

## (12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국(43) 국제공개일  
2018년 2월 8일 (08.02.2018)

(10) 국제공개번호

WO 2018/026249 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/008495

(22) 국제출원일:

2017년 8월 7일 (07.08.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0100211 2016년 8월 5일 (05.08.2016) KR  
10-2017-0099673 2017년 8월 7일 (07.08.2017) KR

(71) 출원인: 주식회사 와이바이오로직스 (Y-BIOLOGICS INC.) [KR/KR]; 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-3 306호, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 박재은 (PARK, Jae Eun); 35282 대전시 서구 신갈마로 95 106-204, Daejeon (KR). 최수아 (CHOI, Soo A); 54651 전라북도 익산시 동서로 151 201-202, Jeol-labuk-do (KR). 이지수 (LEE, Jisu); 30150 세종시 남세종로 358 211-1501, Sejong (KR). 이현미 (LEE, Hyun Mi); 34032 대전시 유성구 배울1로 119 1203-603, Daejeon (KR). 이시형 (LEE, Si Hyung); 34120 대전시 유성구 가정로 65 110-702, Daejeon (KR). 백기선 (BAEK, Gi Sun); 34014 대전시 유성구 테크노4로 33 518호, Daejeon (KR). 김웅철 (KIM, Yeung Chul); 34319 대전시 대덕구 석봉로58번안길 8, Daejeon (KR). 박범찬 (PARK, Bum-chan); 34140 대전시 유성구 어은로 57 106-1305, Daejeon (KR). 임정채 (LIM, Jung Chae); 34082 대전시 유성구 노은서로210번길 32 405-1905, Daejeon (KR). 조영규 (CHO, Young-Gyu); 34032 대전시 유성구 배울2로 114 1102-1004, Daejeon (KR). 박영우 (PARK, Young Woo); 34207 대전시 유성구 학하로 33 102-1201, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, 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,

(54) Title: ANTIBODY AGAINST PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 (PD-L1), AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 프로그램화된 세포 사멸 단백질 리간드-1 (PD-L1)에 대한 항체 및 이의 용도

(A)

PD-L1-hFc



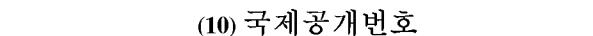
(B)

PD-L1-mFc



(57) Abstract: The present invention relates to an antibody against programmed death-ligand 1 (PD-L1) or an antigen-binding fragment thereof, a nucleic acid for coding same, a vector comprising the nucleic acid, a cell transformed with the vector, a method for preparing the antibody or the antigen-binding fragment thereof, and a composition, comprising same, for preventing or treating a cancer or an infectious disease.

(57) 요약서: 본 발명은 PD-L1(Programmed death-ligand 1)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법 및 이를 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.



EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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))

## 명세서

### 발명의 명칭: 프로그램화된 세포 사멸 단백질 리간드-1 (PD-L1)에 대한 항체 및 이의 용도

#### 기술분야

[1] 본 발명은 PD-L1(Programmed death-ligand 1)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법 및 이를 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

[3] 항원 특이 T-림프구 세포의 면역반응은 매우 복잡하고 정교하게 조절되는 과정이다. 우선 T-림프구의 활성화는 T-림프구 세포표면에 존재하는 T-림프구 항원 수용체(T-cell antigen receptor, TCR)가 항원 제시 세포(antigen presenting cell, APC)의 MHC(major histocompatibility complex, 사람의 경우 HLA (human leucocyte antigen) Class II 분자에 결합된 항원을 인지하는 것으로 시작된다. 이 때, T-림프구가 충분히 활성화하기 위해서는 항원의 인지와 동시에 자극(co-stimulatory) 신호가 필요한데 항원 제시 세포에서 발현하는 CD80, CD40 등이 T-림프구 세포 표면의 리간드에 해당하는 CD28, CD40L 등과 동시에 결합함으로써 이루어지며, 이를 통하여 사이토카인의 분비가 활성화된다. TCR-MHC/에피토프의 결합을 통한 항원의 인지가 이루어지더라도 동시에 자극 신호의 신호 전달이 없을 경우 T-림프구의 활성은 이루어지지 않는다.

[4]

그러나, 활성화된 T-림프구는 일정시간 후 비활성화가 되도록 동시에 억제(co-inhibitory) 신호 또한 활성화된다. 이를 통하여 과도한 면역자극으로 인한 조직 손상 등을 예방할 수 있다. 다양한 동시 억제 신호가 있으며 대표적으로 T-림프구의 CTLA(cytotoxic T lymphocyte antigen)-4와 PD-1(programmed death-1), 이에 상응하는 항원 제시 세포 리간드는 CD80 및 CD86과 PD-L1(programmed death-ligand 1)이 관여한다. CTLA-4의 경우 리간드인 CD80과 CD86과 결합을 통하여 naive 또는 memory T-림프구의 비활성화 기능을 주로 갖고 있으며 PD-1의 경우 PD-L1과 PD-L2를 통하여 말초조직에서 T-림프구 기능을 조절한다.

[5]

우리 몸의 면역기능은 항원인지와 동시에 이러한 동시자극 신호 및 동시억제신호의 조절을 통하여 전체적인 T 림프구 기능을 조절한다. 이러한 조절 기전을 면역검문(immune checkpoint)라고 한다. 우리 몸의 면역기능은 종양세포에서 일어나는 돌연변이 등의 변화로 인해 발현되는 종양 특이 항원(tumor-specific neo-antigen)을 감지하고 이를 통하여 종양세포 또는 바이러스 감염원 등을 제거한다.

- [6] 다만, 일부 종양세포는 반대로 이러한 면역공격을 회피하기 위하여 종양미세환경(tumor micro-environment)을 변화시켜 면역기능을 억제하거나 T세포 면역관용(immune tolerance) 또는 면역편집(immuno-editing) 등을 통하여 면역 회피(immune escape)를 한다.
- [7] 이러한 회피 전략의 하나로서 면역검문(immune checkpoint) 기능의 변화를 통하여 종양 특이 T 림프구 세포의 기능을 억제한다. 즉, 종양세포에서 이러한 억제 면역검문을 활성화시킴으로써 종양 특이 T-림프구 세포의 공격을 회피한다. 이와 관련하여, PD-1 또는 리간드 PD-L1에 대한 단클론항체를 이용하여 그 기능을 억제함으로써 억제된 종양 특이 T-림프구 세포 활성 및 효과를 증강시킴으로써 항종양 효과를 얻을 수 있다.
- [8] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 PD-L1에 높은 친화력으로 결합하는 항-PD-L1 항체를 개발하고, 이러한 항-PD-L1 항체가 PD-1/PD-L1 복합체의 형성을 저해함으로써, 목적하는 면역항암제 또는 감염 질환 치료제의 역할을 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [9]
- [10] **발명의 요약**
- [11] 본 발명의 목적은 PD-L1에 대한 신규 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 8 내지 서열번호 15로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16 내지 서열번호 25로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 88 내지 서열번호 102로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 103 내지 서열번호 119로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120 내지 서열번호 144로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 제공한다.

- [16] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [20] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [21] 도면의 간단한 설명
- [22] 도 1은 PD-L1 발현 벡터에 대한 모식도이다.
- [23] 도 2는 PD-L1 단백질 정제 결과를 나타낸 것이다:
- [24] 도 2a는 PD-L1-hFc의 10% SDS-PAGE gel. RE (reducing)과 NR (non-reducing) 조건에서의 단백질 확인 결과를 나타낸 것이다;
- [25] 도 2b는 G-3000 SWXL SEC-HPLC 결과를 나타낸 것이다. 유속은 1 ml/min이고 전개용매는 PBS이다;
- [26] 도 2c는 PD-L1-mFc의 10% SDS-PAGE gel. RE (reducing)과 NR (non-reducing) 조건에서의 단백질 확인 결과를 나타낸 것이다;
- [27] 도 2d는 G-3000 SWXL SEC-HPLC 결과를 나타낸 것이다. 유속은 1 ml/min이고 전개용매는 PBS이다.
- [28] 도 3은 패닝 횟수에 따른 PD-L1 항원에 대한 결합력 증가 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 4는 PD-L1-His에만 결합능이 강한 모노 파아지의 결합능 측정을 위한 ELSIA 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 5는 선별된 PD-L1 항체를 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 6은 PD-L1 항체의 *in vitro* 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [32] 도 7은 PD-L1 항체의 농도 의존적인 *in vitro* 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 8은 PD-L1 과 발현 세포에서 PD-L1 항체의 결합력 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 9는 PD-L1-hFc와 PD-L1-16E12 간의 키네틱스 (kinetics) 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [35] 도 10은 최적화 단일 클론을 선별한 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 11은 본 발명에 따른 PD-L1 항체의 *in vitro* 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [37] 도 12는 본 발명에 따른 PD-L1 항체의 농도 의존적인 *in vitro* 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

- [38] 도 13은 PD-L1 과 발현 세포에서 항체의 결합력을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [39] 도 14는 선별된 항체에서 효소면역흡착을 이용한 PD-1/PD-L1 복합체의 형성을 막는 항체의 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 15는 PD-L1-hFc와 PD-L1-16E12-4F5간의 키네틱 (kinetics) 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [41] 도 16은 PD-L1 변이체 단백질 및 단일 클론 항체의 결합 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 17은 PD-L1 단일 클론 항체에 의해 이종 MLR (Mixed Lymphocyte Reaction)에서 활성 증가를 나타냄을 확인한 결과이다.
- [43] 도 18은 선택된 PD-L1 단일 클론 항체의 동계 (syngeneic) 암동물 모델에서의 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 19는 본 발명에 따른 항 PD-L1 항체의 PD-L2와 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [45]
- [46] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현 예**
- [47] 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.
- [48] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 8 내지 서열번호 15로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16 내지 서열번호 25로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 88 내지 서열번호 102로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 103 내지 서열번호 119로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120 내지 서열번호 144로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다.
- [49] 본 명세서의 "PD-L1"는 활성화된 T 및 B 세포 상에서 주로 발현하는 면역억제 수용체 "프로그램된 사멸 수용체 1(PD-1)"에 대한 리간드로, PD-1과 리간드인 PD-L1 및/또는 PD-L2이 결합하는 경우 항원 수용체 시그널링을 부정적으로 조절할 수 있다. PD-1에 대한 리간드(PD-L1 및 PD-L2)는 구성적으로 발현되거나, 또는 비-조혈세포 조직 및 다양한 종양형을 포함하는 다수의 세포형으로 유도될

수 있다. PD-L1은 B 세포, T 세포, 골수세포 및 수지상 세포(DCs) 상에서 발현되지만, 또한 말초 세포, 유사 미세혈관 내피세포 및 심장, 폐 등과 같은 비-림프 기관 상에서도 발현된다. 대조적으로, PD-L2는 단지 대식세포 및 수지상 세포 상에서만 발견된다. PD-1 리간드의 발현 패턴은, 말초 내성을 유지하는데 있어 PD-1의 역할을 제시하고, 말초에서 자가-반응성 T-세포 및 B-세포 반응을 조절하는데 기여할 수 있다. 리간드 둘 다는 세포외 영역에서 IgV- 및 IgC-유사 도메인 둘 다를 포함하는 제I형 이동막 수용체이다. 리간드 둘다를 공지되지 않은 시그널링 모티프를 가진 짧은 세포질 영역을 포함한다.

- [50] 다수의 연구는 PD-1과 이의 리간드의 상호작용이 시험관내 및 생체내에서 림프구 증식을 억제함을 밝혔다. PD-1/PD-L1 상호작용의 혼란은 T 세포 증식 및 사이토킨 생산을 증가시키고, 세포 주기의 진행을 차단하는 것으로 알려졌다. PD-1/PD-L1 상호작용의 차단은 증강된 종양-특이적 T-세포 면역을 유도할 수 있으므로, 면역 시스템에 의해 종양 세포를 청소하는데 도움이 될 수 있다. 또한, 만성 HIV 감염시, HIV-특이적 CD8+ T 세포는 기능적으로 손상되고, 사이토카인 및 이펙터 분자를 생산하는 능력의 감소 및 증식하는 능력의 감소를 나타내고, PD-1은 HIV 감염된 개체의 HIV 특이적 CD8+ T 세포에 고발현되는데, PD-1/PD-L1 상호작용의 차단을 통해 HIV 웨პ티드 자극에 반응하여 HIV 특이적 T 세포가 증식하고 사이토카인을 생산하는 능력을 향상시킴으로써, T 세포 활성 또는 항 바이러스 면역 반응을 증대시킬 수 있다.
- [51] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항-PD-L1 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [52] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 멜타( $\delta$ ) 및 앱실론( $\epsilon$ ) 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.
- [53] 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> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 및 WO88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄
- [54]

Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 웹타이드 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 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 웹신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[55] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 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), 감마3(IgG3) 또는 감마4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.

[56] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인  $V_H$  및 3 개의 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  $V_L$  및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[57] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다톤이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 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 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.

[59] "에피토프"은 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 않는다는 점에서 구별된다.

[60] 상기 "인간화" 형태의 비-인간(예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초기면 영역으로부터의 잔기를

목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다.

- [61] 상기 “인간 항체”는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [62] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(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.
- [63] 본원에 사용된 바와 같은 “항체 가변 도메인”은 상보성 결정 영역(CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다.  $V_H$ 는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다.  $V_L$ 은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [64] “상보성 결정 영역”(CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다. 본 발명은 서열번호 1의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 2의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [65] 본 발명에 있어, 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1, 서열번호 8 내지 서열번호 15로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16 내지 서열번호 25로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 88 내지 서열번호 102로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1, 서열번호 103 내지 서열번호 119로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120 내지 서열번호 144로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [66] 구체적으로, 본 발명에 있어, 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [67] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [68] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [69] 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 10의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 19의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,

- [70] 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 20의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [71] 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 12의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [72] 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 13의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 22의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [73] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 23의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [74] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 24의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [75] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 15의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 25의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 또는
- [76] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [77] 또한, 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 88의 경쇄 CDR1, 서열번호 103의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [78] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [79] 서열번호 90의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [80] 서열번호 91의 경쇄 CDR1, 서열번호 106의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 123의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [81] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 107의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 124의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [82] 서열번호 92의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [83] 서열번호 93의 경쇄 CDR1, 서열번호 109의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 125의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [84] 서열번호 94의 경쇄 CDR1, 서열번호 110의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 126의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [85] 서열번호 95의 경쇄 CDR1, 서열번호 111의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 127의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [86] 서열번호 96의 경쇄 CDR1, 서열번호 112의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 128의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [87] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 129의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [88] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 130의

- 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [89] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 113의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 131의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [90] 서열번호 97의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 132의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [91] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 133의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [92] 서열번호 97의 경쇄 CDR1, 서열번호 114의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 134의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [93] 서열번호 92의 경쇄 CDR1, 서열번호 115의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 135의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [94] 서열번호 98의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 130의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [95] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 116의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [96] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 136의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [97] 서열번호 99의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 137의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [98] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 117의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 138의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [99] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 118의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 133의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [100] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 119의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [101] 서열번호 100의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 140의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [102] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [103] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [104] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 142의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [105] 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 143의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [106] 서열번호 101의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는
- [107] 서열번호 102의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 144의

- 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [108] 본 발명에 따른 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편은 다음을 포함할 수 있다:
- [109] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 88의 경쇄 CDR1, 서열번호 103의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [110] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [111] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 90의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [112] 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 10의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 19의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 91의 경쇄 CDR1, 서열번호 106의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 123의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [113] 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 20의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 107의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 124의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [114] 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 12의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 92의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [115] 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 13의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 22의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 93의 경쇄 CDR1, 서열번호 109의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 125의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [116] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 23의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 94의 경쇄 CDR1, 서열번호 110의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 126의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [117] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 24의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 95의 경쇄 CDR1, 서열번호 111의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 127의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
- [118] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 15의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 25의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 96의 경쇄 CDR1, 서열번호 112의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 128의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [119] 본 발명의 일 실시예에 따라, 최적화 과정을 통해 항체를 추가 선별하였으며, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편은 다음의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다:
- [120] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의



- CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 119의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [134] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 100의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 140의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [135] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [136] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [137] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 142의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [138] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 143의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [139] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 101의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
- [140] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 102의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 144의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [141] 구체적으로, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [142] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 130의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [143] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 133의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [144] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 136의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [145] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 119의

- 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [146] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
- [147] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 143의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [148] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [149] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 26 내지 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR1,
- [150] 서열번호 35 내지 서열번호 41로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR2,
- [151] 서열번호 42 내지 서열번호 49로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR3, 또는
- [152] 서열번호 50 내지 서열번호 54로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR4를 포함할 수 있다.
- [153] 또한, 서열번호 145 내지 서열번호 163로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR1,
- [154] 서열번호 164 내지 서열번호 184로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR2,
- [155] 서열번호 185 내지 서열번호 210로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR3, 또는
- [156] 서열번호 211 내지 서열번호 216로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR4를 포함할 수 있다.
- [157]
- [158] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.
- [159] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. F(ab')2 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [160] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V<sub>H</sub> 도메인과 V<sub>L</sub> 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [161] PD-L1 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로,

PD-L1 항체의 결합 친화성은  $10^{-5}$ M 내지  $10^{-12}$ M 범위 내에 있다. 예를 들어, PD-L1 항체의 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.

[162] 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 57 내지 서열번호 87로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 57 내지 서열번호 87로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 58, 68, 71, 76, 80, 83 또는 85의 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[163] 또한, 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 217 내지 서열번호 247로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 217 내지 서열번호 247로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 218, 228, 231, 236, 240, 243 또는 245의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[164] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 서열번호 58의 중쇄 가변영역 및 서열번호 218의 경쇄 가변영역;

[165] 서열번호 68의 중쇄 가변영역 및 서열번호 228의 경쇄 가변영역;

[166] 서열번호 71의 중쇄 가변영역 및 서열번호 231의 경쇄 가변영역;

[167] 서열번호 76의 중쇄 가변영역 및 서열번호 236의 경쇄 가변영역;

[168] 서열번호 80의 중쇄 가변영역 및 서열번호 240의 경쇄 가변영역;

[169] 서열번호 83의 중쇄 가변영역 및 서열번호 243의 경쇄 가변영역; 또는

[170] 서열번호 85의 중쇄 가변영역 및 서열번호 245의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[171] "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 고 친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 웨პ티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데

사용되어 왔다.

- [172] 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 고 친화성으로 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 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.
- [173] 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.
- [174] 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.
- [175] 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 럼프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [176] 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 돌연변이시킴으로써 개선시킬

수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.

- [177] 고 친화성 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.
- [178] 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.
- [179] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 PD-L1을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-PD-L1 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 결사를 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사를 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.
- [180] 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 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 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 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NBCI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 [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.

- [181] 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.
- [182] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [183] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 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 벡터에 관한 것이다.
- [184] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포함적으로 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.
- [185] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [186] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [187] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [188] 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 라이보좀 결합

자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 페탈로티오닌 프로모터, β-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.

