;
- [115] 서열번호 27의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;
- [116] 서열번호 28의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;
- [117] 서열번호 30의 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변영역;
- [118] 서열번호 32의 중쇄 가변영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변영역;
- [119] 서열번호 48의 중쇄 가변영역 및 서열번호 49의 경쇄 가변영역;
- [120] 서열번호 50의 중쇄 가변영역 및 서열번호 51의 경쇄 가변영역;
- [121] 서열번호 52의 중쇄 가변영역 및 서열번호 53의 경쇄 가변영역; 또는
- [122] 서열번호 54의 중쇄 가변영역 및 서열번호 55의 경쇄 가변영역.
- [123] 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10-25 aa 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 글리신 및/또는 세린과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [124] 구체적으로, 상기 링커는 예를 들어,  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$  또는  $(G_nS)_m$  ( $n$ ,  $m$ 은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으나, 상기 링커는 예를 들어  $(G_nS)_m$  ( $n$ ,  $m$ 은 각각 1 내지 10)일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 GGGGS를 포함할 수 있다.
- [125] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 대상으로 하여, 표적 항원과 고친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.
- [126] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드(예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고친화성으로

결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.

- [127] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 *E. coli*의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데에 있어 중요하다. 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리는 수 많은 방식, 예를 들어 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법으로 제조하였다. 라이브러리를 대상으로 하여, 목적하는 특징을 수반한 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝할 수 있다.
- [128] 파지 디스플레이 기술은 목적하는 특징을 지닌 항체를 제조하기 위한 통상적인 하이브리도마 및 재조합 방법에 비해 몇 가지 이점을 지니고 있다. 이러한 기술은 동물을 사용하지 않고서도 짧은 시간에 다양한 서열을 지닌 큰 항체 라이브러리를 생성시킬 수 있도록 한다. 하이브리도마의 제조나 인간화 항체의 제조는 수 개월의 제조기간을 필요로 할 수 있다. 또한, 면역이 전혀 요구되지 않기 때문에, 파지 항체 라이브러리는 독성이거나 항원성이 낮은 항원에 대해서도 항체를 생성시킬 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 또한 사용하여 신규한 치료적 항체를 생성 및 확인할 수 있다.
- [129] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리 (repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [130] 파지 디스플레이 라이브러리로부터 고친화성 항체를 확인 및 분리할 수 있는 기술은 치료용 신규 항체 분리에 중요하다. 라이브러리로부터 고친화성 항체를 분리하는 것은 라이브러리의 크기, 세균성 세포 중에서의 생산 효율 및 라이브러리의 다양성에 좌우될 수 있다. 라이브러리의 크기는 항체 또는 항원 결합성 단백질의 부적절한 폴딩과 정지 코돈의 존재로 인한 비효율적 생산에 의해 감소된다. 세균성 세포에서의 발현은 항체 또는 항원 결합성 도메인이 적절하게 폴딩되지 않는 경우에는 억제될 수 있다. 발현은 가변/불변 계면의 표면이나 선별된 CDR 잔기에서의 잔기를 교대로 돌연변이 시킴으로써 개선시킬 수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.
- [131] 고친화성 항체 분리에서 항체 또는 항원 결합성 단백질의 다양한 라이브러리를 생성시키는 것이 중요하다. CDR3 영역은 이들이 종종 항원 결합에 참여하는

- 것으로 밝혀졌다. 중쇄 상의 CDR3 영역은 크기, 서열 및 구조적 입체 형태 면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [132] 또한, 각 위치에서 20개 아미노산 모두를 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역을 무작위화함으로써 다양성을 발생시킬 수 있다. 20개의 모든 아미노산을 사용하면 다양성이 큰 변이체 항체 서열이 생성되고 신규한 항체를 확인할 기회가 증가할 수 있다.
- [133] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 PD-1을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-PD-1 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [134] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)에서 확인할 수 있다.
- [135] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를

- 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [136] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다.
- [137] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [138] 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 34 내지 47로 구성된 군에서 선택된 중쇄 가변영역 또는 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [139] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 다음을 포함할 수 있다:
- [140] 서열번호 34의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 36의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [141] 서열번호 35의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 36의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [142] 서열번호 37의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 38의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [143] 서열번호 39의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 40의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [144] 서열번호 41의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 43의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [145] 서열번호 42의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 43의 경쇄 가변영역 코딩 핵산;
- [146] 서열번호 44의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 45의 경쇄 가변영역 코딩 핵산; 또는
- [147] 서열번호 46의 중쇄 가변영역 코딩 핵산 및 서열번호 47의 경쇄 가변영역 코딩 핵산.
- [148] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 분자생물학적 수법을 사용하여 (예를 들어, 항체와 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성할 수 있으며, 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나(DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

- [149] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 벡터의 성분으로는 일반적으로 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 항생제 내성 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 전사 종결 서열. 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터 및 전사 종결 서열 등과 같이 작동적으로 연결되어 있다.
- [150] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 따라 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [151] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL $\lambda$  프로모터, pR $\lambda$  프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [152] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [153] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [154] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 발현 벡터로 형질감염된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 숙주세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [155] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)

및 바실러스 투링기엔시스 (*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.

- [156] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 숙주세포를 배양하여 항체를 생성하는 단계; 및 생성된 항체를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [158] 상기 숙주세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [159] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [160]
- [161] 이중 또는 다중특이적 항체
- [162] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [163] 이중특이적 항체는 하나 이상의 타겟에 결합능 또는 길항능을 가지는 항체를 의미하며, 2개의 서로 다른 타겟에 대한 결합능 또는 길항능을 가지는 항체가 결합된 형태 또는 한 타겟에 대한 결합능을 가지는 항체와 다른 타겟에 대한 길항능을 가지는 물질이 결합되어 있는 항체를 의미한다.
- [164] 다중특이적 항체는 적어도 3 이상의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가지는 항체를 의미한다. 다중특이적(multi-specific) 항체는 삼중특이적(Tri-specific) 이상의 항체, 예를 들어 삼중특이적(Tri-specific) 항체, 사중특이적(Tetra-specific) 항체 또는 그 이상의 타겟을 표적하는 항체를 포함할 수 있다.
- [165] 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 속하는 항체들은 scFv 기반 항체, Fab 기반 항체 및 IgG 기반 항체 등으로 구분할 수 있다. 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 경우 두 개 이상의 신호를 동시에 억제 또는 증폭시킬 수 있기 때문에

하나의 신호를 억제/증폭하는 경우보다 더욱 효과적일 수 있으며, 각각의 신호를 각각의 신호억제제로 처리했을 경우와 비교하면, 저용량 투약이 가능하며, 동일한 시간 및 공간에서의 두 개 이상의 신호를 억제/증폭시킬 수 있다.

- [166] 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 제조 방법은 널리 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 두 개 이상의 중쇄가 상이한 특이성을 가지는 조건에서 두 개 이상의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동 발현을 근간으로 한다.
- [167] scFv를 기반으로 하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 경우, 상이한 scFv들의 VL과 VH를 각기 서로 조합하여 혼성 scFv를 heterodimeric 형태로 제조하여 디아바디(diabody)를 만들 수 있고, 상이한 scFv를 서로 연결해서 tandem ScFv를 제조할 수 있으며, Fab의 CH1과 CL을 각각의 scFv의 말단에 발현시켜 heterodimeric 미니항체(miniantibody)를 제조할 수 있고, Fc의 homodimeric 도메인인 CH3 도메인의 일부 아미노산을 치환하여 'knob into hole' 형태의 heterodimeric 구조로 변경시켜, 이들 변경된 CH3 도메인을 상이한 각각의 scFv 말단에 발현시킴으로써 heterodimeric scFv 형태의 미니바디(minibody)를 제조할 수 있다.
- [168] Fab을 기반으로 하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 경우, 특정 항원에 대한 개별 Fab'를 이황화결합 또는 매개체를 이용해서 서로 조합하여 heterodimeric Fab 형태로 제조할 수 있고, 특정 Fab의 중쇄 또는 경쇄의 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 발현시킴으로써 항원 결합가(valency)를 2개로 하거나, Fab과 scFv 사이에 경첩부위(hinge region)를 둠으로써 homodimeric 형태로 4개의 항원결합가를 가지도록 제조할 수 있다. 또한, Fab의 경쇄 말단과 중쇄 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 만든 이중표적 바이바디(bibody), Fab의 경쇄 말단과 중쇄 말단에 상이한 scFv를 각각 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 가지도록 한 삼중표적 바이바디, 상이한 Fab 3개를 화학적으로 접합시킴으로써 수득할 수 있다.
- [169] IgG를 기반으로 하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 경우, 트리온파마(Trion Pharma)사에 의해 마우스와 랫트 하이브리도마를 다시 교잡함으로써, 하이브리드 하이브리도마, 일명 쿼드로마(quadromas)를 제조하여 이중특이적 항체를 생산하는 방법이 알려져 있다. 또한, 경쇄부분은 공유하면서, 상이한 중쇄에 대해서 Fc의 CH3 homodimeric 도메인의 일부 아미노산을 변형시켜 heterodimeric 형태로 제작한 이른바 'Holes and Knob' 형태로 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. heterodimeric 형태의 이중특이적 항체 이외에, 상이한 2종의 scFv를 IgG의 경쇄와 중쇄의 가변 도메인 대신 constant 도메인에 각각 융합 발현시켜 homodimeric 형태의 (scFv)<sub>4</sub>-IgG로 제조할 수 있다. 또한, 임클론(ImClone)사는 인간 VEGFR-2에 대한 키메릭 단클론항체인 IMC-1C11을 기반으로하여, 이 항체의 경쇄 아미노 말단에 마우스 혈소판유도성장인자수용체-알파(Platelet-derived Growth Factor Receptor- $\alpha$ )에

대한 single variable domain만을 융합시켜 이중특이적 항체를 제작하여 보고하였다. 또한, 단백질 카이네이즈 A(protein kinase A, PKA) R 서브유닛의 dimerization and docking domain(DDD)과 PKA의 anchoring domain을 이용한 이른바 'dock and lock(DNL)' 방법을 통해서 CD20에 대한 다수의 항원결합가를 지니는 항체로 제작할 수 있다.

- [170] 매우 다양한 재조합 항체 포맷, 예를 들면, 2가 이상, 3가 이상 또는 4가 이상의 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 개발되었다. 예를 들어, 국제특허출원 공개 제WO2001/077342호, 제WO2009/080251호, 제WO2009/080252호, 제WO2009/080253호, 제WO2009/080254호, 제WO2010/112193호, 제WO2010/115589호, 제WO2010/136172호, 제WO2010/145792호, 제WO2010/145793호 및 제WO2011/117330호에 기재된 2가 이상, 3가 이상 또는 4가 이상의 항체도 포함한다. 2가 이상, 3가 이상 또는 4가 이상의 항체는 각각 2개 이상의 결합 도메인, 3개 이상의 결합 도메인 또는 4개 이상의 결합 도메인이 항체 분자에 존재한다는 것을 표시한다.
- [171] 구체적 실시예에서, 본 발명에 따른 이중 또는 다중특이적 항체는 상기 항-PD-1 항체 또는 항원 결합단편을 구체적으로 IgG 완전한 항체 또는 이의 단편 형태 예를 들어 단일쇄 F<sub>v</sub>, V<sub>H</sub> 도메인 및/또는 V<sub>L</sub> 도메인, Fab 또는 (Fab)<sub>2</sub>의 형태로 포함할 수 있다.
- [172] 또한, 상기 PD-1 을 타겟으로 하는 항체와 다른 타겟에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편 예를 들어, FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은 구체적으로 IgG 완전한 항체 또는 이의 단편 형태 예를 들어 단일쇄 F<sub>v</sub>, V<sub>H</sub> 도메인 및/또는 V<sub>L</sub> 도메인, Fab 또는 (Fab)<sub>2</sub>의 형태로 포함할 수 있다.
- [173] 본 발명에 따른 이중 또는 다중특이적 항체를 통해 PD-1 이외에, 다른 타겟에 의해 유도되거나 매개된 추가적 결합 특이성을 확보할 수 있다.
- [174] 예를 들어, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 PD-1 와 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1로 구성된 군에서 선택된 하나를 동시에 타겟으로 할 수 있다.
- [175] 예를 들어, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 PD-1와 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L),



CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 둘 이상을 동시에 타겟으로 할 수 있다.

[176]

[177] 면역세포 인게이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체

[178] 본 발명은 또 다른 관점에서 항체의 scFv 및 면역세포 활성화 항원에 결합하는 항체의 scFv를 하나 이상 포함하는, 면역세포 인게이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 관한 것이다.

[179] 상기 면역세포 인게이징 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 통해 세포독성 T 세포와 암 타겟 세포 사이의 세포 용해성 시냅스를 일시적으로 유도하여 독성물을 방출하도록 한다.

[180] 하나의 실시예에서, 상기 면역세포 활성화 항원은 예를 들어 다음에서 선택될 수 있으며, 이에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 면역세포 인게이저(immune cell engager) 역할을 할 수 있다:

[181] T 세포 활성화 항원은 CD3, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$ , TCR $\xi$ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226;

[182] NK세포 활성화 항원은 NKp30, NKp40, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM1, DAP10, CD16 (e.g., CD16a, CD16b), CRTAM, CD27, PSGL1, CD96, CD100 (SEMA4D), NKp80, CD244 (SLAMF4 또는 2B4), SLAMF6, SLAMF7, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DS1, CD94, NKG2C, NKG2E 또는 CD160;

[183] B세포 활성화 항원은 OX40, CD40 또는 CD70;

[184] 대식세포 활성화 항원은 CD2 아고니스트, CD40, CD70, TCR (Toll-like Receptor) 아고니스트, CD47, STING 또는 OX40L; 또는

[185] 수지상세포 활성화 항원은 CD2 아고니스트, OX40, OX40L, 41BB 아고니스트, TCR 아고니스트, CD47 아고니스트, 또는 STING 아고니스트.

[186] 면역세포 인게이저(immune cell engager)는 미국특허출원공개 제2017/0368169호에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 발명에 참조로서 도입될 수 있다.

[187] 구체적으로, 상기 면역세포 인게이징 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 직렬 scFv를 포함하고, 다음의 항원 및 암세포 상의 표면 항원에 결합할 수 있다. 상기 암세포 상의 표면 항원은 본 발명에 따른 항체가 표적하는 PD-1 이다:

[188] CD3, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$ , TCR $\xi$ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226;

[189] NKp30, NKp40, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM1, DAP10, CD16 (e.g., CD16a, CD16b), CRTAM, CD27, PSGL1, CD96, CD100 (SEMA4D), NKp80, CD244 (SLAMF4 또는 2B4), SLAMF6, SLAMF7, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1,

- KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DS1, CD94, NKG2C, NKG2E 또는 CD160;
- [190] OX40, CD40 또는 CD70;
- [191] CD2 아고니스트, CD40, CD70, TCR (Toll-like Receptor) 아고니스트, CD47, STING 또는 OX40L; 또는
- [192] CD2 아고니스트, OX40, OX40L, 41BB 아고니스트, TCR 아고니스트, CD47 아고니스트, 또는 STING 아고니스트.
- [193] 상기 면역세포 인게이징 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 예를 들어, VL(PD-1)-VH(PD-1)-VH(CD3 또는 CD16A)-VL(CD3 또는 CD16A), VH(PD-1)-VL(PD-1)-VH(CD3 또는 CD16A)-VL(CD3 또는 CD16A), VH(CD3 또는 CD16A)-VL(CD3 또는 CD16A)-VH(PD-1)-VL(PD-1) 또는 VH(CD3 또는 CD16A)-VL(CD3 또는 CD16A)-VL(PD-1)-VH(PD-1) 형태의 구조를 포함할 수 있다.
- [194] 상기 scFv는 예를 들어, 서열번호 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 48 및 50으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역은 링커를 통해 서열번호 22, 24, 26, 29, 31, 33, 49, 51, 54 및 55로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역은 링커로 연결될 수 있다.
- [195] 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10-25 aa 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 글리신 및/또는 세린과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있다.
- [196] 상기 링커는 예를 들어, (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> 또는 (G<sub>n</sub>S)<sub>m</sub> (n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으나, 상기 링커는 예를 들어 (G<sub>n</sub>S)<sub>m</sub> (n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 GGGGS를 포함할 수 있다.
- [197] 상기 면역세포 인게이징 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 예시로, CD3 및 CD19에 결합하는 블리나투모마브(blinatumomab)(Amgen); CD3 및 EpCAM에 결합하는 솔리토마브(solitomab)(Amgen); CD3 및 CEA에 결합하는 MEDI 565(MedImmune, Amgen); 및 CD3 및 PSMA에 결합하는 BAY2010112(Bayer, Amgen)를 포함한다. 예시적인 DART는 CD3 및 CD123에 결합하는 MGD006(Macrogenics); 및 CD3 및 gpA33에 결합하는 MGD007(Macrogenics)를 포함한다. 예시적인 TandAbs는 CD3 및 CD19에 결합하는 AFM11(Affimed Therapeutics); 및 CD30 및 CD16A에 결합하는 AFM13(Affimed Therapeutics)을 포함할 수 있다.
- [198]
- [199] 항체-약물 접합체 (ADC)
- [200] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체 (ADC)에 관한 것이다.
- [201] 항체-약물 접합체는 타겟 암세포로 항암 약물을 전달하기 전까지 항암 약물이 항체에 안정적으로 결합되어 있어야 한다. 타겟으로 전달된 약물은 항체로부터 유리되어 타겟 세포의 사멸을 유도해야 한다. 이를 위해서는 약물이 항체에

안정적으로 결합함과 동시에 타겟 세포에서 유리될 때는 타겟 세포의 사멸을 유도할 충분한 세포독성을 가져야 한다.

- [202] 하나의 실시예에서, 상기 항체는 링커를 통하여 약물에 결합될 수 있다. 상기 링커는 항-PD-1 항체와 약물 사이를 연결하는 부위로, 세포내 조건에서 절단 가능한 형태 즉, 세포 내 환경에서 항체에서 약물이 방출될 수 있도록 하며, 항체의 긴 반감기를 반영하여 항체가 전신 순환 중에는 안정하고, 링커와 약물의 결합이 항체의 안정성 및 약물 동태에 영향을 주지 않아야 한다.
- [203] 상기 링커는 예를 들어 절단성 링커 또는 비절단성 링커를 포함할 수 있다. 절단성 링커의 경우 펩타이드 링커와 같이 세포 내 펩티다아제 또는 프로테아제 효소 예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단될 수 있고, 비절단성 링커의 경우 예를 들어 티오에테르 링커는 항체가 세포내 가수분해에 의해 비선택적으로 분해된 후에 약물이 방출될 수 있다.
- [204] 하나의 실시예에서, 상기 절단성 링커는 펩타이드 링커를 포함할 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 적어도 2개 이상의 아미노산 길이를 가진다. 예를 들어, Val-Cit, Val-Ala, 또는 Val-Cit의 디펩티드 또는 Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly가 포함될 수 있다. 링커의 예시는 국제특허출원공개 제WO2004/010957호에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 발명에 참조로서 도입될 수 있다.
- [205] 상기 항체-약물 접합체는 표적 암세포의 항원에 ADC의 항체영역이 결합하여 ADC-항원 복합체를 형성한 후 엔도솜-리소솜 경로로 암세포 내부로 내포화된다. 이 경우 세포 독성 약물의 세포 내 방출은 엔도솜/리소솜의 내부 환경에 의해 조절된다.
- [206] 하나의 실시예에서, 상기 절단성 링커는 pH 민감성으로, 특정 pH 값에서 가수분해에 민감할 수 있다. 일반적으로, pH 민감성 링커는 산성 조건에서 가수분해될 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, 리소솜에서 가수분해될 수 있는 산성 불안정 링커 예를 들어, 하이드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아코니틱 아마이드 (cis-aconic amide), 오르쏘에스테르, 아세탈, 케탈 등일 수 있다.
- [207] 다른 실시예에서, 상기 링커는 환원 조건에서 절단될 수도 있으며, 예를 들어 이황화 링커가 이에 해당할 수 있다. SATA (N-succinimidyl-S-acetylthioacetate), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), SPDB (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrate) 및 SMPT (N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)toluene)를 사용하여 다양한 이황화 결합이 형성될 수 있다. 이러한 이황화 링커는 세포내 글루타치온의 티올과 이황화 교환에 의해 분해될 수 있다.
- [208] 상기 약물 및/또는 약물-링커는 항체의 라이신을 통해 무작위로 접합되거나, 이황화 결합 사슬을 환원하였을 때 노출되는 시스테인을 통해 접합될 수 있다. 경우에 따라서, 유전공학적으로 제작된 태그 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질에 존재하는 시스테인을 통해 링커-약물이 결합될 수 있다. 상기 유전공학적으로

- 제작된 태그 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질은 예를 들어, 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 포함할 수 있다. 상기 펩타이드 또는 단백질은 펩타이드 또는 단백질의 카복시 말단에서 결실(deletion)을 가지거나, 펩타이드 또는 단백질의 카복시(C) 말단에 스페이스 유닛의 공유결합을 통한 부가를 갖는다.
- [209] 상기 펩타이드 또는 단백질은 아미노산 모티프와 바로 공유결합되거나 스페이스 유닛과 공유결합되어 아미노산 모티프와 연결될 수 있다. 상기 아미노산 스페이스 유닛은 1 내지 20개의 아미노산으로 구성되며, 그 중에서 글리신(Glycine) 유닛이 바람직하다.
- [210] 상기 이소프레노이드 트랜스퍼라제는 예를 들어, 파네실트랜스퍼라제 (FTase, farnesyl protein transferase) 또는 게라닐게라닐트랜스퍼라제 (GGTase, geranylgeranyl transferase)일 수 있고, FTase 및 GGTase I은 앞서 언급한 화학식 1 중 CAAX 모티프를 인식할 수 있고, GGTase II는 XXCC, XCXC 또는 CXX 모티프(여기서 C는 시스테인이고, A는 지방족 아미노산이고, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질 특이성을 결정하는 아미노산이다)를 인식할 수 있다.
- [211] 또 다른 실시예에서, 상기 링커는 리소솜에서 다수 존재하거나, 또는 몇몇 종양세포에서 과발현되는 베타-글루쿠로니데이즈( $\beta$ -glucuronidase)에 의해 인식되어 가수분해 되는 베타-글루쿠로나이드 링커를 포함할 수 있다. 펩타이드 링커와는 달리 친수성(hydrophilicity)이 커서 소수성의 성질이 높은 약물과 결합시 항체-약물 복합체의 용해도를 증가시킬 수 있는 장점을 지닌다.
- [212] 이와 관련하여, 국제특허출원공개 제WO2015/182984호에 개시된 베타-글루쿠로나이드 링커, 예를 들어 자가-희생기 (self-immolative group)를 포함하는 베타-글루쿠로나이드 링커를 사용할 수 있으며, 위 문헌은 참조로 도입된다.
- [213] 경우에 따라서, 상기 링커는 예를 들어 비절단성 링커일 수 있으며, 세포 내에서 항체 가수분해 한 단계만을 통해 약물이 방출되어, 예를 들어 아미노산-링커-약물 복합체를 생산한다. 이러한 유형의 링커는 티오에테르기 또는 말레이미도카프로일기 (maleimidocaproyl)일 수 있고, 혈액 내 안정성을 유지할 수 있다.
- [214] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 항체의 이황화 결합 사슬을 환원하였을 때 노출되는 시스테인을 통해 링커-약물이 무작위 결합 또는 서열 GGGGGGGCVIM을 가지는 항체 말단 결합 펩타이드를 도입하여 링커-약물이 결합될 수 있다.
- [215] 상기 약물 (화학식 (1)의 D 포함)은 약리학적 효과를 나타내는 제제로 항체에 결합될 수 있으며, 구체적으로 화학요법제, 독소, 마이크로 RNA (miRNA), siRNA, shRNA 또는 방사성 동위원소일 수 있다. 상기 화학요법제는 예를 들어, 세포독성 제제 또는 면역억제제일 수 있다. 구체적으로 마이크로투블린 억제제,

유사분열 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 또는 DNA 인터칼레이터로서 기능할 수 있는 화학요법제를 포함할 수 있다. 또한, 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

- [216] 이러한 약물에는 예를 들어, 마이탄시노이드, 오리스타틴 (MMAE, MMAF 포함), 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 탈리소마이신, 캄프토세신, N8-아세틸 스피미딘, 1-(2-클로로에틸)-1,2-다이메틸 술폰일 하이드라자이드, 에스피라마이신, 에토포사이드, 6-머캅토피린, 돌라스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 탁솔(taxol), 탁산, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메토티렉세이트, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 A, 미토마이신 C, 클로람부실, 듀오카마이신, L-아스파라기나제(L-asparaginase), 머캅토피린(mercaptopyurine), 티오구아닌(thioguanine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 시타라빈(cytarabine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 니트로소우레아(nitrosourea), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 미토마이신(mitomycin), 다카바진(dacarbazine), 프로카바진(procarbazine), 토포테칸(topotecan), 질소 머스터드(nitrogen mustard), 사이톡산(cytoxan), 에토포시드(etoposide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), CNU(bischloroethylnitrosourea), 이리노테칸(irinotecan), 캄포토테신(camptothecin), 블레오마이신(bleomycin), 이다루비신(idarubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(plicamycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 아스파라기나제(asparaginase), 비노렐빈(vinorelbine), 클로로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 부설판(busulfan), 트레오설판(treosulfan), 데카바진(decarbazine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 9-아미노캄포토테신(9-aminocamptothecin), 크리스나톨(crisnatol), 미토마이신 C(mitomycin C), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 티아조퓨린(tiazofurin), 리바비린(ribavirin), EICAR(5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 데프록사민(deferoxamine), 플록수리딘(floxuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 랄티트렉세드(raltitrexed), 시타라빈(cytarabine(ara C)), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside), 플루다라빈(fludarabine), 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 메게스트롤(megestrol), 고세렐린(goserelin), 류프롤리드 아세테이트(leuprolide acetate), 플루타미드(flutamide), 바이칼루타마이드(bicalutamide), EB1089, CB1093, KH1060, 베르테포르핀(verteporfin), 프탈로시아닌(phthalocyanine), 광감작제 Pe4(photosensitizer Pe4), 데메톡시-하이포크레린

A(demethoxy-hypocrellin A), 인터페론- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ ), 인터페론- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ ), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor), 겐사이타빈(Gemcitabine), 벨케이드(velcade), 레발미드(revamid), 탈라미드(thalamid), 로바스타틴(lovastatin), 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온(1-methyl-4-phenylpyridiniumion), 스타우로스포르린(staurosporine), 악티노마이신 D(actinomycin D), 닥티노마이신(dactinomycin), 블레오마이신 A2(bleomycin A2), 블레오마이신 B2(bleomycinB2), 페플로마이신(peplomycin), 에피루비신(epirubicin), 피라루비신(pirarubicin), 조루비신(zorubicin), 마이토산트론(mitoxantrone), 베라파밀(verapamil) 및 탐시가르긴(thapsigargin), 핵산 분해 효소 및 세균이나 동물 유래의 독소로 구성된 균에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[217] 경우에 따라서, 상기 약물은 링커 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 공유결합을 형성하기 위해 반응할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 친핵기를 포함할 수 있다.

