



등록특허 10-2469286



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월22일  
(11) 등록번호 10-2469286  
(24) 등록일자 2022년11월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *A61P 7/06* (2006.01)  
*G01N 33/574* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/2818* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7008464
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월22일  
심사청구일자 2020년06월09일
- (85) 번역문제출일자 2019년03월22일
- (65) 공개번호 10-2019-0050994
- (43) 공개일자 2019년05월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2017/098465
- (87) 국제공개번호 WO 2018/036472  
국제공개일자 2018년03월01일
- (30) 우선권주장  
201610705763.5 2016년08월23일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문현  
CN105175544 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

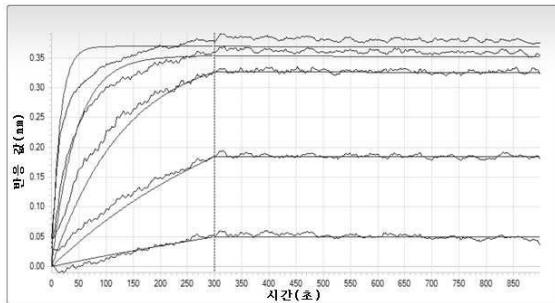
전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 양웅철

(54) 발명의 명칭 항-PD1 단일클론 항체, 이의 약제학적 조성물 및 이의 용도

**(57) 요약**

항-PD1(예정 세포사 1) 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이의 약제학적 조성물 및 이의 용도. 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 9 내지 11에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 CDR(상보성 결정 영역)을 포함하고/하거나; 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12 내지 14에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 CDR을 포함한다. 단일클론 항체는 PD1에 특이적으로 결합하고, 유기체에서 PD1의 면역억제를 특이적으로 완화시키고, T 림프구를 활성화할 수 있다.

**대 표 도 - 도2**

(52) CPC특허분류

*A61P 7/06* (2018.01)

*G01N 33/574* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/76* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

*G01N 2333/70521* (2013.01)

*G01N 2800/7019* (2013.01)

(72) 발명자

**왕 종민 맥스웰**

중국, 광동 528437, 중산, 토치 디벨롭먼트 존, 6

센농 로드

**장 평**

중국, 광동 528437, 중산, 토치 디벨롭먼트 존, 6  
센농 로드

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

상기 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역( $V_H$ )은 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고; 그리고

상기 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역( $V_L$ )은 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단일클론 항체의  $V_H$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 2 및 서열 번호 6으로부터 선택되고; 그리고

상기 단일클론 항체의  $V_L$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 4 및 서열 번호 8로부터 선택된, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 서열 번호 2의  $V_H$  아미노산 서열 및 서열 번호 4의  $V_L$  아미노산 서열을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 서열 번호 6의  $V_H$  아미노산 서열 및 서열 번호 8의  $V_L$  아미노산 서열을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, CDR 단편, 또는 단쇄 항체 (scFv)인, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 PD1에 대한 결합 친화도( $K_D$ )는  $10^{-5} M$  미만인, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 PD1에 대한 결합 친화도( $K_D$ )는  $10^{-6} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $10^{-9} M$  또는  $10^{-10} M$  또는 이것 미만인, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기  $K_D$ 는 포르테바이오(Fortebio) 분자 상호작용 분석장치에 의해 측정된, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 마우스 이외의 종으로부터의 비-CDR 영역을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간으로부터의 비-CDR 영역을 포함하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하이브리도마 세포주 LT003에 의해 생산되고, 상기 하이브리도마 세포주 LT003은 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105호로 중국 균주은행 기관(China Center for Type Culture Collection: CCTCC)에 보존된, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 12

제1항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역( $V_H$ )을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자로서, 상기  $V_H$ 가 서열 번호 9 내지 11로부터의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기  $V_H$ 가 서열 번호 2 또는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 단리된 핵산이 서열 번호 1 또는 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

### 청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 핵산 분자를 포함하는, 발현 작제물.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 발현 작제물은 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 상기  $V_L$ 가 서열번호 12 내지 14로부터의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는, 발현 작제물.

### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기  $V_L$ 가 서열 번호 4 또는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 작제물.

### 청구항 18

제17항에 있어서,  $V_L$ 을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 서열 번호 3 또는 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 발현 작제물.

### 청구항 19

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 핵산 분자를 포함하는, 발현 세포주.

### 청구항 20

제15항의 발현 작제물을 포함하는, 발현 세포주.

### 청구항 21

제1항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법으로서, 적합한 조건 하에 세포주를 성장시키는 단계 및 세포 배양물로부터 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포주는, 제1항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자 또는 발현 작제물을 포함하고, 상기  $V_L$ 이 서열 번호 12 내지 14로부터의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는, 방법.

### 청구항 22

중국 통상 배양 수집 센터(CCTCC)에 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105호로 보존된, 하이브리도마 세포주 LT003.

### 청구항 23

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 검출 가능한 마커로서 접합 파트너를 포함하는 접합체.

### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 접합 파트너가 방사성 동위원소, 플루오레세인, 발광성 재료, 색상 있는 기질 또는 효소를 포함하는, 접합체.

### 청구항 25

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 시약 키트.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 특이적으로 인식하는 2차 항체를 추가로 포함하는, 시약 키트.

### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 2차 항체가 검출 가능한 마커를 추가로 포함하는, 시약 키트.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 검출 가능한 마커가 방사성 동위원소, 플루오레세인, 발광성 재료, 색상 있는 기질 또는 효소를 포함하는, 시약 키트.

### 청구항 29

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 30

제23항의 접합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 31

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 종양의 치료에 사용하기 위한, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 종양이 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암, 결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 또는 백혈병인, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 33

제23항에 있어서, 종양의 치료에 사용하기 위한 접합체로서, 상기 종양이 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암,

결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 또는 백혈병인, 접합체.

## 청구항 34

제29항에 있어서, 종양의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 종양이 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암, 결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 또는 백혈병인, 약제학적 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 항-PD1 항체에 관한 종양 치료 및 분자 면역학의 분야, 약제학적 조성물 및 사용 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 항-PD1 단일클론 항체에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

막관통 수용체 PD1(예정 세포사 1, PD-1로도 공지됨)은 활성화된 T 세포, B 세포 및 골수성 세포에서 발현된 CD28 유전자 패밀리의 구성원이다. PD1의 리간드 둘 다(즉, PDL1 및 PDL2)는 B7 슈퍼패밀리에 속하고; 여기서 PDL1은 T 세포, B 세포, 내피 세포 및 상피 세포를 포함하는 다양한 세포에서 광범위하게 발현되는 한편, PDL2는 오직 항원 제시 세포, 예전대 수지상 세포 및 대식세포에서 발현된다.

[0003]

T 세포는 바이러스 감염의 제거에서 매우 중요한 역할을 하고, T 세포 항바이러스 반응은 보통 면역병인과 연관된다. PD1은 T 세포 활성화의 음성 조절에서 중요한 역할을 한다. T 세포에 대한 PD1 매개된 음성 조절이 감염에 의해 생긴 조직 손상을 감소시킬 수 있지만, PD1의 음성 조절 효과의 차단 또는 저해는 자가면역 질환을 발생시킬 수 있고, 예를 들어 췌장 바이러스 감염은 PD1 유전자 낙아웃 마우스에서 더 효과적으로 제거될 수 있지만, 더 심각한 간 손상을 발생시킬 수 있다(Isai et al., 2003, J.Exp.Med.198:39-50). 또한, 고도로 발현된 PD1을 갖는 종양은 대개 검출하기 어려운 암으로 진행한다(Hamanishi et al., 2007, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:3360-5). PD1 발현을 조절하도록 확립된 방법은 신체로의 항체의 주사를 통해서이다.

[0004]

PD1 항체의 광범위한 항종양 전망 및 믿기 어려운 효율로 인해, PD1 경로에 대한 항체가 다양한 종양의 치료에서 돌파구를 발생시킬 것이라고 일반적으로 믿어진다: 비소세포 폐암, 신장 세포 암종, 난소암, 흑색종(Homet M.B., Parisi G., et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473), 백혈병 및 빈혈(Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74).

[0005]

2012년 및 2013년에 미국 암 연구 협회(American Association for Cancer Research: AACR) 및 미국 임상 종양 협회(American Society of Clinical Oncology: ASCO)의 년간 미팅에서 전례 없는 임상 효율 데이터의 계시 이후로, PD1 항체는 세계적인 약제학적 산업에서 R&D에서의 가장 뜨거운 새로운 약물이 되었다.

[0006]

현재, PDL1에 대한 PD1의 결합을 효과적으로 차단하는 더 양호한 결합 효율을 갖는 새로운 항-PD1 항체를 개발하기 위한 수요가 여전하다.

### 발명의 내용

[0007]

깊이 있는 조사 및 창의적인 작업을 통해, 항원으로서 포유류 세포 발현 시스템에서 발현된 재조합 PD1에 의해 마우스를 면역화함으로써, 본 발명자들은 마우스 비장세포 및 골수종 세포의 융합을 통해 하이브리도마 세포를 얻었다. 많은 수의 샘플을 스크리닝함으로써, 본 발명자들은 하이브리도마 세포주 LT003(CCTCC 기탁 수탁번호 C2015105호)을 얻었다.