- [189] 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(IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [190] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 젠타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [191] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [192] 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속균주, 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 프로테우스미라빌리스(Proteus mirabilis) 및 스타필로코쿠스(Staphylococcus)(예를 들면, 스타필로코쿠스 카르노수스(Staphylococcus carnosus))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [193] 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.
- [194] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [195] 상기 세포는 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 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

- [196] 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.
- [197] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [198] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [199] 상기 조성물은 상술한 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 기재를 생략한다.
- [200] PD-1에 PD-L1의 결합은 자가면역 및 면역병리의 관용 및 예방에 중요한 T 세포 항원 특이적 반응을 음성적으로 조절한다. 그러나, 만성 항원 자극에 의해 유발될 수 있는 과도한 PD-L1/PD-1 상호작용은 T 세포 고갈의 특징이 되는, T 세포 항원 특이적 반응의 억제 및 T 세포의 소실을 가져올 수 있다. T 세포 고갈은 만성 감염 및 암에서 일어날 수 있는 T 세포 기능 장애의 상태이다. 이는 불량한 이펙터 기능, 억제성 수용체의 지속적 발현, 및 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포와는 다른 전사 상태로서 정의된다. 고갈은 감염 및 종양 진행의 관리를 방해한다.
- [201] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PD-L1에 높은 친화도로 결합하여 PD-1과 PD-L1 복합체 형성을 저해함으로써, 항-종양 T 세포 활성을 회피하는 T 세포 고갈을 유도하는 암을 치료하는 데에 유용하게 사용할 수 있다.
- [202] 경우에 따라서, 상기 항체 이외에 다른 항암 치료제를 병용함으로써 PD-L1을 과발현하는 종양 세포를 효과적으로 표적화하고, 항-종양 T 세포 활성을 증가시켜, 종양 세포를 표적화하는 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 기타 항-신생물제 또는 면역원성 제제[(예를 들면, 약화된 암 세포, 종양 항원(재조합 단백질, 웹타이드 및 탄수화물 분자를 포함함), 항원 전달 세포, 예를 들면, 종양 기원된 항원 또는 핵산으로 필스된 가지세포, 면역 자극 사이토킨(예를 들면, IL-2, IFN $\alpha$ 2, GM-CSF), 및 면역 자극 사이토킨을 암호화하는 유전자로 형질감염된 세포(예를 들면, GM-CSF를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)]; 표준 암 치료요법(예를 들면, 화학 치료요법, 방사선치료요법 또는 수술); 또는

기타 항체(VEGF, EGFR, Her2/neu, VEGF 수용체, 기타 성장 인자 수용체, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-IBB, 및 ICOS를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)와 함께 사용될 수 있다.

- [203] 항 PD-L1 항체는 세포 사멸을 유도할 수 있다. 세포 사멸은 직접적 또는 간접적 기전에 의해 유도된다. 예를 들어, 항 PD-L1 항체에 의한 PD-L1 결합은 보체의존성 세포독성(CDC)을 일으킬 수 있다. 경우에 따라, 항 PD-L1 항체는 PD-L1에 결합하고, PD-L1 발현 표적 세포를 사멸시킬 2차 세포 유형의 동원을 일으킨다. 항 PD-L1 항체가 2차 세포 유형의 동원에 의해 세포 사멸을 매개하는 대표적인 기전은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 및 항체 의존성 세포식균작용(ADCP)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표적 PD-L1 발현 세포 유형은 종양 및 T 세포, 예를 들어 활성화된 T 세포를 포함한다.
- [204] 또한, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 감염 및 감염 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- [205] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암 또는 감염 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 암의 발전의 억제, 암의 경감 또는 암의 제거, 또는 감염질환의 억제, 감염질환의 경감 또는 감염질환의 제거를 의미한다.
- [206] 상기 조성물에 적용되는 질환인 암은 전형적으로 면역치료요법에 반응하는 암, 및 지금까지 면역요법에 관련되지 않은 암을 포함한다. 치료용으로 바람직한 암의 비-제한적인 예는 흑색종(예를 들면, 전이성 악성 흑색종), 신장암(예를 들면, 투명세포암종), 전립선암(예를 들면, 호르몬 불응 전립선샘암종), 체장샘암종, 유방암, 결장암, 폐암(예를 들면, 비-소세포 폐암), 식도암, 두경부편평세포암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 갑상샘암, 아교모세포종, 신경아교종, 백혈병, 림프종, 및 기타 신생물암종을 포함한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 성장을 억제할 수 있는 불응 또는 재발 암을 포함한다.
- [207] 항체 또는 항체 단편은 단독, 또는 백신과 함께 사용되어 병원체, 독소, 및 자가-항원에 대한 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 예를 들어, 사람 면역결핍 바이러스, 간염 바이러스 부류 A, B 및 C, 엡스테인 바르 바이러스(Eppstein Barr virus), 사람 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus), 사람 파필로마(papilloma) 바이러스, 헤르페스 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 사람을 전염시키는 바이러스에 대한 면역 반응을 자극시키는데 사용될 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 세균 또는 진균 기생체, 및 기타 병원체의 감염에 대한 면역 반응을 자극시키는데 사용될 수 있다.
- [208] 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, 혼탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [209] 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.
- [210] 경구 투여시, 단백질 또는 웹타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화되어야 한다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [211] 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 암을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [212] 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, 혼탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [213] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [214] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체를 포함하는 암 진단용 조성물이다. 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 처리하여 암을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [215] 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체를 통해 샘플에서의 PD-L1 발현 수준을 측정함으로써 암을 진단할 수 있다. 발현 수준은 통상적인 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있으며, 상기 PD-L1에 대한 항체를 이용한 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [216] 상기 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 암을

진단할 수 있다. 즉, 생물학적 시료에서 본 발명의 마커의 단백질이 고발현 되어 시그널이 정상 생물학적 시료(예컨대, 정상 위조직, 혈액, 혈장 또는 혈청) 보다 강하게 나오는 경우에는 암으로 진단된다.

- [217] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 키트는 본 발명에 따른 PD-L1에 대한 항체를 포함하고, 시료와 항체가 반응함으로써 나타내는 시그널을 분석하여, 암을 진단할 수 있다. 이 때, 상기 시그널은 항체에 결합된 효소 예를 들어 알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 또는 사이토크롬 P450을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이 때 효소에 대한 기질은 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트 (BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움 (NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트 (naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF (enhanced chemiluminescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤자린, D-루시페린, 루시케닌 (비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB (tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민 (OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT (nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS (phenazine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [218] 또한, 본 발명에 따른 키트는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 포함할 수 있으며, 상기 레이블은 화학물질 (예컨대, 바이오틴), 효소 (알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질 (예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질 (chemiluminescent) 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [219] 암 진단을 위해 사용되는 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이를 통해 PD-L1 발현을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있다.
- [220]
- [221] 실시예
- [222] 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.
- [223]

[224] 실시예 1. PD-L1 항원 발현 및 정제

[225] 1. PD-L1 단백질 발현 벡터 제작

[226] PD-L1의 클로닝은 Jurkat cells cDNA 라이브러리 (Stratagene, 미국)를 가지고 세포외 도메인만을 얻기 위해 5'과 3'에 제한효소 *Sfi*I 사이트가 포함된 PD-L1에 대한 프라이머 (표 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭시켰고, 증폭된 PCR 산물은 N293F 벡터를 이용하여 카복시-말단에 인간 Fc (서열번호 248), 마우스 Fc (서열번호 249)를 융합시켜 제작되었다 (도 1).

[227]

[228] [표1]

PD-L1 발현벡터에 대한 프라이머

명칭	5'→3' sequence	서열번호
PD-L1-F	ccaggatggttcttagactcccc	250
PD-L1-R	caccagggttggaaactggc	251

[229]

[230] 2. PD-L1 항원의 발현 및 정제

[231] 항원을 동물세포에서 발현시키기 위해서 HEK-293F 세포에 플라스미드 DNA를 형질감염 (transfection)시켰다. 형질감염을 수행하기 위한 폴리플렉스 (polyplex) 반응액은 프리스타일 293 발현 배지 3 ml에 플라스미드 DNA를 25 μg을 넣어 섞어준 후, 추가로 2 mg/ml PEI (Polyethylenimine) (polyplUSA-형질감염, USA) 50 μl을 넣어 다시 한 번 섞어 주었다. 폴리플렉스 반응액은 15분 동안 상온에서 반응시킨 후, 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 배양된 40 ml의 배양액에 넣어 120 rpm으로 37°C, 8% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다. 형질감염 24시간 후에 보강제 (supplement)인 Soytone (BD, USA)을 최종 농도가 10 g/L가 되도록 첨가한다. 7일 동안 HEK-293F를 이용한 임시발현시스템을 이용하여 항체를 생산하였다. 배양액에서 항원을 얻기 위해 친화도 크로마토그래피 (affinity chromatography)를 수행하였다. 7일째 되는 날 회수한 배양액에서 세포와 세포 잔여물 (debris)을 제거하기 위해 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 DPBS로 세척한 재조합 단백질 A 아가로스 레진과 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다.

[232] 재조합 단백질 A 아가로스 레진을 사용한 경우, 0.1M 글리신 (Glycine)으로 단백질을 용출시켰고 1M Tris-HCl 500 μl로 중화시켜 1차 정제하였고, 1차 정제된 단백질은 Superdex 200 (1.5cm\*100cm) 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 2차 정제를 하였다.

[233] 정제된 단백질은 SDS-PAGE gel과 크기 배제 크로마토그래피 (TSK-GEL G-3000 SWXL Size-exclusion chromatography (SEC) (Tosoh))를 이용하여 순도를

확인하였다.

[234] 그 결과, 도 2a 내지 도 2d에 나타난 바와 같이, 정제된 PD-L1 단백질의 순도는 95% 이상의 순도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[235]

[236] 실시예 2. PD-L1 인간항체의 선별

[237] 1. 항원 준비

[238] 실시예 1에서 제작한 PD-L1-hFc, PD-L1-mFc와 Sino Biological Inc.에서 구입한 PD-L1-his (Catalog Number, 10084-H08H) 단백질 항원 50ug을 면역 흡착(immunosorb) 튜브에 코팅한 후 블로킹(blocking)을 수행하였다.

[239]

[240] 2. 바이오패닝

[241] 인간항체 라이브러리 파아지는  $2.7 \times 10^{10}$ 의 다양성을 가진 인간 scFv 라이브러리를 박테리아에 감염시킨 후 박테리아를 30°C에서 16시간 배양하였다. 배양 후 원심 분리하여 상층액을 PEG로 농축한 다음, 이를 PBS 완충용액에 녹여 인간항체 라이브러리를 준비하였다. 면역튜브에 라이브러리 파아지를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응한 다음, 1XPBS/T와 1XPBS로 워싱 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지들만 용출하였다. 용출된 파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝과정을 통해 양성 파아지의 pool을 얻고, 첫 번째 라운드의 패닝에서 증폭된 파아지를 가지고 PBST 워싱 단계에서 횟수만 늘리고, 나머지는 동일한 방법으로 2라운드와 3라운드 패닝을 수행하였다. 그 결과, 표 2와 같이 3라운드 패닝에서 항원에 결합한 파아지 수가 인풋 대비 아웃풋이 다소 증가였음을 확인하였다.

[242]

[243] [표2]

패닝횟수에 따른 항체의 역가 비교

패닝횟수	파지의 유입수	파지의 결합수
1회	$3 \times 10^{13}$	$6 \times 10^7$
2회	$2 \times 10^{13}$	$2 \times 10^6$
3회	$2.3 \times 10^{13}$	$3 \times 10^8$

[244]

[245] 3. 폴리 파아지 ELISA

[246] 각 1차부터 3차까지 패닝하여 열려두었던 세포 스톡(stock)을 5 ml의 2xYTCM, 2% 글루코오스, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 OD<sub>600</sub>에서 0.1 되게 넣어준 다음, 37°C에서 2~3시간(OD<sub>600</sub>=0.5~0.7) 배양 후 M1 헬퍼 파지를 감염하여 2xYTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리

(4500 rpm, 15 min, 4°C) 후 상층액을 새 투브로 옮겼다. (1차~3차 패닝 poly scFv-phage) 96 웰 면역-플레이트 (NUNC 439454)에 두 종류의 항원 각각을 웰 당 100 ng씩 4°C에서 16시간 정도 코팅버퍼 (coating buffer)로 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스kim 밀크 (skim milk)를 사용하여 각 웰을 블로킹 (blocking)하였다.

[247] 각 웰마다 PBS/T 0.2 ml 사용하여 씻어준 다음 1차~3차 패닝 폴리 scFv-파지를 각 웰에 100 µl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 PBS/T 0.2 ml을 사용하여 4번 씻어준 후 이차 항체인 항-M13-HRP (Amersham 27-9421-01)를 1:2000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. PBS/T로 씻어준 후에 OPD tablet (sigma. 8787-TAB)을 PC 버퍼를 만들어 100 ul/well씩 넣어 10분 동안 발색 시킨 다음 흡광도 490 nm에서 분광광도계 (spectrophotometer : MolecularDevice)로 측정하였다.

[248] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 따르면, 항원에 대한 결합능이 두 가지 PD-L1 항원에 대해 3차 poly scFv-phage에서 증강(enrichment)됨을 ELISA로 확인하였다.

[249]

#### 4. 양성 파아지 선별

[250] 결합능이 큰 다클론 파아지 항체군 (3차 패닝)에서 얻은 클로니를 2xYTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 1 ml 96-깊은 웰 플레이트 (바이오니아 90030)에 37°C에서 16시간 배양하였다. 이렇게 키운 세포에서 OD<sub>600</sub>에서 값이 0.1이 되도록 100~200 ul를 취해 1 ml의 2xYTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 넣은 다음, 96-깊은 웰 플레이트에 37°C에서 OD<sub>600</sub>에서 그 값이 0.5~0.7 되도록 2~3 시간 배양하였다. M1 헬퍼 파지를 MOI값이 1:20 되도록 감염하여 2xYTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양하였다.

[251] 96 웰 면역 플레이트에 항원 PD-L1을 웰당 100 ng씩을 4°C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스kim 밀크를 사용하여 각 웰을 블로킹하였다. 각 웰마다 0.2 ml PBS/T 사용하여 씻어준 16시간 동안 배양한 단일클론 scFv-파지 (각각 100 scFv-phage)를 각 웰에 100 µl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T을 사용하여 4번 씻어준 후 2차 항체인 항-M13-HRP를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[252] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 각 항원에 대한 결합능이 강한 단일 파아지 클론들은 PD-L1에 대해 총 수십 개의 단일 파아지 클론을 얻었다.

[253]

#### 5. 양성 파아지 항체의 염기서열 분석

[254] 상기 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 이용하여 DNA-prep을 수행하여 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠틱). 서열 분석 결과를 보고, 선별된 항체의 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub>의 CDR 부위를 확인하였고 이들 항체와 점라인 (germ line) 항체군의 유사성을 NCBI의 웹페이지

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 조사하였다. 그 결과 10종의 PD-L1에 특이적인 파아지 항체를 얻었고 이는 하기 표 3에 정리하여 제시하였다.

[257]

[258] [표3]

PD-L1 단일 클론의 특성

Clone Name	VH	Identities	VL	Identities2	Group
PDL1-11A7	IGHV1-24	98.00%	IGKV1-12	93.70%	1
PDL1-16E12	IGHV1-69	92.90%	IGLV1-40	89.90%	2
PDL1-22B10	IGHV1-69	93.90%	IGLV1-40	90.90%	3
PDL1-23E5	IGHV1-69	83.70%	IGLV1-40	79.80%	4
PDL1-23E10	IGHV1-69	81.60%	IGLV1-40	96.00%	5
PDL1-27F8	IGHV1-69	85.70%	IGLV1-40	90.90%	6
PDL1-30B1	IGHV3-30	95.90%	IGKV2D-29	93.00%	7
PDL1-31B7	IGHV1-69	93.90%	IGLV1-51	93.90%	8
PDL1-31D9	IGHV3-64	90.80%	IGKV2-40	93.10%	9
PDL1-31E6	IGHV1-69	99.00%	IGKV3-11	89.50%	10

[259]

[260] 선별된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 4 및 표 5와 같다.

[261]

[262] [표4]

PD-L1 클론의 중쇄 가변영역

NAM E	FR1	CD R1	FR2	CD R2	FR3	CDR3	FR4
PDL1- 11A7	QVQLVQS GAEVKKP GASVKVS CKVS	GY TLT ELS	MHWVRQ APGKGLE WMGG	FDP ED GET	IYAQKFQGRVTMTE DTSTDATYMESSL RSEDTAVYYC	ARDPWG GYYGMD V	WGQ GTTV TVSS
서열 번호	26	1	35	8	42	16	50
PDL1- 16E12	QMQLVQ SGAEVKK PGSSVKV SCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQA PGQGLE WMGR	IUPI LGI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMESSLR SEDTAVYYC	AKPRDGY NLVAFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 22B10	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CRAS	GG TFS SYA	ISWVRQA PGQGLE WMGR	IUPI LGI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMESSLR SEDTAVYYC	ARDFVLS GSATVFD P	WGQ GTLV TVSS
서열 번호	28	2	36	9	43	18	52

[263]

PDL1-23E5	QVQLVQS GAEVVKP GSSVKVS CKAS	GD TFS RY A	ISWVRQA PGQAPE WMGR	IIPV LG AA	NYARKFQDRVITITA DISTTTAFMELTSLR SEDTAVYYC	ARSLSGY SLGAFDV	WGPG TLVT VSS
서열 번호	29	3	37	10	44	19	53
PDL1-23E10	QMQLVES GAEVKKP GSSVKVS CKVS	GE NFR SHA	ISWVRQA PGQGLE WMGR	IUPI VG LA	DYPQKFQGRVTISA DESTGTAYMDLSSL RSEDTAVYYC	VTGRPPW H	WGQ GILIT VSS
서열 번호	30	4	36	11	45	20	54
PDL1-27F8	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CKAS	GG TFS SSA	FSWVRQ APGHGLE WMGR	IIP MF DM T	DYAQRFQGRLTIIAD ESSSTAYMELSSLRS EDTAVYYC	ARSNPHY MDV	WGQ GTTV TVSS
서열 번호	31	5	38	12	46	21	50
PDL1-30B1	QVQLVES GGGVVQ PGRSLRL SCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ GPGKGLE WVAV	ISY DGS NE	FYADSVKGRFTISRD NSKNLTYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARGDYNG VYMDV	WGQ GTTV TVSS
서열 번호	32	6	39	13	47	22	50
PDL1-31B7	QVQLVES GAEVKKP GSSVKVS CKAS	GG TFS SYA	ISWVRQA PGQGLE WMGR	IUPI LGI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	ARASSGY SVGAFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	33	2	36	9	43	23	51
PDL1-31D9	QMQLVES GGGLVQP GGSLRLS CSAS	GFT FSS YV	MHWVRQ APGKGLE YVSA	ISS NG GST	YYADSVKGRFTISRD NSKNLTYLQMSSLR SEDTAVYYC	AREHFST YSYGVDV	WGPG TTVT VSS
서열 번호	34	7	40	14	48	24	55
PDL1-31E6	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CKAS	GG TFS SYA	ISWVRQA PGQGLE WMGG	IUPI FGT A	NYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	ARGGRSF GAFDS	WGQ GALV TVSS
서열 번호	31	2	41	15	49	25	56

[264]

[265] [§5]