[218] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서 MC-vc-PAB 링커를 통해, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 약물 예를 들어, 오리스타틴 (MMAE)과 연결한 ADC를 제작하였다. 이러한 ADC는 목적하는 세포독성을 나타냄을 확인하였다.

[219]

[220] 키메라 항원 수용체(CAR)

[221] 본 발명은 다른 관점에서, 항원 결합 부위를 포함하는 세포외도메인, 트랜스 멤브레인 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로, 상기 세포외도메인의 항원 결합 부위는 상기 항체의 scFv인 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.

[222] 키메라 항원 수용체(CAR)는 표적 항원 및 해당 항원을 발현하는 세포에 대하여 면역반응을 유도할 수 있도록 설계된 합성 컨스트럭트이다. CAR는 세포외도메인, 트랜스 멤브레인 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 암세포의 표면에 특이적으로 발현되는 암세포 표면 항원을 인식하는 수용체를 코딩하는 유전자를 면역세포에 도입하여, 암세포를 사멸시킬 수 있다. 암세포에서 특이적으로 발현하는 항원과 결합하는 수용체를 포함하는 면역세포를 통해, 암세포만 표적하여 면역반응을 일으킬 수 있다. 상기 CAR는 본 발명에 따른 항-PD-1 항체의 scFv를 세포외도메인의 항원 인식 부위로 포함한다.

[223] 1세대 CAR에서는 암세포에서 특이적으로 발현하는 항원 인식 부위를 포함하는 세포외도메인, 트랜스 멤브레인 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 신호전달 도메인으로서 CD3 $\zeta$ 만을 이용하였는데, 암에 대한 치료 효과가 미미하였고, 지속시간이 짧은 문제가 있었다. 이러한 1세대 CAR는 미국등록특허 제6,319,494호에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 발명에

참조로서 도입된다.

- [224] 면역세포에 대한 반응성 향상을 위하여 보조 자극 도메인(CD28 또는 CD137/4-1BB)과 CD3 $\zeta$ 를 결합한 2세대 CAR가 제조되었는데 1세대 CAR와 비교하여 체내에 잔존하는 CAR 포함 면역세포의 수가 현저히 증가하였다. 2세대 CAR는 한 가지의 보조 자극 도메인을 이용한 것에 반해, 3세대 CAR에서는 두 가지 이상의 보조 자극 도메인을 이용하였다. 생체 내 CAR를 포함하는 면역세포의 확장 및 지속성 달성을 위해 보조 자극 도메인을 4-1BB, CD28 또는 OX40 등과 결합시킬 수 있다. 2세대 CAR는 미국등록특허 제7,741,465호, 제7,446,190호 또는 제9,212,229호에 구체적으로 기재되어 있고 3세대 CAR는 미국등록특허 제8,822,647호에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 발명에 참조로서 도입된다.
- [225] 4세대 CAR에서는 IL-12 또는 IL-15와 같은 사이토카인을 암호화하는 추가 유전자를 포함하여, 사이토카인의 CAR 기반 면역단백질이 추가로 발현될 수 있도록 하고, 5세대 CAR는 면역세포 강화를 위해 인터루킨 리셉터 체인 예를 들어, IL-2R $\beta$ 를 추가로 포함한다. 4세대 CAR는 미국등록특허 제10,316,102호, 5세대 CAR는 미국등록특허 제10,336,810호에 구체적으로 기재되어 있으며, 본 발명에 참조로서 도입된다.
- [226] 하나의 실시예에서, 상기 세포외도메인의 항원 결합 부위는 항체의 scFv이다. 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 scFv에서 VH 및 VL 도메인은 링커를 통해 연결될 수 있다. 서열번호 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 48 및 50으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역은 링커를 통해 서열번호 22, 24, 26, 29, 31, 33, 49, 51, 54 및 55로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역과 연결될 수 있다.
- [227] 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 10-25 aa 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 글리신 및/또는 세린과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있다.
- [228] 상기 링커는 예를 들어, (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> 또는 (G<sub>n</sub>S)<sub>m</sub> (n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있으나, 상기 링커는 예를 들어 (G<sub>n</sub>S)<sub>m</sub> (n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 GGGGS를 포함할 수 있다.
- [229] 상기 트랜스 멤브레인 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막 결합된 단백질 또는 트랜스 멤브레인 단백질로부터 유래될 수 있다. 상기 트랜스 멤브레인 도메인은 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS의 알파, 베타 또는 제타쇄를 포함할 수 있다. 상기 트랜스 멤브레인 도메인을 합성하는 경우 류신과 발린과 같은 소수성 잔기를 포함하거나, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린 포함 펩타이드를 각 말단에 포함할 수 있다. 2개 내지 10개 아미노산 길이인 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커가 트랜스 멤브레인 도메인과 CAR의 세포질 신호전달 도메인 사이에 결합을 형성할 수 있다. 글리신-세린 펩타이드를 링커로

- 이용할 수 있다.
- [230] 상기 신호 전달 도메인은 CAR이 위치된 면역세포의 정상 효과기 기능에 대한 활성화를 유도할 수 있다. 예를 들어 사이토카인의 분비를 통해 세포융해 활성화 또는 헬퍼 활성화를 유도할 수 있다. 상기 신호 전달 도메인은 효과기 기능 신호를 형질도입하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 절단된 단편을 포함할 수 있다.
- [231] 상기 신호 전달 도메인으로 항원 수용체 관여 후 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체(TCR) 및 공동-수용체의 세포질이 포함될 수 있다.
- [232] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화를 위해 불충분하고 공동-자극 신호가 필요하다는 것이 또한 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화에 TCR을 통해 항원-의존성 일차 활성화를 개시하는 것 및 이차 또는 공동-자극 신호를 제공하도록 항원-의존성 방식으로 작용하는 것이 관여할 수 있다. 일차 세포질 신호전달 서열은 자극성 방식으로, 또는 억제성 방식으로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극성 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 일차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예로는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d를 포함할 수 있다.
- [233] 경우에 따라서, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타쇄 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일 부분을 의미한다. 예를 들어, CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-관련된 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등이 포함될 수 있다. CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 2개 내지 10개 아미노산 예를 들어, 글리신-세린 포함 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [234] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 키메라 항원 수용체(CAR)가 도입된 면역세포에 관한 것이다.
- [235] 상기 면역세포는 면역을 유도하여 목적하는 암 치료 효과를 유발할 수 있는 것으로, 예를 들어, T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [236] 경우에 따라서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv가 세포외도메인의 항원 결합 부위로 포함된 키메라 항원 수용체(CAR)가 추가로 도입될 수 있다.
- [237] 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 예를 들어 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO,



CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, 또는 NRP1를 타겟하는 항체일 수 있다.

[238]

[239] 치료용 조성물

[240]

[241] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

[242] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 PD-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 PD-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포를 암 환자에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법일 수 있다.

[243] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질병의 임상 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 질병에 대한 임상 증상 발전의 억제, 질병에 대한 임상 증상 경감 또는 제거를 의미한다.

[244] 상기 암은 예를 들어, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종(예컨대, B 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 외투세포 림프종, 변연구역 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포 림프종, 모상 세포 백혈병), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 다발성 골수종, 또는 급성 림프구성 백혈병을 포함한다.

[245] 상기 암은 예를 들어, 난소암, 직장암, 위암, 고환암, 항문 부위 암, 자궁암, 결장암, 직장암, 신장 세포 암종, 간암, 폐의 비-소세포 암종, 소장 암, 식도암, 흑색종, 카포시 육종, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선 암, 부신암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌하수체 선암, 표피모양 암, 자궁경부 편평세포 암의 암종, 난관 암종, 자궁내막 암종, 질 암종, 연조직 육종, 요도암, 외음부 암종, 음경암, 방광암, 신장암 또는

요관암, 신우 암종, 척추 종양, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 상기 암들의 전이 병변, 또는 상기 암의 조합을 포함한다.

- [246] 상기 암은 예를 들어, 교모세포종, 폐암, 방광암, 구강암, 두경부 편평세포암, 담낭암 또는 자궁경부암일 수 있다. 특히, 교모세포종의 경우 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편이 뇌 및 척추와 그 주변 순환계 사이에 존재하는 뇌의 모세혈관 내피세포 막내에 타이트 결합(junction)에 의해 형성된 장벽인 혈액뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과할 필요가 있다. BBB 통과를 위해 전달체와 연결되어 사용될 수 있다. BBB를 통하여 약물을 전달하기 위해 예를 들면 브래드키닌, 또는 HIFU(Hign density focues ultrasound)과 같은 방법을 사용하여 BBB의 삼투압을 와해시키는 방법이 있다. 또한, 세포에 내재된 글루코스 및 아미노산 전달체, 인슐린 또는 트랜스페린의 수용체 매개 트랜스사이토시스와 같은 전달 시스템의 사용 또는 당단백질의 활성 유출 전달(efflux transporter)을 차단하는 것이 포함될 수 있다.
- [247] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [248] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [249] 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [250] 본 발명에 따른 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 암의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [251] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성

매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[252]

[253] 병용치료

[254] 본 발명은 면역세포 및 항-PD-1 항체 이외의 약물을 포함하는 병용 치료용 조성에 관한 것이다.

[255] 하나의 실시예에서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 약물은 화학요법제 또는 항-PD-1 항체 이외의 항체를 포함할 수 있다.

[256] 상기 약물은 마이탄시노이드, 오리스타틴 (MMAE, MMAF 포함), 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 탈리소마이신, 캄프토세신, N8-아세틸 스퍼미딘, 1-(2-클로로에틸)-1,2-다이메틸 술폰닐 하이드라자이드, 에스퍼라마이신, 에토포사이드, 6-머캅토피린, 돌라스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 탁솔(taxol), 탁산, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메토티렉세이트, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 A, 미토마이신 C, 클로람부실, 듀오카마이신, L-아스파라기나제(L-asparaginase), 머캅토피린(mercaptopurine), 티오구아닌(thioguanine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 시타라빈(cytarabine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 니트로소우레아(nitrosourea), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 미토마이신(mitomycin), 다카바진(dacarbazine), 프로카바진(procarbazine), 토포테칸(topotecan), 질소 머스터드(nitrogen mustard), 사이톡산(cytosin), 에토포시드(etoposide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), CNU(bischloroethylnitrosourea), 이리노테칸(irinotecan), 캄포토테신(camptothecin), 블레오마이신(bleomycin), 이다루비신(idarubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(plicamycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 아스파라기나제(asparaginase), 비노렐빈(vinorelbine), 클로로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 부셀판(busulfan), 트레오설판(treosulfan), 데카바진(decarbazine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 9-아미노캄포토테신(9-aminocamptothecin), 크리스나톨(crisnatol), 미토마이신 C(mitomycin C), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 티아조퓨린(tiazofurin), 리바비린(ribavirin), EICAR(5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 데프록사민(deferoxamine), 플록수리딘(floxuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 랄티트렉세드(raltitrexed), 시타라빈(cytarabine(ara C)), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside),

플루다라빈(fludarabine), 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 메게스트롤(megestrol), 고세렐린(goserelin), 류프롤리드 아세 테이트(leuprolide acetate), 플루타미드(flutamid), 바이칼루타마이드(bicalutamide), EB1089, CB1093, KH1060, 베르테포르핀(verteporfin), 프탈로시아닌(phthalocyanine), 광감작제 Pe4(photosensitizer Pe4), 데메톡시-하이포크레린 A(demethoxy-hypocrellin A), 인터페론- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ ), 인터페론- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ ), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor), 겐사이타빈(Gemcitabine), 벨케이드(velcade), 레발미드(revamid), 탈라미드(thalamid), 로바스타틴(lovastatin), 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온(1-methyl-4-phenylpyridinium), 스타우로스포린(staurosporine), 악티노마이신 D(actinomycin D), 닥티노마이신(dactinomycin), 블레오마이신 A2(bleomycin A2), 블레오마이신 B2(bleomycinB2), 페플로마이신(peplomycin), 에피루비신(epirubicin), 피라루비신(pirarubicin), 조루비신(zorubicin), 마이토산트론(mitoxantrone), 베라파밀(verapamil) 및 탐시가르긴(thapsigargin), 핵산 분해 효소 및 세균이나 동식물 유래의 독소로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [257] 하나의 실시예에서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 예를 들어 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFR $\alpha$ , NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 타겟하는 항체 또는 이의 항원 결합단편일 수 있다.
- [258] 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합단편과 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [259] (i) 면역세포;
- [260] (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv를 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
- [261] (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [262] 또한, 본 발명은 상기 면역세포 인계이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체 및 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물에 관한 것이다:
- [263] (i) 면역세포;
- [264] (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv 단편을 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
- [265] (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [266] 상기 면역세포는 면역 치료 예를 들어 면역을 유도하여 목적하는 암 치료 효과를 유발할 수 있는 것으로, 예를 들어, T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도

살해세포(Cytokine Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [267] 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 PD-1 이외의 표적을 타겟하는 항체로, 예를 들어 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, 또는 NRP1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [268] 상기 면역관문억제제는 항원 제시 세포 (APC, antigen presenting cell)와 면역세포 예를 들어 T세포가 만나는 부위로 T세포 억제 신호를 차단하여, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 제제를 의미한다. 상기 면역관문억제제는 예를 들어, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, 또는 CD200R를 타겟으로 하는 약물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [269] 상기 병용 투여 대상 제1성분 및 제2성분 각각은 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 병용 투여 대상 제1성분 및 제2성분 각각은 일정 시간 간격을 두고 별도로 투여할 수도 있다. 상기 병용 투여 대상 중 제1성분 투여 전 또는 후 제2성분이 별도로 투여될 수 있다.
- [270]
- [271] 동반진단(Companion diagnostics, CDx)
- [272] 동반진단은 특정 약물치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한 분자 진단 기법의 일종으로, 약물의 적용에 있어, 적용 대상 환자의 선별 기준을 제시하고 이에 부합하는 진단, 예후 및 예측 바이오마커의 특이성 및 민감성을 고려하여, 환자에 적합한 약물을 처리할 수 있도록 하는 기준을 제시할 수 있다.
- [273] 항암제의 경우 반응을 보이는 환자에게서는 높은 효과를 보이지만 반응하는 환자비율이 낮기 때문에 효과를 보일 환자를 선별해내는 것이 중요하며, 동반진단을 통해 항암제에 반응하는 환자를 선별하고, 환자의 치료 효율을 증대시킬 수 있다.
- [274] 상기 샘플은 환자의 조직 또는 체액으로부터 취득되는 생물학적 피검체를 의미한다. 조직 샘플의 공급원은 동결된 및/또는 보존된 기관, 조직 샘플, 생검 또는 흡인물에서 유래되는 것과 같은 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분(예, 혈청, 혈장); 골수 또는 임의의 골수 구성성분; 소변, 뇌척수액, 전혈액, 혈장 및 혈청과 같은 체액일 수 있다. 샘플은 비-세포 분획(예, 소변, 혈장, 혈청 또는 다른 비세포 체액)을 포함할 수 있다. 샘플은 체액 예를 들어, 혈액(예,

전혈액)을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 샘플은 환자로부터 수득되는 전혈액 샘플, 전 골수 샘플, 전 말초혈액 샘플, 또는 전 종양 샘플일 수 있다. 상기 "전" 샘플은 해당 샘플로부터 제거되거나 분리된 성분(예, 세포)이 실질적으로 없는 샘플이다. 상기 샘플, 예를 들어 혈액 샘플은 사용되기 전에 희석(예컨대, 생리적 용화성 완충액 또는 배지에 의해)될 수 있다. 다른 구체예들에서, "전" 샘플, 예컨대 전 조직 샘플 또는 전 종양 샘플은 기원 조직 유래의 미세환경을 실질적으로 유지하고, 예를 들어 종양 또는 면역 미세환경의 구조를 실질적으로 유지할 수 있다. 구체적으로, 샘플, 예컨대 종양 샘플은 더 작은 조각으로 가공(예, 마쇄, 다짐, 블렌딩, 분쇄 등)되고 희석(예컨대, 생리적 용화성 완충액 또는 배지에 의해)될 수 있다.

- [275] 상기 유전자의 발현 확인은 해당 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 중합효소연쇄반응(PCR)에 의해 수행될 수 있고, 경우에 따라서 전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩을 사용하여 수행될 수 있다.
- [276] 중합효소연쇄반응(PCR)은 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 통해 수행될 수 있다. 멀티플렉스 PCR, 실-시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 등이 수행될 수 있다.
- [277] 유전자 코딩에 의한 단백질 발현 여부를 검출할 수도 있다. 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer) 등을 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.
- [278] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip)을 이용한 방법 등이 포함될 수 있다.

[279]

[280] 실시예

[281] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진

자에게 있어서 자명할 것이다.

[282]

[283] 실시에 1. 후보 클론의 제작 및 항원결합력 분석

[284] 도 1에서와 같이 full length PD-1 DNA 서열을 vaccination vector에 클로닝하여 DNA vaccination으로써 사용하였고 재조합 인간 PD-1-His 단백질과 병합하여 마우스를 immunization하였고, 또한 안정적으로 인간 PD-1을 발현하는 293 세포주를 제작하였다. Immunization 전과 후에 혈액을 채취하여 immunization 정도를 확인하였다. 2차 DNA vaccination 후 혈청을 분리하여 인간 PD-1을 발현하는 293 세포주에 결합시켜 분석한 결과, 1번, 2번, 4번 마우스의 혈청에 항-PD-1 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 3차 단백질로 immunization 후 혈청을 분리하여 인간 PD-1을 발현하는 293 세포주에 결합시켜 분석한 결과, 5마리의 모든 마우스의 혈청에 항-PD-1 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 이후 DNA vaccination과 단백질 immunization을 각 한번씩 더 투여한 후 2번과 4번 마우스의 spleen을 SP2/0 myeloid cells과 fusion하여 hybridoma clones을 생성하였다.

[285] 도 2에서와 같이 후보 항체는 hybridoma 배양액을 사용하여 재조합 인간 PD-1-His 단백질에 결합력을 가지는 clones을 ELISA 방법에 의해 1차 11개의 clones을 선별하였다.

[286] 도 3에서와 같이 11개의 hybridoma의 각 clone을  $1 \times 10^6$  세포를 24시간 배양한 후 그 배양액을 사용하여 ELISA를 진행함으로써 정량적으로 항체의 결합력을 비교하였다. ELISA는 재조합 인간 PD-1-His 단백질을 96-well ELISA plate에서 4°C, O/N coating하고 5% non-fat skim milk로 RT에서 1hr동안 blocking하였다. 항체는 각 hybridoma 배양액을 100ul부터 1/2 serial dilution하여 RT에서 2hr 처리하고 anti-mIgG-HRP로 detection하였다. 그 결과, 1차 선별된 후보항체 중에서 2-2B3, 2-3C3, 2-5F1, 2-7C5, 2-9A9, 및 4-8D4, 4-8H11, 4-9D12, 4-9F10 9개의 2차 후보항체를 선별하였다.

[287]

[288] 실시에 2. 선별된 클론의 특성

[289] 도 4에서와 같이 hybridoma의 배양액으로부터 선별된 9개의 후보항체를 정제하여 SDS-PAGE (4a), SEC-HPLC (4b), SPR (4c)에 의해 그 특성을 분석하였다. 9개의 clones은 재조합 인간 PD-1-His 단백질과의 결합력에서 유사한 binding affinity를 보였으며, 그 중 4-9D12, 4-9F10 clones이 상대적으로 더 높은 binding affinity를 나타냈다.

[290] 도 5 및 도 6에서와 같이 PD-1/PD-L1 blocking assay에서 사용한 PD-1 expressing effector cells의 일부를 사용하여 정제된 후보항체의 결합력을 flow cytometry 방법에 의하여 분석한 결과, 2-2B3 (49.9%), 2-7C5 (50.4%), 4-8D4 (23.5%) 등으로 확인하였다.

[291] 도 6에서와 같이 정제된 후보 항체의 in vitro 효능 분석을 위하여 두 개의

유전적으로 engineered cell lines인 PD-1을 발현하는 effector cells과 PD-L1을 발현하는 aAPC cells을 공동 배양하였을 때, PD-1과 PD-L1의 결합은 TCR 신호를 방해함으로써 luminescence 발광이 억제되고 반면에 PD-1과 PD-L1의 결합을 선별된 후보항체의 효능에 의하여 block하게 되면 TCR 신호 활성화에 의하여 luminescence 발광이 유도되는 원리를 시용하였다. 선별된 항체는 5ug부터 2-fold serial dilution하였고 PD-1과 PD-L1의 결합에 대한 blocking 효과를 확인한 결과, 2-2B3, 2-7C5, 4-8D4 clones에서 양성 대조군 anti-PD-1 항체 (Promega)와 유사한 억제 효과를 나타냈다.

[292] 따라서 이상의 결과에 의하여 3개의 후보 항체를 선별하였고, 선별된 항체는 cDNA cloning을 위하여 각 hybridoma부터 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다. 각 항체의 antibody fragments인 VH와 VL은 RACE PCR에 의해 증폭되고 증폭된 PCR product를 pGEM-Teasy vector에 cloning 한 후 그 서열을 분석하였다. 그 결과, 선별된 3 clones은 각 다른 염기, 아미노산 서열을 가지는 항체였고, 이 3개의 항체를 인간화하였다.

[293]

[294] 실시에 3. 선별된 개별클론의 서열분석

[295] 선별된 클론의 VH와 VL 및 CDR region 시퀀스 분석 결과는 표 1에 정리하였다. 선별된 클론 중 2-2B3의 두개의 클론을 2-2B3W 및 2-2B3R로 나타내었다.