[0008]

본 발명자들은 놀랍게도 하이브리도마 세포주 LT003이 PD1에 특이적으로 결합하는 특이적 단일클론 항체(14C12라 명명)를 분비할 수 있고, 이 단일클론 항체가 PDL1에 대한 PD1의 회합을 효과적으로 차단할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0009]

더욱이, 본 발명자들은 인간화된 항-PD1 항체(14C12H1L1이라 명명)를 창의적인 방식으로 생성하였다.

[0010]

더 놀랍게도, 본 발명자들은 본 명세서에서 항체 14C12 및 14C12H1L1이 효과적으로 인간 T 세포에 결합하고, T 세포를 활성화하고, 인간 램프구로부터의 IFN- $\gamma$  및 IL-2의 분비를 유도할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 명세서에서 항체 14C12 및 14C12H1L1은 폐암, 흑색종, 신장암, 난소암 및 백혈병 및 빈혈을 포함하는 악성종양을 예

방하고 치료하기 위한 약물이 되는 가능성을 갖는다.

[0011] 하기는 본 발명에 의해 제공된다:

[0012] 본 발명은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이고, 여기서

[0013] 상기 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역( $V_H$ )은 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고; 그리고/또는

[0014] 상기 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역( $V_L$ )은 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함한다.

[0015] 본 발명의 몇몇 예에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서

[0016] 단일클론 항체의  $V_H$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 2 및 서열 번호 6으로부터 선택되고; 그리고/또는

[0017] 단일클론 항체의  $V_L$ 의 아미노산 서열은 서열 번호 4 및 서열 번호 8로부터 선택된다.

[0018] 본 발명의 예에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 단일클론 항체는

[0019] (1) 서열 번호 2로 표시된  $V_H$  및 서열 번호 4로 표시된  $V_L$ ;

[0020] (2) 서열 번호 6으로 표시된  $V_H$  및 서열 번호 8으로 표시된  $V_L$ 을 포함한다.

[0021] 항체의 중쇄 및 경쇄에서의 가변 영역은 결합 활성을 지배한다. 각각의 사슬은, Kabat 등(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), volume 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD)에 의해 정의된 바대로, 3개의 초가변 영역, 즉 상보성 결정 영역(complementary determining region: CDR)(중쇄(H)에서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 경쇄(L)에서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 함유한다.

[0022] 본 명세서에 기재된 분야에서 기술자 직원에게 널리 공지된 기법, 예를 들어 VBASE2 데이터베이스를 통해 상기 항목 (1) 및 (2)에서 단일클론 항체 서열의 CDR에서의 아미노산 서열을 분석하는 것을 통해,

[0023] 본 명세서에서 항체 14C12 및 14C12H1L1은 동일한 CDR을 포함한다:

[0024] 여기서,  $V_H$ 의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0025] HCDR1: GFAFSSYD(서열 번호 9),

[0026] HCDR2: ISGGGRYT(서열 번호 10),

[0027] HCDR3: ANRYGEAWFAY(서열 번호 11);

[0028] 여기서,  $V_L$ 의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0029] LCDR1: QDINTY(서열 번호 12),

[0030] LCDR2: RAN(서열 번호 13),

[0031] LCDR3: LQYDEFPLT(서열 번호 14).

[0032] 소정의 예에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, dAb, CDR, 단쇄 항체(예를 들어, scFv), 인간화된 항체, 키메라 항체 또는 이중특이적 항체로부터 선택된다.

[0033] 소정의 실시형태에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체는 대략  $10^{-5} M$  미만, 예를 들어 대략  $10^{-6} M$  미만,  $10^{-7} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $10^{-10} M$ , 또는 이것 미만; 바람직하게는, 포르테바이오 (Fortebio) 분자 상호작용 설비에 의해 검출된 것의  $K_D$ 로 PD1 단백질에 결합한다.

[0034] 소정의 실시형태에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체는 대략 100nM 미만, 예를 들어 10nM 미만, 1nM, 0.9nM, 0.8nM, 0.7nM, 0.6nM, 0.5nM, 0.4nM, 0.3nM, 0.2nM, 0.1nM 또는 이것 미만의  $EC_{50}$ 으로 PD1 단백질에 결합한다. 구체적으로, 상기  $EC_{50}$ 은 간접적인 ELISA에 의해 결정된다.

- [0035] 소정의 실시형태에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체는 대략  $10^{-5}$  M 미만, 예컨대 대략  $10^{-6}$  M 미만,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M, 또는 이것 미만의 K<sub>D</sub>로 PD1 단백질에 결합한다.
- [0036] 소정의 실시형태에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체는 마우스 이 외의 종, 예를 들어 인간으로부터의 비-CDR 영역을 함유한다.
- [0037] 소정의 실시형태에서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 상기 단일클론 항체는 하이브리도마 세포주 LT003에 의해 생산되고, 상기 하이브리도마 세포주 LT003은 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105호로 중국 균주 은행 기관(China Center for Type Culture Collection: CCTCC)에 보존된다.
- [0038] 본 발명은 항체의 V<sub>H</sub>를 코딩할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이고, 여기서
- [0039] 상기 항체의 V<sub>H</sub>는 서열 번호 9 내지 11로부터의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고;
- [0040] 구체적으로, 상기 항체의 중쇄는 서열 번호 2 및 서열 번호 6으로부터의 아미노산 서열을 갖고;
- [0041] 더 구체적으로, 상기 핵산 분자는 서열 번호 1 또는 서열 번호 5로부터의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0042] 본 발명은 항체의 V<sub>L</sub>를 코딩할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이고, 여기서
- [0043] 상기 항체의 V<sub>L</sub>은 서열 번호 12 내지 14로부터의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고;
- [0044] 구체적으로, 상기 항체의 V<sub>L</sub>은 서열 번호 4 또는 서열 번호 8로부터의 아미노산 서열을 갖고;
- [0045] 더 구체적으로, 상기 핵산 분자는 서열 번호 3 또는 서열 번호 7로부터의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0046] 본 발명은 본 발명에 기재된 단리된 핵산 분자를 포함하는 백터에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명은 본 발명에 기재된 단리된 핵산 분자, 또는 본 발명에 기재된 백터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명은 적절한 조건 하에 본 발명에서의 숙주 세포를 배양하고, 세포 배양으로부터 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수함으로써, 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105호로 중국 통상 배양 수집 센터(CCTCC)에 보존된 하이브리도마 세포주 LT003에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 검출 가능한 마커로서 이의 접합 파트로 이루어진 접합체에 관한 것이고, 여기서 상기 단일클론 항체는 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 구체적으로, 상기 접합 파트는 방사성 동위원소, 플루오레세인, 발광성 재료, 색상 있는 기질 또는 효소이다.
- [0051] 본 발명은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체로 이루어진 시약 키트에 관한 것이다.
- [0052] 구체적으로, 시약 키트는 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 특이적으로 인식하는 2차 항체를 함유할 수 있고; 선택적으로, 상기 2차 항체는 검출 가능한 마커, 예컨대 방사성 동위원소, 플루오레세인, 발광성 재료, 색상 있는 기질 또는 효소를 함유할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 시약 키트의 제조에서의 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체의 용도에 관한 것이고, 상기 시약 키트는 샘플에서 PD1의 존재 또는 수준의 검출에서 사용된다.
- [0054] 본 발명은 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체를 포함하는 약제 학적 조성물에 관한 것이다. 선택적으로, 이것은 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유할 수 있다.
- [0055] 본 발명은 종양 또는 빈혈의 예방 및/또는 치료 및/또는 애주번트 치료 및/또는 진단을 위한 약물의

제조에서의, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체의 용도에 관한 것이고; 구체적으로, 상기 종양은 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암, 결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 및 백혈병일 수 있다.

[0056] 본 발명자들은, 동물 실험을 통해, 14C12H1L1이 PD-1 HuGEMM 마우스에서 피하로 오른 측에서 접종된 MC38 종양 세포의 성장을 효과적으로 저해할 수 있다는 것을 발견하였고, 항체 약물 14C12H1L1은, 동일한 표적을 표적화하는 승인된 약물인 판매 중인 단일클론 항체 약물 니볼루맙과 동등한 효율을 갖는, PD-1 HuGEMM 종양 보유 마우스에서 종양 성장을 상당히 저해할 수 있다.

[0057] 본 발명은 하기 목적을 갖는, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체의 용도에 관한 것이다:

[0058] PD1 리간드에 대한 PD1의 결합의 차단의 목적,

[0059] PD1 활성 또는 수준의 조절(예를 들어, 하향조절)의 목적,

[0060] PD1의 면역억제의 완화의 목적, 또는

[0061] T 림프구에서의 IFN- $\gamma$  및/또는 IL-2 발현의 상향조절의 목적;

[0062] 구체적으로, 상기 PD1 리간드는 PDL1 또는 PDL2, 바람직하게는 PDL1이다.

[0063] 본 발명은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 본 발명에 기재된 이의 접합체의 유효량을 요하는 세포 또는 대상체에게 적용하기 위한 생체내 또는 시험관내 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 하기로부터 선택된다:

[0064] PD1 리간드에 대한 PD1의 결합을 차단하는 방법,

[0065] PD1 활성 또는 수준을 조절(예를 들어, 하향조절)하는 방법,

[0066] PD1의 면역억제를 완화시키는 방법, 또는

[0067] T 림프구에서의 IFN- $\gamma$  및/또는 IL-2 발현을 상향조절하는 방법;

[0068] 구체적으로, 상기 PD1 리간드는 PDL1 또는 PDL2, 바람직하게는 PDL1이다.