## PD-L1 클론의 경쇠 가변영역

NAME	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
PDL1-11A7	DIQMTQSPS SVSASVGD RVTINCRAS	QGIRT W	LAWYQQ KPGKAPK LLIY	AAS	NLQSGVPSPRFSG SGSGTDFTLTIAS LQPEDFATYYC	QQAN SFPLT	FGGG TKVE IK
서열번호	145	88	164	103	185	120	211
PDL1-16E12	QLVLTQPPS VSGAPGQT VTISCTGS	SSNIG AGYD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	GNN	NRPSGVPDFSG SKSGALASLAIT GLQAEDGADYH C	QSYD NSLSA HAV	FGTG TKVT VL
서열번호	146	89	165	104	186	121	212
PDL1-22B10	QFVLTQPPS VSGAPGQR VTISCTGS	STNIG AGYD	VHWYQQ LPGKAPK VVIY	GNS	NRPSGVLDRFSA SKSATASLAITG LQAEDDEADYYC	QSYD SSLG YV	FGTG TKVT VL
서열번호	147	90	166	105	187	122	212
PDL1-23E5	QLVLTQPPS VSGAPGQS VSISCIIGS	NSNIG TPYD	VHWYQQI PGEAPKL LIY	GST	NRPSGVPDFSG SRSGSSASLDITG LQADDEAYYYC	QSYD RSLG VSDV V	FGGG TKLT VL
서열번호	148	91	167	106	188	123	213
PDL1-23E10	QLVLTQPPS VSGAPGQR VTISCTGS	SSNIG AGYD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	SNR	NRPSGVPDFSG SKSGTSASLAITG LQAEDDEADYYC	QSYD SSLG PNYV	FGTG TKVT VL
서열번호	149	89	165	107	189	124	212
PDL1-27F8	QLVLTQPPS VSGAPGQR VTISCTGS	NSDIG AGHD	VHWYQQI PGTAPKV LIY	GNT	DRPSGVPDFSG SKSGTSASLAITG LQAEDDEADYYC	QSYD SSLG YV	FGTG TKVT VL
서열번호	149	92	168	108	190	122	212
PDL1-30B1	DIVMTQTPL SLSVTPGQP ASISCKSS	QSLLH SDGK TY	LYWYLQ KPGQSPQ LLIY	EVS	KRFSGVPDFSG SGSGTDFTLKIG RVEAEVGVYY C	MQGL HLPYT	FGQG TKLE IK
서열번호	150	93	169	109	191	125	214
PDL1-31B7	QLVLTQPPS VSAPPGQK VTISCSGS	SSNIG NNY	VSWYQQ LPGTAPK LLIY	DNN	ERPSGIPDRFSAS KSGTSATLGISG LQTGDEADYYC	GTWD SSLG GV	FGGG TKLT VL
서열번호	151	94	170	110	192	126	213
PDL1-31D9	DIVMTQTPL SLPVTPGEP ASISCRSS	QSLLD SDDG NTY	LDWYLQ KPGQSPQ LLIY	MIS	FRASGVPDFSG SGSGTDFTLKISR VEAEDSGIYYC	MQRV EFPYT	FGQG TKLE IK
서열번호	152	95	171	111	193	127	214
PDL1-31E6	DIQMTQSPA TLSLSPGER ATLSCTAS	QSISS Y	LAWYQQ KPGQAPR LLIY	DSS	NRATGIPARFSG SGSGTAFTLTISS LEPEDFAVYFC	QQRG QWPL T	FGGG TKVD IK
서열번호	153	96	172	112	194	128	215

- [266]
- [267] 실시예 3: PD-L1 인간항체의 생산
- [268] 1. scFv 형태를 IgG 형태로 전환 (conversion)
- [269] 선별된 1110종의 PD-L1에 대한 단일 클론 파아지 항체들을 파아지에서 IgG 전체 벡터 (whole vector)로 전환하기 위해 중쇄와 경쇄에 대해 PCR (iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행하였다. 그 결과, 중쇄와 경쇄를 얻었고, 제한 효소로 벡터와 각 클론의 중쇄, 경쇄를 절단하였다. 벡터와 중쇄 각각은 DNA-gel extraction kit (Qiagen)으로 DNA를 용출하였다. 라이게이션 (Ligation)은 vector 1 ul (10 ng) 중쇄 (100~200 ng) 15 ul, 10x Buffer 2 ul, ligase (1 U/ul) 1 ul, 중류수를 혼합하여 실온에서 1~2시간 방치 후, 형질전환 세포 (competent cell) (XL1-blue)에 넣어 열음에 5분간 놓고, 42°C에서 90초간 열 충격 (heat shock)을 주었다.
- [270] 열 충격 후 배지 1 ml을 넣은 뒤 1시간 동안 37°C에서 키운 후, LB Amp 플레이트에 스프레딩 (spreading)하여 37°C에 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 얻은 콜로니를 취해 LB Amp 배지 5 ml을 접종하여 37°C에 16시간 동안 배양 후, DNA-prep kit (Nuclogen) 이용하여 DNA-prep을 수행하였다. 얻은 DNA는 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠틱).
- [271] 그 결과, 전체 IgG로 전환한 PD-L1에 대한 11개의 클론의 중쇄와 경쇄의 서열이 파아지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. HEK 293F 세포에 형질감염하기 위해, 전체 IgG로 전환한 각 클론의 중쇄와 경쇄는 LB Amp 100 ml 배지에 키워 midi-prep kit (QIAgen)을 이용하여 DNA를 얻었다.
- [272]
- [273] 2. 인간항체 생산
- [274] 클로닝된 pNATVH와 pNATVL 벡터는 6:4의 비율로 HEK293F 세포에 동시 형질감염(co-형질감염)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22 μm Top-필터를 통해 세포와 부유물질을 제거한 후, 상층액을 모아 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 수행하여 IgG 항체를 정제하였다. 정제 후 글리신 버퍼 (glycine buffer)를 통해 항체를 분리하고, 최종 재서스펜션 버퍼 (resuspension buffer)는 PBS가 되도록 버퍼를 교환하였다. 정제된 항체를 BCA 및 나노 드랍 (nano drop)을 통해 정량하였고, 15종의 항체를 환원, 비환원 조건에서 각 5 ug씩 로딩하여 SDS-PAGE 분석하여 정제 단백질의 순도 및 이동도 (mobility) 상태를 확인하였다 (도 5).
- [275] 그 결과, 도 5에 따르면, 10종 항체 모두 비환원 조건에서는 150 kDa이상의 크기에서 검출되었다.
- [276]
- [277] 실시예 4: PD-L1 단일 클론 항체의 특성
- [278] 1. 항체의 활성 평가
- [279] 선별된 항체의 활성 평가 실험은 PD1/PD-L1 차단 바이오어세이 키트 (promega, J1250)을 사용하여 진행하였다. PD-L1이 고발현되어 있는 CHO 세포주를 96-웰

플레이트에 도말하고 16시간 이상 배양 후, 일정 농도로 연속 희석된 각 항체들을 처리하고, 인간 PD-1이 고발현되는 Jurkat 세포주를 6시간 동안 함께 배양하였다. 항체의 저해 회복 정도는 루시페라제 (luciferase)가 기질을 분해하여 나오는 발광세기로 알 수 있고 분광광도계 (SpectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, 미국)로 측정하였다. 10종의 PD-L1 항체는 PD-1/PD-L1 복합체 형성으로 감소되어 있던 시그널을 회복시키는 값으로 항체의 활성을 확인하였고, 16E12가 대조 항체 대비 비슷한 활성을 보였다 (도 6).

[280] PD-L1 항체 16E12의 활성 평가를 농도 의존적으로 측정하기 위해 단계 희석을 하여 PD-1/PD-L1 차단 바이오어세이를 다시 진행한 결과 감소되어 있던 시그널을 농도 구배 의존적으로 회복시켰다. 그 회복 정도는 EC50 (effective concentration of mAb at 50% level of Recovery signal)으로 나타낼 수 있고 Graphpad Prism6를 이용하여 분석하였으며 EC50의 *in vitro* efficacy 저해회복능력은 도 7과 같다.

[281]

[282] 2. 과발현 세포에 대한 PD-L1 항체의 친화도

[283] PD-L1을 고발현하는 형질전환 세포 풀은 인간 PD-L1을 포함하고 있는 pcDNA3.1 플라스미드를 HEK293E에 형질전환 시키고, 150 ug/ml Zeocin (#R25001, Thermo Fisher)이 들어 있는 선택적 배지에서 선별하였다. 각 세포 풀은 각 anti-PD-L1을 이용한 FACS (fluorescence activated cell sorting) 분석을 통해 확인되고 선택되었고, FACS 결합 어세이나 FACS 경쟁 어세이와 같은 기능 평가법에 사용되었다.

[284] 인간 PD-L1을 고발현하는 형질전환 세포 풀 각각을 시료당 0.5-1x10<sup>6</sup>의 세포를 준비하고, 항체들을 각각 일정한 희석 배수로 연속적으로 희석하여 준비된 세포와 4°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후, 세포는 2% 소태아혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 PBS (#LB001-02, welgene)로 3차례 수세하고, FITC (fluorescein isothiocyanate) 형광물질이 결합된 항-인간 IgG 항체 (#FI-3000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 20분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.5 ml의 2% FBS(#26140-079, Thermo fisher)가 든 PBS로 혼탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다. 그 결과로 PD-L1 항체 16E12가 특이적으로 결합하였고, 그 결합력은 평형해리상수(equilibrium dissociation constant, Kd)를 Graphpad Prism6의 분석함수를 통하여 구하였다.

[285] 그 결과, 도 8에 따르면, 세포표면에 과발현된 인간 PD-L1에 대해 농도 의존적으로 결합된 항체의 결합력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 알 수 있다.

[286]

[287] 3. ProteOn XPR36을 이용한 PD-L1 항체의 친화도

[288] ProteOn XPR36 (BioRad) 기기를 통해 수행하였다. GLC 센서칩 (BioRad)을

기기에 장착하고 PBST 완충용액으로 세척을 한 후, EDC/sulfo-NHS 혼합액으로 카르복시메틸 텍스트란 표면을 활성화시켰다. 10 mM 소듐 아세테이트 (sodium acetate), pH 5.0, 완충액에 5 ug/ml 농도로 녹인 PD-L1-hFc을 주입시켜 GLC 센서칩에 고정화시켰다.

- [289] PD-L1 단백질과 반응하지 않고 남아있는 활성화된 카르복시 그룹을 비활성화시키기 위해 1 M 에탄올아민을 흘려주었고, 센서칩에 결합되지 않은 단백질을 세척하기 위해 10 mM glycine, pH2.0을 주입하였다. 이후 PBST 완충액을 이용하여 항체를 농도별 (30 nM ~ 0.123 nM)로 30 ul/min 유속으로 10분 흘려주면서 시간에 따른 결합과 해리과정 중의 센소그램 (sensogram) 데이터를 수집하였다.
- [290] 평형상태에서의 센소그램 데이터를 농도에 따라 플로팅 (plotting) 및 피팅 (fitting)하여 평형 해리상수 ( $K_D$ ) 계산한 결과 0.045 nM로 PD-L1 항원에 대해 높은 친화도를 보였다 (도 9).
- [291]
- [292] 실시예 5: PD-L1항체 16E12에 대한 항체 최적화
- [293] 1. PD-L1-16E12 항체의 최적화를 위한 라이브러리 제작
- [294] 항체 최적화는 중쇄는 고정하고 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 105-106 경쇄 (LC) 풀 (pool)을 넣어 새로운 LC 셔플링 라이브러리 (LC shuffling library)를 제작하고, LC 셔플링, 중쇄의 소수성 코어 (hydrophobic core), 노출 잔기 (exposed residue), 전하 클러스터 (charge cluster), 염 브릿지 (salt bridge)등과 같이 구조적으로 중요한 부위의 잔기들과 비교분석을 하여 보존된 잔기 (conserved residue)로 변이시킨 뒤 LC 셔플링을 진행하는 코어 팩킹 (core packing) + LC 셔플링, 항체 가변 영역 (antibody variable region)의 DNA는 *in vivo* 친화도 성숙 (affinity maturation) 과정에서 빈번하게 변이 (mutation) 될 수 있는 변이 핫스팟 (mutational hot spot)을 랜덤하게 변이시킨 뒤 LC 셔플링을 진행하는 CDR 핫스팟 + LC 셔플링등 3가지 방법으로 진행을 하였다.
- [295] LC 셔플링 라이브러리를 제작하기 위해 16E12 항체의 LC 유전자를 BstX I으로 절단한 다음 벡터로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약  $1.5 \times 10^7$  의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 서열은 모두 같으며 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.
- [296] Core 팩킹 + LC 셔플링 라이브러리를 제작하기 위해 16E12 항체의 frame work (FR) 부분을 보존 (conserved)된 아마노산 서열로 치환한 뒤 LC 유전자를 BstX I으로 절단한 다음 벡터로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행하였다.

사각 접시 (square plate)에 형질전환된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약  $8.4 \times 10^6$ 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR 부위가 보존 (conserved)된 아마노산 서열로 치환되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.

- [297] CDR 핫스팟 + LC 셔플링 라이브러리를 제작하기 위해 16E12 항체의 frame work (FR) 부분을 보존 (conserved)된 아마노산 서열로 치환한 뒤 CDR1의 핫스팟 라이브러리를 Sfi I으로 절단 한 다음 인서트로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 library pool을 Sfi I으로 절단하여 벡터로 사용하였다. 리가제로 라이게인션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행 하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환 된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약  $5.6 \times 10^6$ 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR 부위가 보존 (conserved)된 아마노산 서열로 치환되었고 CDR1의 핫스팟 서열의 아미노산이 랜덤하게 변이되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.
- [298]
- [299] 실시예 6: PD-L1 인간 항체의 선별
- [300] 1. 항원 준비
- [301] 와이바이오로직스에서 생산한 PD-L1-hFc, PD-L1-mFc와 Sino Biological Inc.에서 구입한 PD-L1-his (Catalog Number, 10377-H08H) 단백질 항원 50 ug을 immunosorb tube에서 코팅한 후 블로킹 (blocking)을 수행하였다.
- [302]
- [303] 2. 바이오-패닝
- [304] 인간항체 라이브러리 파아지는  $2.7 \times 10^{10}$ 의 다양성을 가진 인간 scFv 라이브러리를 박테리아에 감염시킨 후 박테리아를  $30^{\circ}\text{C}$ 에 16 시간 배양하였다. 배양 후 원심 분리하여 상층액을 PEG로 농축한 다음, 이를 PBS 완충용액에 녹여 인간항체 라이브러리를 준비하였다. 면역튜브에 라이브러리 파아지를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응한 다음, 1XPBS/T와 1XPBS로 위싱 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지들만 용출하였다.
- [305] 용출된 파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝과정을 통해 양성 파아지의 폴 (pool)을 얻었고, 항체 죄적화를 위한 패닝은 첫 번째 라운드만 진행하였다. 그 결과, 표 6과 같이 1라운드 패닝에서 항원에 결합한 파아지 수가 유입 (input) 대비 결합 (output)이 다소 증가였음을 확인 하였다.
- [306]

[307] [표6]

최적화 패닝에 따른 항체의 역가미교

샘플	파지 유입수	파지 결합수
16E12 (LS)	$1.3 \times 10^{13}$	$2.8 \times 10^7$
16E12 (Core packing +LS)	$1.1 \times 10^{13}$	$1.8 \times 10^6$
16E12 (CDR hotspot +LS)	$1.1 \times 10^{13}$	$1.6 \times 10^6$

[308]

[309] 3. 양성 파아지 선별

[310] 패닝에서 얻은 콜로니를 2xYTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 1 ml 96-깊은 웰 플레이트 (96-deep well plate: 바이오니아 90030)에 37°C에서 16시간 배양 하였다. 이렇게 키운 세포에서 OD<sub>600</sub>에서 값이 0.1이 되도록 100~200 ul를 취해 1 ml의 2xYTCM, 2% glucose, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 넣은 다음, 96-깊은 웰 플레이트에 37°C에서 OD<sub>600</sub>에서 그 값이 0.5~0.7 되도록 2~3 시간 배양하였다. M1 헬퍼 파지를 MOI값이 1:20 되도록 감염하여 2xYTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양하였다.

[311] 96웰 면역 플레이트에 항원 PD-L1을 well당 100 ng씩을 4 °C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스Kim 밀크를 사용하여 각 웰을 블로킹하였다. 각 웰마다 0.2 ml PBS/T 사용하여 씻어준 16시간 동안 배양한 단일클론 scFv-파지 (각각 100 scFv-phage)를 각 well에 1 μl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T을 사용하여 4번 씻어준 후 2차 항체인 anti-M13-HRP를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[312] 그 결과, 모항체 (16E12, 빨간색표시-6D) 각 항원에 대한 결합능이 강한 수십개의 단일 파아지 클론을 얻었고, 도 10과 같다.

[313] 4. 양성 파아지 항체의 염기서열 분석

[314] 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 이용하여 DNA-prep을 수행하여 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠틱). 서열 분석 결과를 보고, 선별된 항체의 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub>의 CDR region을 확인하였고 이들 항체와 germ line 항체군의 유사성을 NCBI 의 웹페이지 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> 의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 조사하여 그 결과 21종의 모항체보다 결합력이 높은 특이적인 파아지 항체를 얻었고 이는 하기 표 7에서 정리하여 제시하였다.

[315]

[316] [표7]

## 최적화 PD-L1의 단일 클론의 특성

클론명	VH	유사도	VL	유사도 2	그룹
PDL1-16E12(LS/4A6)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	90.91%	1
PDL1-16E12(LS/4A7)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	88.89%	2
PDL1-16E12(LS/4A8)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	85.86%	3
PDL1-16E12(LS/4A10)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	87.88%	4
PDL1-16E12(LS/4A11)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	90.91%	5
PDL1-16E12(LS/4B7)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	88.89%	6
PDL1-16E12(LS/4B8)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	84.85%	7
PDL1-16E12(LS/4B11)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	86.87%	8
PDL1-16E12(LS/4B12)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	89.90%	9
PDL1-16E12(LS/4C9)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	88.89%	10
PDL1-16E12(LS/4D4)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	92.93%	11
PDL1-16E12(LS/4E5)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	90.91%	12
PDL1-16E12(LS/4E12)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	86.87%	13
PDL1-16E12(LS/4F5)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	93.94%	14
PDL1-16E12(LS/4F11)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	94.95%	15
PDL1-16E12(LS/4G1)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	89.90%	16
PDL1-16E12(LS/4H5)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	97.98%	17
PDL1-16E12(LS/4H6)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	88.89%	18
PDL1-16E12(LS/4H8)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	96.97%	19
PDL1-16E12(LS/4H9)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	90.91%	20
PDL1-16E12(LS/4H11)	IGHV1-69	92.86%	IGLV1-40	91.92%	21

[317]

[318] 선별된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 8 및 표 9와 같다.