[296] 2-2B3W의 경우, 서열번호 20의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFVFSNYD(서열번호 1), VH CDR2는 ITIGGGTT (서열번호 2), VH CDR3은 ARWVYDPLYAMDY(서열번호 3), VL CDR1은 ESVNYGISF(서열번호 5), VL CDR2는 AAS(서열번호 6) 및 VL CDR3은 QQSKEVPWT(서열번호 7)이고;

[297] 2-2B3R의 경우, 서열번호 21의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFVFSNYD (서열번호 1), VH CDR2는 ITIGGGTT (서열번호 2), VH CDR3은 ARVYDPLYAMDY (서열번호 4), VL CDR1은 ESVNYGISF (서열번호 5), VL CDR2는 AAS (서열번호 6) 및 VL CDR3은 QQSKEVPWT (서열번호 7)이고;

[298] 2-7C5의 경우, 서열번호 23의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 24의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFTFSSFG (서열번호 8), VH CDR2는 IYSNGDYT (서열번호 9), VH CDR3은 ARYYGNYGGYFDY (서열번호 10), VL CDR1은 QSVSNDVA (서열번호 11), VL CDR2는 YAS (서열번호 12) 및 VL CDR3은 QQDYSSPPT (서열번호 13)이고;

[299] 4-8D4의 경우, 서열번호 25의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 26의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GYTFTTYW (서열번호 14), VH CDR2는 INPTTGYT (서열번호 15), VH CDR3은 ARGVRYDFDY (서열번호 16), VL CDR1은 QSLDSRTRKNY (서열번호 17), VL CDR2는 WAS (서열번호 18) 및 VL CDR3은 KQSYNLIT (서열번호 19)이다.



[300] [표1]  
항체 서열

클론	구분	Amino acid sequence	서열번호
2-2B3 W	VH	MDSRLNLVFLVLT <b>L</b> KG <b>V</b> KCEVQLVESGGGLV <b>K</b> PGGSL KLSCAAS <b>G</b> F <b>V</b> FSNYDMSWVRQTPEKRLEWVAY <b>I</b> <b>T</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>I</b> <b>S</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>M</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>E</b> DTAIYYCAR <b>W</b> V <b>Y</b> D <b>P</b> L <b>Y</b> A <b>M</b> D <b>Y</b> W <b>G</b> Q <b>G</b> T <b>S</b> V <b>T</b> V <b>S</b> S	20
	VL	M <b>E</b> T <b>D</b> T <b>L</b> L <b>L</b> W <b>V</b> L <b>L</b> L <b>L</b> W <b>V</b> P <b>G</b> S <b>T</b> G <b>D</b> I <b>L</b> L <b>T</b> Q <b>S</b> P <b>A</b> S <b>L</b> A <b>V</b> S <b>L</b> G <b>Q</b> R A <b>T</b> I <b>S</b> C <b>R</b> A <b>S</b> E <b>S</b> V <b>D</b> N <b>Y</b> G <b>I</b> S <b>F</b> M <b>N</b> W <b>F</b> Q <b>Q</b> K <b>P</b> G <b>Q</b> P <b>P</b> K <b>L</b> L <b>I</b> Y <b>A</b> A S <b>N</b> Q <b>G</b> S <b>G</b> V <b>P</b> A <b>R</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b> G <b>T</b> D <b>F</b> S <b>L</b> N <b>I</b> H <b>P</b> M <b>E</b> E <b>D</b> D <b>T</b> A <b>M</b> Y <b>F</b> C <b>Q</b> Q <b>S</b> K <b>E</b> V <b>P</b> W <b>T</b> F <b>G</b> G <b>G</b> T <b>K</b> L <b>E</b> I <b>K</b>	22
2-2B3R	VH	MDSRLNLVFLVLT <b>L</b> KG <b>V</b> KCEVQLVESGGGLV <b>K</b> PGGSL KLSCAAS <b>G</b> F <b>V</b> FSNYDMSWVRQTPEKRLEWVAY <b>I</b> <b>T</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>I</b> <b>S</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>M</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>E</b> DTAIYYC <b>A</b> R <b>R</b> V <b>Y</b> D <b>P</b> L <b>Y</b> A <b>M</b> D <b>Y</b> W <b>G</b> Q <b>G</b> T <b>S</b> V <b>T</b> V <b>S</b> S	21
	VL	M <b>E</b> T <b>D</b> T <b>L</b> L <b>L</b> W <b>V</b> L <b>L</b> L <b>L</b> W <b>V</b> P <b>G</b> S <b>T</b> G <b>D</b> I <b>L</b> L <b>T</b> Q <b>S</b> P <b>A</b> S <b>L</b> A <b>V</b> S <b>L</b> G <b>Q</b> R A <b>T</b> I <b>S</b> C <b>R</b> A <b>S</b> E <b>S</b> V <b>D</b> N <b>Y</b> G <b>I</b> S <b>F</b> M <b>N</b> W <b>F</b> Q <b>Q</b> K <b>P</b> G <b>Q</b> P <b>P</b> K <b>L</b> L <b>I</b> Y <b>A</b> A S <b>N</b> Q <b>G</b> S <b>G</b> V <b>P</b> A <b>R</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b> G <b>T</b> D <b>F</b> S <b>L</b> N <b>I</b> H <b>P</b> M <b>E</b> E <b>D</b> D <b>T</b> A <b>M</b> Y <b>F</b> C <b>Q</b> Q <b>S</b> K <b>E</b> V <b>P</b> W <b>T</b> F <b>G</b> G <b>G</b> T <b>K</b> L <b>E</b> I <b>K</b>	22
2-7C5	VH	MDSRLNLVFL <b>A</b> L <b>I</b> L <b>K</b> G <b>V</b> QCEVQLVESGGGLV <b>Q</b> PV <b>G</b> SL KLSCAAS <b>G</b> F <b>T</b> F <b>S</b> S <b>F</b> G <b>M</b> S <b>W</b> V <b>R</b> Q <b>T</b> P <b>D</b> K <b>R</b> L <b>E</b> L <b>V</b> A <b>T</b> I <b>Y</b> S <b>N</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>M</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>E</b> DTAMYYC <b>A</b> R <b>Y</b> Y <b>G</b> N <b>Y</b> G <b>G</b> Y <b>F</b> D <b>Y</b> W <b>G</b> Q <b>G</b> T <b>T</b> L <b>T</b> V <b>S</b> S	23
	VL	M <b>E</b> S <b>Q</b> T <b>Q</b> V <b>F</b> V <b>L</b> L <b>L</b> C <b>V</b> S <b>G</b> A <b>H</b> G <b>S</b> I <b>V</b> M <b>T</b> Q <b>T</b> P <b>K</b> F <b>L</b> L <b>V</b> S <b>A</b> G <b>D</b> R <b>V</b> T <b>I</b> T <b>C</b> K <b>A</b> S <b>Q</b> S <b>V</b> S <b>N</b> D <b>V</b> A <b>W</b> Y <b>Q</b> Q <b>K</b> P <b>G</b> Q <b>S</b> P <b>K</b> L <b>L</b> I <b>Y</b> Y <b>A</b> S <b>N</b> R <b>Y</b> T <b>G</b> A <b>P</b> D <b>R</b> F <b>T</b> G <b>S</b> G <b>Y</b> G <b>T</b> D <b>F</b> T <b>F</b> T <b>I</b> S <b>T</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> D <b>L</b> A <b>V</b> Y <b>F</b> C <b>Q</b> Q <b>D</b> Y <b>S</b> S <b>P</b> P <b>T</b> F <b>G</b> G <b>G</b> T <b>K</b> L <b>E</b> I <b>K</b>	24
4-8D4	VH	M <b>E</b> C <b>T</b> W <b>V</b> I <b>L</b> F <b>L</b> F <b>S</b> V <b>T</b> A <b>G</b> V <b>H</b> S <b>Q</b> V <b>Q</b> L <b>Q</b> Q <b>S</b> G <b>A</b> E <b>L</b> A <b>K</b> P <b>G</b> A <b>S</b> V K <b>M</b> S <b>C</b> K <b>A</b> S <b>G</b> Y <b>T</b> F <b>T</b> T <b>Y</b> W <b>I</b> H <b>W</b> V <b>K</b> Q <b>R</b> P <b>G</b> Q <b>G</b> L <b>E</b> W <b>I</b> G <b>Y</b> I <b>N</b> P <b>T</b> <b>T</b> G <b>Y</b> T <b>E</b> Y <b>N</b> Q <b>K</b> F <b>K</b> D <b>K</b> A <b>T</b> L <b>T</b> A <b>D</b> K <b>S</b> S <b>N</b> T <b>A</b> Y <b>M</b> Q <b>L</b> S <b>S</b> L <b>T</b> S <b>E</b> D <b>S</b> A <b>V</b> Y <b>Y</b> C <b>A</b> R <b>G</b> V <b>R</b> Y <b>Y</b> F <b>D</b> Y <b>W</b> G <b>K</b> G <b>T</b> L <b>T</b> V <b>S</b> S	25
	VL	M <b>G</b> F <b>K</b> M <b>E</b> S <b>Q</b> S <b>L</b> V <b>L</b> I <b>L</b> L <b>L</b> L <b>L</b> W <b>V</b> S <b>G</b> S <b>C</b> G <b>D</b> I <b>V</b> M <b>S</b> Q <b>S</b> P <b>S</b> S <b>L</b> A <b>V</b> S A <b>G</b> E <b>K</b> V <b>T</b> M <b>S</b> C <b>K</b> S <b>S</b> Q <b>S</b> L <b>L</b> D <b>S</b> R <b>T</b> R <b>K</b> N <b>Y</b> L <b>A</b> W <b>Y</b> Q <b>Q</b> K <b>P</b> G <b>Q</b> S P <b>K</b> L <b>L</b> I <b>Y</b> W <b>A</b> S <b>T</b> R <b>E</b> S <b>G</b> V <b>P</b> D <b>R</b> F <b>T</b> G <b>S</b> G <b>S</b> G <b>T</b> D <b>F</b> T <b>L</b> T <b>I</b> S <b>S</b> V <b>K</b> A <b>E</b> D <b>L</b> A <b>V</b> Y <b>L</b> C <b>K</b> Q <b>S</b> Y <b>N</b> L <b>I</b> T <b>F</b> G <b>A</b> G <b>T</b> K <b>L</b> E <b>L</b> K	26

[301] 시그널 펩타이드는 이탤릭체로 나타내었다. 각 클론의 VH CDR region 및 VL CDR region은 굵은 글씨체로 나타내었다.

[302] [표2]  
 핵산 서열

	Optimized Nucleotide sequence	서열번호
<b>2-2B3</b> <b>W-VH</b>	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTTGTCCTTACTTT AAAAGGTGTGAAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTTCGTTTTTCAGTAACTATGACATGTC TTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCATACATTACTATTGGTGGTGGTACCACCTACTATCCAG AACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAACACCCTGTACCTTCAAATGAACAGTCTGAAGTCT GAGGACACAGCCATATATACTGTGCAAGGTGGGTCTATG ATCCTCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC AGTCACCGTCTCCTCA	34
<b>2-2B3</b> <b>W-VL</b>	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTCCTGCTTCTCT GGGTTCAGGTTCCACAGGTGACATTTTGCTGACCCAATCT CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCA TCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATAATTATGGCAT TAGTTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCA CCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGATCCG GGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA CTTCAGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACT GCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA	36
<b>2-2B3</b> <b>R-VH</b>	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTTGTCCTTACTTT AAAAGGTGTGAAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTTCGTTTTTCAGTAACTATGACATGTC TTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCATACATTACTATTGGTGGTGGTACCACCTACTATCCAG AACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAACACCCTGTACCTTCAAATGAACAGTCTGAAGTCT GAGGACACAGCCATATATACTGTGCAAGGCGGGTCTATG ATCCTCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC AGTCACCGTCTCCTCA	35

<p><b>2-2B3</b> <b>R-VL</b></p>	<p>ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTCCTGCTTCTCT GGGTTCCAGGTTCCACAGGTGACATTTTGCTGACCCAATCT CCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCA TCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGGCAT TAGTTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCA CCCAAACCTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGATCCG GGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA CTTCAGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACT GCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA</p>	<p>36</p>
<p><b>2-7C5-</b> <b>VH</b></p>	<p>ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGCCCTTATTTT AAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG GGAGGCTTAGTGCAGCCTGTAGGGTCCCTGAAACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTTTGGCATGTCT TGGGTTCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCCG CAACCATTTATAGTAATGGTGATTACACCTATTATCCAGAC AGTGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAATGCCA AGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGA GGACACAGCCATGTACTGTGCAAGGTACTATGGTAAC TACGGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC TCACAGTCTCCTCA</p>	<p>37</p>
<p><b>2-7C5-</b> <b>VL</b></p>	<p>ATGGAGTCACAGACCCAGGTCTTTGTATTTCTACTGCTCTG TGTGTCTGGTGCTCATGGGAGTATTGTGATGACCCAGACT CCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGGTTACCA TAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGC TTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAATTGCTG ATATACTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGCCCCTGATC GCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTCAC CATCAGCACTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTT TGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCTCCGACATTCGGTGGAG GCACCAAGCTGGAAATCAA</p>	<p>38</p>
<p><b>4-8D4-</b> <b>VH</b></p>	<p>ATGGAATGCACCTGGGTCATTCTTCTCCTGTTTTTCAGTAAC TGCAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGG GCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCT GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTACCTACTGGATTAC TGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTGGAATGGATT GGATACATTAATCCTACCACTGGTTATACTGAATACAATC</p>	<p>39</p>

	AGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAT CCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATC TGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAGTACGG TACTACTTTGACTACTGGGGCAAAGGCACCACTCTCACAG TCTCCTCA	
<b>4-8D4-VL</b>	ATGGGCTTCAAGATGGAGTCACAGTCTCTGGTTCTTATATT GCTGCTGCTATGGGTATCTGGTTCCTGTGGGGACATTGTGA TGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGA GAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTC GACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGC AGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGC ATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATCTCTGCAAGCAATC TTATAATCTGATCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAG CTGAAA	40

[303] 실시예 4. 인간화 항체 제조

[304] 상기 실시예 1 내지 3의 결과로부터 클론 2-2B3W, 2-2B3R, 2-7C5 및 4-8D4에 대한 인간화 항체인 2B3W, 2B3R, 7C5 및 8D4를 제작하였다. 제작된 인간화 항체의 서열을 분석한 결과는 표 3에 나타내었다.

[305] 2B3W의 경우, 서열번호 27의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFVFSNYD(서열번호 1), VH CDR2는 ITIGGGTT (서열번호 2), VH CDR3은 ARWVYDPLYAMDY(서열번호 3), VL CDR1은 ESDVNYGISF(서열번호 5), VL CDR2는 AAS(서열번호 6) 및 VL CDR3은 QQSKEVPWT(서열번호 7)이고;

[306] 2B3R의 경우, 서열번호 28의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFVFSNYD (서열번호 1), VH CDR2는 ITIGGGTT (서열번호 2), VH CDR3은 ARVYDPLYAMDY (서열번호 4), VL CDR1은 ESDVNYGISF (서열번호 5), VL CDR2는 AAS (서열번호 6) 및 VL CDR3은 QQSKEVPWT (서열번호 7)이고;

[307] 7C5의 경우, 서열번호 30의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 31의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFTFSSFSG (서열번호 8), VH CDR2는 IYSNGDYT (서열번호 9), VH CDR3은 ARYYGNYGGYFDY (서열번호 10), VL CDR1은 QSVSNDVA (서열번호 11), VL CDR2는 YAS (서열번호 12) 및 VL CDR3은 QQDYSSPPT (서열번호 13)이고;

[308] 8D4의 경우, 서열번호 32의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 33의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GYTFTTYW (서열번호 14), VH CDR2는

INPTTGYT (서열번호 15), VH CDR3은 ARGVRYYFDY (서열번호 16), VL CDR1은 QSLDSRTRKNY (서열번호 17), VL CDR2는 WAS (서열번호 18) 및 VL CDR3은 KQSYNLIT (서열번호 19)이다.

[309] [표3]  
인간화 항체 서열

클론	구분	Amino acid sequence	서열 번호
2B3W	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <b>FVFSNYDMSW</b> VRQAPGKGLEWVA <b>YITIGGGTTY</b> YPDTVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>CARWVYDPLYAMD</b> YWGQGT <b>TVTVSS</b>	27
	VL	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASE <b>SVDNYGISFMN</b> WFLQKPGQPPQLLIYAASNQGS <b>GV</b> PDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC <b>QQSKEVPWTF</b> GQG <b>TKVEIK</b>	29
2B3R	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <b>FVFSNYDMSW</b> VRQAPGKGLEWVA <b>YITIGGGTTY</b> YPDTVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>CARRVYDPLYAMD</b> YWGQGT <b>TVTVSS</b>	28
	VL	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASE <b>SVDNYGISFMN</b> WFLQKPGQPPQLLIYAASNQGS <b>GV</b> PDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC <b>QQSKEVPWTF</b> GQG <b>TKVEIK</b>	29
2B3W-T1 4-05	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <b>FVFSNYDMSW</b> VRQAPGKGLEWVA <b>YITIGGGTTY</b> YPDTVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>CARWRVYDPLFAMD</b> YWGQGT <b>TVTVSS</b>	48
	VL	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASE <b>SVTDYGISFMN</b> WFLQKPGQPPQLLIYAASNQGS <b>GV</b> PDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC <b>QQSKEVPWTF</b> GQG <b>TKVEIK</b>	49
7C5	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG <b>FTFSSFGMSWV</b> RQAPGKGLELVATI <b>YSNGDY</b> TYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>ARYYGNYGGYFDY</b> WGQGT <b>LVTVSS</b>	30
	VL	AIQMTQSPSSLSASV <b>GDRVTITCKASQSVSNDVAWYQ</b> QKPGKAPKLLI <b>YAS</b> NR <b>Y</b> TGVPSR <b>FSGSGSGTDFTLTIS</b> SLQPEDFATYYC <b>QQDYSSPPTF</b> GGG <b>TKVEIK</b>	31
7C5-T15- 01	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG <b>FTFSSFGMSWV</b> RQAPGKGLELVATI <b>YSNGDY</b> TYYPDSVKGRFTVSRDN	50

		AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNYGGYFDY WGQGLVTVSS	
	<b>VL</b>	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>WDDL</u> TWYQ QKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQDYSSPPT</u> FGGGTKVEIK	51
<b>8D4</b>	<b>VH</b>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWIHW VRQAPGQGLEWIGYIN <u>PTT</u> GYTEYNQKFKDRATLTA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWG KGTTVTVSS	32
	<b>VL</b>	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC <u>KQSYNLIT</u> FGQGKLEIK	33
<b>8D4-T16-01</b>	<b>VH</b>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWIHW VRQAPGQGLEWIGYIN <u>PTT</u> GYTEYNQKFKDRATLTA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWG KGTTVTVSS	52
	<b>VL</b>	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC <u>KQSYNLIT</u> FGQGKLEIK	53
<b>8D4-T16-02</b>	<b>VH</b>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWIHW VRQAPGQGLEWIGYIN <u>PTT</u> GYTEYNQKFKDRATLTA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWG KGTTVTVSS	54
	<b>VL</b>	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC <u>QQQYDPPIT</u> FGQGKLEIK	55

[310] 각 클론의 VH CDR region 및 VL CDR region은 굵은 글씨체로 나타내었다. 각 클론의 엔지니어링된 아미노산 잔기는 밑줄로 나타내었다.



[311] [표4]  
 핵산 서열

	Optimized Nucleotide sequence	서열 번호
<b>2B3W -VH</b>	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC GTGTTCACTACGACATGAGCTGGGTGAGGCAGGCC CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTACATCACCATCGG CGGCGGCACCACCTACTACCCCGACACCGTGAAGGGCAGG TTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCT GCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGTGGGTGTACGACCCCTGTACGCCATGGA CACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC	41
<b>2B3W -VL</b>	GACATCGTGCTGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGAC CCCC GGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGGCCAGCGAG AGCGTGGACA ACTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCCT GCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAGCTGCTGATCTACGCCG CCAGCAACCAGGGCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTCAGCGG CAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGG GTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCCAGCAGA GCAAGGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGT GGAGATCAAG	43
<b>2B3R- VH</b>	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC GTGTTCACTACGACATGAGCTGGGTGAGGCAGGCC CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTACATCACCATCGG CGGCGGCACCACCTACTACCCCGACACCGTGAAGGGCAGG TTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCT GCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGAGGGTGTACGACCCCTGTACGCCATGGA CACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC	42
<b>2B3R- VL</b>	GACATCGTGCTGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGAC CCCC GGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGGCCAGCGAG AGCGTGGACA ACTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCCT GCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAGCTGCTGATCTACGCCG CCAGCAACCAGGGCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTCAGCGG	43

	CAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGG GTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCCAGCAGA GCAAGGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGT GGAGATCAAG	
<b>7C5-V H</b>	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGAAGC CCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCAGCTTCGGCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC CGGCAAGGGCCTGGAGCTGGTGGCCACCATCTACAGCAAC GGCGACTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGGT TCACCGTGAGCAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCT GCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGTACTACGGCAACTACGGCGGCTACTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC	44
<b>7C5-V L</b>	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCA GAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCAAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCAACA GGTACACCGGCGTGCCAGCAGGTTACAGCGGCAGCGGCAG CGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCG AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACTACAGCAGC CCCCCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG	45
<b>8D4-V H</b>	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGC CCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTA CACCTTCACCACCTACTGGATCCACTGGGTGAGGCAGGCC CCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCACC ACCGGCTACACCGAGTACAACCAGAAGTTCAAGGACAGGG CCACCCTGACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGGCGTGAGGTACTACTTCGACTACTGGGG CAAGGGCACCCCGTGACCGTGAGCAGC	46
<b>8D4-V L</b>	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGA GCCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCA GAGCCTGCTGGACAGCAGGACCAGGAAGAATACTGACC TGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGAT CTACTGGGCCAGCACCCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGG TTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT CAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGC	47

	AAGCAGAGCTACAACCTGATCACCTTCGGCCAGGGCACCA AGCTGGAGATCAAG	
--	--	--

[312] 실시에 5. 특성 분석

[313] 도 7에서와 같이 3개의 인간화 항체는 Expi293 transient expression system을 사용하여 인간화 항체를 생산 및 정제하였고 SDS-PAGE (7a)와 ELISA 방법에 의하여 정제된 각 인간화 항체의 정량적 결합력을 분석하였고 이중 2B3R clone은 결합력을 나타내지 않았다. ELISA는 도 3의 실시예와 유사한 방법으로 실시하였으며 항체는 각 500ng 농도부터 1/2 serial dilution하여 처리하였다. 인간화 후보항체의 순도와 결합력은 SEC-HPLC, SPR (7b)에 의해 그 특성을 분석하였고 양성 대조군으로 경쟁사 Keytruda 항체와 비교하였다. 또한 정제된 각 인간화 항체는 인간 PD-1을 발현하는 293 세포에 결합시켜 flow cytometry에 의해 분석한 결과 3개의 인간화 항체 2B3W, 7C5 및 8D4에서 높은 결합력을 나타냄으로써 이 후 in vivo, 항암 효능 분석을 위한 후보 항체로 선별하였다.

[314]

[315] 실시에 6. 후보 항체의 In vivo 효능 분석

[316] 본 발명자들은 상기 실시예 5에서 선별된 인간화 항체 2B3W, 7C5 및 8D4 후보 항체의 In vivo 효능을 분석하였다.

[317] 간략하게는 다음과 같다: 인간화 후보항체의 in vivo 효능 분석을 위하여 hPD-1을 발현하는 C57BL/6 knock-in mice에 hPD-L1을 발현하는 MC38 암 세포주(mouse colon cancer)로 종양모델을 만들어서 항암 효능 및 혈청 내 간독성에 대한 마커를 측정하였다. 인간화 후보항체 2B3W, 7C5, 8D4를 10 mg/kg 농도로 3일 간격으로 5회 투여하였고 각 인간화 항체당 5마리를 그룹으로 하였다.

[318] 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, 각 그룹에서 개체별로 tumor size를 측정했을 때, 경쟁사 항체인 keytruda와 유사하게 모든 후보 항체의 투여에서 현저하게 암 성장이 억제되었다. 이를 각 그룹별로 그 결과값의 평균 값을 그래프화하였다. 종양내 TIL (tumor infiltrated lymphocyte) 분석은 종양이 거의 제거되어 분석할 수 없었다.

[319] 또한, 도 8b에 나타낸 바와 같이, 실험 종료와 동시에 각 그룹의 동물로부터 혈액을 채취하여 간 독성 여부를 분석하였고, 본 발명의 항체 처리군에서 간독성의 증상은 관찰할 수 없었다.

[320] 상기 데이터들은 본 발명의 인간화 후보항체 2B3W, 7C5 및 8D4가 탁월한 항암 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 간독성이 없이 생체에 안전함을 확인할 수 있었다.