[0069] 본 발명의 구체적인 예에서, 상기 시험관내 방법은 비치료학적 또는 비진단학적 목적에 의도된다.

[0070] 인터페론  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )는 주로 천연 살해(NK) 세포 및 천연 살해 T(NKT) 세포에 의해 천연 제조되거나, 특이적 항원에 의해 자극된 후 CD4 Th1 세포 및 CD8 세포독성 T 림프구로 이루어진 효과기 T 세포에 의해 제조된다. 선천성 및 후천성 면역의 중요한 사이토카인으로서, IFN  $\gamma$ 는 바이러스, 몇몇 박테리아 및 원생동물 감염을 길항작용하거나 억제하는 데 중요한 역할을 한다. 한편, IFN  $\gamma$ 는 대식세포를 활성화하고, 2형 주요 조직적합성 복합체 (major histocompatibility complex: MHC)의 발현을 유도할 수 있어서, 면역 반응을 활성화하여 종양의 진행을 제어한다(Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. Advances in Immunology 2007; 96:41-101). 본 발명의 시험관내 연구에서, 항-PD1 항체는 IFN  $\gamma$ 의 분비를 유도할 수 있어서, 면역 반응을 활성화한다.

[0071] T 세포에 의해 제조된 인터류킨 2(IL-2)는 T 세포 하위집단을 조절하는 성장 인자 및 면역 반응을 조절하여서, 활성화된 B 세포 증식을 촉진하고, 항체 반응, 조혈작용 및 종양학적 감시에서 참여하는 중요한 인자이다. 재조합 인간 IL-2는 만성 바이러스 감염의 치료에 대해 임상 연구를 겪으면서 악성 종양(흑색종, 신장 종양 등을 포함)의 치료에 대해 미국 FDA에 의해 승인되었다(Chavez, A.R., et al., Pharmacologic administration of interleukin-2. Ann N Y Acad Sci, 2009.1182:p.14-27). 시험관내 연구에서, 본 발명의 항-PD1 항체는 PD1의 면역억제를 특이적으로 완화시키고, T 세포를 활성화하고, IL-2 제조를 유도하여서, 신생물 및 기생충 질환에 대한 유전자 치료에서 광범위한 분야의 유망한 전망을 나타낼 수 있다.

[0072] 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 접합체는 종양 또는 빈혈의 예방 및/또는 치료 및/또는 애주번트 치료 및/또는 진단에 사용되고; 구체적으로, 상기 종양은 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암, 결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 또는 백혈병일 수 있다.

[0073] 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 접합체는

[0074] PD1 리간드에 대한 PD1의 결합을 차단하거나,

- [0075] PD1 활성 또는 수준을 조절(예를 들어, 하향조절)하거나,
- [0076] PD1의 면역억제를 완화시키거나,
- [0077] T 림프구에서의 IFN- $\gamma$  및/또는 IL-2 발현을 상향조절하도록 사용되고;
- [0078] 구체적으로, 상기 PD1 리간드는 PDL1 또는 PDL2, 바람직하게는 PDL1이다.
- [0079] 본 발명의 특정한 예에서, 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 접합체는 PDL1에 대한 PD1의 결합을 오직 차단한다.
- [0080] 본 발명은 본 발명에 기재된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 접합체의 유효량을 대상체에게 적용하는 절차를 포함하는 종양 또는 빈혈의 예방 및/또는 치료 및/또는 아주번트 치료 및/또는 진단에 대한 방법에 관한 것이고; 구체적으로, 상기 종양은 흑색종, 신장암, 전립선암, 방광암, 결장직장암, 위장암, 간암, 비소세포 폐암, 난소암 또는 백혈병일 수 있다.
- [0081] 본 명세서에 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련되어 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 보통 이해하는 의미를 가져야 한다. 더욱이, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 유전학, 올리고- 또는 폴리뉴클레오파우드 화학 및 면역학의 실험실 기법은 널리 공지되고 당해 분야에서 보통 사용된 것이다. 한편, 본 발명을 더 잘 이해하기 위해, 하기 용어는, 달리 표시되지 않는 한, 하기 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다:
- [0082] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "PD1 단백질의 아미노산 서열(예정 세포사 단백질 1, NCBI 유전자은행: NP\_005009.2)"은 전장 PD1 단백질, 또는 PD1ECD(PD1의 세포외 분절) 또는 PD1ECD 함유 단편을 포함하고; 예를 들어 마우스 또는 인간 IgG의 Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)과 융합된 PD1ECD의 융합 단백질을 또한 포함한다. 더욱이, 당업자에 의해 이해된 바대로, PD1 단백질의 아미노산 서열은 이의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않으면서 천연 또는 인공 돌연변이(치환, 결실, 및/또는 부가를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명에서, 용어 "PD1 단백질"은 모든 이러한 서열 및 이의 천연 또는 인공 변이체를 포함해야 한다. 더욱이, PD1 단백질의 서열 단편을 기재할 때, 상기 서열 단편은 이의 천연 또는 인공 변이체의 서열 단편 및 상응하는 서열 단편 둘 다를 포함한다.
- [0083] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "PDL1 단백질의 아미노산 서열(예정 사멸-리간드 1, NCBI 유전자은행 번호: NP\_054862.1)"은 전장 PDL1 단백질, 또는 PDL1ECD(PDL1의 세포외 분절) 또는 PDL1ECD 함유 단편을 포함하고; 예를 들어 마우스 또는 인간 IgG의 Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)과 융합된 PDL1ECD의 융합 단백질을 또한 포함한다. 더욱이, 당업자에 의해 이해된 바대로, PDL1 단백질의 아미노산 서열은 이의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않으면서 천연 또는 인공 돌연변이(치환, 결실, 및/또는 부가를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명에서, 용어 "PDL1 단백질"은 모든 이러한 서열 및 이의 천연 또는 인공 변이체를 포함해야 한다. 더욱이, PDL1 단백질의 서열 단편을 기재할 때, 상기 서열 단편은 이의 천연 또는 인공 변이체의 서열 단편 및 상응하는 서열 단편 둘 다를 포함한다.
- [0084] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "EC<sub>50</sub>"은 최대 효과의 50%에 대한 농도를 의미한다.
- [0085] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 통상적으로 폴리펩타이드 사슬의 2개의 쌍으로 이루어진(각각의 쌍은 "경쇄"(L) 및 "중쇄"(H)를 가짐), 면역글로불린 단백질을 의미한다. 경쇄는  $\kappa$  및  $\lambda$  경쇄로 분류된다. 중쇄는  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  또는  $\epsilon$ 로 분류되고, 각각 아이소유형 항체를 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로서 정의한다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산으로 이루어진 "J" 영역에 의해 연결된다. 중쇄는 또한 약 3개 이상의 아미노산을 갖는 "D" 영역을 함유한다. 각각의 중쇄는 가변 영역(V<sub>H</sub>) 및 3개의 도메인(C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3)으로 이루어진 불변 영역(C<sub>H</sub>)을 함유한다. 각각의 경쇄는 가변 영역(V<sub>L</sub>) 및 1개의 도메인 C<sub>L</sub>로 이루어진 불변 영역(C<sub>L</sub>)을 함유한다. 불변 영역은 면역계에서의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 보체 성분 1q(C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역 글로불린의 결합을 매개 할 수 있다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>은 또한 프레임워크 영역(framework region: FR)이라 불리는 비교적 보존된 영역에 의해 분리된 높은 가변성을 갖는 영역(상보성 결정 영역(CDR)이라 칭함)으로 더욱 분할될 수 있다. 아미노 말단으로부터 카복실 말단으로, 각각의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역(V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>)은 항체 결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산의 분포는 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health Bethesda, MD (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk (1987) Mol. Biol., 196:901-917; or Chothia et

a1. (1989) Nature, 342:878-883]에서 Kabat에 의한 정의를 따른다. 용어 "항체"는 이를 제조하는 임의의 특정한 방법에 의해 제한되지 않는다. 예를 들어, 이것은 특히 재조합 항체, 단일클론 항체 및 다중클론 항체를 포함한다. 항체는 상이한 아이소유형, 예를 들어 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위유형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.

[0086] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "항원 결합 단편"은, "항원 결합 부분"이라 또한 칭하는, 동일한 항원에 특이적으로 결합하고/하거나, 항원에 결합하는 것에 전장 항체와 경쟁하는 능력을 유지하는, 전장 항체의 단편을 함유하는 폴리펩타이드를 의미한다. 모든 목적을 위해 본 발명에서 전체 논문 및 참고문헌을 포함하여 문헌 [Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed. 2, Raven Press, N. Y. (1989)]을 참조한다. 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 단백분해 효소 또는 화학물질에 의해 온전한 항체를 절단함으로써 생성될 수 있다. 몇몇 경우에, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, 및 CDR 단편, 단쇄 항체(예를 들어, scFv), 키메라 항체, 다이아바디, 및 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합 역량을 부여하기에 충분한 항체 부분을 적어도 함유하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0087] 몇몇 경우에, 항원 결합 단편은 다이아바디, 즉 이합체 항체 단편이고, 이의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에서 발현되지만, 동일한 사슬의 2개의 도메인 사이에 쌍 짓기를 허용하기에 너무 짧은 링커를 사용하는 것 때문에, 도메인은 2개의 항원 결합 부위를 생성하도록 또 다른 사슬에서 상보성 도메인과 쌍 짓기 하도록 강요된다(예를 들어, 문헌[Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), 및 Poljak R. J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)] 참조).