[319]

[320] [§8]

## PD-L1 인간항체의 종세 가변영역

NAM E	FR1	CD R1	FR2	CD R2	FR3	CDR3	FR4
PDL1- 16E12 (LS/4 A6)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 A7)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 A8)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 A10) 서열 번호	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
PDL1- 16E12 (LS/4 A11)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 B7)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 B8)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 B11)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 B12)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 C9)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 D4)	QMQLVQSGA EVKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS

[321]

서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 E5)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 E12)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 F5)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 F11)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 G1)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 H5)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 H6)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 H8)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 H9)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51
PDL1- 16E12 (LS/4 H11)	QMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKAS	GG TFS SYA	ISWVRQ APGQGL EWMGR	IIP IL GI A	NYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	AKPRD GYNLV AFDI	WGQ GTMV TVSS
서열 번호	27	2	36	9	43	17	51

[322]

[323] [§9]

PD-L1 인간형체의 경쇄 가변영역

NAM E	FR1	CDR1	FR2	C D R 2	FR3	CDR3	FR4
PDL1- 16E12 (LS/4 A6)	QLVLTQPTSV SGAPGQRVII SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N T	NRPSGVDRFSGSKS GTAASLAITGLQAED EADYYC	QSFDR SRSGS NV	FGTG TKVT VL
서열 번호	154	89	165	10 8	195	129	212
PDL1- 16E12 (LS/4 A7)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQS LPGTPK LLIS	G N S	NRPPGVDRFSGSKS GTSASLAITSQSEDE ADYYC	HSYD GSLSE GV	FGTG TKVT VL
서열 번호	149	89	173	10 5	196	130	212
PDL1- 16E12 (LS/4 A8)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVII SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQH RPGKAPQ LLIY	G D N	NRPSGIPDRFSGSKS GTSASLAITGLQPED EADYYC	QSFDS RLGIV V	FGGG TKLT VL
서열 번호	149	89	174	11 3	197	131	213
PDL1- 16E12 (LS/4 A10)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	NSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIH	G N N	IRPSGVDRFSGSRSG TSASLAITGLQADDE ANYFC	QSYD NSLRG SV	FGTG TKVT VL
서열 번호	149	97	175	10 4	198	132	212
PDL1- 16E12 (LS/4 A11)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVII SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ VPGTAPK LLIY	G N N	HRPSGVDRFSGSKS GTSASLAITGLQAED ETDYYC	QSYD NRLSG SL	FGGG TKLT VL
서열 번호	155	89	176	10 4	199	133	213
PDL1- 16E12 (LS/4 B7)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGT	NSNI GAG YD	VIIWYQQ LPGTAPK LLIV	T N H	NRPSGVDRFSGSKS DTSASALATGLQADE EATYYC	QSYD RLSGP V	FGTG TKVT VL
서열 번호	156	97	177	11 4	200	134	212
PDL1- 16E12 (LS/4 B8)	QLVLTQPPSV SGAPGQSVTI SCTGS	NSDI GAG HD	VHWYQQ LPGAAPK LLIH	G D R	DRPSGVDRFSGSKS GTSASLAITGLQPED EADYYC	QSYN NSLRG SV	FGTG TKVT VL
서열 번호	158	92	178	11 5	201	135	212
PDL1- 16E12 (LS/4 B11)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGT	NSNI GAG HD	VQWYQQ IPGTAPK LLIY	G N N	NRPSGVDRFSGSKS GTLASLAITGLQSED EADYYC	HSYD GSLSE GV	FGTG TKVT VL
서열 번호	157	98	179	10 4	202	130	212
PDL1- 16E12 (LS/4 B12)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G D T	KRASGVDRFSGSKS GTSASLAITGLQAED GADYYC	QSYD NSLSA HAV	FGTG TKVT VL
서열 번호	149	89	180	11 6	203	121	212
PDL1- 16E12 (LS/4 C9)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGG	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLLF	G N T	NRPSGVGRFSGSKS GSSASLAITGLQSDD EADYYC	QSYDS SLGGS V	IGIG TKVT VL
서열 번호	159	89	181	10 8	204	136	216
PDL1- 16E12 (LS/4 D4)	QLVLTQPSSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNL GAP YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N S	NRPSGVDRFSVSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS SLSSS V	FGGG TKLT VL
서열 번호	160	99	165	10 5	205	137	213
PDL1- 16E12 (LS/4E 5)	QLVLTQPPSV SGAPGQGVII SCTGD	SSNI GAG YD	VHWYQQ FPGTAPK LLIY	E N S	NRPSGVDRFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYD RLGA V	FGGG TKLT VL
서열 번호	161	89	182	11 7	189	138	213
PDL1- 16E12 (LS/4E 12)	QLVLTQPPSV SAAPGQKVTF SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQH LPGAAPR LLIY	A N T	NRPLGVDRFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYD NRLSG SL	FGGG TKLT VL

[324]	서열 번호	162	89	183	11 8	206	133	213
PDL1-16E12 (LS/4F 5)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G DI	NRPSGVPDFSGSKS GISASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS SLSGG V	FGGG TKLT VL	
서열 번호	149	89	184	11 9	207	139	213	
PDL1-16E12 (LS/4F 11)	QFVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG SD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N N	NRPSGVPDFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS SLNGV V	FGGG TKLT VL	
서열 번호	147	100	165	10 4	189	140	213	
PDL1-16E12 (LS/4 G1)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGG	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLL	G N T	NRPSGVGRFSGSKS GSSASLAITGLQSDD EADYYC	QSYDS SLSGS V	FGTG TKVT VL	
서열 번호	159	89	181	10 8	204	141	212	
PDL1-16E12 (LS/4 H5)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N S	NRPSGVPDFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS SLSGG V	FGGG TKLT VL	
서열 번호	149	89	165	10 5	189	139	213	
PDL1-16E12 (LS/4 H6)	QLVLTQPPSV SAAPGQTVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ FPGTAPK LLIY	G N N	NRPSGVPDFSGSKS GTSASLAITGLQTDD EADYFC	QSYDS SLRVS SV	FGTG TKVT VL	
서열 번호	163	89	182	10 4	208	142	212	
PDL1-16E12 (LS/4 H8)	QLVLTQPSSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNI GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N S	NRPSGVPDFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS SLSGS GV	FGTG TKVT VL	
서열 번호	160	89	165	10 5	189	143	212	
PDL1-16E12 (LS/4 H9)	QFVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	RSNF GAG HD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N N	NRPSGVPDFSGSKS GTSASLAIAGLQSDD EADYYC	QSYDS SLSGS V	FGTG TKVT VL	
서열 번호	147	101	165	10 4	209	141	212	
PDL1-16E12 (LS/4 H11)	QLVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGS	SSNV GAG YD	VHWYQQ LPGTAPK LLIY	G N N	NRPSGVPARFSGSKS GTSASLAITGLQAED EADYYC	QSYDS RLGV V	FGGG TKLT VL	
서열 번호	149	102	165	10 4	210	144	213	

[325]

[326] 실시예 7: PD-L1 인간항체의 생산

[327] 1. scFv 형태를 IgG 형태로 전환 (conversion)

[328] 선별된 21종의 PD-L1에 대한 단일 클론 파아지 항체들을 파아지에서 IgG whole

vector로 전환하기 위해 중쇄와 경쇄에 대해 PCR (iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행하였다. 그 결과, 중쇄와 경쇄를 얻었고, 제한 효소로 벡터와 각 클론들의 중쇄, 경쇄를 절단하였다. 벡터와 중쇄 각각은 DNA-겔 추출 키트 (DNA-gel extraction kit : Qiagen)로 DNA 용출하였다. 라이게이션 (ligation)은 벡터 1 ul (10 ng) 중쇄 (100~200 ng) 15 ul, 10x 버퍼 2 ul, 리가아제 (1 U/ul) 1 ul, 중류수를 혼합하여 실온에서 1~2시간 방치 후, 형질전환 세포 (competent cell : XL1-blue)에 넣어 얼음에 5분간 놓고, 42°C에서 90초간 열 충격 (heat shock)을 주었다.

- [329] 열 충격 후 배지 1 ml을 넣은 뒤 1시간 동안 37°C에서 키운 후, LB Amp 플레이트에 스프레딩하여 37°C에 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 얻은 콜로니를 취해 LB Amp 배지 5 ml을 접종하여 37°C에 16시간 동안 배양 후, DNA-prep kit (Nuclogen) 이용하여 DNA-prep을 수행하였다. 얻은 DNA는 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠틱).
- [330] 그 결과, 전체 IgG로 전환한 PD-L1에 대한 21개의 클론의 중쇄와 경쇄의 서열이 파악지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. HEK 293F 세포에 형질감염하기 위해, 전체 IgG로 전환한 각 클론의 중쇄와 경쇄는 LB Amp 100 ml 배지에 키워 midi-prep kit (QIAgen)을 이용하여 DNA를 얻었다.
- [331]
- [332] 2. 인간항체 생산
- [333] 클로닝된 pNATVH와 pNATVL 벡터는 6:4의 비율로 HEK293F 세포에 동시 형질감염(co-형질감염)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22 μm Top-필터를 통해 세포와 부유물질을 제거한 후, 상층액을 모아 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 수행하여 IgG 항체를 정제하였다. 정제 후 글리신 버퍼 (glycine buffer)를 통해 항체를 분리하고, 최종 재서스펜션 버퍼 (resuspension buffer)는 PBS가 되도록 버퍼를 교환하였다. 정제된 항체를 BCA 및 나노 드랍 (nano drop)을 통해 정량하였고, 21종의 항체를 환원, 비-환원 조건에서 각 5 ug씩 로딩하여 SDS-PAGE 분석하여 정제 단백질의 순도 및 이동도 (mobility) 상태를 확인하였다. 또한 상층액의 일부는 모항체와의 발현율을 비교하기 위해 SDS-PAGE에 로딩하였고 대부분 항체가 모항체보다 발현율이 증가하였다.
- [334]
- [335] 실시 예 8: PD-L1 단일 클론 항체의 특성
- [336] 1. 항체의 활성 평가
- [337] 선별된 항체의 활성 평가 실험은 PD-1/PD-L1 차단 바이오어세이 키트 (blockade bioassay kit : promega, J1250)을 사용하여 진행하였다. PD-L1이 고발현되어 있는 CHO 세포주를 96-웰 플레이트에 도말하고 16시간 이상 배양 후, 일정 농도로 연속 희석된 각 항체들을 처리하고, 인간 PD-1이 고발현되는 Jurkat 세포주를 6시간 동안 함께 배양하였다. 항체의 저해 회복 정도는 루시퍼라제가 기질을 분해하여 나오는 발광세기로 알 수 있고 분광광도계 (SpectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, 미국)로 측정하였다.

21종의 PD-L1 항체는 PD-1/PD-L1 복합체 형성으로 감소되어 있던 시그널을 회복시키는 값으로 항체의 활성을 확인하였고, 4A7, 4A11, 4C9, 4F5, 4H5, 4H8이 모항체 대비 활성이 증가하였고 대조 항체 대비 비슷한 활성도를 보였다(도 11 및 표 10).

[338]

[339] [표10]

선택된 PD-L1 항체 변이체의 단일 클론의 활성

Name	Average *EC50 [nM]
PD-L1-11A7	3.25
PD-L1-16E12(WT/Lambda)	
PD-L1-16E12(WT/Lambda)	0.96
PD-L1-16E12-4A6	0.48
PD-L1-16E12-4A7	0.37
PD-L1-16E12-4A8	0.83
PD-L1-16E12-4A10	0.45
PD-L1-16E12-4A11	0.34
PD-L1-16E12-4B8	188.40
PD-L1-16E12-4B11	0.63
PD-L1-16E12-4B12	0.46
PD-L1-16E12-4C9	0.39
PD-L1-16E12-4D4	0.57
PD-L1-16E12-4E5	0.45
PD-L1-16E12-4E12	0.49
PD-L1-16E12-LS-4F5(Kappa)	0.25
PD-L1-16E12-4F11	1.68
PD-L1-16E12-4G1	0.47
PD-L1-16E12-4H5	0.33
PD-L1-16E12-4H6	0.51
PD-L1-16E12-4H8	0.36
PD-L1-16E12-4H9	0.63
PD-L1-16E12-4H11	1.02
PD-L1-16E12-Kappa	0.47
PD-L1-16E12-FR-LS-4F5(Kappa)	13.67
PD-L1-16E12-LS-4F5(Lambda)	0.25
PD-L1-16E12-FR-LS-4F5(Lambda)	14.19
PD-L1-16E12-FR-C-LS-4F5(Kappa)	5.93
PD-L1-16E12-FR-C-LS-4F5(Lambda)	4.92
PD-L1-23E5	1.61
PD-L1-27F8	1.10
PD-L1-31B7	1.74

[340]

- [341] PD-L1 항체 6종(4A7, 4A11, 4C9, 4F5, 4H5, 4H8)에 대해 다시 활성 평가를 놓고 의존적으로 측정하기 위해 단계 희석을 하여 PD-1/PD-L1 차단 바이오어세이를 다시 진행한 결과 감소되어 있던 시그널을 놓고 구배 의존적으로 회복시켰다. 그 회복 정도는 EC50 (effective concentration of mAb at 50% level of Recovery signal)으로 나타낼 수 있고 Graphpad Prism6를 이용하여 분석하였으며 EC50의 In vitro efficacy 저해 회복 능력은 4F5가 가장 높게 나왔다 (도 12).
- [342]
- [343] 2. 과발현 세포에 대한 PD-L1 항체의 친화도
- [344] 인간 PD-1을 고발현하는 형질전환 세포 풀은 인간 PD-1(NM\_005018.2) 혹은 인간 PD-L1(NM\_014143.2)을 포함하고 있는 pcDNA3.1 플라스미드를 HEK293E에 형질전환시키고, 400 ug/ml Zeocin (#R25001, Thermo Fisher)이 들어있는 선택적 배지에서 선별하였다. 각 세포 풀은 각각 anti-PD-1 (#557860, BD)을 이용한 FACS(fluorescence activated cell sorting) 분석을 통해 확인되고 선택되었고, FACS 결합 어세이나 FACS 경쟁 어세이 (Competition assay)와 같은 기능 평가법에 사용되었다. 인간 PD-L1을 고발현하는 형질전환 세포 풀 각각을 시료당 0.5-1x10<sup>6</sup>의 세포를 준비하고, 항체들을 각각 일정한 희석 배수로 연속적으로 희석하여 준비된 세포와 4°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후, 세포는 2% 소태아혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 PBS (#LB001-02, welgene)로 3차례 수세하고, FITC (fluorescein isothiocyanate) 형광물질이 결합된 항-인간 IgG 항체 (#FI-3000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 20분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.5 ml의 2% FBS(#26140-079, Thermo fisher)가 든 PBS로 혼탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다 (표 11).
- [345]

[346] [표11]

선별된 PD-L1 항체 변이체의 세포 표면에 발현된 PD-L1에 대한 결합

	Binding at 0.9 ~10 ug/ml Y / N
	human PD-L1+
<b>Atezolizumab</b>	Y
<b>Avelumab</b>	Y
<b>PD-L1-11A7</b>	Y
<b>PD-L1-16E12</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4A11)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4A7)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4C9)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4F5)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4H5)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(LS/4H8)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(WT/kappa)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12(WT/Lambda)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12-FR-LS- 4F5(Kappa)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12-FR-LS- 4F5(Lambda)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12-LS-4F5(Kappa)</b>	Y
<b>PD-L1-16E12-LS-4F5(Lambda)</b>	Y
<b>PD-L1-22B10</b>	Y
<b>PD-L1-22E10</b>	Y
<b>PD-L1-22E5</b>	Y
<b>PD-L1-27F8</b>	Y
<b>PD-L1-30B1</b>	N
<b>PD-L1-31B7</b>	Y
<b>PD-L1-31D9</b>	N
<b>PD-L1-31E6</b>	Y

[347]

- [348] 인간의 PD-L1을 고발현하는 형질전환 세포 풀 각각을 시료당  $0.5 \times 10^6$ 의 세포를 준비하고, 항체들을 각각 일정한 희석배수로 연속적으로 희석하여 준비된 세포와 4°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후, 세포는 2% 소태아혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 PBS (#LB001-02, welgene)로 3차례 수세하고, FITC (fluorescein isothiocyanate) 형광물질이 결합된 항-인간 IgG 항체 (#FI-3000, Vectorlabs)를 사용하여 4°C에서 20분간 반응 후, 동일한 수세과정을 거치고 이후 0.5 ml의 2% FBS(#26140-079, Thermo fisher)가 든 PBS로 혼탁시킨 후, 유세포 분석기인 FACsCanto II flow cytometer(BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다 (도 13).
- [349]
- [350] 3. 효소면역흡착을 이용한 PD-1/PD-L1 복합체의 형성을 막는 항체의 저해능력
- [351] 인간 PD-1-Fc(S1420, Y-Biologics)를 96-웰 면역 마이크로플레이트 (96-well immuno microplate: #439454, Thermo)의 웰에 4°C에서 16시간 동안 고정시키고, 0.05% tween-20(#P9416, Sigma-Aldrich)이 들어있는 PBS로 3번 세척 후, 4% 스呓 밀크(#232120, Becton, Dickinson and Company)가 포함된 세척액으로 상온에서 1시간동안 방치함으로써 비특이적 결합을 차단하였다. 그 사이 일정 희석배수로 연속 희석된 각 항체와 인간 PD-L1-His (S1479, Y-Biologics)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 준비된 마이크로플레이트에 넣어 상온에서 1시간 동안 방치시킨다. 동일한 세척방법을 적용한 이후, anti-Biotin-His 항체 (#MA1-21315-BTIN, Thermo)를 1:2000으로 희석하여 마이크로플레이트의 웰에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세척한 뒤 Streptavidin poly-HRP 항체(#21140, Pierce)를 1: 5000으로 희석하여 마이크로플레이트의 웰에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세척하였다. 100 ul TMB 기질용액 (#T0440, Sigma-Aldrich)을 넣고 빛을 차단한 뒤 상온에서 3분간 방치 후 50 ul 2.5M 황산(#S1478, Samchun)을 넣어 반응을 중단시키고 분광광도계(#GM3000, Glomax® Discover System Promega)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.
- [352]
- [353] 4. ProteOn XPR36을 이용한 PD-L1 항체의 친화도
- [354] ProteOn XPR36 (BioRad) 기기를 통해 수행하였다. GLC 센서칩 (BioRad)을 기기에 장착하고 PBST 완충용액으로 세척을 한 후, EDC/sulfo-NHS 혼합액으로 카르복시메틸 텍스트란 표면을 활성화 시켰다. 10 mM 소듐 아세테이트 (sodium acetate), pH 5.0, 완충액에 5 ug/ml 농도로 녹인 PD-L1-hFc을 주입시켜 GLC 센서칩에 고정화시켰다.
- [355] PD-L1 단백질과 반응하지 않고 남아있는 활성화된 카르복시 그룹을 비활성화시키기 위해 1 M 에탄올아민을 흘려주었고, 센서칩에 결합되지 않은 단백질을 세척하기 위해 10 mM 글리신 (glycine), pH 2.0을 주입하였다. 이후 PBST 완충액을 이용하여 항체를 농도별 (30 nM ~ 0.123 nM)로 30 ul/min

유속으로 10분 흘려주면서 시간에 따른 결합과 해리과정 중의 센소그램 (sensogram) 데이터를 수집하였다.