[321]

[322] 실시에 7. 후보 항체의 gene engineering 평가

[323] 본 발명자들은 상기 실시예 5에서 선별된 인간화 항체 2B3W, 7C5 및 8D4 후보 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키기 위해 gene engineering을 실시하여, 각

후보항체들을 얻었다. 각 항체의 특성을 SDS-PAGE, SEC-HPLC 및 SPR 분석하여 양성 대조군인 keytruda와 비교하였다.

- [324] 그 결과, 도 9a에 나타낸 바와 같이, 2B3W의 친화도가 개선된 5 개 클론(clones)의 항체 T14-01, T14-02, T14-03, T14-04 및 T14-05를 획득하였고, 양성 대조군인 keytruda (9nM)와 비교하였을 때, 2B3W로부터 친화도 개선된 T14-05 (5.8nM)의 경우, 항원 친화도가 keytruda보다 높은 것으로 나타났다.
- [325] 또한, 도 9b에 나타낸 바와 같이, 7C5의 친화도가 개선된 5 개 클론의 항체 T15-01, T15-02, T15-03, T15-04 및 T15-05를 획득하였고, 양성 대조군인 keytruda (9nM)와 비교하였을 때, 7C5로부터 친화도 개선된 T15-01 (9.7nM)의 경우, 항원 친화도가 keytruda와 유사한 항원 결합력을 가진 것으로 나타났다.
- [326] 반면, 도 9c에 나타낸 바와 같이, 8D4의 친화도가 개선된 2 개 클론의 항체 T16-01 및 T1-02를 획득하였고, 양성 대조군인 keytruda (9nM)와 비교하였을 때, 이들의 항원 친화도는 개선되지 않은 것으로 나타났다.
- [327] 상기와 같이 제조된 인간화 항체의 gene engineering 된 항체들의 서열은 상기 표 3에 함께 나타내었다.
- [328] 또한, 도 9d에 나타낸 바와 같이, 친화도 개선된 후보 항체중에서 선별된 T14-05(5.8nM)와 T15-01(9.7nM) 항체를 경쟁사 항체 Keytruda(9nM)와 최종 비교한 SEC-HPLC-순도와 SPR-친화도를 나타내었다.
- [329] 상기 결과로부터 항원 친화도가 높다고 판단된 클론 2B3W-T14-05(T14-05) 및 7C5-T15-01(T15-01)을 추가적으로 선별하였다.
- [330]
- [331] 실시예 8. 후보 항체의 목적 세포에 대한 결합력 평가
- [332] 본 발명자들은 상기 실시예들에서 선별된 인간화 항체 2B3W, 7C5, 8D4, T14-05 및 T15-01의 hPD-1-과발현 세포에 대한 결합력을 flow cytometry로 분석하였다.
- [333] 그 결과, 도 10a에 나타낸 바와 같이, 모든 후보 항체들은 세포 표면에 발현되는 hPD-1에 대하여 우수한 결합력을 보였다.
- [334] 또한, 도 10b에 나타낸 바와 같이, 인간 혈액으로부터 분리한 activated hCD8 T 세포에서 후보 항체의 결합력을 flow cytometry로 분석했을 때, 각 클론마다 결합력의 비율적 차이를 보였으며 T14-05와 T15-01 항체가 상대적으로 높은 결합력을 나타냈다.
- [335]
- [336] 실시예 9. 후보 항체의 PD-1/PD-L1 세포 기반 blockade assay 평가 및 서열 분석
- [337] 본 발명자들은, 상기 실시예들에서 선별된 인간화 항체 2B3W, 7C5, 8D4, T14-05 및 T15-01이, hPD-1을 발현하는 effector 세포와 그 receptor인 hPD-L1을 발현하는 APC 세포와의 결합을 저해할 수 있는 지에 대해 세포 수준에서 분석하였다.
- [338] 상기 실험은 PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay (Promega) kit을 사용하였으며 인간 PD-1을 발현하고 luciferase reporter를 가지는 Jurkat Effector cells과 인간 PD-L1을

발현하는 CHO-K1 aAPC를 co-culture하였을 때, 후보항체 처리시 항체가 hPD-1에 결합하여 hPD-L1과의 결합을 block하면 TCR signal이 activation됨으로써 luciferase 발현 정도를 측정할 수 있는 방법을 사용하였다. 각 후보 항체와 친화도 개선된 후보 항체들을 비교하였다.

- [339] 그 결과, 도 11a 및 11b에 나타낸 바와 같이, PD-L1에 대한 후보 항체의 PD-1의 blocking effect는 T14-05와 T15-01 항체에서 양성 대조군인 keytruda와 유사한 효능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [340] 이에, 상기 결과를 기반으로 하여 클론 T14-05 및 T15-01을 최종 후보 항체로 선별하고 시퀀싱하였다. 상기 클론 T14-05 및 T15-01의 서열을 분석한 결과는 상기 표 3에 함께 나타내었다.
- [341] 2B3W로부터 친화도 개선된 T14-05(2B3W-T14-05)의 경우, 서열번호 48의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 49의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFVFSNYD (서열번호 1), VH CDR2는 ITIGGGTT (서열번호 2), VH CDR3은 ARWRYDPLFAMDYW (서열번호 56), VL CDR1은 ESVTDYGISFMN (서열번호 57), VL CDR2는 AAS (서열번호 6) 및 VL CDR3은 QQSKEVPWT (서열번호 7)이고;
- [342] 7C5로부터 친화도 개선된 T15-01(7C5-T15-01)의 경우, 서열번호 50의 중쇄 가변영역(VH) 및 서열번호 51의 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고; VH CDR1은 GFTFSSFG (서열번호 8), VH CDR2는 IYSNGDYT (서열번호 9), VH CDR3은 ARYYGNYGGYFDY (서열번호 10), VL CDR1은 QSVWDDLT (서열번호 58), VL CDR2는 YAS (서열번호 12) 및 VL CDR3은 QQDYSSPPT (서열번호 13)이다.
- [343] 도 12a에 나타낸 바와 같이, 각 CDR region은 굵은 글씨체로 표기하였고, 친화도 개선을 위하여 sequence engineering된 서열은 밑줄로 표기하였다. 후보 항체 T14-05는 VH의 CDR3에서 2개의 아미노산이 바뀐 T14-04의 VH 서열과 동일하고 VL은 CDR1에서 2개의 아미노산이 바뀌었다.
- [344] 또한, 도 12b에 나타낸 바와 같이, 각 CDR region은 굵은 글씨체로 표기하였고, 친화도 개선을 위하여 sequence engineering된 서열은 밑줄로 표기하였다. 후보 항체 T15-01은 7C5의 VH sequence는 동일하고 VL의 CDR1에서 4개의 아미노산이 바뀌었다.
- [345] 또한, 도 12c에 나타낸 바와 같이, 각 CDR region은 굵은 글씨체로 표기하였고, 친화도 개선을 위하여 sequence engineering된 서열은 밑줄로 표기하여, 8D4 및 이의 클론 T16-01 및 T16-02 서열을 분석한 결과를 나타내었다.
- [346] 또한, 도 12d에 나타낸 바와 같이, 최종 선별된 T14-05와 T15-01의 아미노산 서열을, 양성 대조군인 keytruda 아미노산 서열과 비교한 결과, 각 CDR region을 포함하여 서로 상이한 서열을 갖는 신규한 항체임을 확인하였다. 항체는 인간 IgG4 isotype의 힌지 부분을 항체 구조의 안정화를 증가할 수 있는 CPPCP 아미노산 서열을 사용하였다.
- [347]

[348] 실시에 10. 후보 항체의 중간 Cross-Reactivity 분석

[349] 본 발명자들은, 상기 실시예들에서 최종 선별된 인간화 항체 T14-05 및 T15-01의 human, monkey (cynomolgus, rhesus), canine, mouse에서의 결합력을 각 종의 PD-1 항원을 이용하여 ELISA로 분석하였다.

[350] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 최종 선별된 T14-05와 T15-01 두 인간화 후보 항체는 monkey에 cross-reactivity를 가지며, canine과 mouse에서는 결합력을 가지지 않았다.

[351]

[352] 실시에 11. 최종 후보 항체의 *In vivo* 효능 분석

[353] 본 발명자들은 상기 실시예들에서 확인된 바와 같이 친화도가 개선된 인간화 후보 항체 중에서도 양성 대조군인 keytruda (9nM)보다 친화도가 높은 것으로 나타난 T14-05 (5.8nM)를 대표적 항체로 이용하여 *in vivo* 항암 효능을 분석하였다.

[354] *In vivo* 효능 분석을 위하여 hPD-1을 발현하는 C57BL/6 knock-in mice에 hPD-L1을 발현하는 mouse colon cancer MC38 세포주를  $1 \times 10^6$  cells/mouse 투여하여 종양모델을 만들고 항암 효능을 분석하였다. T14-05 항체(EU135-T14.05)는 1 mg/kg, 3 mg/kg, 및 5 mg/kg의 3 종류의 농도를 3일간격으로 6회 투여하였고 각 항체 투여 농도당 6마리를 그룹하였다. 양성 대조군으로 경쟁사 항체인 Keytruda를 5 mg/kg 농도로 투여하여 비교 분석하였다. Tumor size 측정은 1차 투여 일부터 일주일에 2번씩 측정하였다. 마우스의 종양 크기 100~150mm<sup>3</sup>에서 평균 사이즈를 기초하여 각 그룹을 나누었고 마우스 개체별 숫자 꼬리표식을 만들어서 항체 투여에 따른 종양 크기를 추적하였다.

[355] 그 결과, 도 14a에 나타낸 바와 같이, 각 그룹에서 개체별로 tumor size를 분석했을 때, 모든 항체 투여 군에서 종양 성장율은 2차 항체 투여 후부터 지연되기 시작하였고 3차 항체 투여 후에는 종양 크기의 감소 및 괴사 현상이 시작되면서 현저하게 암 성장이 억제되는 현상을 관찰하였다. 이러한 항암 효능은 항체의 농도에 따라 정도의 차이를 나타냈다.

[356] 또한, 각 그룹에서 종양 크기 결과값의 평균값을 그래프화하였다. 그 결과, 도 14b에 나타낸 바와 같이, 대조군 PBS의 지속적인 종양 성장과 비교하여 항체 투여 군에서는 암 성장의 감소를 나타냈으며, 특히, 5 mg/kg 농도 투여 군에서는 경쟁사 항체인 keytruda보다 더 좋은 항암 효과를 나타냈다. 또한, T14-05 투여 군에서는 항체 투여 농도에 의존하여 항암 효능을 나타냈다.

[357] 또한, 3차 항체 투여 후 각 그룹의 모든 개체로부터 혈액을 채취하여 마우스 CD4와 CD8 T 세포의 분포율을 조사하였다. 100ul 안와 채혈된 혈액은 1:1 비율로 100ul PBS를 첨가하여 희석하였고 이를 100ul Ficoll 위에 올려 원심 분리함으로써 밀도 구배에 의한 PBMC를 분리하였다. 분리된 PBMC는 마우스 CD45, 마우스 CD8, 그리고 마우스 CD4 항체를 사용하여 그 비율을 flow

cytometry로 분석하였다.

[358] 그 결과, 도 14c에 나타낸 바와 같이, PBS 투여 대조군(G1)과 비교하였을 때, 항체를 투여한 모든 그룹에서 암세포 사멸을 위한 마우스 CD8 T 세포 비율은 증가한 반면, 마우스 CD4 T 세포 비율은 감소하였다.

[359] 상기 결과로 항체 투여군에서 면역 살해 세포인 CD8 T 세포의 증가로 인하여 항암 효능이 나타나는 것을 의미할 수 있다.

[360]

[361] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 청구범위

- [청구항 1] 다음을 포함하는 PD-1 (Programmed cell death protein 1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편:  
 서열번호 1, 8 및 14로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,  
 서열번호 2, 9 및 15로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,  
 서열번호 3, 4, 10, 16 및 56으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,  
 서열번호 5, 11, 17, 57 및 58로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,  
 서열번호 6, 12 및 18로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및  
 서열번호 7, 13 및 19으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은,  
 (i) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;  
 (ii) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 4의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;  
 (iii) 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 11의 경쇄 CDR1, 서열번호 12의 경쇄 CDR2 및 서열번호 13의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;  
 (iv) 서열번호 14의 중쇄 CDR1, 서열번호 15의 중쇄 CDR2 및 서열번호 16의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 17의 경쇄 CDR1, 서열번호 18의 경쇄 CDR2 및 서열번호 19의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;  
 (v) 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 56의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 57의 경쇄 CDR1, 서열번호 6의 경쇄 CDR2 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는



(vi) 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2 및 서열번호 10의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 58의 경쇄 CDR1, 서열번호 12의 경쇄 CDR2 및 서열번호 13의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;

을 포함하는,

항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 3]

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은,

서열번호 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 48 및 50으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 4]

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은,

서열번호 22, 24, 26, 29, 31, 33, 49, 51, 54 및 55로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은,

서열번호 20의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 21의 중쇄 가변영역 및 서열번호 22의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 23의 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 25의 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 27의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 28의 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 30의 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 32의 중쇄 가변영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 48의 중쇄 가변영역 및 서열번호 49의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 50의 중쇄 가변영역 및 서열번호 51의 경쇄 가변영역;  
 서열번호 52의 중쇄 가변영역 및 서열번호 53의 경쇄 가변영역; 또는  
 서열번호 54의 중쇄 가변영역 및 서열번호 55의 경쇄 가변영역;

을 포함하는,

항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 6]

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은, 단쇄 Fvs (scFv), 단쇄 항체, Fab, F(ab'), 다이설파이드-결합 Fvs (sdFv)을 포함하는,

항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 7]

제6항에 있어서,

상기 scFv는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 링커를 통해 연결된 것을

- 특징으로 하는,  
항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 9] 제8항의 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 10] 제9항의 재조합 발현벡터로 형질감염된 숙주세포.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080인 숙주세포.
- [청구항 12] 제10항의 숙주세포를 배양하여 항체를 생성하는 단계; 및 생성된 항체를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편의 제조방법.
- [청구항 13] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 파트너로 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 15] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체의 scFv 및 면역세포 활성화 항원에 결합하는 항체의 scFv를 하나 이상 포함하는, 면역세포 인게이징(immune cell engage) 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 면역세포 활성화 항원은 다음에 해당하는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체:  
T 세포 활성화 항원으로 CD3, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$ , TCR $\xi$ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226;  
NK세포 활성화 항원으로 NKp30, NKp40, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM1, DAP10, CD16 (CD16a 또는 CD16b), CRTAM, CD27, PSGL1, CD96, CD100 (SEMA4D), NKp80, CD244 (SLAMF4 또는 2B4), SLAMF6, SLAMF7, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DS1, CD94, NKG2C, NKG2E 또는 CD160;  
B세포 활성화 항원으로 OX40, CD40 또는 CD70;  
대식세포 활성화 항원으로 CD2 아고니스트, CD40, CD70, TCR (Toll-like Receptor) 아고니스트, CD47, STING 또는 OX40L; 또는

수지상세포 활성화 항원은 CD2 아고니스트, OX40, OX40L, 41BB 아고니스트, TCR 아고니스트, CD47 아고니스트, 또는 STING 아고니스트.

- [청구항 17] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편이 약물에 결합된 항체-약물 접합체 (ADC).
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 약물은 마이탄시노이드, 오리스타틴 (MMAE, MMAF 포함), 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 탈리소마이신, 캄포토제신, N8-아세틸 스퍼미딘, 1-(2-클로로에틸)-1,2-다이메틸 술폰닐 하이드라자이드, 에스퍼라마이신, 에토포사이드, 6-머캅토피린, 돌라스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 탁솔(taxol), 탁산, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메토틀렉세이트, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 A, 미토마이신 C, 클로람부실, 듀오카마이신, L-아스파라기나제(L-asparaginase), 머캅토피린(mercaptopyurine), 티오구아닌(thioguanine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 시타라빈(cytarabine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 니트로소우레아(nitrosourea), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 미토마이신(mitomycin), 다카바진(dacarbazine), 프로카바진(procarbazine), 토포테칸(topotecan), 질소 머스터드(nitrogen mustard), 사이톡산(cytosan), 에토포시드(etoposide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), CNU(bischloroethylnitrosourea), 이리노테칸(irinotecan), 캄포토테신(camptothecin), 블레오마이신(bleomycin), 이다루비신(idarubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(plicamycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 아스파라기나제(asparaginase), 비노렐빈(vinorelbine), 클로로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 부셀판(busulfan), 트레오설판(treosulfan), 데카바진(decarbazine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 9-아미노캄포토테신(9-aminocamptothecin), 크리스나톨(crisnatol), 미토마이신 C(mitomycin C), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 티아조퓨린(tiazofurin), 리바비린(ribavirin), EICAR(5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 데프록사민(deferoxamine), 플록수리딘(floxuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 랄티트렉세드(raltitrexed), 시타라빈(cytarabine(ara C)), 시토신

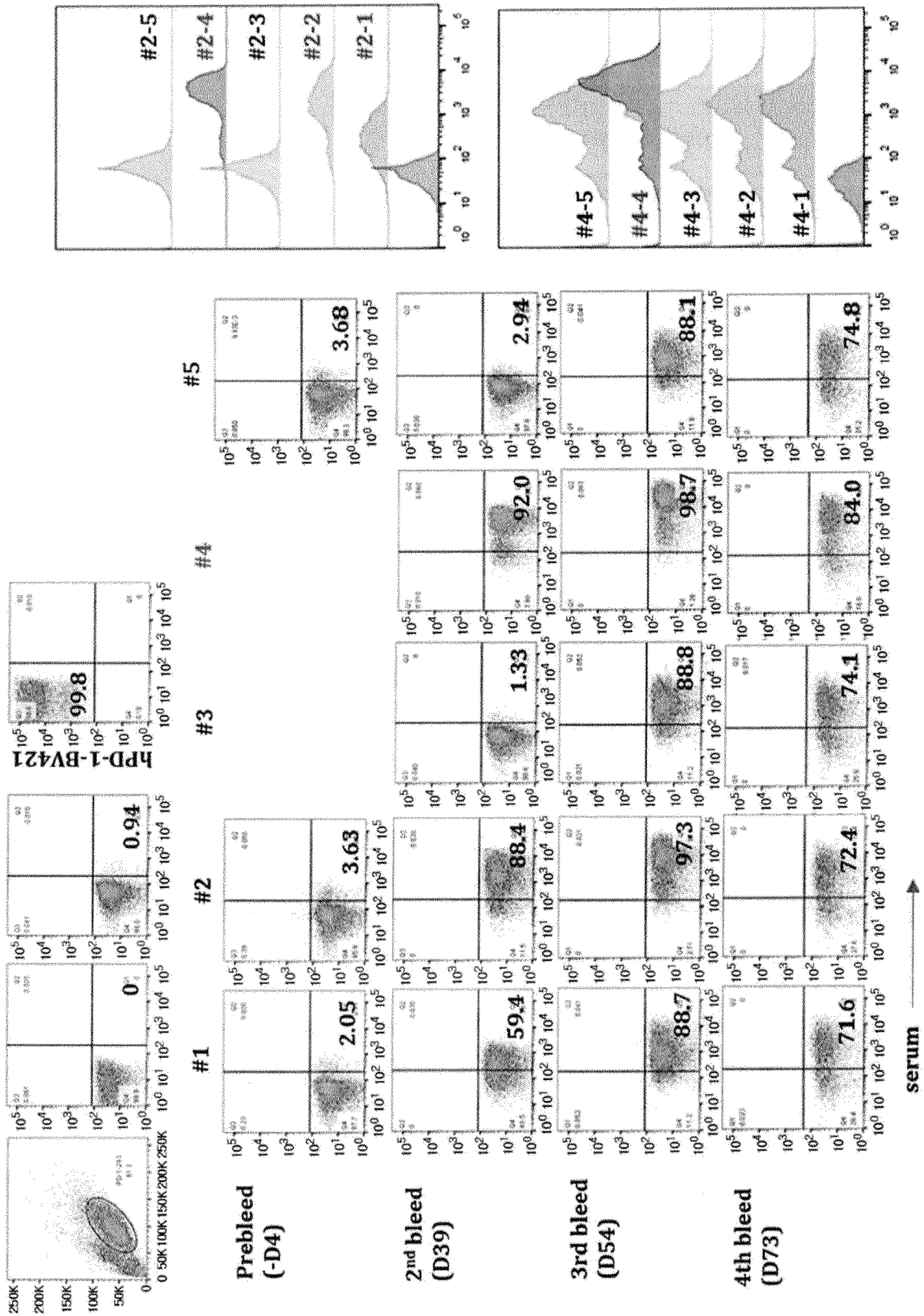
아라비노시드(cytosine arabinoside), 플루다라빈(fludarabine),  
 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 메게스트롤(megestrol),  
 고세렐린(goserelin), 류프롤리드 아세 테이트(leuprolide acetate),  
 플루타미드(flutamide), 바이칼루타마이드(bicalutamide), EB1089, CB1093,  
 KH1060, 베르테포르핀(verteporfin), 프탈로시아닌(phthalocyanine),  
 광감작제 Pe4(photosensitizer Pe4), 데메톡시-하이포크레린  
 A(demethoxy-hypocrellin A), 인터페론- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ ),  
 인터페론- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ ), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor),  
 겐사이타빈(Gemcitabine), 벨케이드(velcade), 레발미드(revamid),  
 탈라미드(thalamid), 로바스타틴(lovastatin), 1-메틸-4-페닐피리디늄  
 이온(1-methyl-4-phenylpyridiniumion), 스타우로스포르린(staurosporine),  
 악티노마이신 D(actinomycin D), 닥티노마이신(dactinomycin),  
 블레오마이신 A2(bleomycin A2), 블레오마이신 B2(bleomycinB2),  
 페플로마이신(peplomycin), 에피루비신(epirubicin),  
 피라루비신(pirarubicin), 조루비신(zorubicin), 마이토산트론(mitoxantrone),  
 베라파밀(verapamil) 및 탐시가르긴(thapsigargin), 핵산 분해 효소 및  
 세균이나 동식물 유래의 독소로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을  
 특징으로 하는 항체-약물 접합체.

- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은 약물과 링커를  
 통하여 결합되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커인 것을  
 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 절단성 링커는 산성 불안정 링커 (acid-labile  
 linker), 이황화 링커, 펩타이드 링커, 또는 베타-글루쿠로나이드  
 (beta-glucuronide) 링커이고, 또는 상기 비절단성 링커는 티오에테르기  
 또는 말레이미도카프로일기를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체-약물  
 접합체.
- [청구항 22] 제19항에 있어서, 상기 링커는 항체의 이황화 결합 환원시 노출되는  
 시스테인 잔기 또는 항체에 결합된 태그에 존재하는 시스테인 잔기에  
 결합되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 23] 항원 결합 부위를 포함하는 세포외도메인, 트랜스 멤브레인 도메인 및  
 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로, 상기  
 세포외도메인의 항원 결합 부위는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른  
 항체의 scFv인 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체.
- [청구항 24] 제23항에 따른 키메라 항원 수용체(CAR)가 도입되어 있는 면역세포.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine  
 Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T  
 Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포

- (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 면역세포.
- [청구항 26] 제23항에 있어서, 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv가 세포외도메인의 항원 결합 부위로 포함된 키메라 항원 수용체(CAR)가 추가로 도입되어 있는 면역세포.
- [청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 타겟하는 항체 또는 이의 항원 결합단편인 면역세포.
- [청구항 28] 제24항의 면역세포 및 항-PD-1 항체 이외의 약물을 포함하는 병용 치료용 조성물.
- [청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 약물은 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 타겟하는 항체 또는 이의 항원 결합단편인 조성물.
- [청구항 30] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편과 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물:
- (i) 면역세포;
  - (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv를 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
  - (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 면역세포는 T 세포, NK 세포, 사이토카인 유도 살해세포(Cytokine Induced Killer cell, CIK), 활성화 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL), 마크로파지, 종양 조직 내 침투 T 세포 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL), 수지상세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 조성물.
- [청구항 32] 제30항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR,

- HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 타겟하는 항체 또는 이의 항원 결합단편인 조성물.
- [청구항 33] 제30항에 있어서, 상기 면역관문억제제는 TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, 또는 CD200R를 타겟으로 하는 약물인 조성물.
- [청구항 34] 제13항에 따른 이중특이적 또는 다중특이적 항체 및 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 병용 치료용 조성물:
- (i) 면역세포;
- (ii) 항-PD-1 항체 이외의 항체에 대한 scFv 단편을 세포외도메인으로 포함하는 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역세포; 및
- (iii) 면역관문억제제 (Immune checkpoint inhibitor).
- [청구항 35] 제34항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체 이외의 항체는 FGFR3, TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), VISTA, CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200, CD200R, 트랜스페린 수용체 (Transferrin receptor), c-Met, EGFR, HER2, KDR, PDGFRa, NRP1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 타겟하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 조성물.
- [청구항 36] 제34항에 있어서, 상기 면역관문억제제는 TIGIT, PD-L1, BTLA, CTLA-4, VISTA, LAG3, TIM3, CD137(4-1BB), CD258(LIGHT), MARCO, CD134(OX40), CD28, CD278(ICOS), CD27, CD154(CD40L), CD357(GITR), CD30, DR3, CD226(DNAM1), CD96, CD200 또는 CD200R 를 타겟으로 하는 약물인 조성물.
- [청구항 37] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 또는 다중특이적 항체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역세포를 포함하는 암 치료용 조성물.