[0088] 당업자에 의해 공지된 종래의 기법(예컨대, 재조합 DNA 기술 또는 효소/화학 절단)을 이용하여, 항원 결합 단편(예컨대, 상기 기재된 항체 단편)은 소정의 항체(예를 들어, 본 발명에서 명세서에 제공된 단일클론 항체 14C12, 14C12H1L1)로부터 얻어지고, 완전 항체에서와 동일한 방식으로 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0089] 본 발명에서, 달리 기재되지 않는 한, 용어 "항체"는 온전한 항체뿐만 아니라, 항체의 항원 결합 단편을 의미한다.

[0090] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "mAb" 및 "단일클론 항체"는, 저절로 생길 수 있는 돌연변이를 제외하고, 고도로 상동성인 항체의 군, 즉 동일한 항체 분자의 군으로부터 유래된 항체 또는 항체의 단편을 의미한다. 단일클론 항체는 항원에서 단일 에피토프에 대해 높은 특이성을 갖는다. 다중클론 항체는 항원에서 상이한 에피토프를 보통 인식하는 적어도 2개 이상의 상이한 항체를 함유하는 단일클론 항체와 다르다. 단일클론 항체는 Kohler 등에 의해 원래 보고된 하이브리도마 기술(Nature, 256: 495, (1975)), 및 재조합 DNA 기술(미국 특허 제 4,816,567호 참조)에 의해 얻어질 수 있다.

[0091] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "인간화된 항체"는 CDR 또는 CDR의 일부가 비인간 항체(도너 항체)의 CDR 영역에 의해 대체되고, 도너 항체가 예측적인 특이성, 결합 친화도 또는 반응성을 갖는 비인간 항체(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼)일 수 있는, 인간 면역글로불린(수용체 항체)로부터 유래된, 항체 또는 이의 단편을 의미한다. 또한, 수용체 항체 프레임워크 영역(FR)의 몇몇 아미노산 잔기는 항체의 성능을 추가로 개선하거나 최적화하도록 비인간 소스의 상응하는 아미노산 잔기에 의해 대체되거나, 다른 항체의 아미노산 잔기에 의해 또한 대체될 수 있다. 인간화된 항체에 대한 더 상세내용을 위해, 예를 들어 문헌[Jones, et al., Nature, 321: 522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329(1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992); 및 Clark, Immunol. Today, 21: 397-402(2000)]을 참조한다.

[0092] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "단리물" 또는 "단리된"은 자연 상태의 인공 수단에 의해 얻어짐을 의미한다. 자연에서 "단리된" 물질 또는 성분의 소정의 종류가 존재하는 경우, 이것은 이의 천연 환경의 변화로 인하거나, 천연 환경으로부터 단리되거나, 또는 둘 다일 수 있다. 예를 들어, 살아 있는 동물에서의 천연 존재에서의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는, 이것이 동일한 천연 상태에서 높은 순도로 분리되는 경우, "단리된"이라 불릴 것이다. 용어 "단리물" 또는 "단리된"은 인공 또는 합성 재료, 또는 활성에 영향을 미치지 않는 다른 불순물의 존재를 배제하지 않는다.

[0093] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오타이드에 의해 삽입될 수 있는 핵산 전달 비히클을 의미한다. 발현되는 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 단백질을 가질 수 있는 벡터는 발현 벡터라 불린다. 벡터는 형질전환, 형질도입 또는 형질주입에 의해 숙주 세포로 삽입될 수 있어서, 벡터에 의해 운반된 유전 물질은 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 벡터는 플라스미드; 파스미드; 코스미드; 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체(yeast artificial chromosome: YAC), 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosome:

BAC), 또는 P1 유래 인공 염색체(P1 derived artificial chromosome: PAC); 파지, 예컨대 λ 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 분야에서의 기술 직원에게 널리 공지되어 있다. 동물 바이러스는 역전사효소 바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스 바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스), 닭 수두 바이러스, 바클로바이러스, 유두종 바이러스 및 파포바 바이러스(예컨대, SV40)를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 벡터는 측진자, 전사 개시 인자, 인핸서, 선택 요소 및 리포터 유전자(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 발현을 제어하는 다수의 성분을 함유 할 수 있다. 또한, 벡터는 또한 복제 개시 부위를 함유할 수 있다.

[0094] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "숙주 세포"는 원핵생물 세포, 예컨대 이. 콜라이 및 바실러스 서브틸리스, 진균 세포, 예컨대 효모 및 아스페르길루스, 곤충 세포, 예컨대 S2 드로소필라 세포 및 Sf9, 또는 동물 세포, 예컨대 섬유아세포 세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK293 세포 또는 인간 세포 (이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 벡터를 불러들일 수 있는 세포를 의미한다.

[0095] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "특이적 결합"은 2개의 분자 사이의 비랜덤 결합, 예컨대 항체와 이의 표적 항원 사이의 상호작용을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 항원에 대한 항체의 특이적 결합은 예를 들어 약  $10^{-5}$  M 미만, 특히  $10^{-6}$  M 미만,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M, 또는 이것 미만의 친화도( $K_D$ )를 의미한다.

[0096] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 " $K_D$ "는 항체와 항원 사이의 결합 친화도를 기재하도록 항체와 항원 사이의 특이적 상호작용의 해리 평형 상수를 의미한다. 해리 평형 상수가 더 적을수록, 항체가 항원에 더 단단히 결합하고, 항체와 항원 사이의 친화도는 더 높다. 통상적으로, 항체(예를 들어, 본 발명에서 단일클론 항체 14C12, 14C12H1L1)는 대략  $10^{-5}$  M 미만, 예를 들어  $10^{-6}$  M 미만,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M 또는  $10^{-10}$  M 또는 심지어 이것 미만의  $K_D$ 로 항원(예를 들어, PD1 단백질)에 결합한다.  $K_D$ 는 예를 들어 Fortebio Octet 시스템을 사용하여 분야에서 기술 직원에게 널리 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "단일클론 항체" 및 "mAb"는 동일한 의미를 갖고, 상호 교환되어 사용되고; 용어 "다중클론 항체" 및 "PcAb"는 동일한 의미를 갖고, 상호 교환되어 사용되고; 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 동일한 의미를 갖고, 상호 교환되어 사용된다. 또한 본 발명에서, 아미노산은 이 분야에 공지된 단일 철자 또는 3개 철자 약어에 의해 보통 표시된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시된다.

[0097] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"는 상호 교환되어 사용될 수 있고, 본 명세서에서 언급될 때, 하이브리도마의 서브클론 및 자손 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에서 언급 될 때, 하이브리도마 세포주 LT003은 또한 LT003의 서브클론 및 자손 세포를 포함한다.

[0098] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제"는, pH 조정제, 계면활성제, 애주번트 및 이온성 강도 인핸서(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는, 대상체 및 활성 성분과 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 맞고, 본 명세서에서 분야에서 널리 인식된 담체 및/또는 부형제를 의미한다(Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995). 예를 들어, pH 조정제는 포스페이트 완충제 용액을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않고; 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween-80을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않고; 이온성 강도 인핸서는 염화나트륨을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다.

[0099] 본 발명에 사용된 바와 같은, 용어 "유효 용량"은 원하는 효과를 달성하거나 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 치료학적의 양으로서 정의된다. 예를 들어, (예를 들어, 암에 대한) 유효 예방 용량은 질환(예를 들어, 암)의 발생을 예방, 중단 또는 지연시키는 양이고; 유효 치료 용량은 질환을 갖는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치유하거나, 적어도 부분적으로 중단하는 양이다. 이러한 유효 용량의 결정은 완전히 분야에서의 기술 직원의 역량의 범위 내에 있다. 예를 들어, 유효 치료 용량은 질환, 대체로 환자의 면역계의 상태의 중증도, 환자의 일반 배경, 예컨대 연령, 체중 및 성별, 상기 약물의 투여 방법, 및 다른 병존 치료 등에 따라 달라질 것이다.

#### 본 발명의 효과

[0100] 본 발명에서의 단일클론 항체, 특히 14C12H1L1은 PD1에 특이적으로 결합하고, PDL1에 대한 PD1의 결합을 효과적으로 차단하고, PD1의 면역억제를 완화시켜 T 림프구를 활성화할 수 있다. 여기서, PD1 항체 14C12H1L1은 대조군 항체 5C4보다 훨씬 양호하게 IFN-γ 및 IL-2의 분비를 유도할 수 있다(5C4: Medarex Inc.로부터의 PD1 항체: Alan J.Korman, et al., Human monoclonal antibodies to programmed death 1 (PD1) and methods for

treating cancer using anti-PD1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics, 미국 특히, 특히 US 제8008449 B2호). 본 발명의 단일클론 항체, 특히 14C12H1L1은 동일한 표적에 대한 승인된 약물 니볼루맙에 동등한 항종양 효과를 갖는다. 본 발명의 항체는 비소세포 폐암, 신장 세포암, 난소암, 흑색종, 백혈병 또는 빈혈의 예방 및/또는 치료를 위한 약물이 되거나 이로 제조될 가능성을 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

[0102]

도 1: 인간화된 단일클론 항체 14C12H1L1의 SDS-PAGE 결과. 왼쪽으로부터 오른쪽으로: 1. 비활원된 로딩 완충제 중의  $1\mu\text{g}$ 의 항체; 2. 활원된 로딩 완충제 중의  $1\mu\text{g}$ 의 항체; 3.  $5\mu\text{l}$ 의 마커; 3.  $1\mu\text{g}$ 의 BSA.