[356] 평형상태에서의 센소그램 데이터를 농도에 따라 플로팅 (plotting) 및 피팅 (fitting)을 하여 평형 해리상수 (KD)계산한 결과 16E12(4F5)은 0.001 nM로 PD-L1 항원에 대해 높은 친화도를 보였다 (도 15).

[357] PDL1-16E12, LS, 4F5의 사람, 원숭이, 생쥐 PD-L1 단백질의 결합능 비교 결과는 표 12에 기재한 바와 같다.

[358]

[359] [표12]

선별된 PD1 항체(16E12-4F5)의 단일 클론 항체의 사람, 원숭이 생쥐의 결합력

PD-L1 Origin	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)
human	$1.0 \times 10^{-12}$	$3.100 \times 10^5$	$1.0 \times 10^{-7}$
mouse	$8.082 \times 10^{-10}$	$8.327 \times 10^5$	$6.730 \times 10^{-4}$
cynomolgus	$1.0 \times 10^{-12}$	$2.869 \times 10^5$	$1.0 \times 10^{-7}$

[360]

[361] 실시예 9: PD-L1 단일 클론 항체의 에피토프 (epitope) 결정

[362] 96-웰 면역-플레이트에 항원 PD-L1 wild type (WT) 또는 여러 변이체 (mutants)를 웰 당 100 ng씩 4 °C에서 16시간 코딩한 후 PBS에 녹인 4% 스kim 밀크를 사용하여 각 웰을 차단 (blocking)하였다. 각 웰마다 0.2 ml PBS/T 사용하여 씻어준 뒤 16시간 동안 배양한 단일클론 scFv-phage (each 100 scFv-phage)를 각 well에 100 μl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T을 사용하여 4번 씻어준 후 2차 항체 (second antibody)인 anti-Fab를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[363] 그 결과, 대조 항체와 PD-L1 변이체들에 대해 다른 결합양상을 보임으로 다른 에피토프를 가진다는 것을 확인할 수 있었다 (도 16).

[364]

[365] 실시예 10: PD-L1 단일 클론 항체의 이종 MLR (allogenic MLR) 반응에서의 활성 증가

[366] 서로 다른 인간으로부터 분리된 단핵구 유래 수지상 세포 (monocyte derived dendritic cell)에 T 세포를 1: 10의 비율로 섞은 후에 5일 배양 후 배양액의 인터페론 감마의 양을 재어 보면 16E12의 모항체를 넣어준 것에서 농도에 의존적으로 인터페론 감마의 양이 증가함을 확인하였다 (도 17).

[367]

[368] 실시예 11: PD-L1 단일 클론 항체의 동계 (syngeneic) 암동물 모델에서의 효능 평가

- [369] 16E12-2B9 PD-L1 단일 클론 항체의 생체내 효능을 확인하기 위하여 BALb/C 마우스에 옆구리 피하에 대장암 세포인 CT-26 세포를  $8 \times 10^6$ 개 투여하고 종양의 크기가 줍쌀만할 때부터 3주간 주 2회씩 5mg/kg의 용량으로 투여하면서 종양의 성장을 관찰하였다. 경우, PD-L1 단일 클론 항체 투여 군에서 현격한 종양 크기의 증가 감소가 관찰되었다(도 18).
- [370] 실시 예 11: PD-L1 단일 클론 항체의 열 안정성 테스트
- [371] 항체 단백질을 DPBS에 희석하여 3uM, 45 uL를 만들고, 200x sypro orange dye(#S6650, Thermo) 5 uL와 섞어서 qPCR Tube(#B77009, B57651, bioplastics)에 50 uL씩 분주한다. Biorad CFX96 real time PCR 기기를 사용하여 qPCR을 실시하였다. qPCR 조건은 다음과 같이 25도에서 30초 반응 후, 99도까지 1도씩 증가시키되 각 온도에 1분간 반응시키고 마지막 25도 10초 반응을 시켜 마무리 하였다. 항체 구조가 풀리는 속도 상수로는 Tm (Melting temperature, 용융 온도)을 사용하였다. 그 결과는 아래 표(표13)와 같다.
- [372]
- [373] [표13]

## 항체의 열역학적 안정성

Sample	Tm
Avelumab	61
Atezolizumab	67
16E12(WT/kappa)	67
16E12-LS-4F5(K)	67
16E12-LS-4F5(L)	67

- [374]
- [375] 실시 예 13: PD-L2와의 결합력 여부
- [376] 항 PD-L1 항체의 PD-L2와 결합 여부를 확인하기 위해 인간 PD-L2-Fc(#10292-H02H, Sino)를 96-웰 면역 마이크로플레이트 (96-well immuno microplate: #439454, Thermo)의 웰에 4°C에서 16시간 동안 고정시키고, 0.05% tween-20(#P9416, Sigma-Aldrich)이 들어 있는 PBS로 3번 세척 후, 4% 스呓 밀크(#232120, Becton, Dickinson and Company)가 포함된 세척액으로 상온에서

1시간동안 방치함으로써 비특이적 결합을 차단하였다. 그 사이 일정 희석 배수로 연속 희석된 각 항체 혹은 양성 대조로 사용된 인간 PD-1-His (S1352, Y-Biologics)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 준비된 마이크로플레이트에 넣어 상온에서 1시간 동안 방치시킨다. 동일한 세척 방법을 적용한 이후, anti-Biotin-His 항체 (#MA1-21315-BTIN, Thermo)를 1:2000으로 희석하여 마이크로플레이트의 웰에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세척한 뒤 Streptavidin poly-HRP 항체(#21140, Pierce)를 1: 5000으로 희석하여 마이크로플레이트의 웰에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세척하였다. 100 ul TMB 기질용액 (#T0440, Sigma-Aldrich)을 넣고 빛을 차단한 뒤 상온에서 3분간 방치 후 50 ul 2.5M 황산(#S1478, Samchun)을 넣어 반응을 중단시키고 분광광도계(#GM3000, Glomax® Discover System Promega)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 19 에 나타내었다.

[377]

### 산업상 이용가능성

[378]

본 발명에 따른 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 PD-L1에 높은 친화력으로 결합하면서도, PD-1/PD-L1 복합체의 형성을 저해함으로써, PD-1/PD-L1 매개 T 세포 활성을 회피하는 T 세포 고갈을 억제할 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 목적하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[379]

[380]

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[381]

### 서열목록 Free Text

[382]

전자파일 첨부하였음.

## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 8 내지 서열번호 15로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16 내지 서열번호 25로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 88 내지 서열번호 102로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 103 내지 서열번호 119로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120 내지 서열번호 144로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
- 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 16의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 10의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 19의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 11의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 20의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 12의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 13의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 22의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 23의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 24의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 15의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 25의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 또는

서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 9의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 17의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

서열번호 88의 경쇄 CDR1, 서열번호 103의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 120의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 90의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 91의 경쇄 CDR1, 서열번호 106의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 123의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 107의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 124의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 92의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 122의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 93의 경쇄 CDR1, 서열번호 109의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 125의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 94의 경쇄 CDR1, 서열번호 110의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 126의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 95의 경쇄 CDR1, 서열번호 111의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 127의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 96의 경쇄 CDR1, 서열번호 112의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 128의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 129의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 130의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 113의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 131의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 97의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 132의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 133의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 97의 경쇄 CDR1, 서열번호 114의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 134의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 92의 경쇄 CDR1, 서열번호 115의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 135의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 98의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 130의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 116의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 121의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 136의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 99의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 137의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 117의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 138의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 118의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 133의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 119의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 100의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 140의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 108의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 139의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 142의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 89의 경쇄 CDR1, 서열번호 105의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 143의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 101의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 141의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는  
 서열번호 102의 경쇄 CDR1, 서열번호 104의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 144의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 26 내지 서열번호 34로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR1,  
 서열번호 35 내지 서열번호 41로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR2,  
 서열번호 42 내지 서열번호 49로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR3, 또는  
 서열번호 50 내지 서열번호 54로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR4를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 서열번호 145 내지 서열번호 163로 구성된 군에서

선택되는 경쇄 가변영역 FR1,

서열번호 164 내지 서열번호 184로 구성된 군에서 선택되는 경쇄  
가변영역 FR2,

서열번호 185 내지 서열번호 210로 구성된 군에서 선택되는 경쇄  
가변영역 FR3, 또는

서열번호 211 내지 서열번호 216로 구성된 군에서 선택되는 경쇄  
가변영역 FR4를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 서열번호 57 내지 서열번호 87로 구성된 군에서  
선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는  
중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 서열번호 217 내지 서열번호 247로 구성된 군에서  
선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는  
경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 8] 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을  
코딩하는 핵산.

[청구항 9] 제8항의 핵산을 포함하는 발현벡터.

[청구항 10] 제9항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.

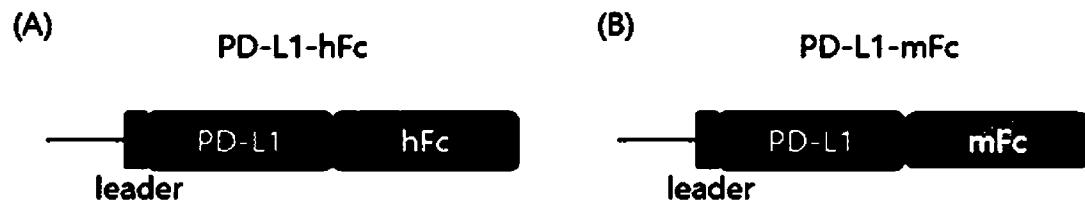
[청구항 11] 다음 단계를 포함하는 PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합  
단편의 제조방법:

(a) 제10항의 세포를 배양하는 단계; 및

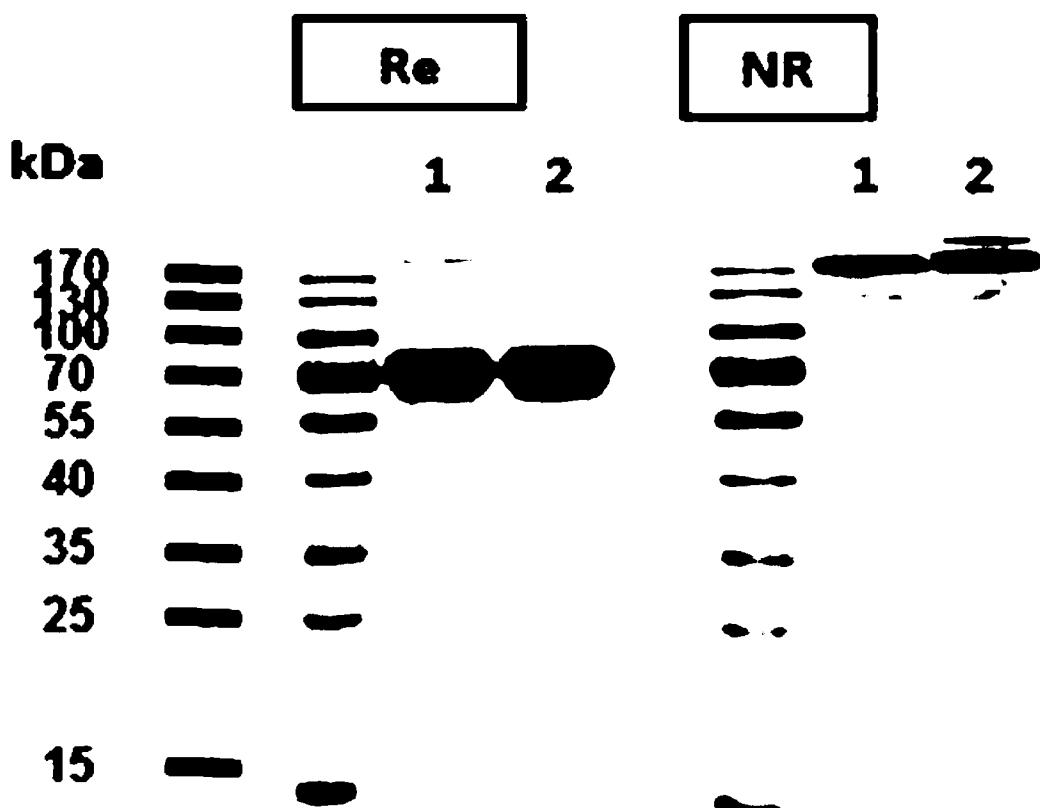
(b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는  
단계.

[청구항 12] 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을  
유효성분으로 포함하는 암 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

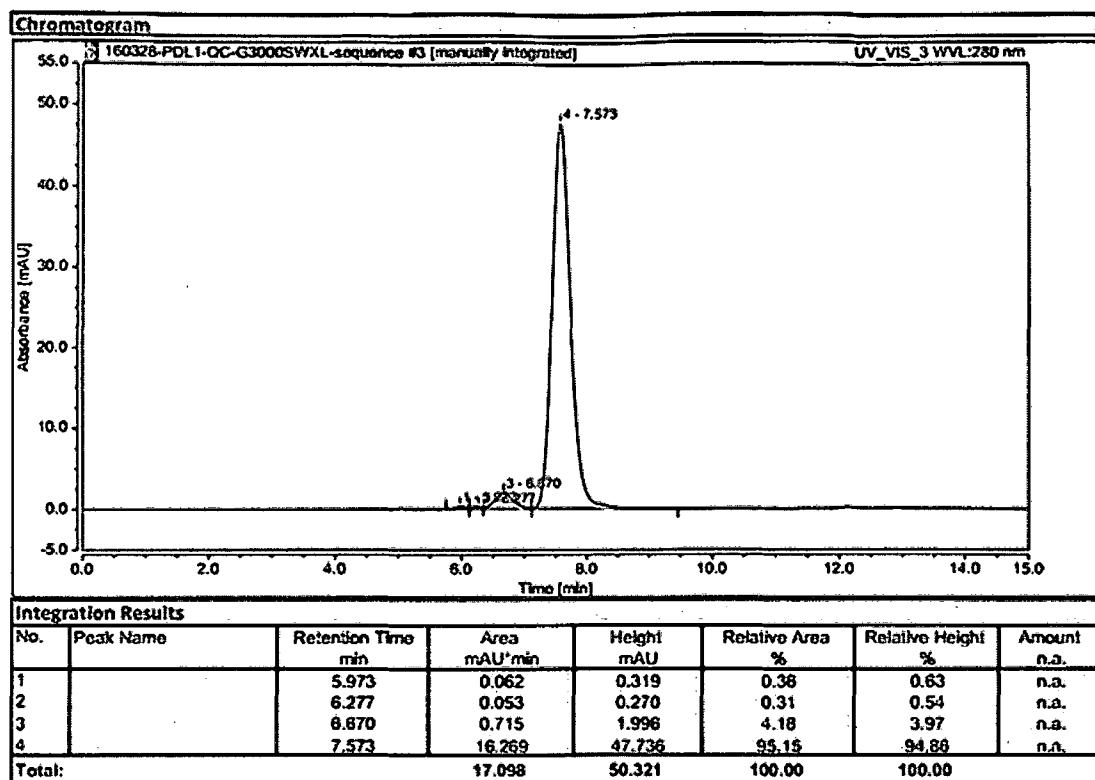
[도 1]



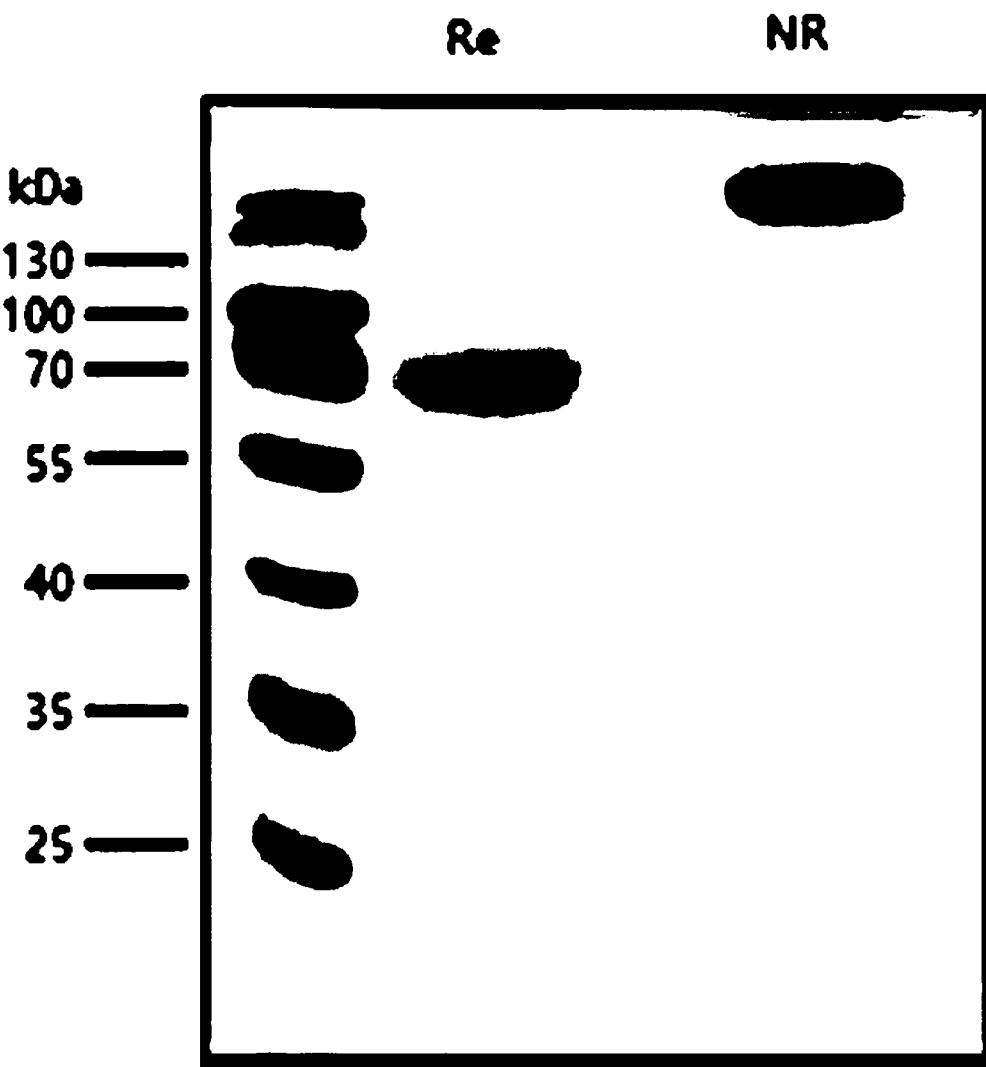
[도2a]