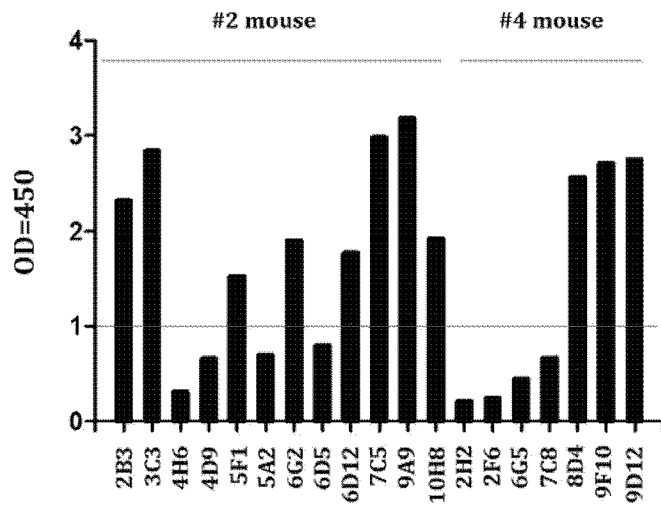
[도 1]



[도2]

## Development of anti-PD-1 hybridoma

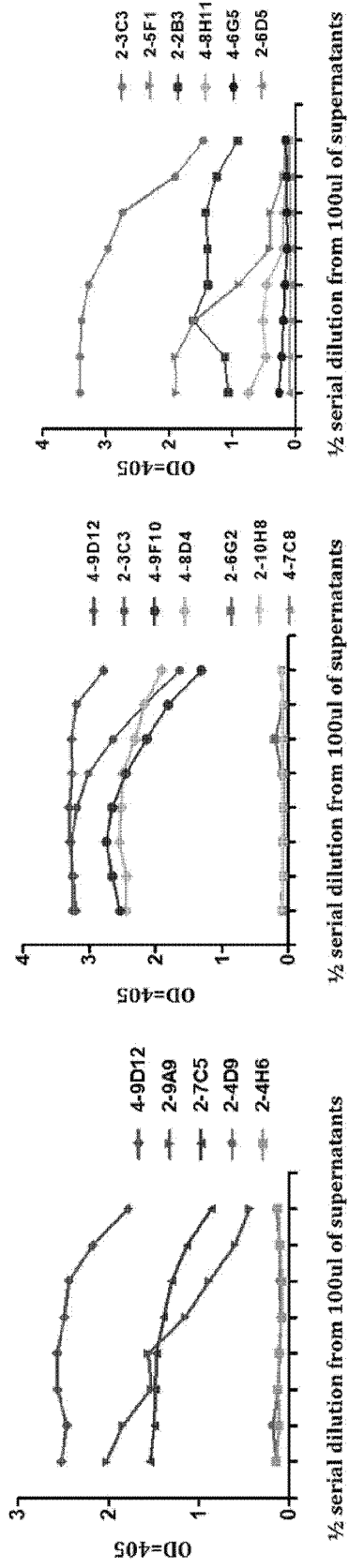
Purpose – hybridoma screening by ELISA



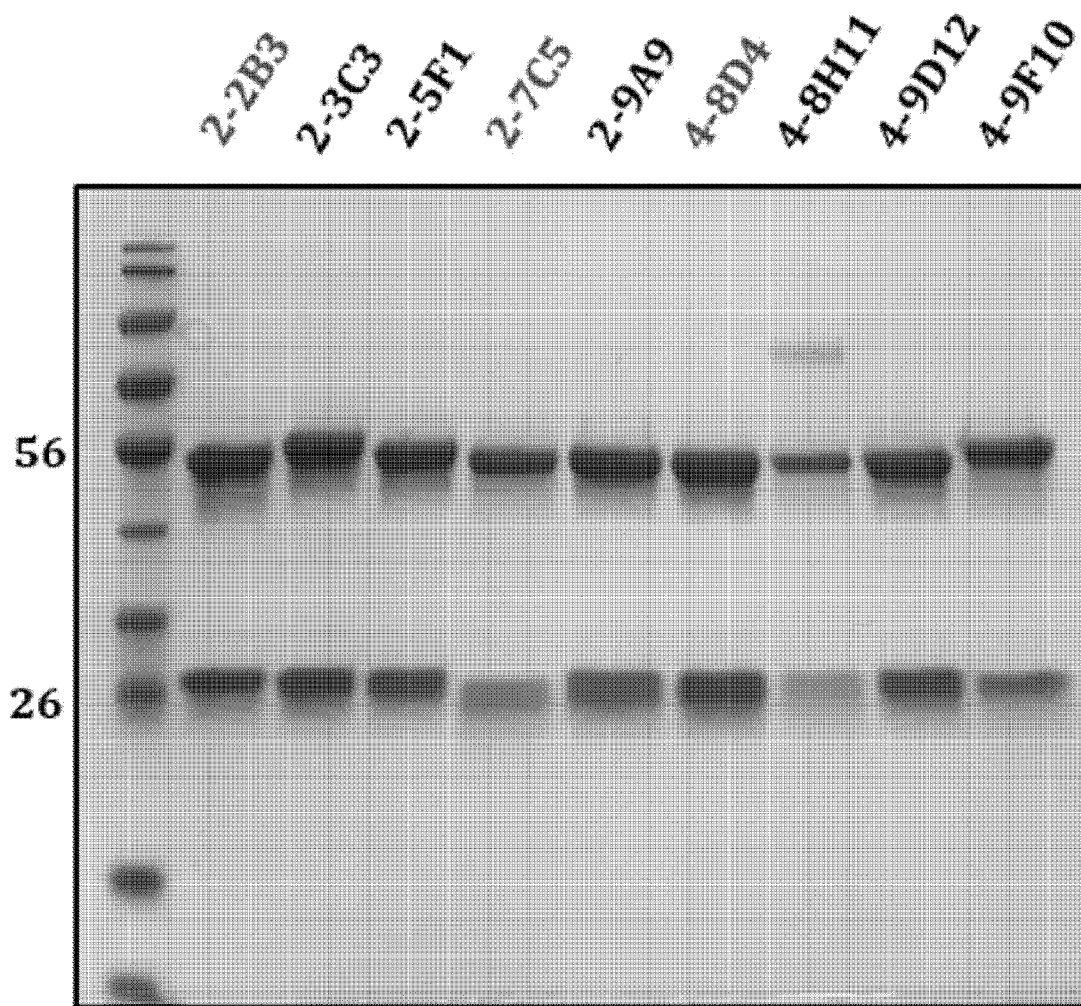
#2	OD=450	#4	OD=450
2B3	2.315	2H2	0.204
3C3	2.837	2F6	0.240
4H6	0.302	6G5	0.436
4D9	0.648	7C8	0.652
5F1	1.518	8D4	2.561
5A2	0.683	9F10	2.712
6G2	1.898	9D12	2.747
6D5	0.794		
6D12	1.761		
7C5	2.977		
9A9	3.179		
10H8	1.921		



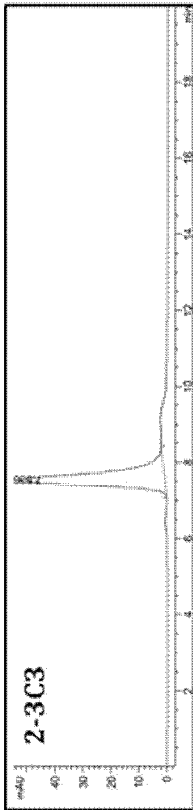
[도3]



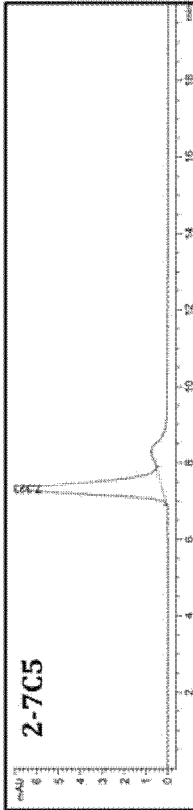
[도4a]



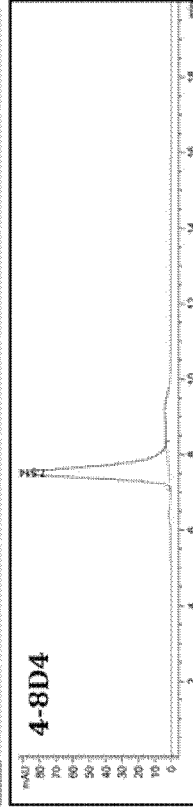
[도4b]



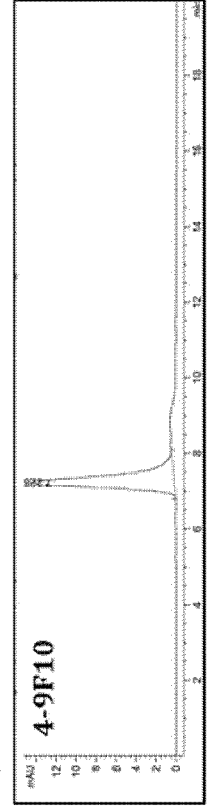
#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.536	1.17E+03	51.61318	0.3436	100.000	2.146	140.038



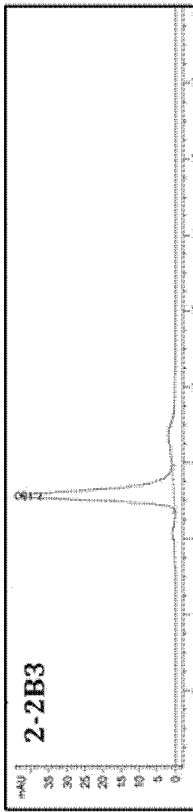
#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.323	1.41E+02	6.56228	0.3343	100.000	2.114	129.897



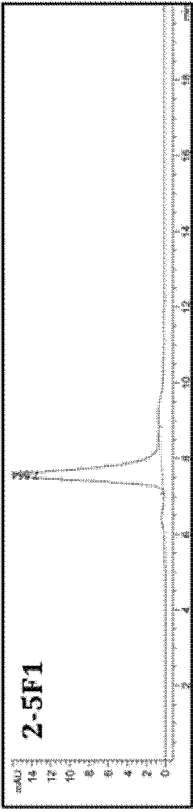
#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.514	1.94E+03	87.19324	0.3381	100.000	2.155	143.022



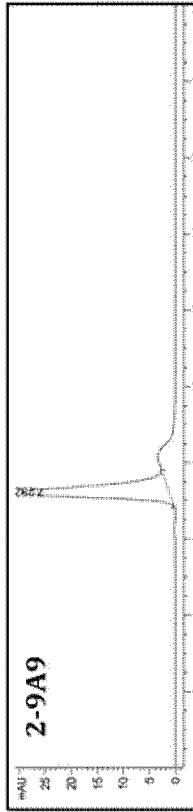
#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.228	3.17E+02	14.40983	0.3325	100.000	2.274	188.118



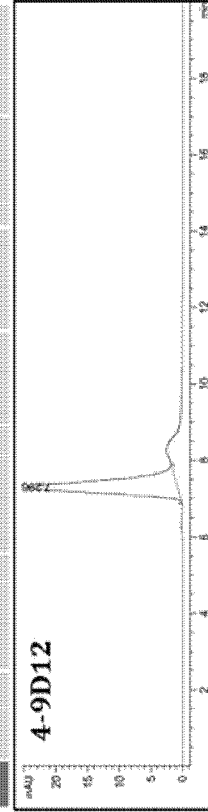
#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.130	8.73E+02	42.08497	0.3121	100.000	2.200	158.489



#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.554	3.60E+02	15.19206	0.3563	100.000	2.139	137.643

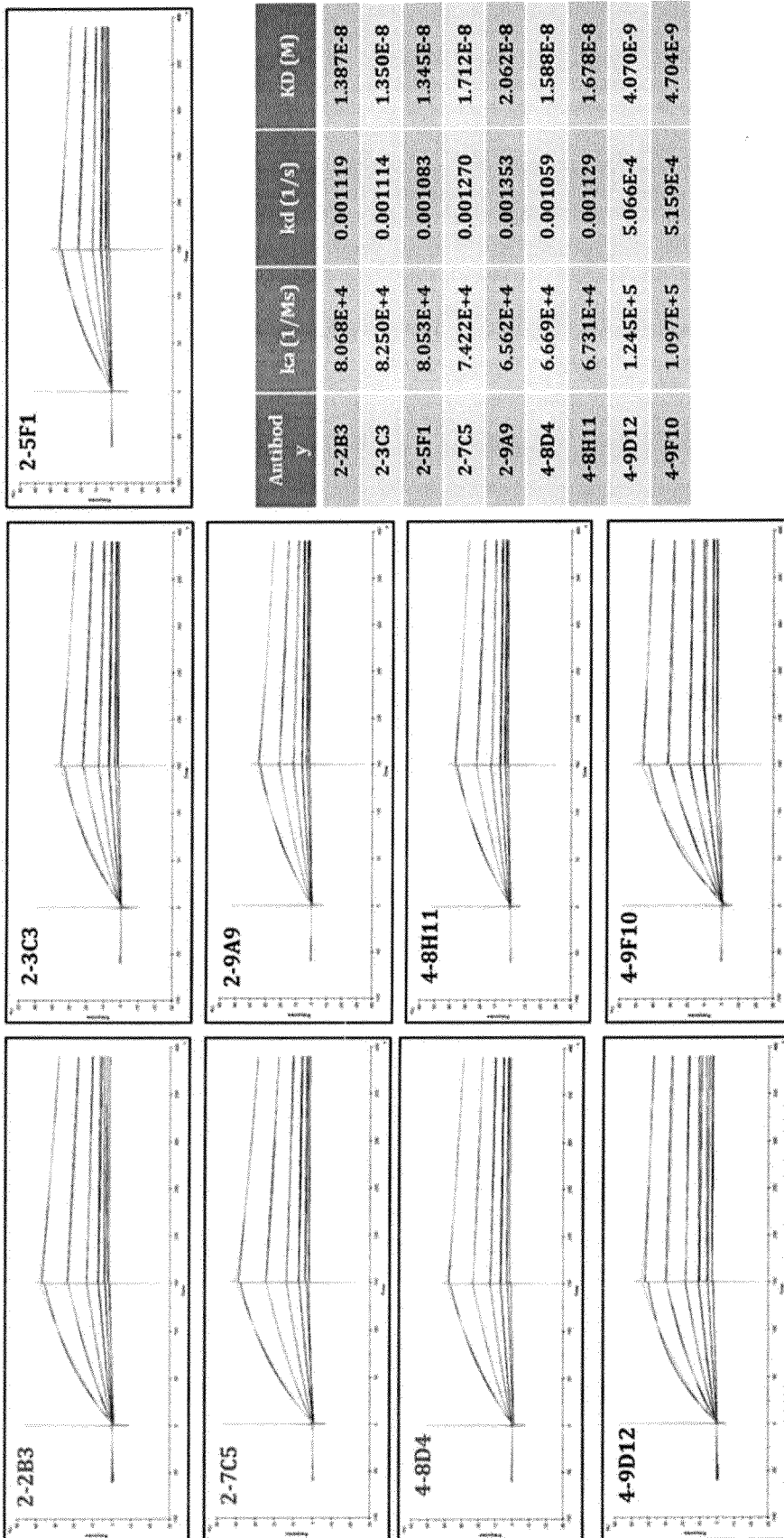


#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.232	5.91E+02	28.22145	0.3244	100.000	2.154	142.627

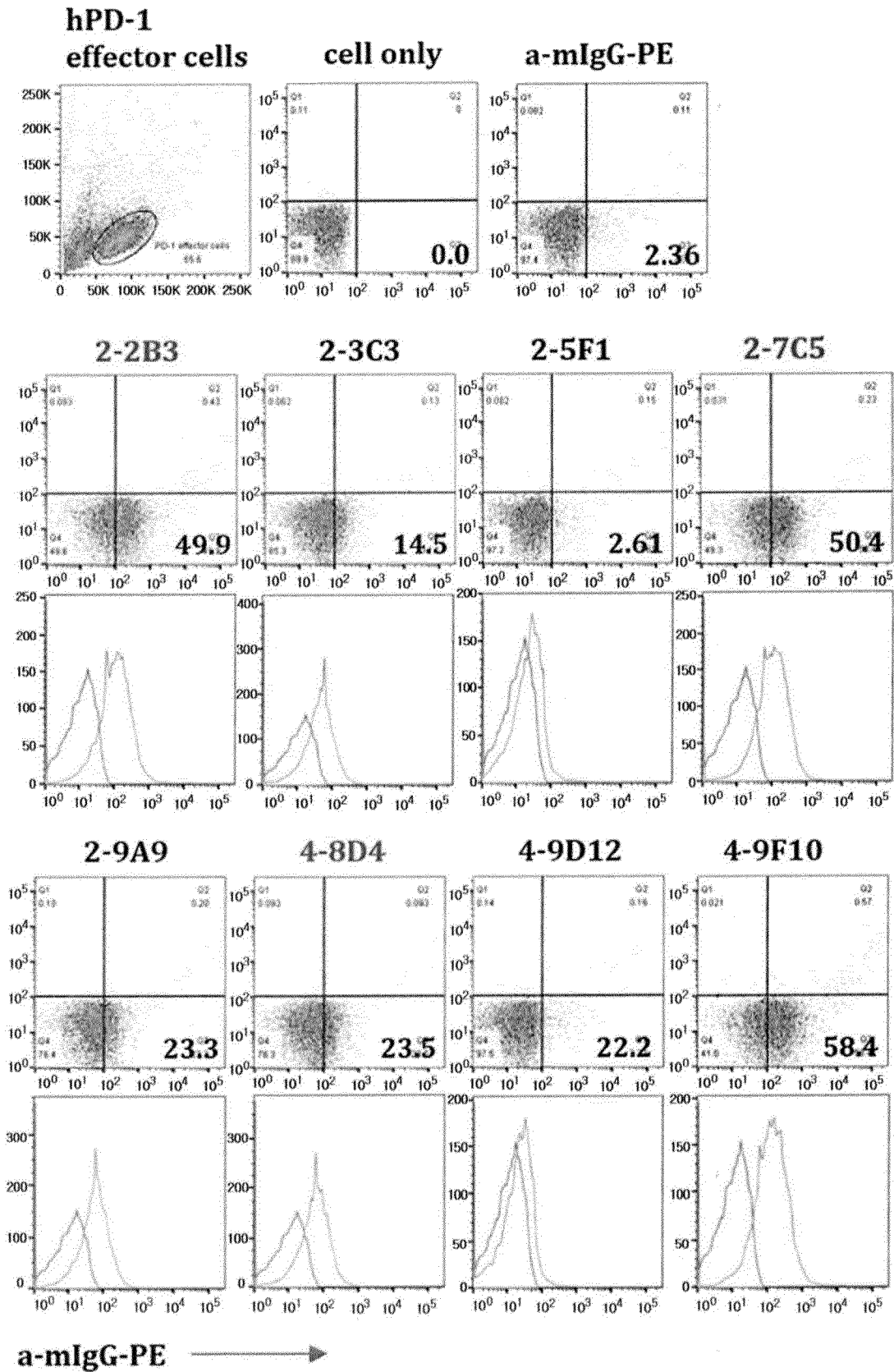


#	Time	Area	Height	Width	% Area	Log(MW)	MW
1	7.296	5.10E+02	23.48106	0.3355	100.000	2.126	133.551

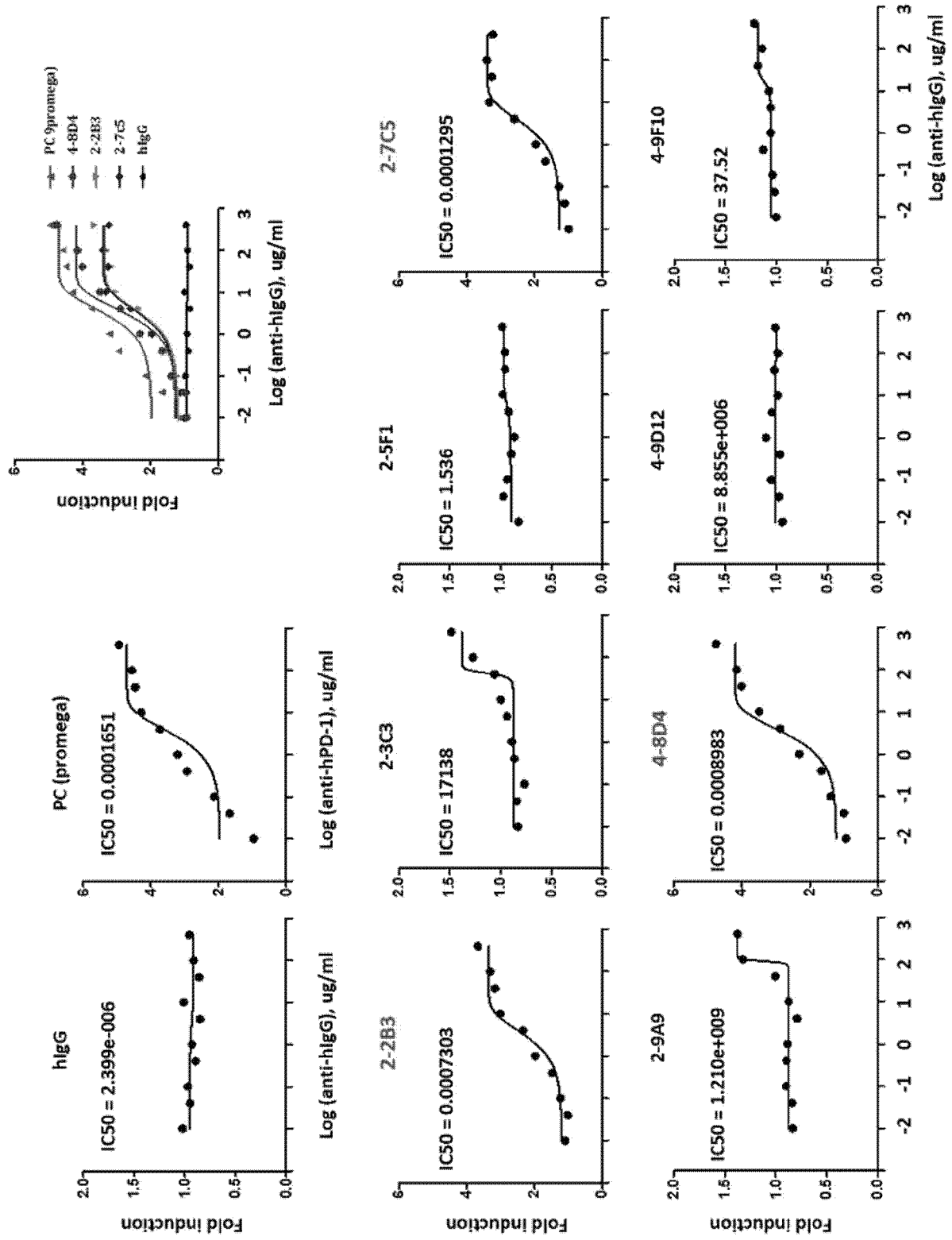
[도 4c]



[도 5]

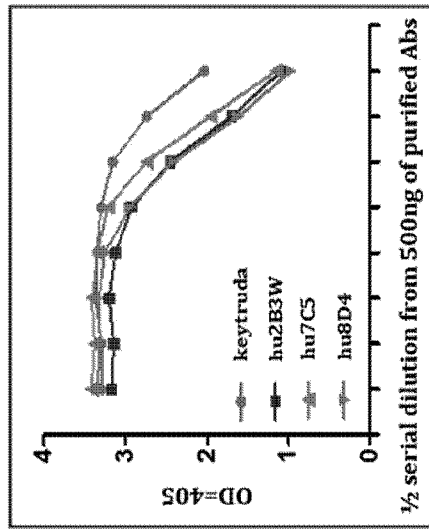


[도6]