도 2: 항체 14C12의 결합 역학.

도 3: 항체 14C12H1L1의 결합 역학.

도 4: 항체 5C4의 결합 역학.

도 5: PD1에 대한 14C12H1L1 및 5C4 결합의 ELISA 결과.

도 6: PDL1에 대해 PD1에 대한 14C12H1L1 및 5C4 결합의 경쟁 ELISA 결과.

도 7: 293T-PD1 세포의 표면에서 PD1에 대한 14C12H1L1 결합의 EC<sub>50</sub>.

도 8: T 세포 표면 항원 PD1에 대한 14C12H1L1의 결합 활성.

도 9: 혼합된 램프구의 IFN-γ 분비에 대한 14C12H1L1의 영향.

도 10: 혼합된 램프구의 IL-2 분비에 대한 14C12H1L1의 영향.

도 11: PBMC, MDA-MB-231 및 Raji 세포를 혼합함으로써 유도된 사이토카인 IL-2의 분비에 대한 14C12H1L1의 영향.

도 12: PD-1 HuGEMM 마우스에서 MC38 종양 모델의 종양 성장에 대한 14C12H1L1의 영향.

하이브리도마 세포주 LT003은 2015년 6월 16일자에 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105로 우한 대학교(Wuhan University)(중국 430072 우한)에서의 중국 통상 배양 수집 센터(CCTCC)에 보존되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103]

본 발명은 이제 자세히 기재될 것이다. 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 하기 실시예는 본 발명의 설명에 오직 사용되고, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 기법 또는 조건의 특정한 설명이 없는 사례는 분야에서 문헌(예를 들어, Guide to Molecular Cloning, written by J Sambrook, et al, translated by Peitang Huang, et al, third Edition, Science Press)에 따라 또는 제품 지시 매뉴얼에 따라 수행될 수 있다. 기재된 제조사가 없는 시약 또는 기계는 모두 상업적으로 이용 가능한 종래의 생성물이다.

[0104]

하기 실시예에서, 사용된 T 세포는 Akeso Biopharma, Inc.로부터 구입하고; BALB/C 마우스는 광동 의학 실험실 동물 센터(Medical Laboratory Animal Center)로부터 구입하였다. 사용된 PD-1 HuGEMM 마우스는 Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.로부터 구입하고; MC38 세포는 상하이 후단 IBS 세포 센터(Shanghai Fudan IBS Cell Center)로부터 구입하고; 사용된 니볼루맙(Opdivo(등록상표))인 동일한 표적에 대한 판매된 약물은 Bristol-Myers Squibb Company로부터 구입하였다.

[0105]

실시예 1: 하이브리도마 세포주 LT003의 획득 및 단일클론 항체 14C12의 제조

[0106]

1. 하이브리도마 세포주 LT003의 확립

[0107]

항원으로서 PD1-mFc(PD1: 예정 세포사 단백질 1, NCBI 유전자은행 번호: NP\_005009.2) 융합 단백질을 사용하고, 면역화된 BALB/C 마우스(광동 의학 실험실 동물 센터로부터 구입)의 비장세포 및 마우스 골수종 세포를 현재 확립된 방법에 의해 하이브리도마 세포로 융합하였다(예를 들어, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds.G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

[0108]

マイクロプレート를 항원으로서 PD1-mFc에 의해 코팅하고, 하이브리도마 세포를 간접 ELISA에 의해 스크리닝하여, PD1에 특이적으로 결합하는 새로운 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 얻었다.

- [0109] 리간드 PDL1-hFc 융합된 단백질(PDL1: 예정 사멸-리간드 1, NCBI 유전자은행 ID:NP\_054862.1)에 대해 경쟁 ELISA에 의해 PD1에 결합하는 단일클론 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고, 제한된 희석 방법에 의해 안정한 하이브리도마 세포주를 얻고, 이후 제한된 희석 방법에 의해 안정한 LT003 세포주(LT003으로부터 분비된 단일클론 항체는 14C12라 칭함)를 얻었다.
- [0110] 하이브리도마 세포주 LT003(PD1-14C12)은 CCTCC 기탁 수탁 번호 C2015105호로 2015년 6월 16일자로 우한 대학교(Wuhan University)(중국 430072 우한)에서 중국 통상 배양 수집 센터(CCTCC)에 보존되었다.
- [0111] 2. 단일클론 항체 14C12의 제조
- [0112] 본 발명에서의 LT003 세포주를 7일 동안 10% 낮은 IgG 소 태아 혈청을 함유하는 IMDM 배지 중에 배양하고, 이후 세포 배양 상清액을 수확하고 정제하여 항체 14C12를 얻었다.
- [0113] 실시예 2: 단일클론 항체 14C12의 경쇄 및 중쇄 서열의 획득
- [0114] 세포/박테리아 전체 RNA 추출 시약 키트(Tiangen, 제품 번호 DP430)의 매뉴얼에 따라 상기 실시예 1에서 제조된 하이브리도마 세포주 LT003으로부터 mRNA를 추출하였다.
- [0115] RT-PCR 키트에 대한 Invitrogen SuperScript(등록상표) III First-Strand Synthesis System의 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하고, PCR 증폭을 수행하였다.
- [0116] pEASY-T1 Cloning 키트(Transgen CT101)의 지시에 따라 PCR 증폭 산물을 사용하여 TA 클로닝을 직접적으로 수행하였다.
- [0117] TA 클로닝 산물을 서열분석하고, 하기 결과를 얻었다:
- V<sub>H</sub>의 DNA 서열분석 결과: (354bp)
- ```
GAGGTCAAACGGTGAGAGCGGGCGGGCTGGTGAAGCCCCGGCGGGTCACTGAAACT
GAGCTGCGCCGCTTCGGCTCGCCTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCT
GAGAAGCGCCTGGAATGGTCGCTACTATCAGCGGAGGCAGGCGATAACACCTACTATCCTGAC
TCTGTCAAAGGGAGATTACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATG
TCTAGTCTCGGGTCCGAGGATAACAGCTGTACTATTGTGAAACCGGTACGGCGAAGCATGGT
TTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTACAGTCTGTGCC (서열 번호 1)
```
- [0118] 코딩된 단백질 서열: (118 개의 aa)
- ```
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRYTYYPD
SVKGRTISRDNAARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSA (서열 번호 2)
```
- V<sub>L</sub>의 DNA 서열분석 결과: (318bp)
- ```
GACATTAAGATGACACAGTCCCCTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGACC
TTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATAACCTGTCTGGTTTCAGCAGAACGCCAGGC
AAAAGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTG
TCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATG
GGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGAGTCCCTGTACCTTGGAGCAGGCACAAACTGG
AACTG (서열 번호 3)
```
- 코딩된 단백질 서열: (106 개의 aa)
- ```
DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSG
SGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (서열 번호 4)
```
- [0122] 2. 재조합 단일클론 항체 14C12(Re)의 제조
- [0123] 14C12(Re)의 중쇄 cDNA 서열(가변 영역 서열은 서열 번호 1임) 및 경쇄 cDNA 서열(가변 영역 서열은 서열 번호 3임)을 pUC57simple(GenScript Biotech Corp.에 의해 제공됨) 벡터(효소 절단 부위: XbaI 및 BamHI)로 별개로 클로닝하고, 각각 pUC57simple-14C12H 및 pUC57simple-14C12L 플라스미드를 얻었다.
- [0124] 각각 플라스미드 pUC57simple-14C12H 및 pUC57simple-14C12L를 효소 절단(HindIII 및 EcoRI)하고, 이후 전기천공으로부터 회수된 중쇄 및 경쇄를 pcDNA3.1 벡터로 서브클로닝하고, 재조합 플라스미드 둘 다를 추출하고,

293F 세포를 동시형질주입하였다.

[0125] 7일 세포 배양 후, 세포 배양 상청액을 고속 원심분리에 의해 원심분리하고, 미세다공성 막에 의해 진공 여과에 의해 여과시키고, HiTrap MabSelectSuRe 칼럼에 로딩하고, 이후 항체를 일 단계에서 Elution Buffer에 의해 용리하고, HiTrap Desalting 칼럼을 통해 지나가고, PBS 완충제로 회수하고, 이후 재조합 항체 14C12(Re)를 추가의 정제 후 얻었다.

[0126] ELISA 결합 활성 검정에 의해 검증된 바대로, 재조합 항체 14C12(Re)는 항체 14C12와 동등한 결합 활성을 갖고, 그러므로 후속하는 항체 인간화 설계에서 추가로 사용할 수 있다.