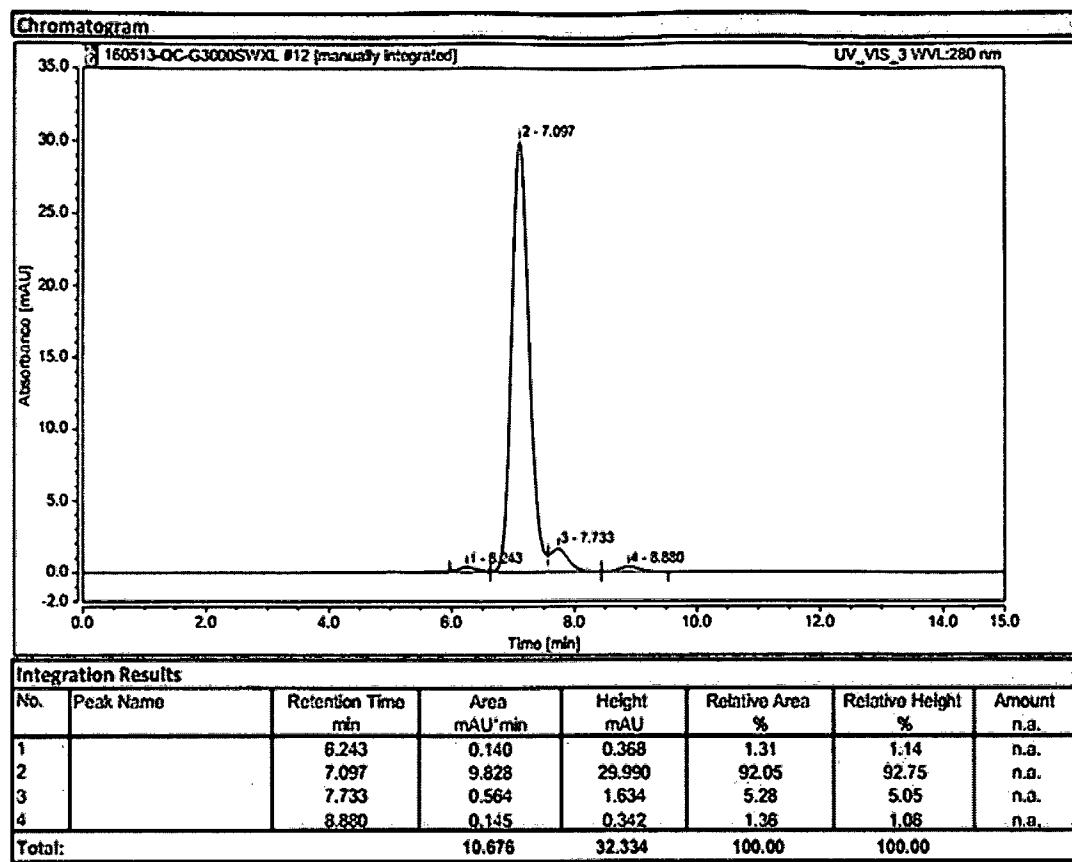
[도2b]



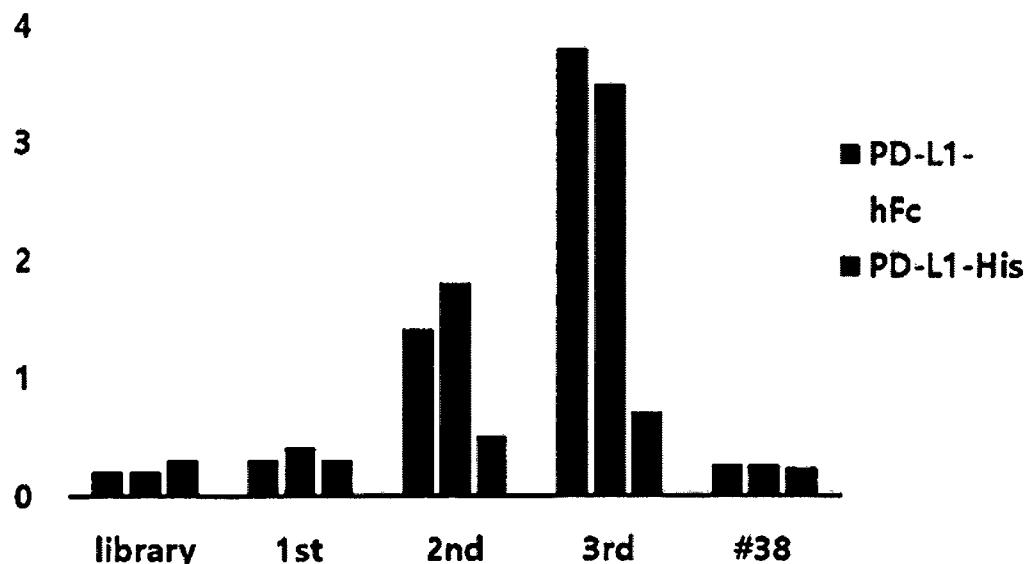
[도2c]



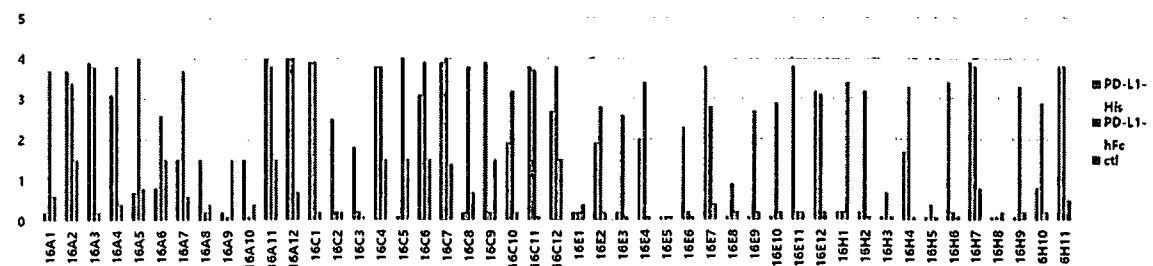
[도2d]



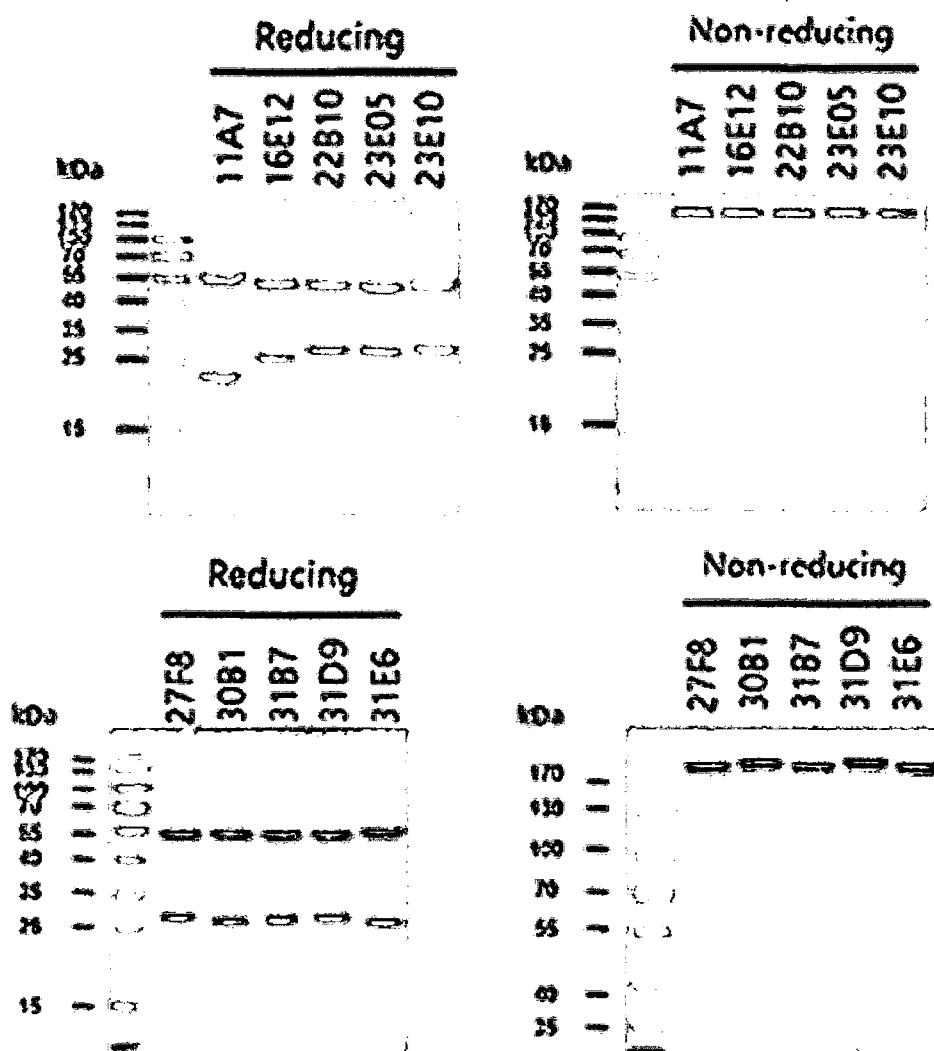
[도3]



[도4]

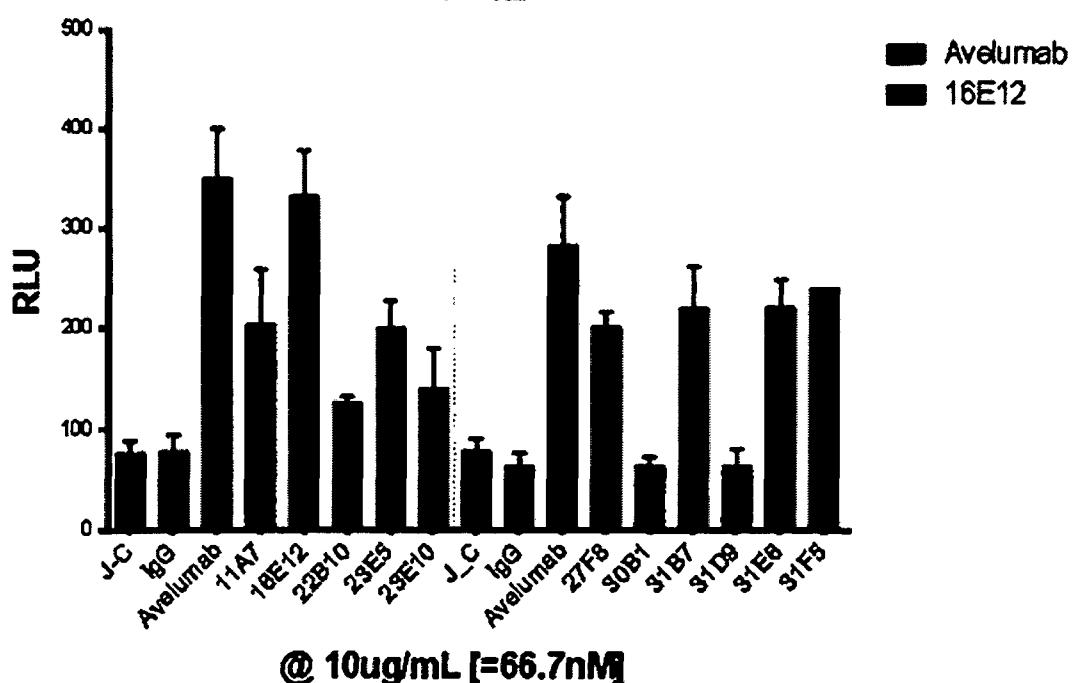


[도5]

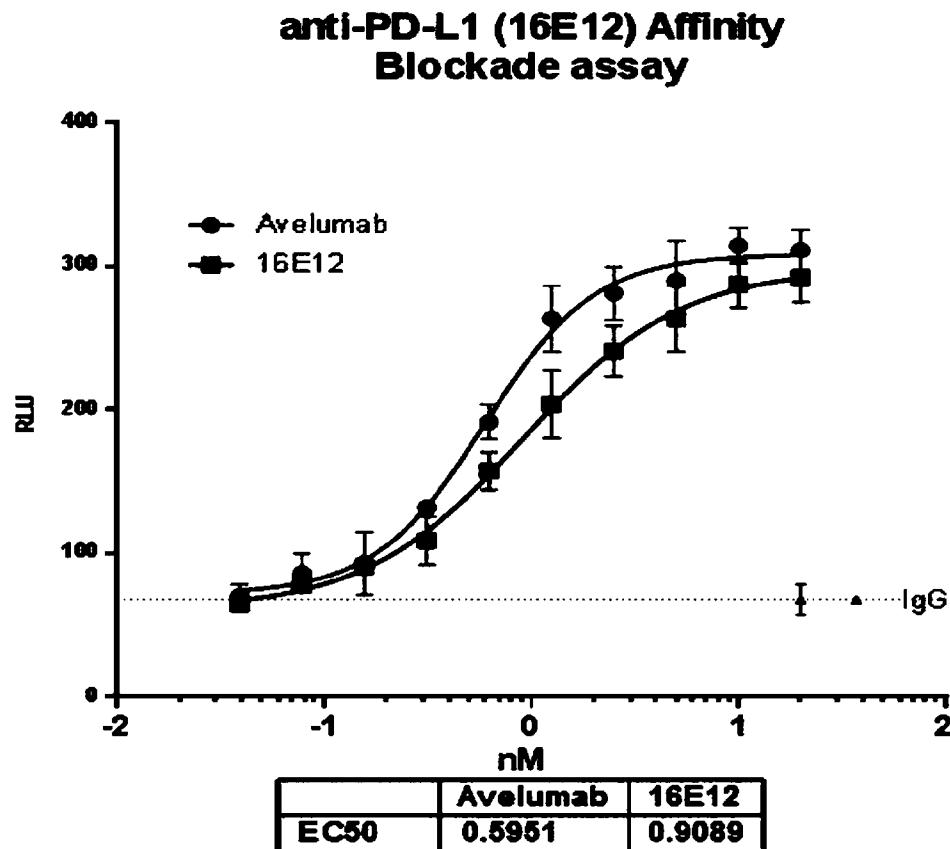


[도6]

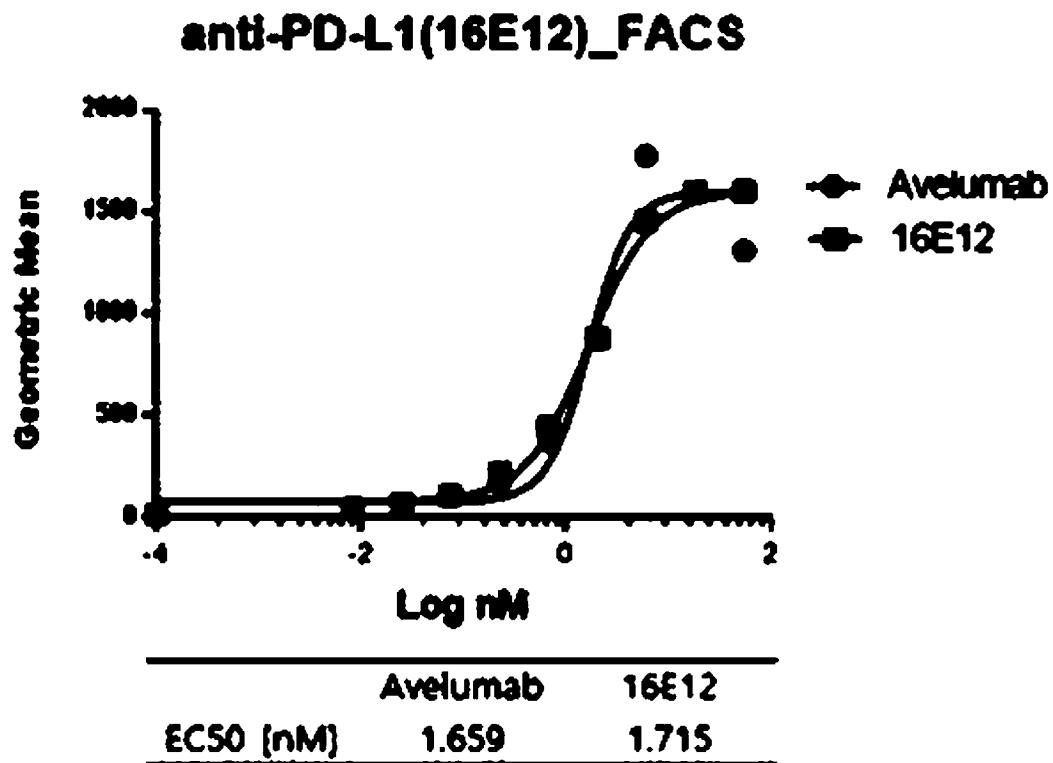
### anti-PDL1(11)\_Blockade



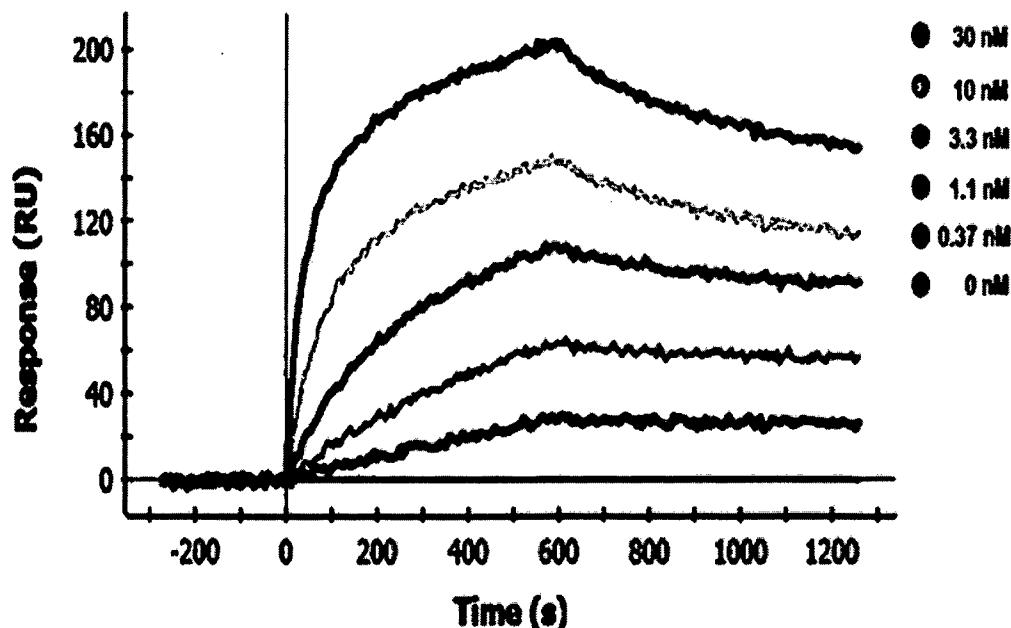
[도7]



[도8]



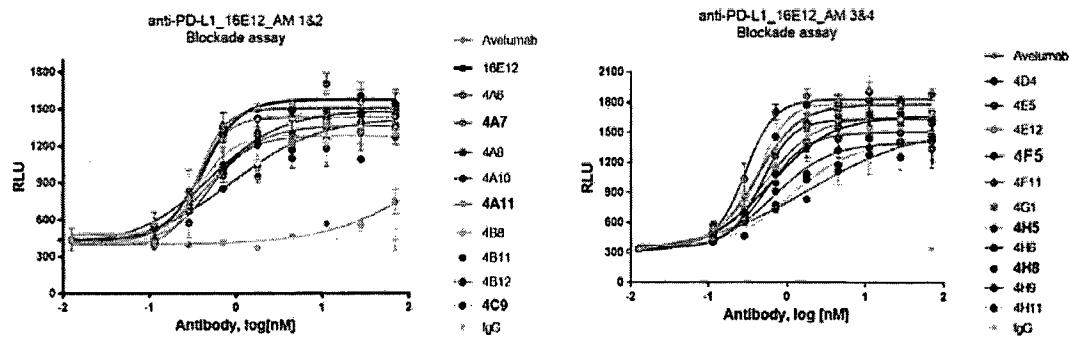
[도9]