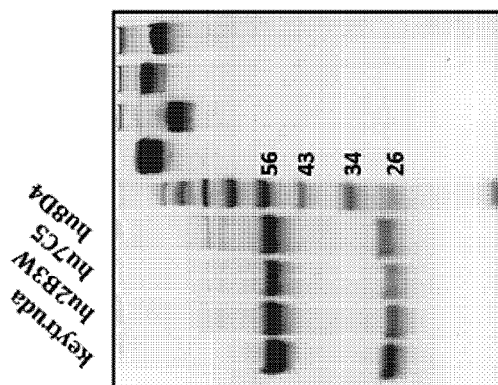
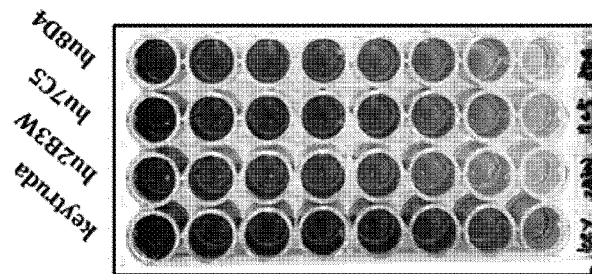
[도7a]

**Q-ELISA**

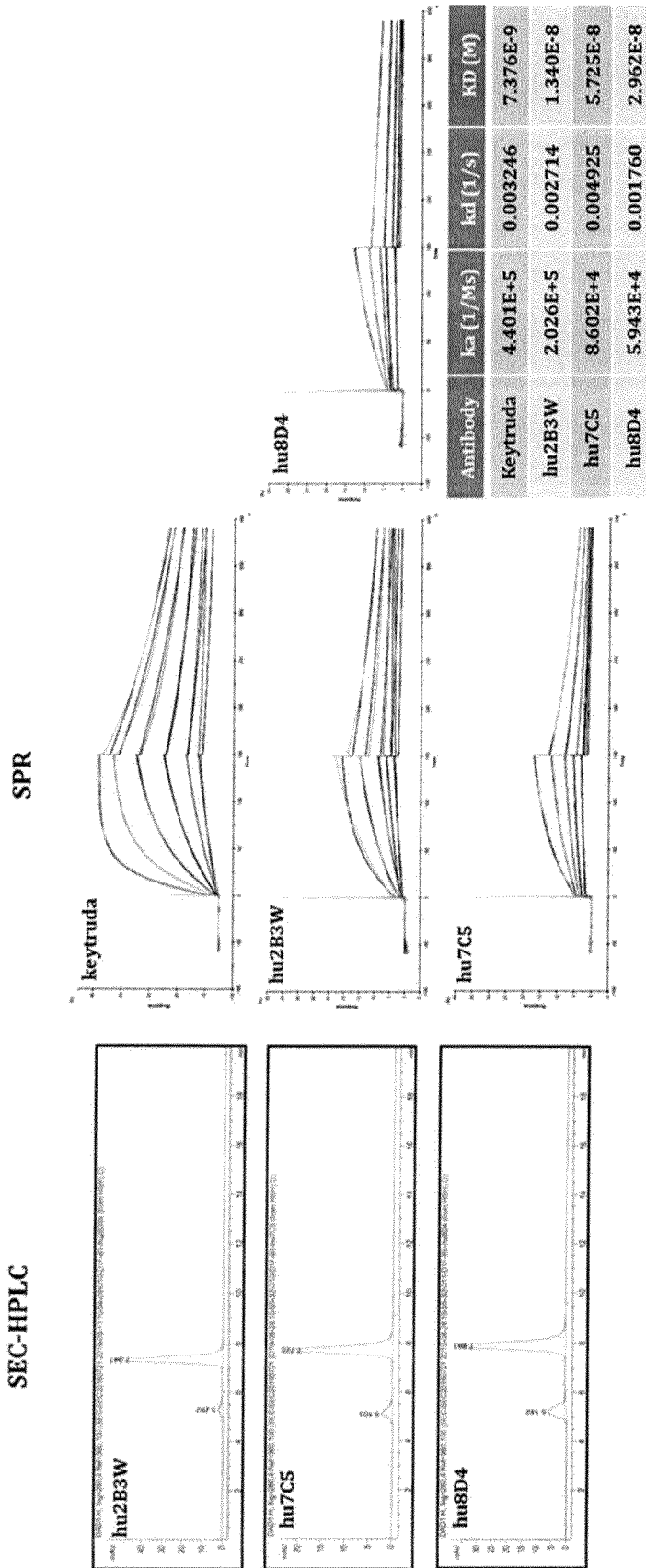


keytruda	2B3W	7C5	8D4
3.299	3.172	3.420	3.349
3.295	3.148	3.386	3.315
3.367	3.203	3.417	3.331
3.356	3.127	3.344	3.257
3.301	2.925	3.219	2.947
3.158	2.452	2.742	2.413
2.741	1.700	1.958	1.615
2.038	1.092	1.156	0.975

**SDS-PAGE**



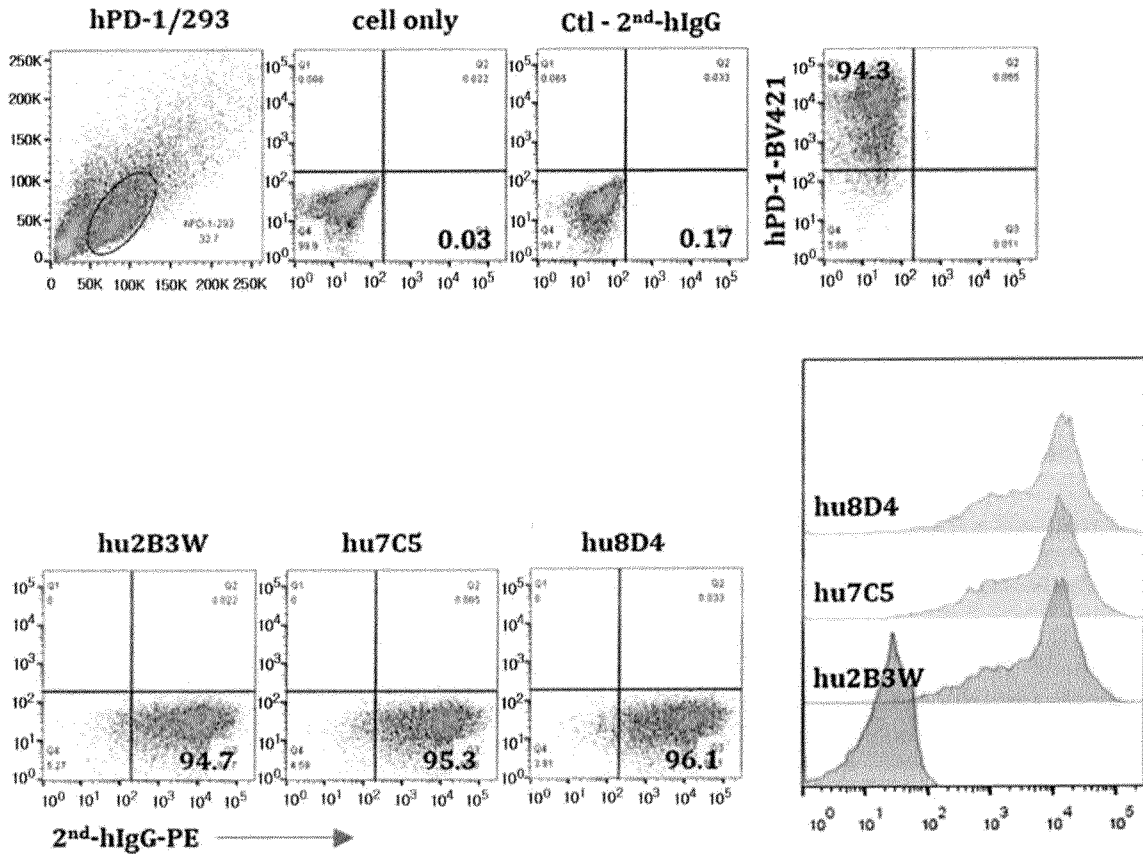
[도 7b]





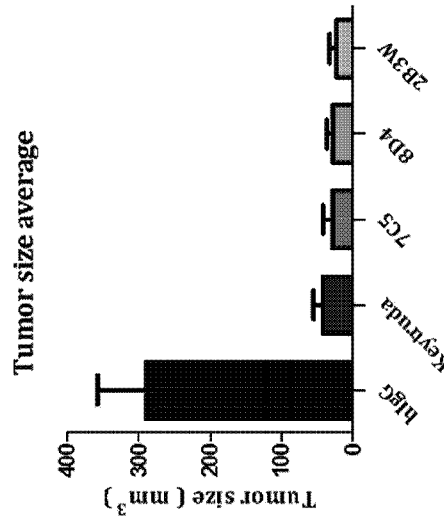
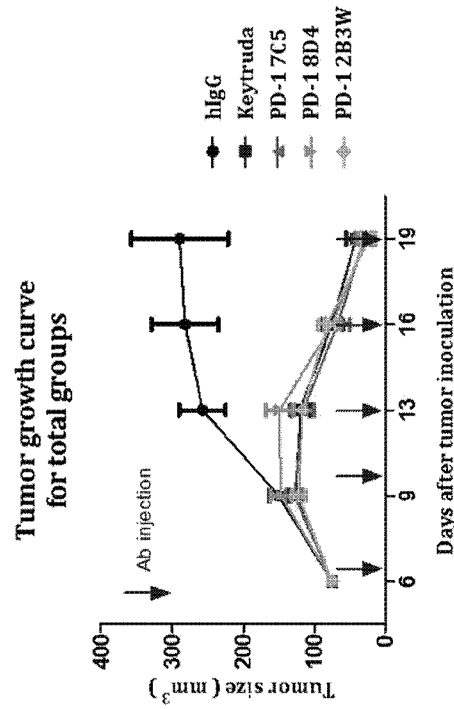
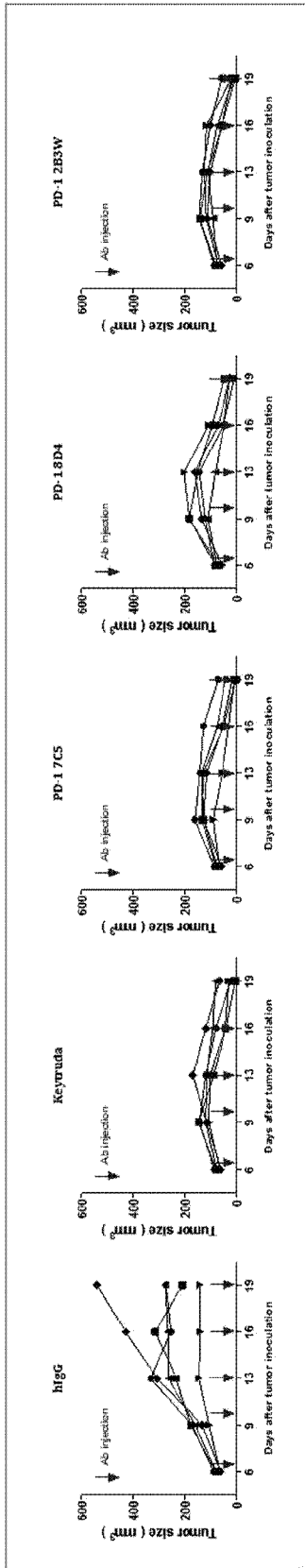
[도 7c]

### FACS binding test

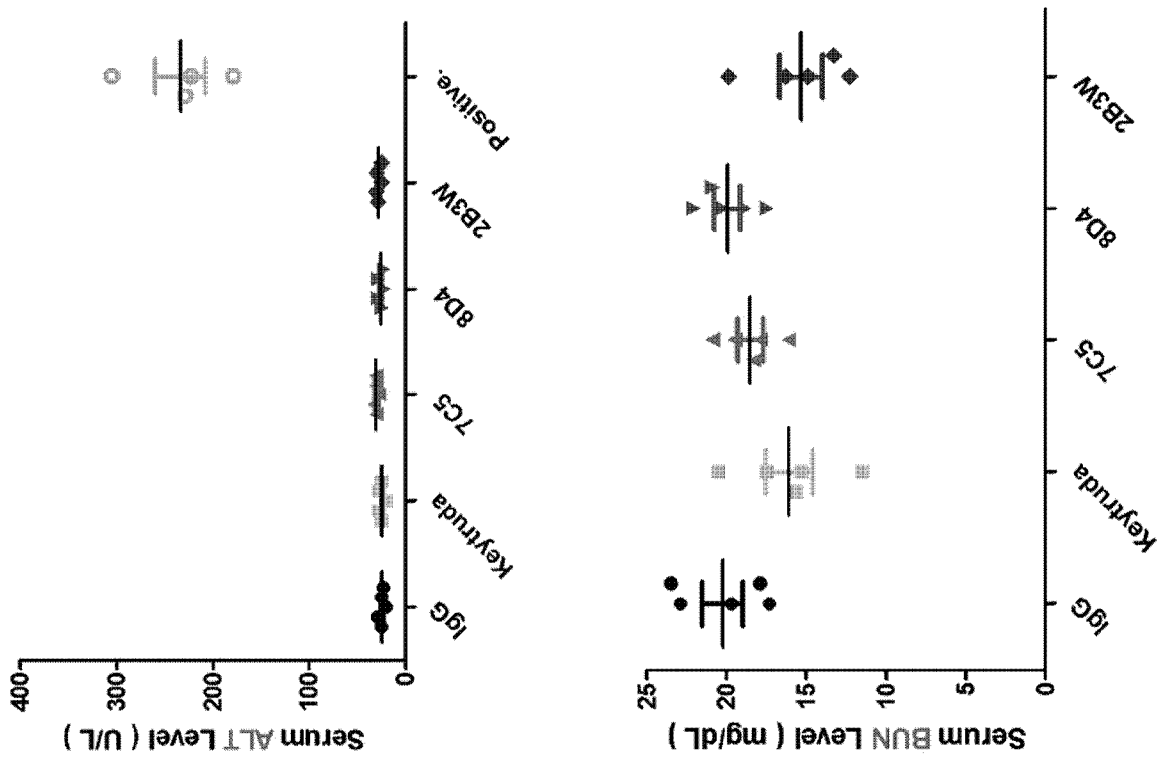
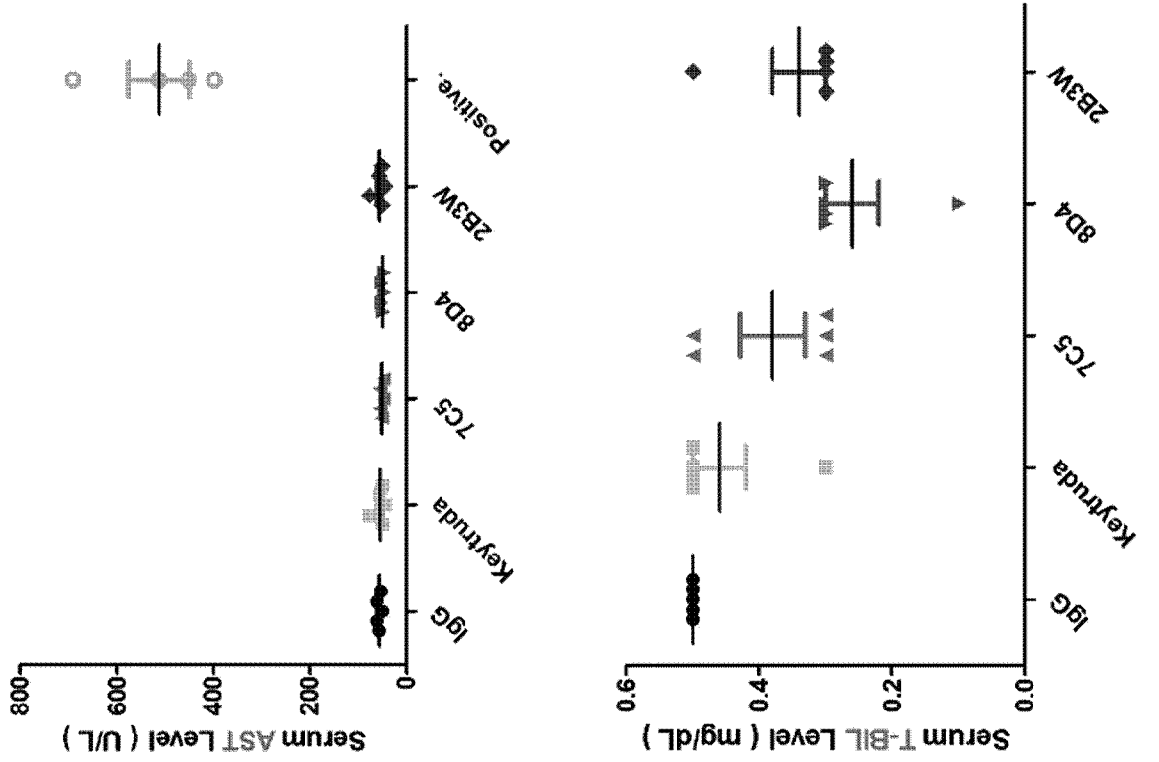


[Figure 8a]

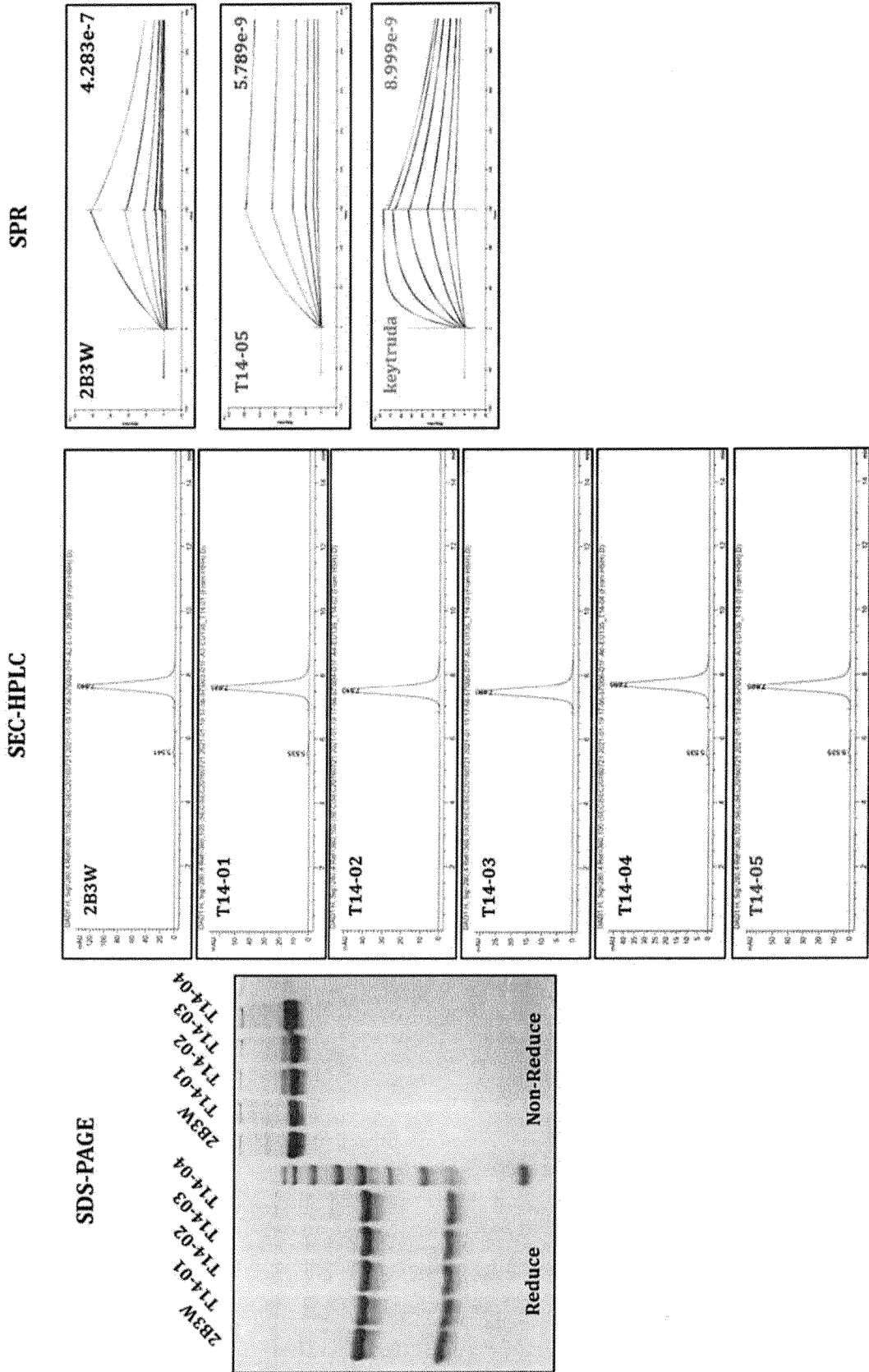
Strain : hPD1 expressing C57BL/6 with hPD-L1 MC38 Sex : Female



[도8b]

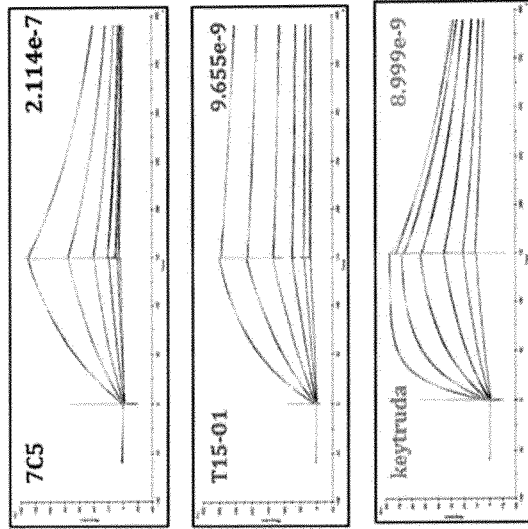


[도 9a]

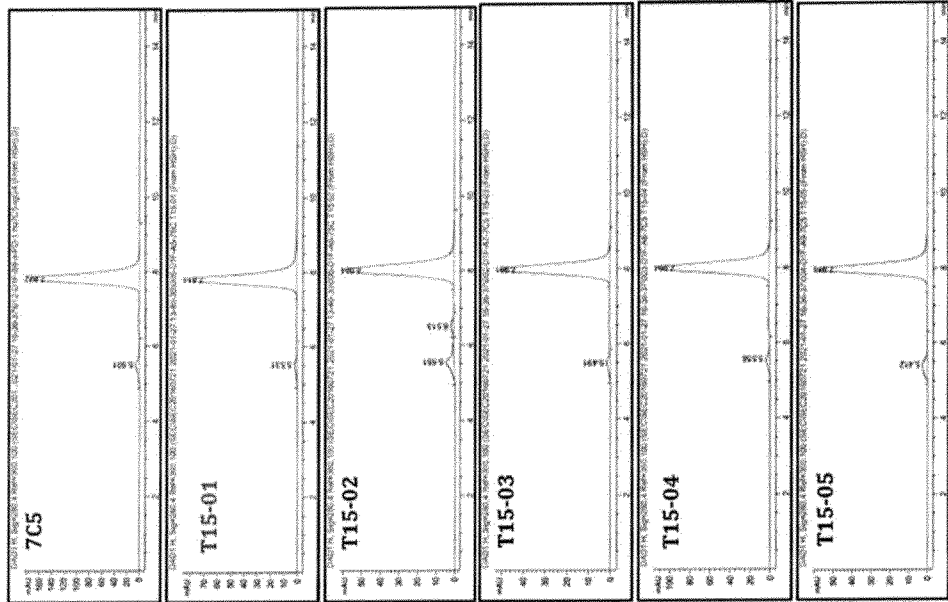


[도 9b]