#### 실시예 3: 인간화된 항체 14C12H1L1의 중쇄 및 경쇄 서열의 설계

##### 1. 인간화된 항체 14C12H1L1의 경쇄 및 중쇄 서열의 설계

[0129] PD1 단백질의 3차원 결정 구조(Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3):704-6)) 및 실시예 2에서 얻은 항체 14C12의 서열에 따라, 컴퓨터 항체 모델링을 통해, 아미노산 돌연변이는 모델에 따라 설계되고, 하기한 바대로 항체 14C12H1L1의 가변 영역 서열(중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁번호: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호 P01834임)을 얻었다:

중쇄 가변 영역의 DNA 서열: (354bp)

```
GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCGGCGGGTCACTGCGACTG  
AGCTGCGCAGCTCCGGATCGCCTTAGCTCCTACGACATGTCTGGTGCACAGGCCACAG  
GAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATAACCTACTATCCTGACA  
GCGTCAAGGGCCGGTTCACAACTCTAGAGATAACAGTAAGAACAAATCTGTATCTGCAGATGA  
ACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAAGCATGGT  
TTGCCTATTGGGGCAGGGAACCTGGTGACAGTCTAGT (서열 번호 5)
```

코딩된 단백질 서열: (118 개의 aa)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDSWVRQAPGKGQLDWVATISGGGRYTYYP  
DSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLTVSS (서열 번호 6)
```

경쇄 가변 영역의 DNA 서열: (321bp)

```
GACATTCAAGATGACTCAGAGCCCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGCGACAGGGTCACCT  
TCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAACGCCAGGG  
AAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTGGAGTCCAAGTCGGTTCA  
GTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGG  
CAAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGITCCCAC TGACCTTGGCGCCGGACAAAATGGA  
GCTGAAG (서열 번호 7)
```

코딩된 단백질 서열: (107 개의 aa)