**PD-L1, 16E12**

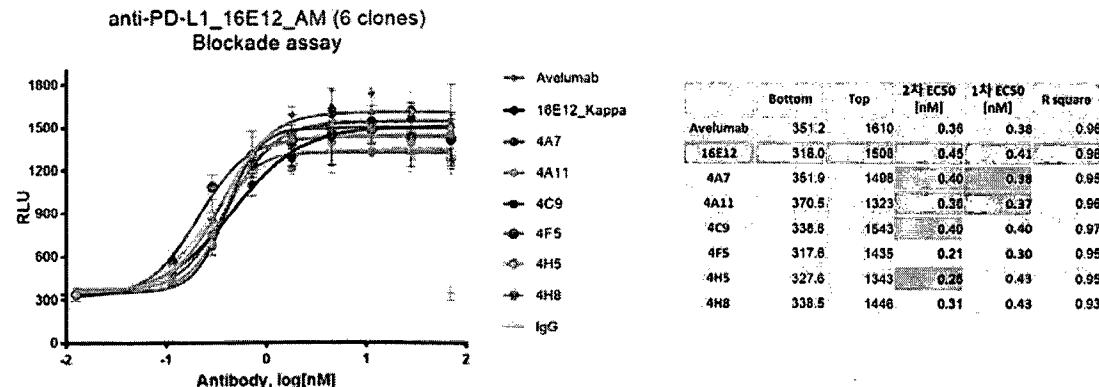
[도10]

PD-L1-His (sino) 1/400												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.428	0.558	0.797	0.044	0.061	1.678	1.325	1.742	1.006	2.167	1.248	1.67
B	0.396	1.136	1.344	1.144	1.123	0.045	1.55	1.738	0.047	0.345	1.614	1.658
C	0.044	0.147	0.096	0.962	0.047	1.024	0.933	1.055	1.235	0.047	1.659	0.383
D	0.831	1.042	0.966	1.189	0.343	0.75	1.409	1.147	0.997	1.162	1.095	0.05
E	0.046	1.119	0.467	0.608	1.465	1.494	0.045	1.491	1.34	0.826	0.533	1.417
F	0.42	0.044	0.524	0.115	1.438	0.564	1.881	1.129	0.048	0.716	1.728	0.981
G	0.835	0.899	1.427	0.044	0.201	0.95	0.047	1.329	0.835	0.538	1.304	1.018
H	1.103	0.301	0.717	0.573	1.976	1.472	0.123	2.065	1.959	0.053	1.609	0.856

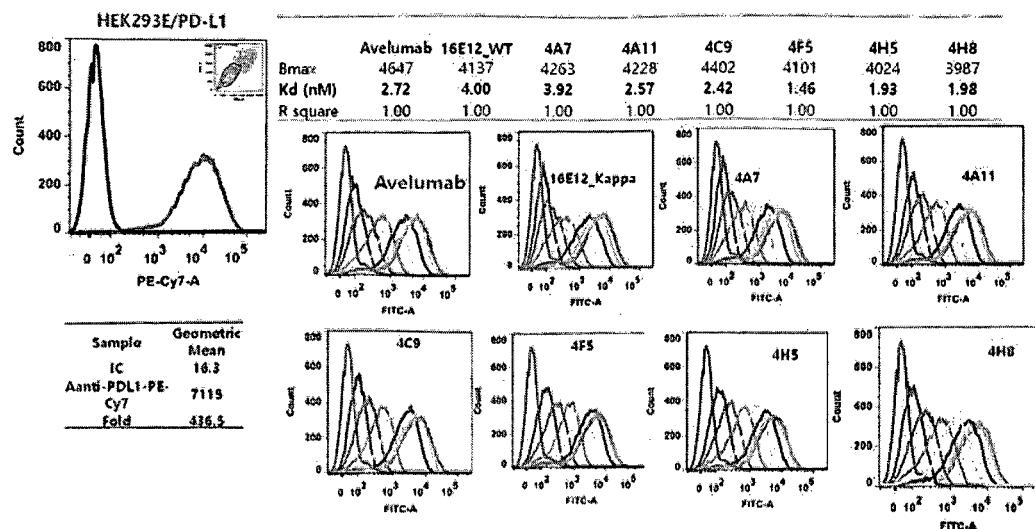
[도11]



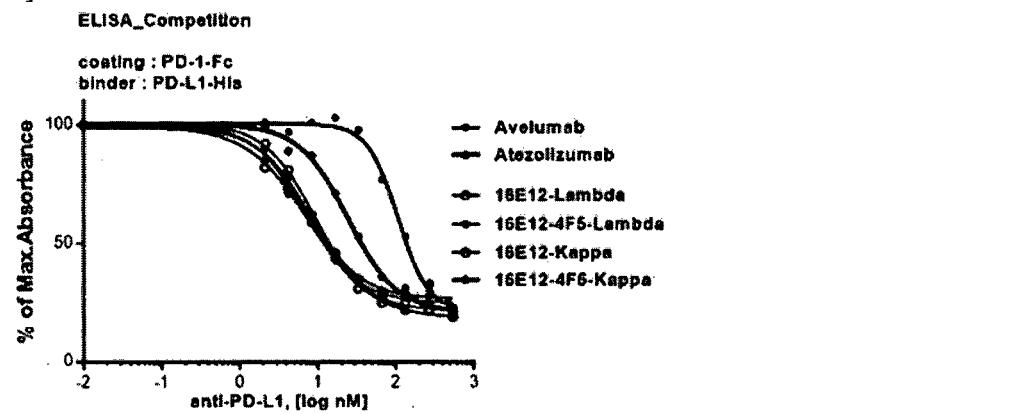
[도12]



[도13]

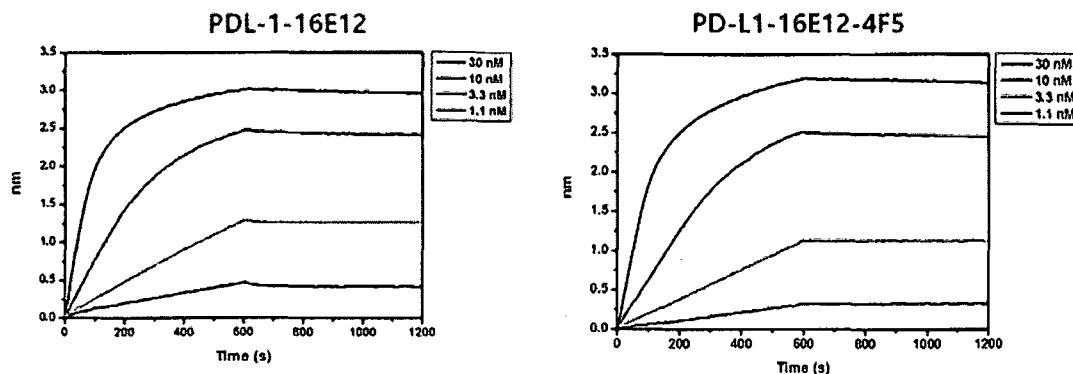


[도14]



## [도15]

Clone	$K_D$ (M)	$K_{on}$ (1/Ms)	$K_{off}$ (1/s)	Full $\chi^2$	Full $R^2$
PDL1-16E12	$4.296 \times 10^{-11}$	$3.335 \times 10^5$	$1.433 \times 10^{-5}$	0.7146	0.9989
PDL1-16E12, WT kappa	$1.489 \times 10^{-11}$	$2.678 \times 10^5$	$3.999 \times 10^{-4}$	0.3379	0.9996
PDL1-16E12, LS, 4A7	$3.965 \times 10^{-11}$	$1.609 \times 10^5$	$6.378 \times 10^{-5}$	0.9064	0.9987
PDL1-16E12, LS, 4A11	$7.975 \times 10^{-11}$	$1.601 \times 10^5$	$1.277 \times 10^{-5}$	0.97	0.9989
PDL1-16E12, LS, 4C9	$1.577 \times 10^{-11}$	$1.664 \times 10^5$	$2.625 \times 10^{-6}$	1.245	0.9984
PDL1-16E12, LS, 4F5	$8.531 \times 10^{-12}$	$2.556 \times 10^5$	$2.180 \times 10^{-6}$	0.7839	0.999
PDL1-16E12, LS, 4H5	$< 1.0 \times 10^{-12}$	$2.261 \times 10^5$	$< 1.0 \times 10^{-7}$	0.9109	0.9988
PDL1-16E12, LS, 4H8	$< 1.0 \times 10^{-12}$	$2.401 \times 10^5$	$< 1.0 \times 10^{-7}$	0.6232	0.9992



## [도16]

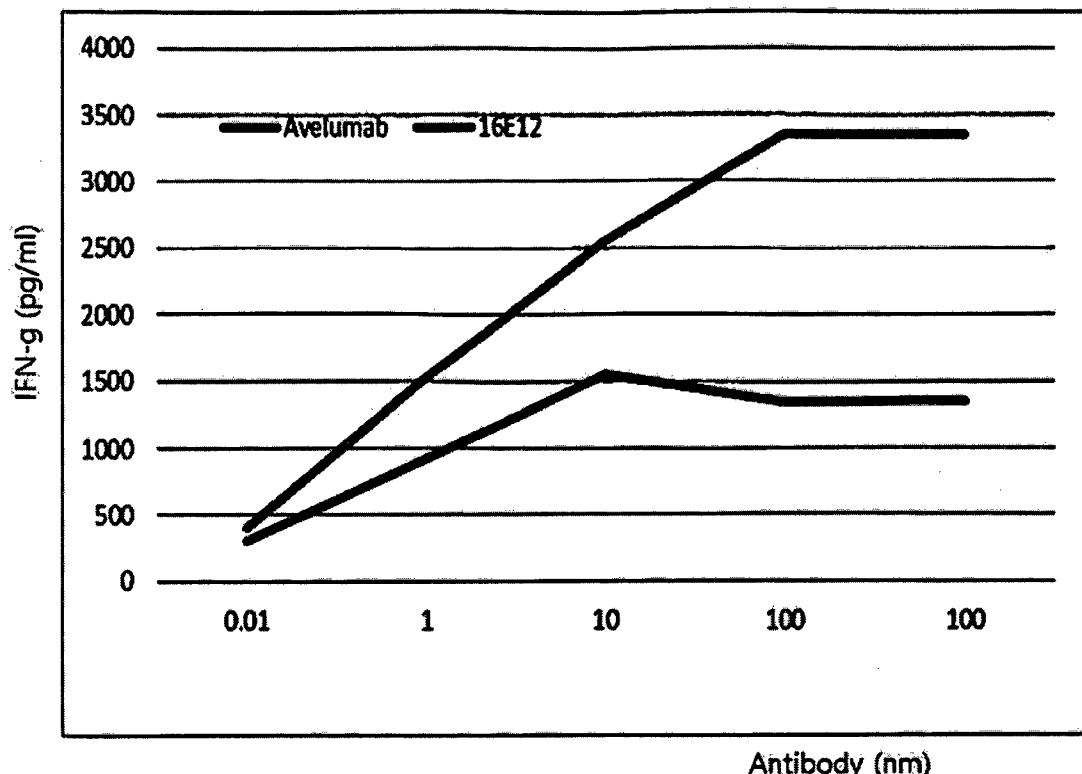
M1 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M2 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M3 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M4 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M5 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M6 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M7 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA  
M8 FTVTVPKDLYVEYGSHMTIECKPVEKQLDLAAALIVYMEDEDKIIIQFVHGEEDLKVKQHESYRQARLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCHISYGGADYKRITVKVHA

\* 변형된 아미노산의 서열을 팔간색으로 표시

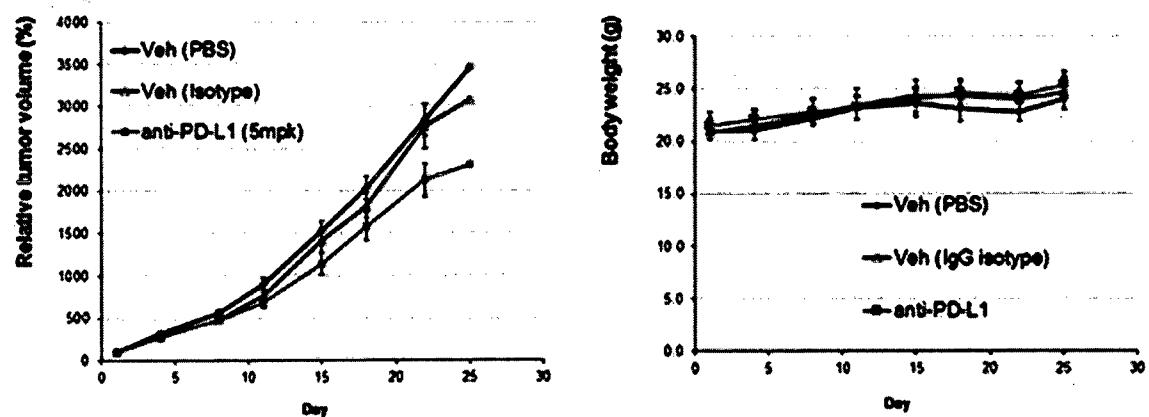
	WT	mPD-L1	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	ITGA6
Avelumab	2.4	2.7	2.8	2.7	2.0	2.6	2.7	2.7	2.8	2.8	0.6
11A7	2.5	0.1	2.3	2.3	0.8	2.4	2.3	2.5	2.5	0.4	0.5
16E12	2.5	2.2	2.4	2.8	0.9	0.4	2.3	2.3	2.3	2.6	0.5
22B10	2.3	0.2	2.3	2.3	1.0	0.4	2.5	2.3	2.3	2.6	0.5
23E5	2.4	2.3	2.4	2.4	0.9	0.5	2.5	2.4	2.6	2.6	0.5
23E10	2.2	0.3	2.1	2.1	0.7	0.5	2.2	2.2	2.2	1.0	0.5
27F8	2.9	0.1	2.8	2.5	0.9	0.4	2.9	2.9	3.0	2.0	0.5
30B1	2.6	0.1	2.6	2.3	2.8	2.6	2.6	2.6	2.7	2.7	0.6
31B7	2.5	0.8	2.8	2.7	1.1	0.7	2.9	2.9	3.0	3.0	0.5
31D9	2.5	0.1	1.6	1.7	2.5	3.8	3.8	3.9	3.9	3.8	0.5
31E6	2.2	1.3	2.1	1.8	1.0	2.4	2.7	2.3	2.3	3.9	0.5

\* 결합력이 낮을수록 낮은 값을 보임

[도 17]

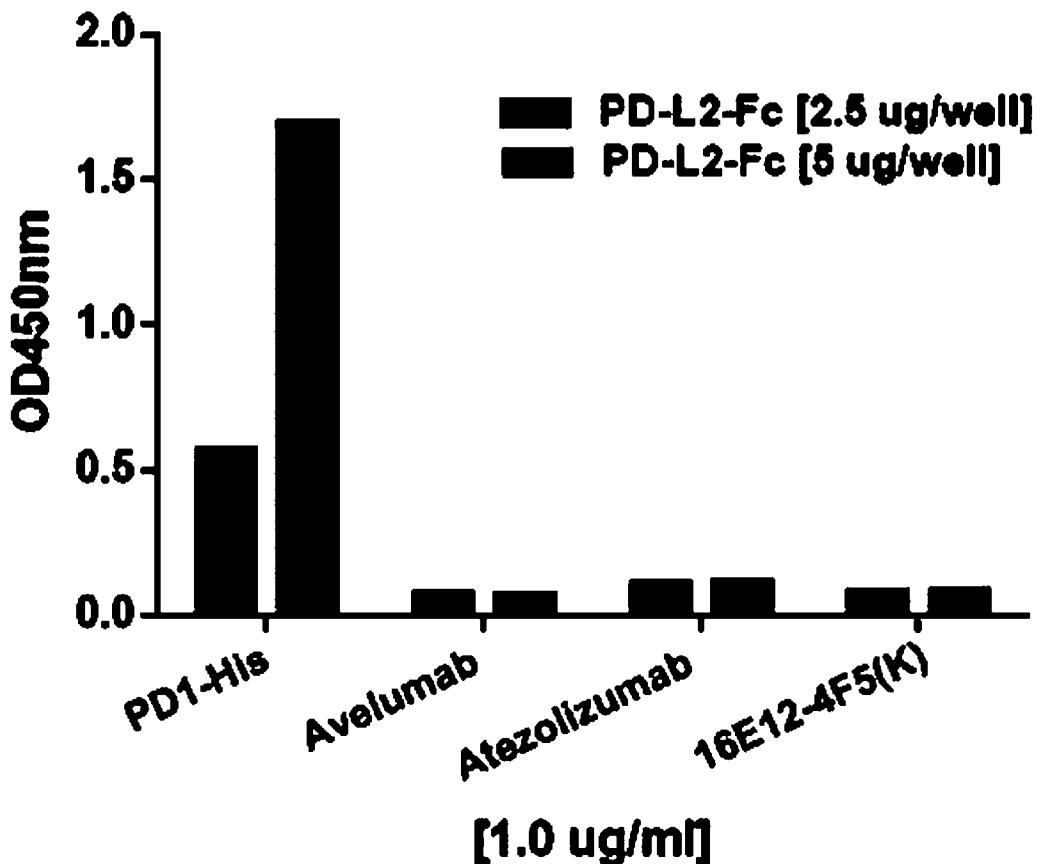


[도 18]



[도19]

## ELISA\_anti-PDL1 & PDL2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008495

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*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. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; C07H 21/04; C12N 5/18; A61P 35/00; A01K 67/027; C07K 16/30; A61K 39/00

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-L1 antibody, cancer treatment, infectious diseases treatment, CDR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0209230 A1 (KORMAN, Alan J. et al.) 25 August 2011 See abstract; claims 1-7, 14-17; and example 7.	1-12
X	WO 2016-061142 A1 (NOVARTIS AG. et al.) 21 April 2016 See abstract; and claims 1-126.	1-12
X	US 2009-0055944 A1 (KORMAN, Alan J. et al.) 26 February 2009 See abstract; and claims 1, 18, 40-43, 45-46.	1-12
X	WO 2010-077634 A1 (GENENTECH, INC.) 08 July 2010 See abstract; and claims 1-68.	1-12
A	WO 2015-061668 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 30 April 2015 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 NOVEMBER 2017 (10.11.2017)