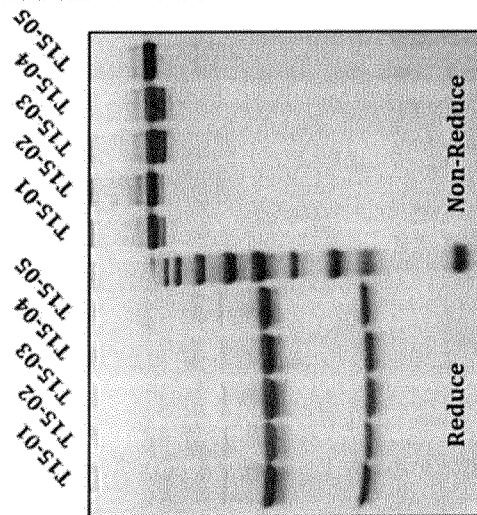
SPR



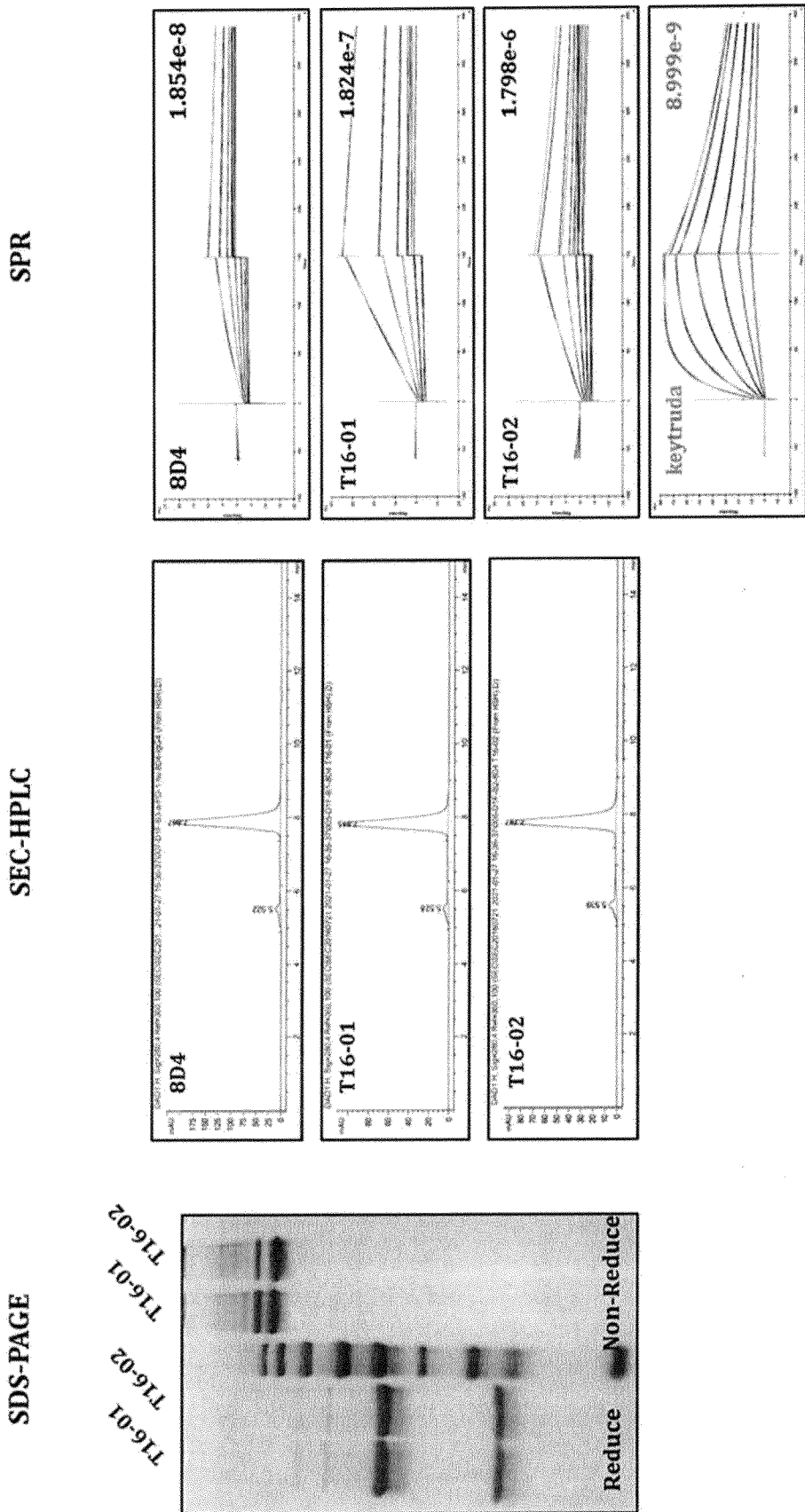
SEC-HPLC



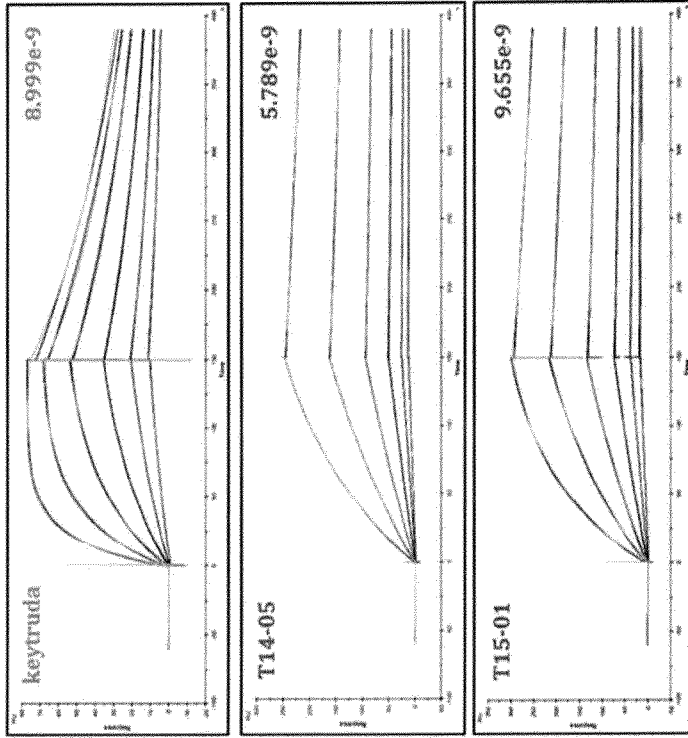
SDS-PAGE



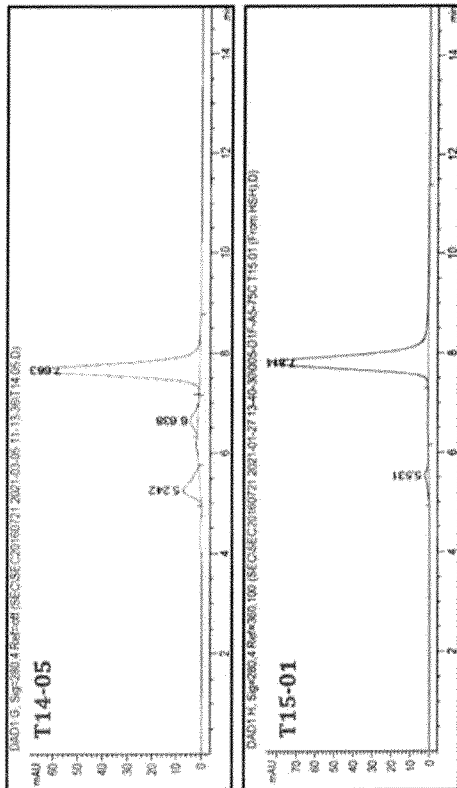
[도 9c]



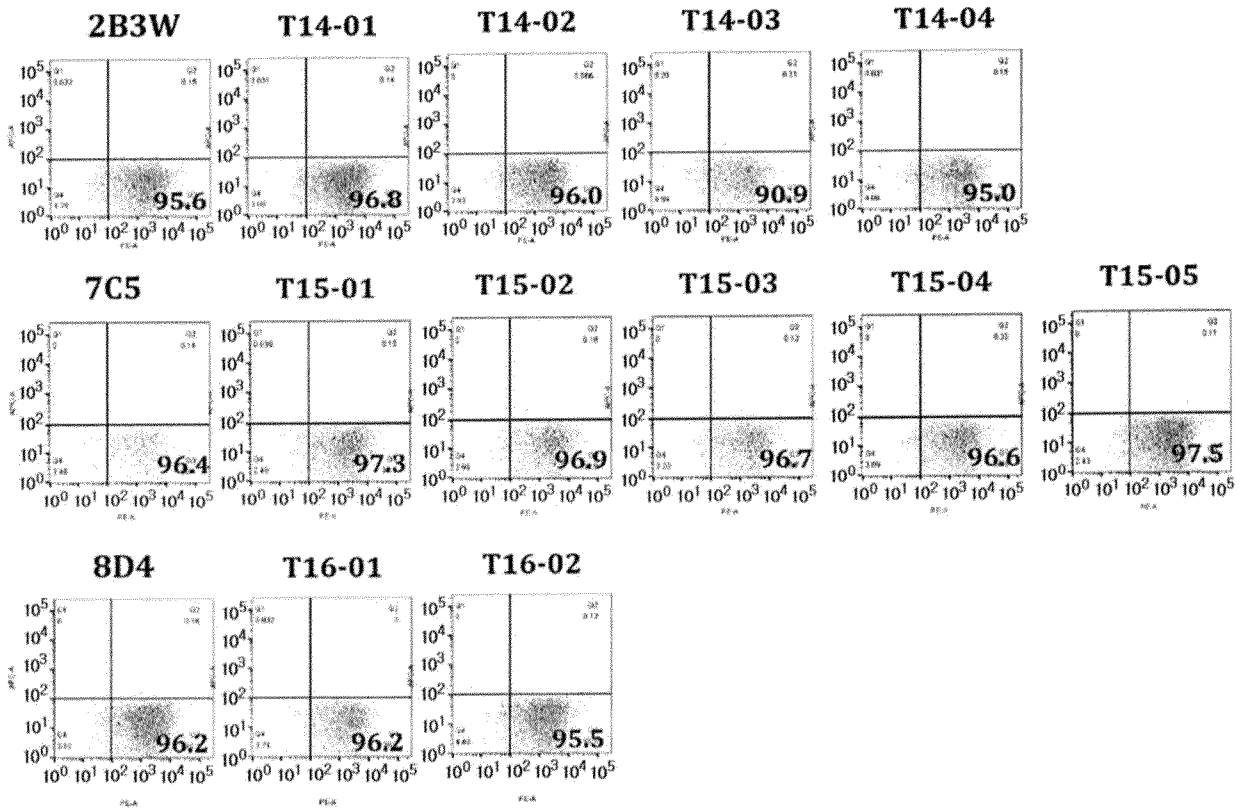
[도 9d]



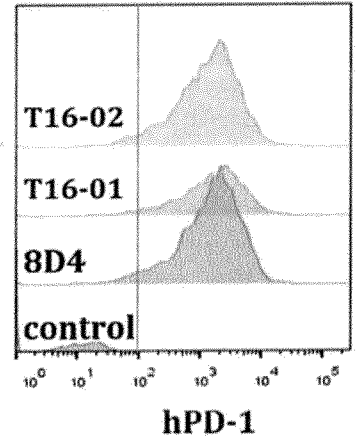
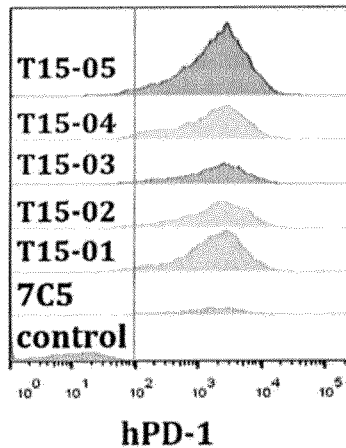
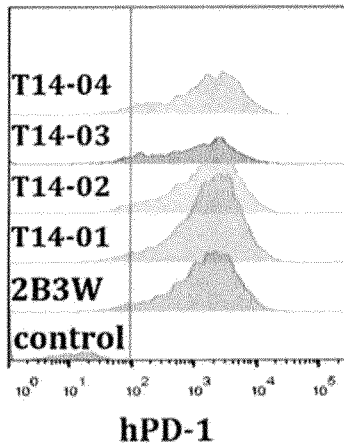
	ka	kd	KD	Affinity
Keytruda	4.448E+5	0.004003	8.999E-9	9 nM
T14-05	8.781E+4	5.084E-4	5.789E-9	5.8 nM
T15-01	6.548E+4	6.322E-4	9.655E-9	9.7 nM



[도 10a]

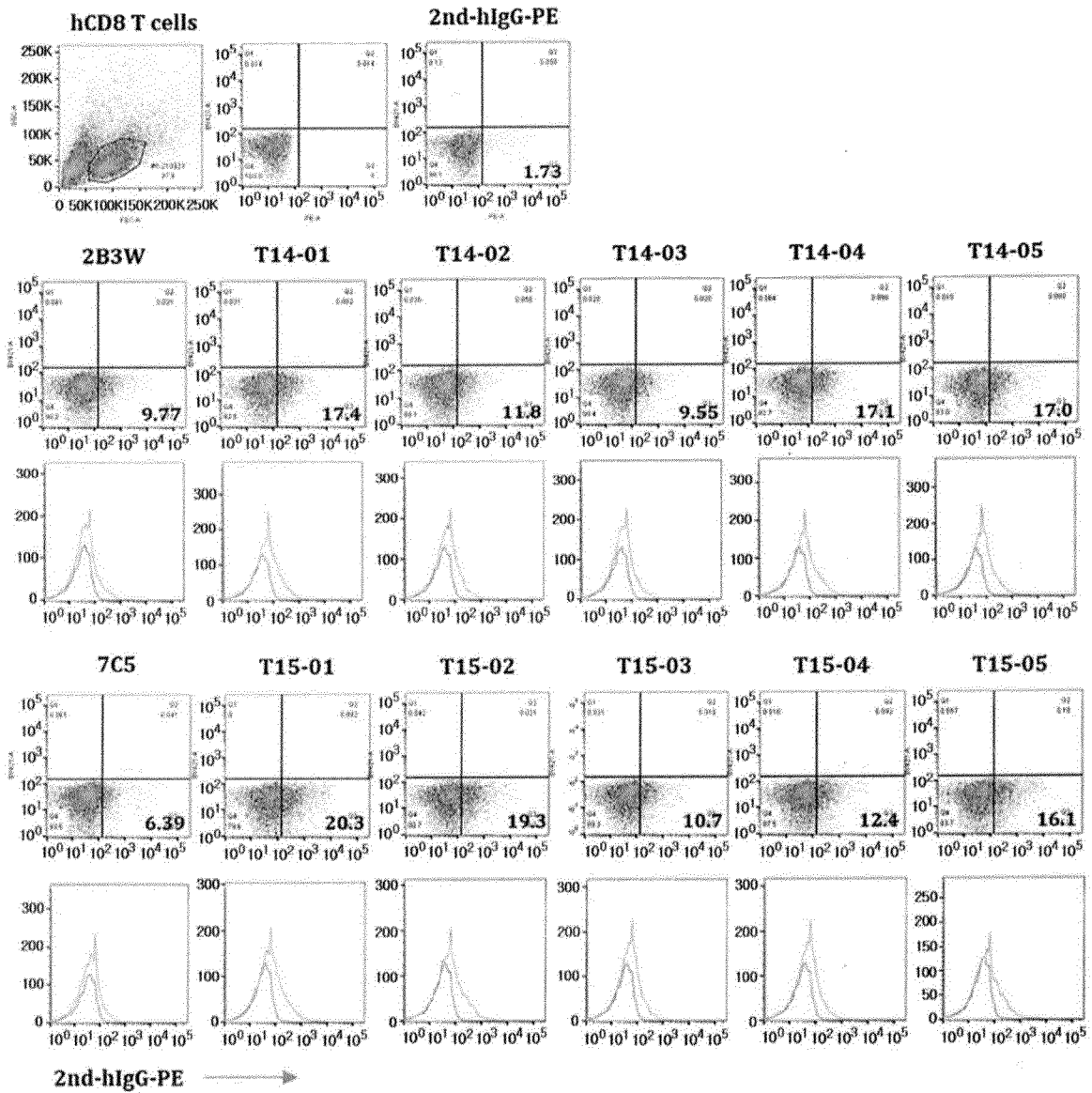


hPD-1 →

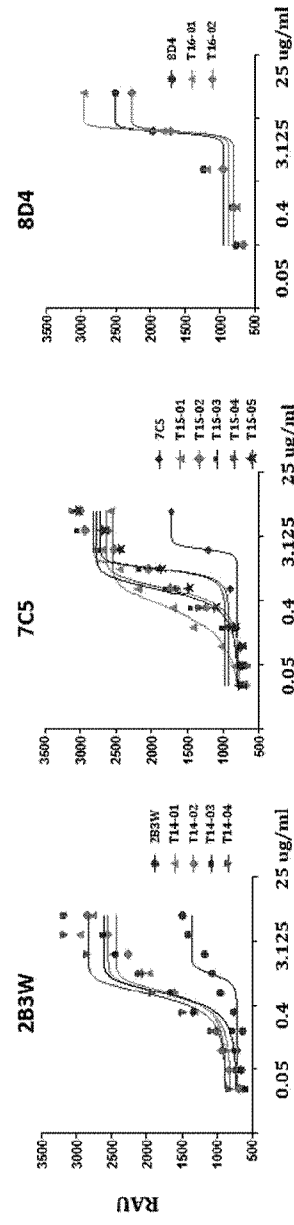
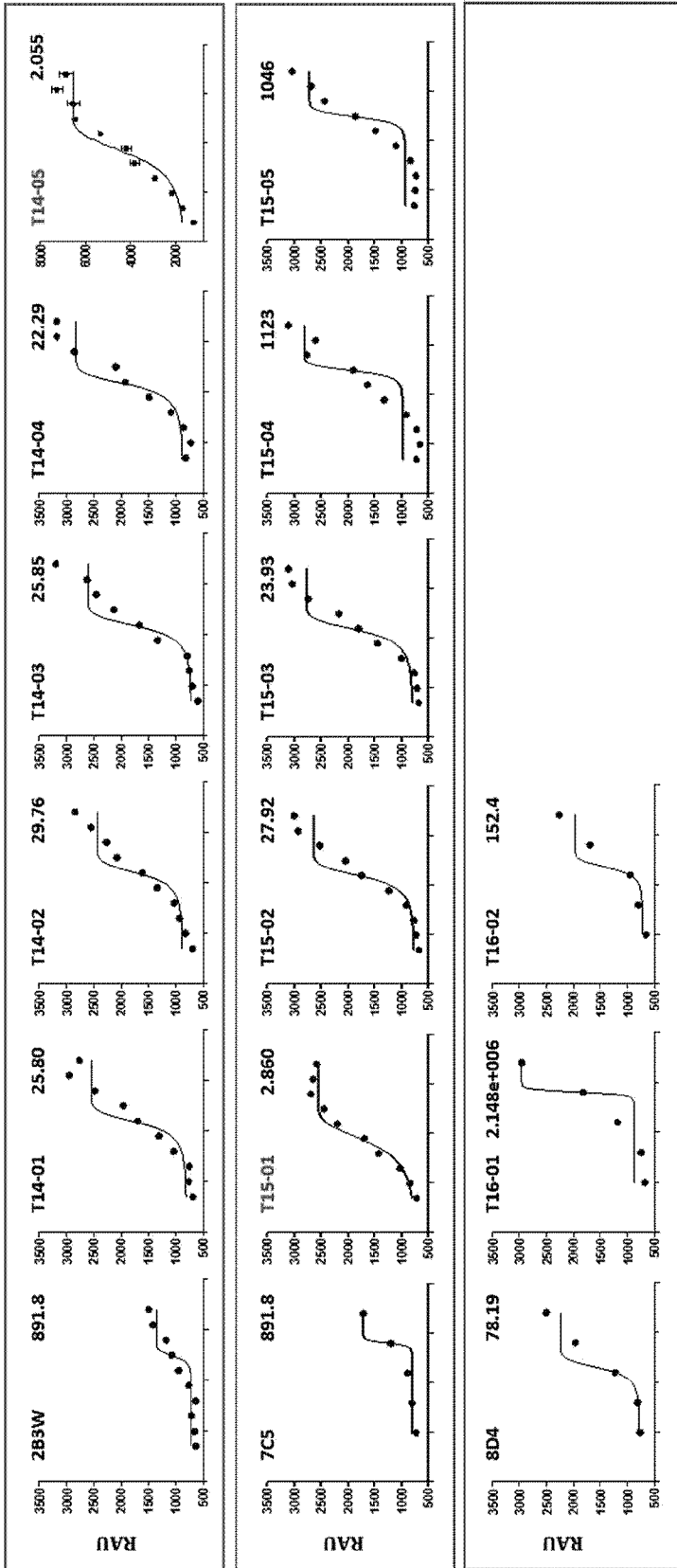




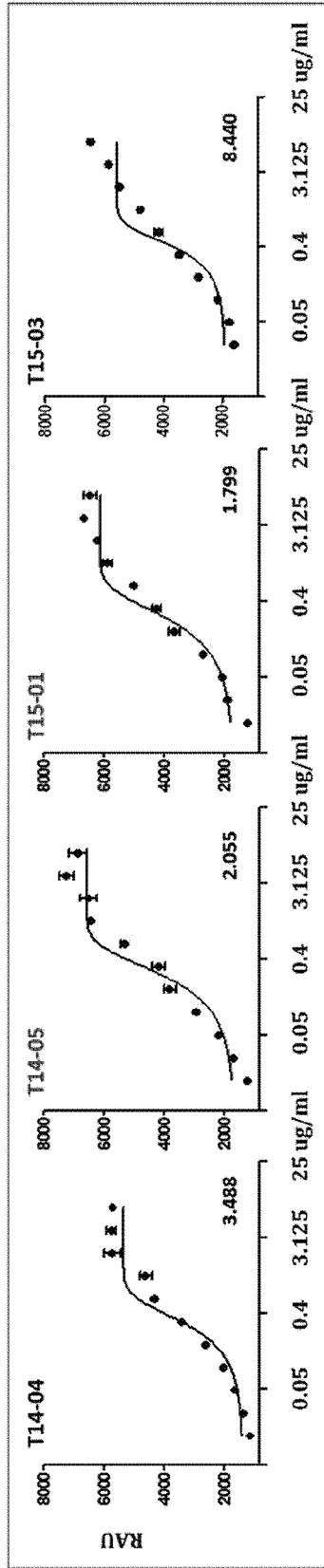
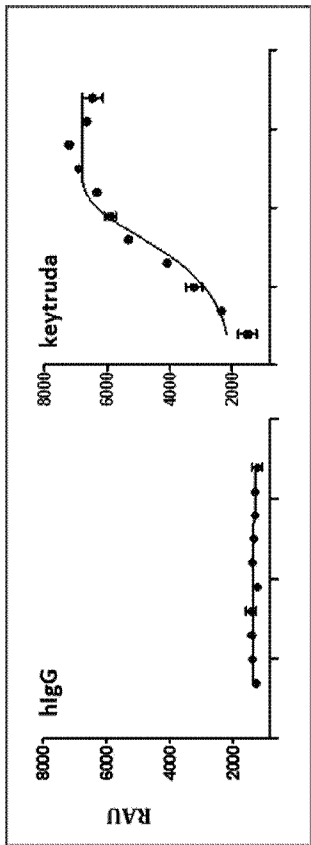
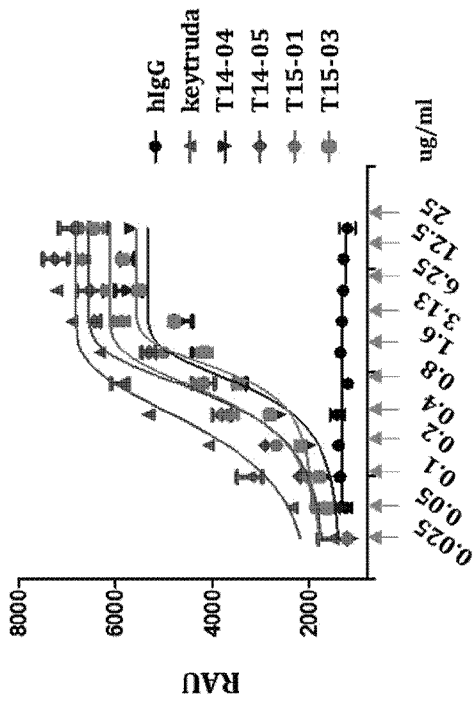
[도 10b]



[Figure 11a]



[도11b]



[도 12a]

	VH	VL
keytruda	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTFNYYMY WVRQAPGGGLEWVGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT LTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPLT <sup>F</sup> GGG <sup>T</sup> KVEIK
2B3W	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWVYDPLYAMD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>D</sup> NYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> KEVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK
T14-01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWVYDPLYAMD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>T</sup> DIYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> KEVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK
T14-02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWVYDPLYAMD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>D</sup> NYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> EVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK
T14-03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWVYDPLYAMD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>T</sup> DIYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> EVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK
T14-04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARW <sup>R</sup> YD <sup>P</sup> LE <sup>A</sup> MD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>D</sup> NYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> KEVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK
T14-05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSNYDMSW VRQAPGKGLEWVAYITIGGGTTYYPDTVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARW <sup>R</sup> YD <sup>P</sup> LE <sup>A</sup> MD YWGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	DIVLTQTPLSLSVTPGGPASPISCRASESV <sup>T</sup> DIYGISFMNWFLQ KPGQPPQLLIYAASNQSGV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVG <sup>V</sup> YYCQ <sup>S</sup> KEVPW <sup>T</sup> FGQGT <sup>K</sup> VEIK

[도 12b]

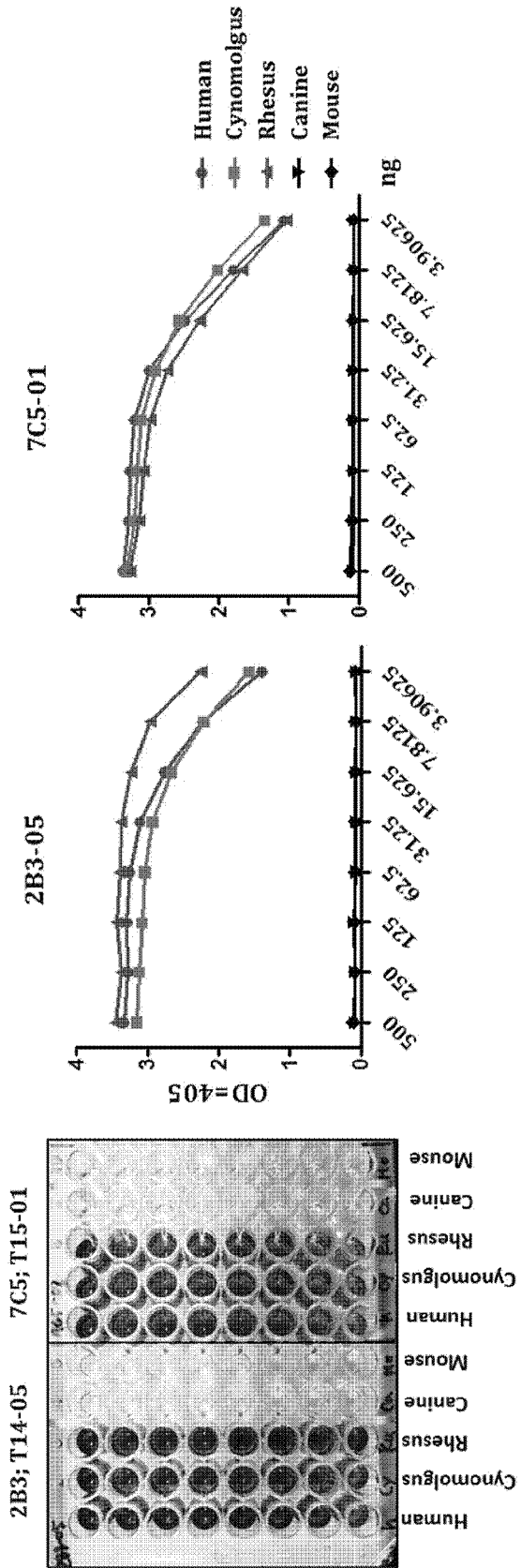
	VH	VL
keytruda	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYMY WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT LTTDSSITTAAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTITVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLASYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
7C5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYSNGDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPG KAPKLLIYASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQDDYSSPPTFGGGTKVEIK
T15-01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYSNGDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVWDDLTWYQQK GKAPKLLIYASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA ATYYCQDDYSSPPTFGGGTKVEIK
T15-02	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYSNGDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPG KAPKLLIYASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQDQEWYPPPTFGGGTKVEIK
T15-03	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYSNGDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPG KAPKLLIYAYMRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCHQDYSSPPTFGGGTKVEIK
T15-04	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYSNGDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPG KAPKLLIYAYMRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQDDYSSPPTFGGGTKVEIK
T15-05	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLELVATIYHSRDYTYYPDSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGNVGGYFDY WGQGTITVTVSS	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPG KAPKLLIYASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQDDYSSPPTFGGGTKVEIK

[도 12c]

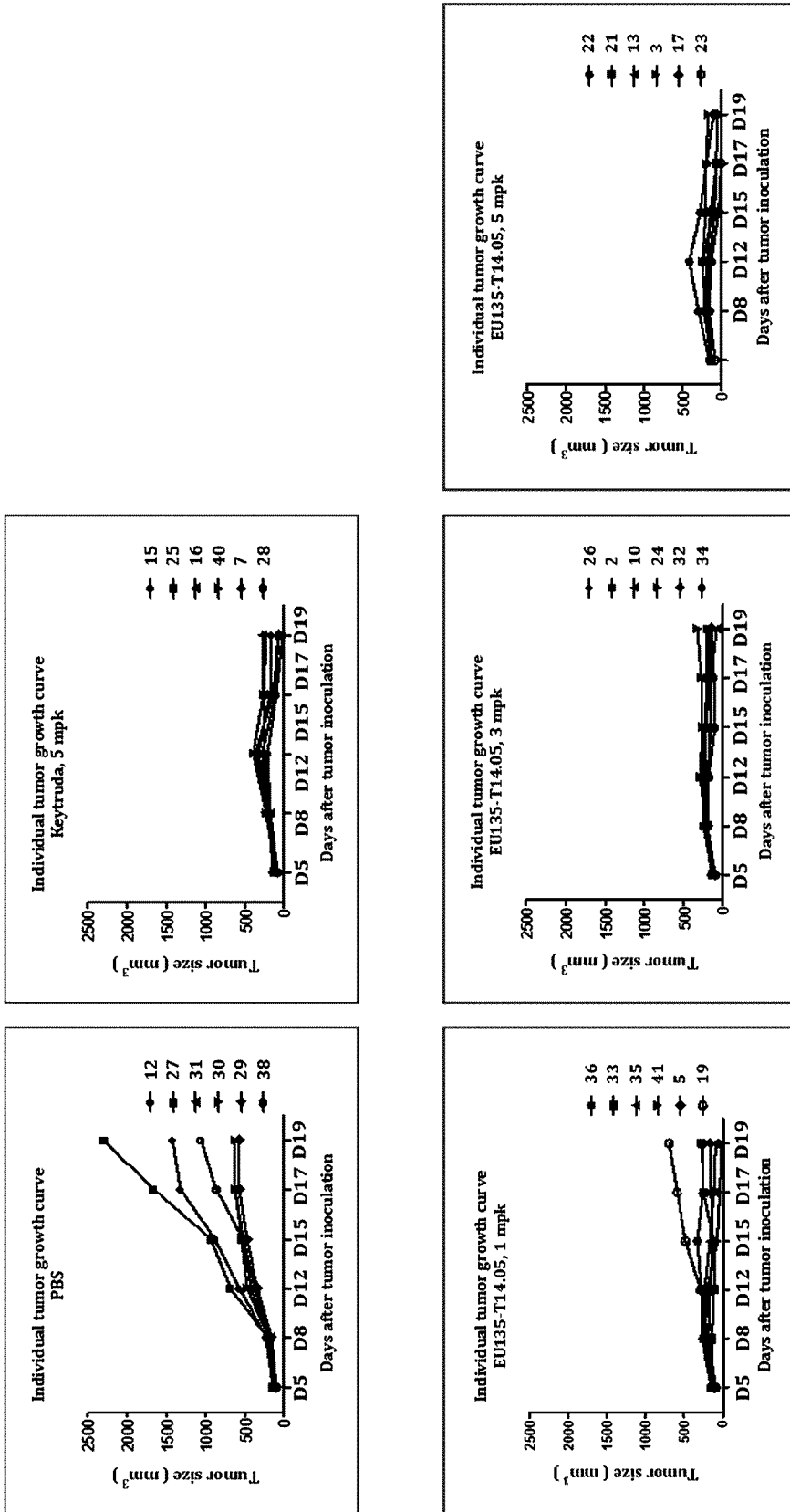
	VH	VL
keytruda	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYMY WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT LTTDSSITTAAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTITVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLASYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
8D4	QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIH WVRQAPGQGLEWIGYINPTTGYTEYNQKFKDRATL TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVRYYFDY WGKGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQSYNLITFGGQTKLEIK
T16-01	QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIH WVRQAPGQGLEWIGYINPTTGYTEYNQKFKDRATL TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVRYYFDY WGKGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQSYNLITFGGQTKLEIK
T16-02	QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSKASGYTFTTYWIH WVRQAPGQGLEWIGYINPTTGYTEYNQKFKDRATL TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVRYYFDY WGKGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSRTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQQQYDPPITFGGQTKLEIK



[도 13]

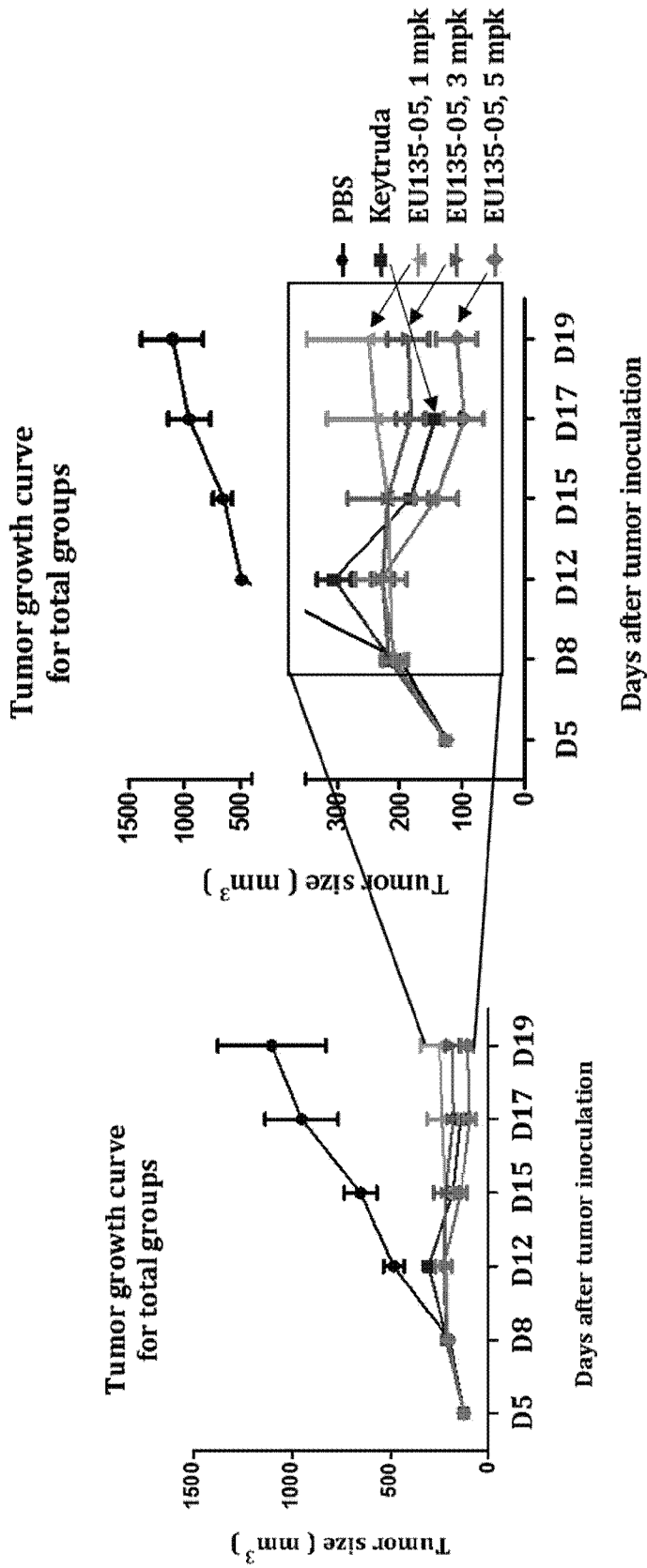


[도 14a]

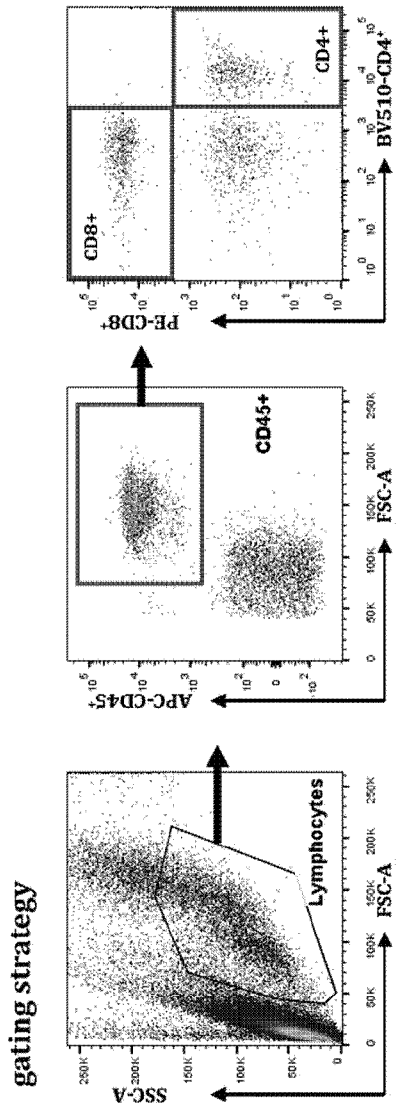




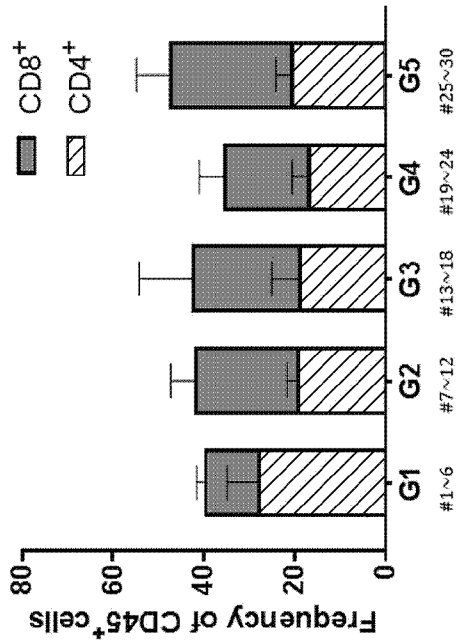
[도14b]



[도 14c]



mCD4/CD8 T cell ratio



% of CD45 <sup>+</sup>	PBS G1	Keytruda G2	T14-05 1 mpk G3	T14-05 3 mpk G4	T14-05 5 mpk G5
CD4 <sup>+</sup>	28.2	19.6	19.3	17.4	20.9
CD8 <sup>+</sup>	11.8	22.5	23.4	18.4	26.8
DP	3.3	1.0	0.8	0.9	2.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/018799

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28(2006.01); A61K 35/17(2014.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12N 15/13(2006.01)  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: PD-1, 항체(antibody), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor), 병용(combination), 암(cancer)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0034588 A (MACROGENICS, INC.) 04 April 2018 (2018-04-04) See paragraphs [0109]-[0112], [0445], [0458]-[0460], [0471]-[0473], [0500], [0708], [1463]-[1464] and [1491]; and claims 1 and 23-24.	1-37
A	KR 10-2019-0085553 A (TAYU HUAXIA BIOTECH MEDICAL GROUP CO., LTD.) 18 July 2019 (2019-07-18) See abstract; and paragraphs [0035], [0066]-[0068], [0083]-[0084], [0119], [0134] and [0153].	1-37
A	TW 202003558 A (TAYU HUAXIA BIOTECH MEDICAL GROUP CO., LTD.) 16 January 2020 (2020-01-16) See abstract.	1-37
A	US 2018-0051085 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.) 22 February 2018 (2018-02-22) See paragraphs [0003], [0007]-[0009] and [0066]-[0068]; and claims 1 and 8.	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>15 March 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>15 March 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b> Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2021/018799**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019-148410 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 08 August 2019 (2019-08-08) See claims 1-40.	1-37
.....		

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2021/018799**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0034588	A		04 April 2018	CN	107847574	A	27 March 2018
				CN	108976300	A	11 December 2018
				EP	3328419	A1	06 June 2018
				EP	3328419	B1	25 August 2021
				EP	3456346	A1	20 March 2019
				EP	3456346	B1	07 July 2021
				JP	2018-524394	A	30 August 2018
				JP	2019-055948	A	11 April 2019
				JP	2022-002540	A	11 January 2022
				JP	6959897	B2	05 November 2021
				JP	6959907	B2	05 November 2021
				KR	10-2018-0093127	A	20 August 2018
				TW	201710292	A	16 March 2017
				TW	202028234	A	01 August 2020
				US	10577422	B2	03 March 2020
				US	2019-0127467	A1	02 May 2019
				US	2020-0231675	A1	23 July 2020
				WO	2017-019846	A1	02 February 2017
				<hr/>			
KR 10-2019-0085553	A		18 July 2019	CN	110291109	A	27 September 2019
				CN	110382536	A	25 October 2019
				EP	3571231	A1	27 November 2019
				JP	2020-505386	A	20 February 2020
				KR	10-2365972	B1	21 February 2022
				TW	201827464	A	01 August 2018
				US	10465007	B2	05 November 2019
				US	2019-0144543	A1	16 May 2019
				US	2020-0115454	A1	16 April 2020
				WO	2018-133837	A1	26 July 2018
				WO	2018-133842	A1	26 July 2018
<hr/>							
TW	202003558	A	16 January 2020	None			
<hr/>							
US 2018-0051085	A1		22 February 2018	CN	104379169	A	25 February 2015
				CN	105073128	A	18 November 2015
				CN	106132436	A	16 November 2016
				CN	106132436	B	15 June 2021
				CN	107252485	A	17 October 2017
				CN	109513003	A	26 March 2019
				EP	2885002	A2	24 June 2015
				EP	2981281	A1	10 February 2016
				EP	2981281	B1	15 July 2020
				EP	3107577	A1	28 December 2016
				EP	3586874	A1	01 January 2020
				JP	2016-520548	A	14 July 2016
				JP	2017-507936	A	23 March 2017
				JP	2018-135371	A	30 August 2018
				JP	2019-048869	A	28 March 2019
				JP	2019-108373	A	04 July 2019
				JP	6361039	B2	25 July 2018
				JP	6447933	B2	09 January 2019
				JP	6759508	B2	23 September 2020
				JP	6767029	B2	14 October 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2021/018799**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 10111954 B2	30 October 2018
		US 10131712 B2	20 November 2018
		US 10183992 B2	22 January 2019
		US 10239938 B2	26 March 2019
		US 10245321 B2	02 April 2019
		US 10308688 B2	04 June 2019
		US 10662252 B2	26 May 2020
		US 2014-0050660 A1	20 February 2014
		US 2015-0132217 A1	14 May 2015
		US 2016-0176968 A1	23 June 2016
		US 2017-0021017 A1	26 January 2017
		US 2018-0118846 A1	03 May 2018
		US 2019-0142939 A1	16 May 2019
		US 9315567 B2	19 April 2016
		US 9382329 B2	05 July 2016
		US 9670286 B2	06 June 2017
		US 9682143 B2	20 June 2017
		US 9879088 B2	30 January 2018
		WO 2014-028560 A2	20 February 2014
		WO 2014-163684 A1	09 October 2014
		WO 2015-126548 A1	27 August 2015
		WO 2017-210058 A1	07 December 2017
		WO 2018-217227 A1	29 November 2018
WO 2019-148410 A1	08 August 2019	CN 111670047 A	15 September 2020
		EP 3746120 A1	09 December 2020
		JP 2021-511806 A	13 May 2021
		KR 10-2020-0115595 A	07 October 2020
		US 2021-0032342 A1	04 February 2021
		WO 2019-152571 A1	08 August 2019

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 35/17(2014.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12N 15/13(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PD-1, 항체(antibody), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor), 병용(combination), 암(cancer)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0034588 A (마크로제닉스, 인크.) 2018.04.04 단락 [0109]-[0112], [0445], [0458]-[0460], [0471]-[0473], [0500], [0708], [1463]-[1464], [1491]; 청구항 1, 23-24 참조.	1-37
A	KR 10-2019-0085553 A (타유 후아시아 바이오테크 메디컬 그룹 컴퍼니 리미티드) 2019.07.18 요약; 단락 [0035], [0066]-[0068], [0083]-[0084], [0119], [0134], [0153] 참조.	1-37
A	TW 202003558 A (TAYU HUAXIA BIOTECH MEDICAL GROUP CO., LTD.) 2020.01.16 요약 참조.	1-37
A	US 2018-0051085 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2018.02.22 단락 [0003], [0007]-[0009], [0066]-[0068]; 청구항 1, 8 참조.	1-37
A	WO 2019-148410 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 2019.08.08 청구항 1-40 참조.	1-37
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년03월15일 (15.03.2022)	2022년03월15일 (15.03.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	



제1기재란      핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
  - a.  아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
    - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
    - 서면 혹은 이미지 파일
  - b.  PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
  - c.  국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
    - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
    - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2.  추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0034588 A	2018/04/04	CN 107847574 A	2018/03/27
		CN 108976300 A	2018/12/11
		EP 3328419 A1	2018/06/06
		EP 3328419 B1	2021/08/25
		EP 3456346 A1	2019/03/20
		EP 3456346 B1	2021/07/07
		JP 2018-524394 A	2018/08/30
		JP 2019-055948 A	2019/04/11
		JP 2022-002540 A	2022/01/11
		JP 6959897 B2	2021/11/05
		JP 6959907 B2	2021/11/05
		KR 10-2018-0093127 A	2018/08/20
		TW 201710292 A	2017/03/16
		TW 202028234 A	2020/08/01
		US 10577422 B2	2020/03/03
		US 2019-0127467 A1	2019/05/02
		US 2020-0231675 A1	2020/07/23
		WO 2017-019846 A1	2017/02/02
		KR 10-2019-0085553 A	2019/07/18
CN 110382536 A	2019/10/25		
EP 3571231 A1	2019/11/27		
JP 2020-505386 A	2020/02/20		
KR 10-2365972 B1	2022/02/21		
TW 201827464 A	2018/08/01		
US 10465007 B2	2019/11/05		
US 2019-0144543 A1	2019/05/16		
US 2020-0115454 A1	2020/04/16		
WO 2018-133837 A1	2018/07/26		
WO 2018-133842 A1	2018/07/26		
TW 202003558 A	2020/01/16	없음	
US 2018-0051085 A1	2018/02/22	CN 104379169 A	2015/02/25
		CN 105073128 A	2015/11/18
		CN 106132436 A	2016/11/16
		CN 106132436 B	2021/06/15
		CN 107252485 A	2017/10/17
		CN 109513003 A	2019/03/26
		EP 2885002 A2	2015/06/24
		EP 2981281 A1	2016/02/10
		EP 2981281 B1	2020/07/15
		EP 3107577 A1	2016/12/28
		EP 3586874 A1	2020/01/01
		JP 2016-520548 A	2016/07/14
		JP 2017-507936 A	2017/03/23
		JP 2018-135371 A	2018/08/30
		JP 2019-048869 A	2019/03/28
		JP 2019-108373 A	2019/07/04
JP 6361039 B2	2018/07/25		
JP 6447933 B2	2019/01/09		
JP 6759508 B2	2020/09/23		
JP 6767029 B2	2020/10/14		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 10111954 B2	2018/10/30
		US 10131712 B2	2018/11/20
		US 10183992 B2	2019/01/22
		US 10239938 B2	2019/03/26
		US 10245321 B2	2019/04/02
		US 10308688 B2	2019/06/04
		US 10662252 B2	2020/05/26
		US 2014-0050660 A1	2014/02/20
		US 2015-0132217 A1	2015/05/14
		US 2016-0176968 A1	2016/06/23
		US 2017-0021017 A1	2017/01/26
		US 2018-0118846 A1	2018/05/03
		US 2019-0142939 A1	2019/05/16
		US 9315567 B2	2016/04/19
		US 9382329 B2	2016/07/05
		US 9670286 B2	2017/06/06
		US 9682143 B2	2017/06/20
		US 9879088 B2	2018/01/30
		WO 2014-028560 A2	2014/02/20
		WO 2014-163684 A1	2014/10/09
		WO 2015-126548 A1	2015/08/27
		WO 2017-210058 A1	2017/12/07
		WO 2018-217227 A1	2018/11/29
WO 2019-148410 A1	2019/08/08	CN 111670047 A	2020/09/15
		EP 3746120 A1	2020/12/09
		JP 2021-511806 A	2021/05/13
		KR 10-2020-0115595 A	2020/10/07
		US 2021-0032342 A1	2021/02/04
		WO 2019-152571 A1	2019/08/08