Date of mailing of the international search report

13 NOVEMBER 2017 (13.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
 Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008495**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0209230 A1	25/08/2011	AU 2006-262232 A1 AU 2006-265108 A1 AU 2006-265108 B2 AU 2006-265108 C1 CA 2611814 A1 CA 2612241 A1 CN 101233156 A CN 101233156 B CN 101248089 A CN 104356236 A CN 105330741 A EA 019344 B1 EA 2008-00229 A1 EP 1899379 A2 EP 1907424 A2 EP 1907424 B1 EP 2982379 A1 HK 1117850 A1 HR 20080053 A2 IL 188088 A IL 188124 A IL 188124 B IL 241092 A JP 2008-543339 A JP 2008-544755 A JP 2013-150606 A JP 2016-006123 A JP 5215180 B2 JP 5252635 B2 JP 5848719 B2 KR 10-1411165 B1 KR 10-1607288 B1 KR 10-1704734 B1 KR 10-2008-0032097 A KR 10-2008-0045674 A KR 10-2014-0002041 A KR 10-2015-0082674 A KR 10-2017-0018085 A MX 2007-015942 A NO 20080590 A NZ 564592 A PT 1907424 E RS 54271 B1 SG 163554 A1 UA 99701 C2 US 2009-0055944 A1 US 2009-0142349 A1 US 2013-0122014 A1 US 2015-0337038 A1	04/01/2007 11/01/2007 17/05/2012 17/01/2013 04/01/2007 11/01/2007 30/07/2008 27/06/2012 20/08/2008 18/02/2015 17/02/2016 31/03/2014 30/06/2008 19/03/2008 09/04/2008 29/07/2015 10/02/2016 15/07/2016 31/08/2009 20/03/2008 20/03/2008 29/09/2016 30/11/2015 04/12/2008 11/12/2008 08/08/2013 14/01/2016 19/06/2013 31/07/2013 27/01/2016 25/06/2014 05/04/2016 09/02/2017 14/04/2008 23/05/2008 07/01/2014 15/07/2015 15/02/2017 07/03/2008 31/03/2008 25/11/2011 09/10/2015 29/02/2016 30/08/2010 25/09/2012 26/02/2009 04/06/2009 16/05/2013 26/11/2015

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008495**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2016-0075782 A1 US 2016-0362495 A1 US 2017-0158767 A1 US 7943743 B2 US 8097703 B2 US 8383796 B2 US 9102725 B2 US 9273135 B2 US 9546216 B2 US 9580505 B2 US 9580507 B2 WO 2007-002223 A2 WO 2007-002223 A3 WO 2007-005874 A2 WO 2007-005874 A3 ZA 2007-10919 A	17/03/2016 15/12/2016 08/06/2017 17/05/2011 17/01/2012 26/02/2013 11/08/2015 01/03/2016 17/01/2017 28/02/2017 28/02/2017 04/01/2007 19/04/2007 11/01/2007 19/07/2007 29/10/2008
WO 2016-061142 A1	21/04/2016	AU 2015-333687 A1 CN 107001478 A EP 3206711 A1 IL 251563 A KR 10-2017-0069257 A PE 10672017 A1 TW 2016-20940 A US 2016-0108123 A1 UY 36351 A	21/04/2016 01/08/2017 23/08/2017 29/05/2017 20/06/2017 24/07/2017 16/06/2016 21/04/2016 01/06/2016
US 2009-0055944 A1	26/02/2009	AU 2006-262232 A1 AU 2006-265108 A1 AU 2006-265108 B2 AU 2006-265108 C1 CA 2611814 A1 CA 2612241 A1 CN 101233156 A CN 101233156 B CN 101248089 A CN 104356236 A CN 105330741 A EA 019344 B1 EA 200800229 A1 EP 1899379 A2 EP 1907424 A2 EP 1907424 B1 EP 2982379 A1 HK 1117850 A1 HR 20080053 A2 IL 188088 A IL 188124 A IL 188124 B IL 241092 A	04/01/2007 11/01/2007 17/05/2012 17/01/2013 04/01/2007 11/01/2007 30/07/2008 27/06/2012 20/08/2008 18/02/2015 17/02/2016 31/03/2014 30/06/2008 19/03/2008 09/04/2008 29/07/2015 10/02/2016 15/07/2016 31/08/2009 20/03/2008 20/03/2008 29/09/2016 30/11/2015

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008495**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2008-543339 A	04/12/2008
		JP 2008-544755 A	11/12/2008
		JP 2013-150606 A	08/08/2013
		JP 2016-006123 A	14/01/2016
		JP 5215180 B2	19/06/2013
		JP 5252635 B2	31/07/2013
		JP 5848719 B2	27/01/2016
		KR 10-1411165 B1	25/06/2014
		KR 10-1607288 B1	05/04/2016
		KR 10-1704734 B1	09/02/2017
		KR 10-2008-0032097 A	14/04/2008
		KR 10-2008-0045674 A	23/05/2008
		KR 10-2014-0002041 A	07/01/2014
		KR 10-2015-0082674 A	15/07/2015
		KR 10-2017-0018085 A	15/02/2017
		MX 2007015942 A	07/03/2008
		NO 20080590 A	31/03/2008
		NZ 564592 A	25/11/2011
		PT 1907424 E	09/10/2015
		RS 54271 B1	29/02/2016
		SG 163554 A1	30/08/2010
		UA 99701 C2	25/09/2012
		US 2009-0142349 A1	04/06/2009
		US 2011-0209230 A1	25/08/2011
		US 2013-0122014 A1	16/05/2013
		US 2015-0337038 A1	26/11/2015
		US 2016-0075782 A1	17/03/2016
		US 2016-0362495 A1	15/12/2016
		US 2017-0158767 A1	08/06/2017
		US 7943743 B2	17/05/2011
		US 8097703 B2	17/01/2012
		US 8383796 B2	26/02/2013
		US 9102725 B2	11/08/2015
		US 9273135 B2	01/03/2016
		US 9546216 B2	17/01/2017
		US 9580505 B2	28/02/2017
		US 9580507 B2	28/02/2017
		WO 2007-002223 A2	04/01/2007
		WO 2007-002223 A3	19/04/2007
		WO 2007-005874 A2	11/01/2007
		WO 2007-005874 A3	19/07/2007
		ZA 2007-10919 A	29/10/2008
WO 2010-077634 A1	08/07/2010	AR 074563 A1	26/01/2011
		AU 2009-333580 A1	08/07/2010
		AU 2009-333580 B2	07/07/2016
		AU 2016-203867 A1	30/06/2016
		CA 2740806 A1	08/07/2010
		CA 2746153 A1	08/07/2010
		CN 102245640 A	16/11/2011

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008495**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-061668 A1	30/04/2015	CN 102245640 B	31/12/2014
		CN 104479018 A	01/04/2015
		CO 6390023 A2	29/02/2012
		CR 20110316 A	18/07/2011
		EP 2370135 A1	05/10/2011
		EP 2376535 A1	19/10/2011
		EP 2376535 B1	12/04/2017
		HK 1163130 A1	17/07/2015
		HK 1207387 A1	29/01/2016
		IL 213353 A	31/07/2011
		IL 213353 B	30/04/2017
		IL 249127 A	31/01/2017
		JP 2012-511329 A	24/05/2012
		JP 2012-511390 A	24/05/2012
		JP 2015-091260 A	14/05/2015
		JP 2017-136085 A	10/08/2017
		JP 5600115 B2	01/10/2014
		JP 5681638 B2	11/03/2015
		JP 6178349 B2	09/08/2017
		KR 10-2011-0092300 A	17/08/2011
		MA 32948 B1	02/01/2012
		MX 2011-005853 A	04/08/2011
		MX 342591 B	05/10/2016
		NZ 592119 A	26/07/2013
		PE 03412012 A1	24/04/2012
		PE 17222014 A1	02/12/2014
		RU 2011-128399 A	20/01/2013
		SG 172059 A1	28/07/2011
		SG 196798 A1	13/02/2014
		SG 2014-001614 A	13/02/2014
		TW 2010-32822 A	16/09/2010
		TW 2014-17828 A	16/05/2014
		TW 2017-12034 A	01/04/2017
		TW 1419705 B	21/12/2013
		UA 109108 C2	27/07/2015
		US 2010-0203056 A1	12/08/2010
		US 2012-0004620 A1	05/01/2012
		US 2013-0045200 A1	21/02/2013
		US 2013-0045201 A1	21/02/2013
		US 2013-0045202 A1	21/02/2013
		US 2014-0065135 A1	06/03/2014
		US 2015-0322153 A1	12/11/2015
		US 2016-0222117 A1	04/08/2016
		US 2016-0346474 A1	01/12/2016
		US 2017-107287 A1	20/04/2017
		US 8217149 B2	10/07/2012
		US 9446200 B2	20/09/2016
		WO 2010-077277 A1	08/07/2010
AU 2014-339900 A1	30/04/2015		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008495**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CA 2926856 A1 EP 3060581 A1 US 2016-0272712 A1	30/04/2015 31/08/2016 22/09/2016

## A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

## B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; A61K 39/395; C07H 21/04; C12N 5/18; A61P 35/00; A01K 67/027; C07K 16/30; A61K 39/00

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) &amp; 키워드: PD-L1 항체, 암 치료, 감염질환 치료, CDR

## C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2011-0209230 A1 (KORMAN, ALAN J. 등) 2011.08.25 요약; 청구항 1-7, 14-17; 및 실시예 7 참조.	1-12
X	WO 2016-061142 A1 (NOVARTIS AG 등) 2016.04.21 요약; 및 청구항 1-126 참조.	1-12
X	US 2009-0055944 A1 (KORMAN, ALAN J. 등) 2009.02.26 요약; 및 청구항 1, 18, 40-43, 45-46 참조.	1-12
X	WO 2010-077634 A1 (GENENTECH, INC.) 2010.07.08 요약; 및 청구항 1-68 참조.	1-12
A	WO 2015-061668 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 2015.04.30 전체 문헌 참조.	1-12

 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 11월 10일 (10.11.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 11월 13일 (13.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/008495**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2011-0209230 A1	2011/08/25	AU 2006-262232 A1 AU 2006-265108 A1 AU 2006-265108 B2 AU 2006-265108 C1 CA 2611814 A1 CA 2612241 A1 CN 101233156 A CN 101233156 B CN 101248089 A CN 104356236 A CN 105330741 A EA 019344 B1 EA 2008-00229 A1 EP 1899379 A2 EP 1907424 A2 EP 1907424 B1 EP 2982379 A1 HK 1117850 A1 HR 20080053 A2 IL 188088 A IL 188124 A IL 188124 B IL 241092 A JP 2008-543339 A JP 2008-544755 A JP 2013-150606 A JP 2016-006123 A JP 5215180 B2 JP 5252635 B2 JP 5848719 B2 KR 10-1411165 B1 KR 10-1607288 B1 KR 10-1704734 B1 KR 10-2008-0032097 A KR 10-2008-0045674 A KR 10-2014-0002041 A KR 10-2015-0082674 A KR 10-2017-0018085 A MX 2007-015942 A NO 20080590 A NZ 564592 A PT 1907424 E RS 54271 B1 SG 163554 A1 UA 99701 C2 US 2009-0055944 A1 US 2009-0142349 A1 US 2013-0122014 A1 US 2015-0337038 A1	2007/01/04 2007/01/11 2012/05/17 2013/01/17 2007/01/04 2007/01/11 2008/07/30 2012/06/27 2008/08/20 2015/02/18 2016/02/17 2014/03/31 2008/06/30 2008/03/19 2008/04/09 2015/07/29 2016/02/10 2016/07/15 2009/08/31 2008/03/20 2008/03/20 2016/09/29 2015/11/30 2008/12/04 2008/12/11 2013/08/08 2016/01/14 2013/06/19 2013/07/31 2016/01/27 2014/06/25 2016/04/05 2017/02/09 2008/04/14 2008/05/23 2014/01/07 2015/07/15 2017/02/15 2008/03/07 2008/03/31 2011/11/25 2015/10/09 2016/02/29 2010/08/30 2012/09/25 2009/02/26 2009/06/04 2013/05/16 2015/11/26
--------------------	------------	--	--

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/008495**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2016-061142 A1	2016/04/21	US 2016-0075782 A1	2016/03/17
		US 2016-0362495 A1	2016/12/15
US 2009-0055944 A1	2009/02/26	US 2017-0158767 A1	2017/06/08
		US 7943743 B2	2011/05/17
IL 241092 A	2015/11/30	US 8097703 B2	2012/01/17
		US 8383796 B2	2013/02/26
EP 1907424 A2	2008/03/20	US 9102725 B2	2015/08/11
		US 9273135 B2	2016/03/01
EP 2982379 A1	2008/03/20	US 9546216 B2	2017/01/17
		US 9580505 B2	2017/02/28
EP 104356236 A	2008/03/20	US 9580507 B2	2017/02/28
		WO 2007-002223 A2	2007/01/04
EP 10672017 A1	2008/03/20	WO 2007-002223 A3	2007/04/19
		WO 2007-005874 A2	2007/01/11
EP 101233156 B	2008/03/20	WO 2007-005874 A3	2007/07/19
		ZA 2007-10919 A	2008/10/29
EP 101233156 A	2008/03/20	AU 2015-333687 A1	2016/04/21
		CN 107001478 A	2017/08/01
EP 2611814 A1	2008/03/20	EP 3206711 A1	2017/08/23
		IL 251563 A	2017/05/29
EP 101248089 A	2008/03/20	KR 10-2017-0069257 A	2017/06/20
		PE 10672017 A1	2017/07/24
EP 1045330741 A	2008/03/20	TW 2016-20940 A	2016/06/16
		US 2016-0108123 A1	2016/04/21
EP 10117850 A1	2008/03/20	UY 36351 A	2016/06/01
		AU 2006-262232 A1	2007/01/04
EP 101233156 B	2008/03/20	AU 2006-265108 A1	2007/01/11
		AU 2006-265108 B2	2012/05/17
EP 101233156 C1	2008/03/20	AU 2006-265108 C1	2013/01/17
		CA 2611814 A1	2007/01/04
EP 101233156 D	2008/03/20	CA 2612241 A1	2007/01/11
		CN 101233156 A	2008/07/30
EP 101233156 E	2008/03/20	CN 101233156 B	2012/06/27
		CN 101248089 A	2008/08/20
EP 104356236 A	2008/03/20	CN 104356236 A	2015/02/18
		CN 105330741 A	2016/02/17
EP 1019344 B1	2008/03/20	EA 019344 B1	2014/03/31
		EA 200800229 A1	2008/06/30
EP 1899379 A2	2008/03/20	EP 1899379 A2	2008/03/19
		EP 1907424 A2	2008/04/09
EP 1907424 B1	2008/03/20	EP 1907424 B1	2015/07/29
		EP 2982379 A1	2016/02/10
EP 10117850 A1	2008/03/20	HK 1117850 A1	2016/07/15
		HR 20080053 A2	2009/08/31
IL 188088 A	2008/03/20	IL 188088 A	2008/03/20
		IL 188124 A	2008/03/20
IL 188124 B	2008/03/20	IL 188124 B	2016/09/29
		IL 241092 A	2015/11/30

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/008495**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

JP 2008-543339 A	2008/12/04		
JP 2008-544755 A	2008/12/11		
JP 2013-150606 A	2013/08/08		
JP 2016-006123 A	2016/01/14		
JP 5215180 B2	2013/06/19		
JP 5252635 B2	2013/07/31		
JP 5848719 B2	2016/01/27		
KR 10-1411165 B1	2014/06/25		
KR 10-1607288 B1	2016/04/05		
KR 10-1704734 B1	2017/02/09		
KR 10-2008-0032097 A	2008/04/14		
KR 10-2008-0045674 A	2008/05/23		
KR 10-2014-0002041 A	2014/01/07		
KR 10-2015-0082674 A	2015/07/15		
KR 10-2017-0018085 A	2017/02/15		
MX 2007015942 A	2008/03/07		
NO 20080590 A	2008/03/31		
NZ 564592 A	2011/11/25		
PT 1907424 E	2015/10/09		
RS 54271 B1	2016/02/29		
SG 163554 A1	2010/08/30		
UA 99701 C2	2012/09/25		
US 2009-0142349 A1	2009/06/04		
US 2011-0209230 A1	2011/08/25		
US 2013-0122014 A1	2013/05/16		
US 2015-0337038 A1	2015/11/26		
US 2016-0075782 A1	2016/03/17		
US 2016-0362495 A1	2016/12/15		
US 2017-0158767 A1	2017/06/08		
US 7943743 B2	2011/05/17		
US 8097703 B2	2012/01/17		
US 8383796 B2	2013/02/26		
US 9102725 B2	2015/08/11		
US 9273135 B2	2016/03/01		
US 9546216 B2	2017/01/17		
US 9580505 B2	2017/02/28		
US 9580507 B2	2017/02/28		
WO 2007-002223 A2	2007/01/04		
WO 2007-002223 A3	2007/04/19		
WO 2007-005874 A2	2007/01/11		
WO 2007-005874 A3	2007/07/19		
ZA 2007-10919 A	2008/10/29		
WO 2010-077634 A1	2010/07/08	AR 074563 A1	2011/01/26
		AU 2009-333580 A1	2010/07/08
		AU 2009-333580 B2	2016/07/07
		AU 2016-203867 A1	2016/06/30
		CA 2740806 A1	2010/07/08
		CA 2746153 A1	2010/07/08
		CN 102245640 A	2011/11/16

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/008495**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

	CN 102245640 B	2014/12/31	
	CN 104479018 A	2015/04/01	
	CO 6390023 A2	2012/02/29	
	CR 20110316 A	2011/07/18	
	EP 2370135 A1	2011/10/05	
	EP 2376535 A1	2011/10/19	
	EP 2376535 B1	2017/04/12	
	HK 1163130 A1	2015/07/17	
	HK 1207387 A1	2016/01/29	
	IL 213353 A	2011/07/31	
	IL 213353 B	2017/04/30	
	IL 249127 A	2017/01/31	
	JP 2012-511329 A	2012/05/24	
	JP 2012-511390 A	2012/05/24	
	JP 2015-091260 A	2015/05/14	
	JP 2017-136085 A	2017/08/10	
	JP 5600115 B2	2014/10/01	
	JP 5681638 B2	2015/03/11	
	JP 6178349 B2	2017/08/09	
	KR 10-2011-0092300 A	2011/08/17	
	MA 32948 B1	2012/01/02	
	MX 2011-005853 A	2011/08/04	
	MX 342591 B	2016/10/05	
	NZ 592119 A	2013/07/26	
	PE 03412012 A1	2012/04/24	
	PE 17222014 A1	2014/12/02	
	RU 2011-128399 A	2013/01/20	
	SG 172059 A1	2011/07/28	
	SG 196798 A1	2014/02/13	
	SG 2014-001614 A	2014/02/13	
	TW 2010-32822 A	2010/09/16	
	TW 2014-17828 A	2014/05/16	
	TW 2017-12034 A	2017/04/01	
	TW I419705 B	2013/12/21	
	UA 109108 C2	2015/07/27	
	US 2010-0203056 A1	2010/08/12	
	US 2012-0004620 A1	2012/01/05	
	US 2013-0045200 A1	2013/02/21	
	US 2013-0045201 A1	2013/02/21	
	US 2013-0045202 A1	2013/02/21	
	US 2014-0065135 A1	2014/03/06	
	US 2015-0322153 A1	2015/11/12	
	US 2016-0222117 A1	2016/08/04	
	US 2016-0346474 A1	2016/12/01	
	US 2017-107287 A1	2017/04/20	
	US 8217149 B2	2012/07/10	
	US 9446200 B2	2016/09/20	
	WO 2010-077277 A1	2010/07/08	
WO 2015-061668 A1	2015/04/30	AU 2014-339900 A1	2015/04/30

국 제 조 사 보 고 서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/008495**

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

CA 2926856 A1	2015/04/30
EP 3060581 A1	2016/08/31
US 2016-0272712 A1	2016/09/22