```
DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSG  
SGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (서열 번호 8)
```

#### 실시예 4: 인간화된 단일클론 항체 14C12H1L1의 제조 및 SDS-PAGE 전기천공

[0135] 14C12H1L1의 중쇄 cDNA(가변 영역 서열은 서열 번호 5이고, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁번호: P01857임) 및 경쇄 cDNA(가변 영역 서열은 서열 번호 7이고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호 P01834임)를 pUC57simple(GenScript Biotech Corp.에 의해 제공됨) 벡터(효소 절단 부위: XbaI 및 BamHI)로 별개로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-14C12H1 및 pUC57simple-14C12L1 플라스미드를 얻었다. 이 플라스미드를 각각 pcDNA3.1 벡터(효소 절단 부위: XbaI 및 BamHI)로 클로닝하고, 재조합 플라스미드 둘 다를 추출하고, 293F 세포를 동시형질주입하였다.

[0136] 7일 세포 배양 후, 세포 배양물을 고속 원심분리에 의해 원심분리하고, 미세다공성 막에 의해 진공 여과에 의해 여과시키고, HiTrap MabSelectSuRe 칼럼에 로딩하고, 이후 항체를 일 단계에서 Elution Buffer에 의해 용리시키고, HiTrap Desalting 칼럼을 통해 지나가고, PBS 완충제로 회수하고, 추가로 정제하여 재조합 항체

14C12H1L1을 얻고, 이것을 SDS-PAGE 전기천공에 의해 분석하였다.

[0137] 결과는 도 1에 도시되어 있고, 환원된 표적 단백질은 대략 24.5kD 및 49kD에서 보이고, 비환원된 표적 단백질은 대략 147kD에서 보였다.

[0138] 실시예 5: 항체의 역학적 측정

[0139] Fortebio Octet System에 의해 항원 PD1에 대한 항체 14C12 및 인간화된 항체 14C12H1L1의 결합 역학을 측정하였다.

[0140] 1. TEV 프로테아제에 의해 PD1-mFc 단백질을 절단하고, 칼럼 정제에 의해 PD1 항원을 얻었다.

[0141] 2. 바이오틴에 의해 표지된 항원 PD1( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 농도)을 SA 센서의 표면에서 부동화하고, PBST 완충제 중에 평형화시키고, 이후 결합된 항체 14C12, 14C12H1L1 및 5C4, 및 항체를 200nM 이후로 이전의 것에 대해 각각 회석 3배에 의해 회석하였다. 항원 및 항체의 해리는 또한 PBST 중에 있었다.

[0142] 항체 14C12, 14C12H1L1 및 5C4의 결합 역학은 각각 표 1 및 도 2, 도 3 및 도 4에 도시되어 있다. 결과는 14C12 및 14C12H1L1 둘 다가 5C4의 것보다 더 높은 친화도로 PD1에 양호한 친화도를 갖는다는 것을 보여주었다.

표 1: 항체 14C12의 동적 매개변수.

항체 명칭	$K_D(\text{M})$	$K_{on}(1/\text{Ms})$	$K_o$ 오차	$K_{dis}(1/\text{s})$	$K_{dis}$ 오차
14C12	$1.81\text{E}-11$	$3.38\text{E}+05$	$8.23\text{E}+03$	$6.12\text{E}-06$	$1.04\text{E}-05$
14C12H1L1	$2.42\text{E}-11$	$3.17\text{E}+05$	$5.90\text{E}+03$	$7.66\text{E}-06$	$8.70\text{E}-06$
5C4	$6.46\text{E}-10$	$5.63\text{E}+05$	$1.38\text{E}+04$	$3.63\text{E}-04$	$0.77\text{E}-06$

$K_D$ : 해리 상수;

$K_{on}$ : 항원 및 항체의 결합 속도;

$K_{dis}$ : 항원 및 항체의 해리 속도;

$$K_D = K_{dis}/K_{on}.$$

[0143] 실시예 6: 간접 ELISA에 의해 측정된 항체 및 항원 PD1의 결합 활성

[0144] PD1에 대한 항체 14C12H1L1 및 5C4의 결합 활성을 하기한 바대로 간접 ELISA에 의해 별개로 측정하였다:

[0145] 4°C에서 밤새 PD1-mFc와 항온처리한 후, 마이크로플레이트를 37°C에서 2시간 동안 1% BSA에 의해 차단하고, 이후 항체를 별개로 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 항온처리하고, 이후 HRP 표지된 2차 항체(염소 항-인간 IgG(H+L))(Jackson, 109-035-088)를 첨가하고, 이후 TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 5분 동안 반응시키고, 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에서 450nm의 파장에서 판독하였다.

[0146] 항원 PD1에 대한 항체 14C12H1L1 및 5C4의 결합 결과는 도 5에 도시되어 있다. 도 5에 도시된 바대로, 항체 14C12H1L1 및 5C4 둘 다는 용량 의존성으로 효과적으로 PD1 단백질에 결합할 수 있다. 상이한 용량에서의 흡광도 강도는 표 2에 기재되어 있다. 흡광도 값의 정량적 분석을 이용한 곡선 모의를 통해, PD1과의 14C12H1L1 및 5C4 결합의 EC50은 이후 각각 0.032nM 및 0.043nM인 것으로 결정되었다.

표 2: PD1에 대한 14C12H1L1 및 5C4 결합의 흡수 강도

항체 농도( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	항원 코팅: PD1-mFc ( $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	14C12H1L1	5C4		
1	2.970	2.954	2.950	2.991
0.3	2.886	2.961	2.978	3.079
0.1	2.864	2.868	2.838	2.926
0.03	2.674	2.669	2.617	2.650
0.01	2.222	2.201	1.981	2.221
0.003	1.383	1.464	1.169	1.222
0.001	0.676	0.736	0.527	0.548
0	0.062	0.062	0.065	0.073
2 차 항체	HRP 표지된 2 차 항체(염소 항-인간 IgG)			

[0147]

[0148] 실시예 7: 경쟁 ELISA에 의한 PDL1에 대하여 항원 PD1에 대한 항체의 결합 활성

[0149] PDL1에 대하여 항원 PD1에 대한 인간화된 항체 14C12H1L1 및 5C4의 결합 활성은 하기한 바대로 경쟁 ELISA에 의해 측정되었다:

[0151] 4°C에서 밤새 PD1-hFc와 항온처리한 후, 마이크로플레이트를 2시간 동안 1% BSA에 의해 차단하고, 상이한 농도(희석 강도에 대해 표 3 참조)를 갖는 항체 14C12H1L1 및 5C4를 PDL1-mFc와 10분 동안 혼합하고, 혼합물을 37°C에서 30분 동안 항온처리하고, 이후 각각 상응하는 항-인간 및 항-마우스 효소 표지된 2차 항체를 30분 동안 37°C에서 항온처리하고 첨가하였다. 마이크로플레이트 판독기에서 450nm의 파장에서의 흡광도를 판독하였다.

[0152] 항원 PD1에 대한 항체 14C12H1L1 및 5C4의 결합 결과는 도 6에 도시되어 있다. 도 6에서처럼, 항체 14C12H1L1은 PDL1에 대해 경쟁하고, 용량 의존성으로 효과적으로 PD1 단백질에 결합할 수 있다. 상이한 용량에서의 흡광도 강도는 표 3에 기재되어 있다. 흡광도 값의 정량적 분석을 이용한 곡선 모의를 통해, 14C12H1L1 및 5C4 결합 활성의 EC50은 이후 각각 1.322nM 및 1.199nM인 것으로 결정되었다.

표 3: PDL1에 대하여 PD1에 대한 14C12H1L1 및 5C4의 경쟁적 결합

항원 코팅	PD1-mFc 0.5 µg/ml			
항체 농도/희석 구배	14C12H1L1		5C4	
1.5 µg/ml	0.062	0.064	0.070	0.075
1:3	0.069	0.064	0.081	0.086
1:9	0.363	0.305	0.372	0.269
1:27	1.727	1.543	1.429	1.604
1:81	1.892	1.752	1.766	1.881
1:243	1.984	2.029	2.045	2.005
1:729	1.937	1.978	1.934	1.954
0	1.870	1.977	1.933	1.977
리간드	PDL1-mFc 0.3 µg/ml			
2차 항체	HRP 표지된 염소 항-마우스 2차 항체			

[0153]

#### 실시예 8: 유세포분석법에 의한 세포 표면 항원 PD1에 대한 항체의 결합 활성

[0155] PD1 항원을 발현하는 숙주 세포 293T를 작제하고, 본 발명에서 제조된 인간화된 항체 14C12H1L1에 의해 표지하였다(실시예 4 참조). 네이티브 구성에서 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 14C12H1L1의 능력을 분석하고, 유세포분석법에 의해 검증하였다.

[0156] 1. PD1 항원을 발현하는 숙주 세포 293T의 작제

[0157] 특정한 단계는 하기와 같다:

[0158] PD1 항원을 발현하는 숙주 세포 293T의 작제: 293T 세포를 LipofectaminTransfection Kit(Invitrogen Corporation으로부터 구입)의 매뉴얼에 따라 PD1 함유 벡터 pLenti6.3-PD1(벡터 pLenti6.3은 Invitrogen Corporation으로부터 구입함)에 의해 형질주입하여 스크리닝에 의해 PD1을 발현하는 293T-PD1의 안정한 폴을 얻었다.

[0159] 2. 293T-PD1 세포 표면 항원에 대한 항체의 결합

[0160] 항체 표지 및 유세포분석법: 상기 단계에 의해 얻은 293T-PD1을 트립신에 의해 분해하고, 각각  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 함유하는 관에 분포시켰다. PD1 항체를 50nM, 10nM, 5nM, 1nM, 0.1nM 및 0.01nM의 농도에서 PBS 완충제(1% BSA)를 사용하여 희석하고, 2시간 동안 PD1 발현 293T 세포에 의해 얼음에서 항온처리하였다. 100µl의 FITC 표지된 염소 항-인간 2차 항체(1:500)를 각각의 관에 첨가하고, 1시간 동안 얼음에서 항온처리하였다. PBS에 의해 3회 세척한 후, 세포를 300µl의 PBS 중에 재현탁시키고, FITC 채널을 사용하여 유세포분석기에서 형광 신호를 측정하였다.

[0161] 293T-PD1 세포에 대한 인간화된 항체 14C12H1L1의 결합 결과는 도 7에 도시되어 있다. 도 7에 도시된 것처럼, 항체 14C12H1L1은 용량 의존성으로 효과적으로 숙주 세포 293T-PD1의 표면에서 발현하는 표적 PD1 단백질에 결합할 수 있다. 상이한 용량에서의 형광 강도는 표 4에 기재되어 있다. 형광 강도의 정량적 분석을 이용한 곡선 모의를 통해, PD1과의 14C12H1L1 결합의 EC50은 이후 1.89nM인 것으로 결정되었다.

표 4: 유세포분석법에 의해 검출된 293T-PD1 표면 항원에 대한 14C12H1L1 결합의 형광 강도

농도(nM)	0.01	0.1	1	5	10	50
형광 강도	8.32	20.31	174.62	579.41	686.49	669.54

[0162]

#### 실시예 9: 유세포분석법에 의해 T 세포 표면 항원 PD1에 대한 항체의 결합 활성

[0164] PBMC를 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare 로트 171440-02호)에 의해 단리하고, 추가로 단리하여 CD4<sup>+</sup> 세포를

얻고, 세포를 PHA(Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 $\mu$ l/ml)에 의해 3일 동안 자극하고, 이후 PBS에 의해 1회 세척하고, 상이한 농도에서의 항체를 첨가하고, 1.5시간 동안 염음에서 항온처리하였다. 이후, 세포를 항온 처리 후 PBS에 의해 1회 세척하고, FITC 표지된 염소 항-인간 2차 항체(Jackson immunoresearch 로트 102155호)를 첨가하고, 1시간 동안 암소에서 염음에서 항온처리하고, PBS에 의해 1회 세척한 후, 유세포분석기에서 형광 신호를 측정하였다.

[0165] T 세포에 대한 인간화된 항체 14C12H1L1의 결합 결과는 도 8에 도시되어 있다. 분명히, 항체 14C12H1L1은 용량 의존성으로 효과적으로 T 세포 표면에서 PD1 단백질에 결합할 수 있다.

실시예 10: 혼합된 립프구 반응: 사이토카인 IFN- $\gamma$ , IL-2의 분비

[0167] PBMC를 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare 로트 171440-02호)에 의해 단리하고, 단리된 PBMC를 6일 동안 IL-4(Peprotech K2513, 1,000 U/ml) 및 GM-CSF(Peprotech H1513, 1,000U/ml)에 의해 유도하고, 이후 TNF- $\alpha$  (Peprotech G1513, 200U/ml)를 첨가하여 3일 동안 유도하여 DC 세포를 얻었다.

[0168] T 세포를 PBMC로부터 단리시키고, 10:1의 비율로 상기에서 얻은 DC 세포와 혼합하여서, 5일 내지 6일 동안 상이한 비율로 항체 14C12H1L1, 5C4 및 hIgG(아이소유형 대조군으로서 hIgG)와 함께 배양하였다. IFN- $\gamma$  및 IL-2의 분비를 각각 상응하는 ELISA 시약 키트(둘 다 Dakewe로부터 구입)에 의해 측정하였다.

[0169] DC 세포 및 T 세포의 혼합된 배양 후 IFN- $\gamma$  및 IL-2의 분비는 도 9 및 도 10에 도시되어 있다. 14C12H1L1 항체는 용량 의존성으로 IFN- $\gamma$  및 IL-2의 분비를 효과적으로 유도할 수 있다. 항체 14C12H1L1은 대조군 항체 5C4보다 IFN- $\gamma$  및 IL-2 둘 다의 더 높은 분비를 유도할 수 있다.

실시예 11: 유도된 IL-2 분비

[0171] 단리된 PBMC(실시예 10에서와 동일한 방법)를 3일 동안 PHA(Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 $\mu$ l/ml)에 의해 자극하고, 이후 성숙 PBMC( $5 \times 10^4$  개의 세포/웰)를 96웰 플레이트에서 Raji 세포(Chinese Academy of Sciences Shanghai Branch)( $5 \times 10^4$  개의 세포/웰) 및 MDA-MB-231 세포(ATCC)( $1 \times 10^4$  세포/웰)와 혼합하였다. 100nM의 14C12H1L1 또는 대조군 항체 5C4 또는 hIgG(아이소유형 대조군으로서 hIgG)를 첨가하고 혼합하고 3일 동안 함께 배양하였다. IL-2의 분비는 키트의 지시에 따라 ELISA 시약 키트(Dakewe로부터 구입)에 의해 검출되었다.

[0172] 혼합된 세포 배양 후 IL-2 분비의 결과는 도 11에 도시되어 있다. 도 11에 도시된 바대로, 항체는 IL-2를 분비시키도록 PBMC를 효과적으로 유도할 수 있고, 14C12H1L1에 의해 유도된 IL-2 분비는 대조군 항체 5C4의 것보다 상당히 더 높았다.

실시예 12: PD-1 HuGEMM 마우스에서의 MC38 종양 모델의 종양 성장에 대한 항체 14C12H1L1의 영향

[0174] MC38 종양 세포( $1 \times 10^6$  개의 세포/마우스)를 PD-1 HuGEMM 마우스(인간 PD-1 형질전환 마우스)의 오른쪽 측에서 피하로 접종하였다. 평균 종양 용적이 대략 118mm<sup>3</sup>에 도달할 때, 마우스를 각각의 군에서 8개의 마우스를 갖는 4개의 실험 군으로 무작위로 나눴다. 항체는 복부 투여를 통해 주어졌다. 특정한 그룹화 및 투약량은 하기와 같다:

[0175] 아이소유형 대조군(용량: 8mg/kg),

[0176] 14C12H1L1 고용량 군(용량: 8mg/kg),

[0177] 14C12H1L1 저용량 군(용량: 0.8mg/kg),

[0178] 니볼루맙 군(용량: 8mg/kg).

[0179] 상기 4개의 군은 전체 5 용량으로 주마다 2회 항체가 주사되었다. 주사 후, 종양 크기를 주마다 2회 측정하였다.

[0180] 결과는 도 12에 제시된다.

[0181] 결과는 하기를 나타낸다:

[0182] 니볼루맙, 14C12H1L1 고용량 및 14C12H1L1 저용량 군에서의 종양 크기는 아이소유형 대조군에서보다 통계학적으로 모두 유의미하게 더 작았다(각각,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). 14C12H1L1 고용량 군(8mg/kg)은 PD-1 HuGEMM 마우스에서 MC38 종양 모델에 대해 통계학적으로 유의미한 항종양 효과를 나타냈고, 니볼루맙인 동일한 표적에 대해 승인된 약물과 동등한 효율(8mg/kg)을 가졌다.

[0183] 당업자가 이해하는 것처럼, 본 발명의 구체적인 실시형태가 자세히 기재되어 있지만, 이 상세내용은 본 발명자들이 개시한 모든 교시내용에 따라 다양한 변형 및 치환을 발생시킬 수 있다. 이 변경은 본 발명의 범위에 의해 모두 포함된다. 본 발명의 완전한 범위는 첨부된 청구항 및 임의의 등가물에 의해 주어진다.

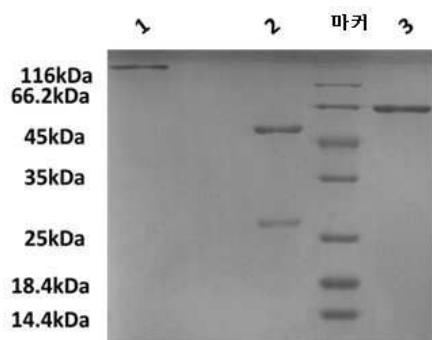
[0184] 기탁기관명 : 중국 통상 배양 수집 센터

[0185] 수탁번호 : CCTCCC2015105

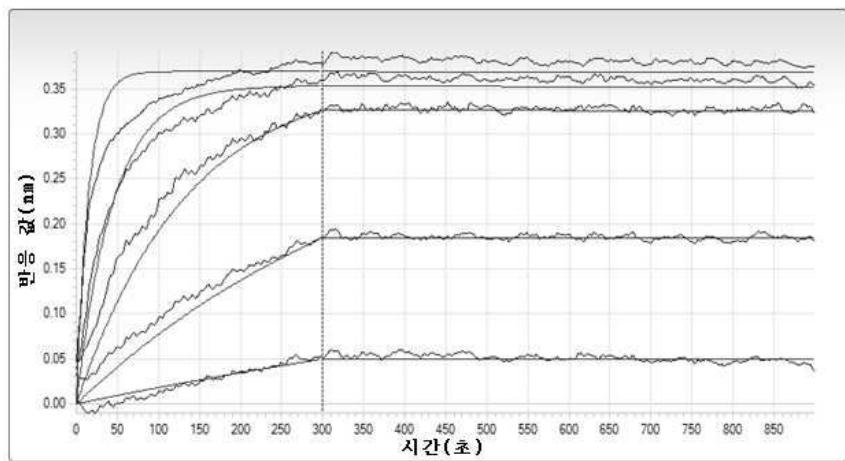
[0186] 수탁일자 : 20150616

## 도면

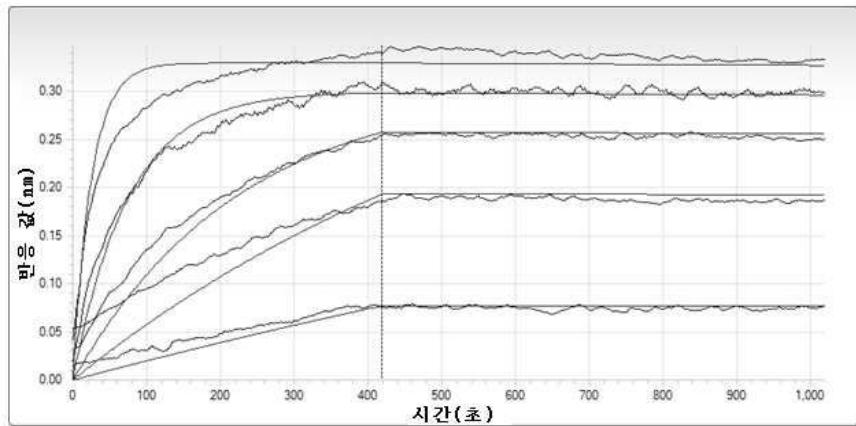
### 도면1



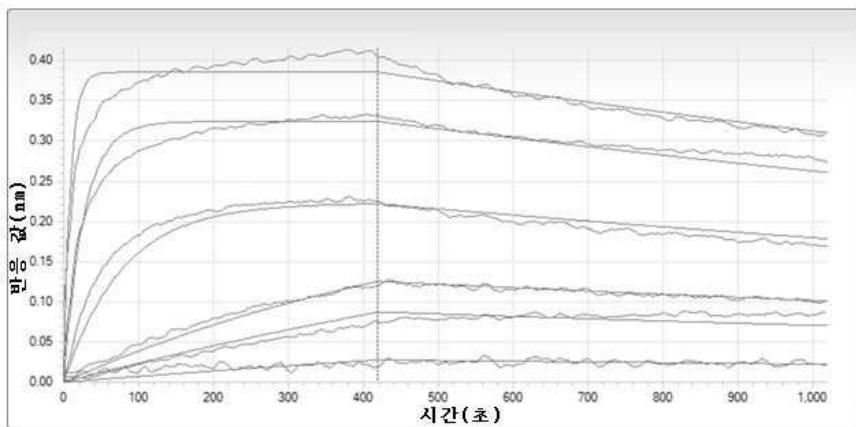
### 도면2



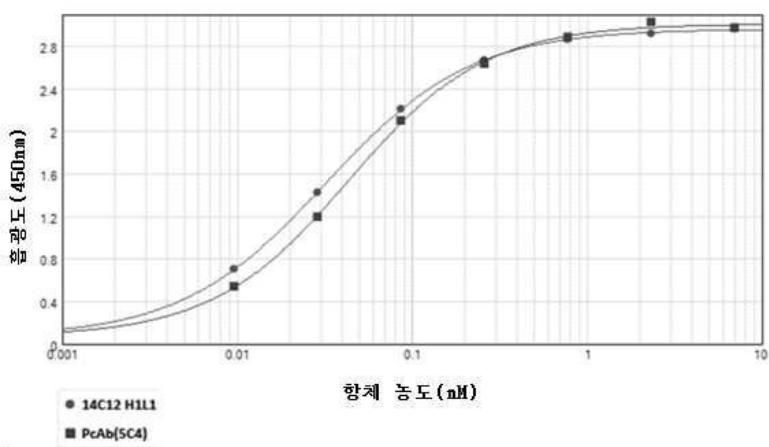
## 도면3



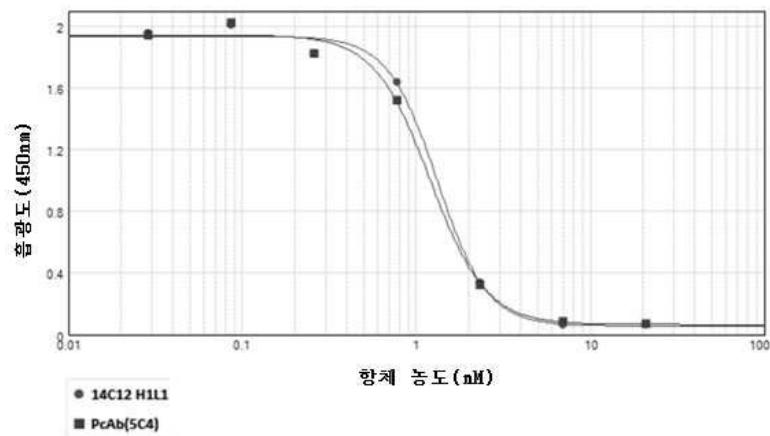
## 도면4



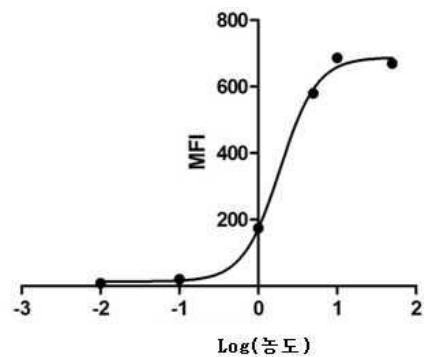
## 도면5



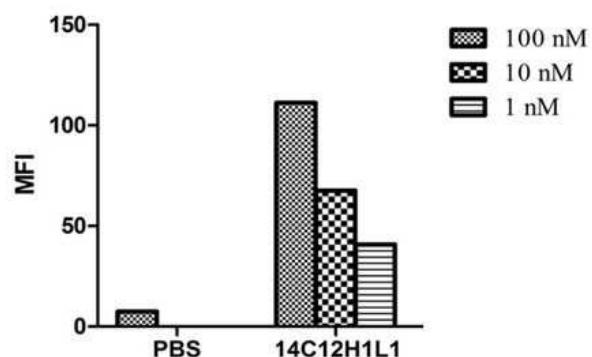
도면6



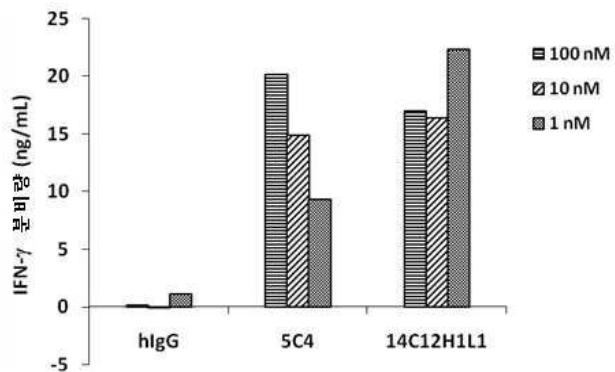
도면7



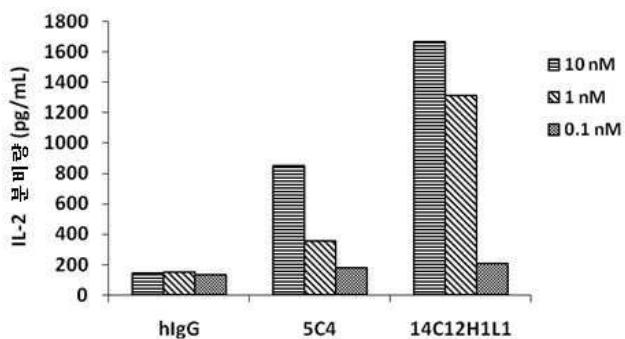
도면8



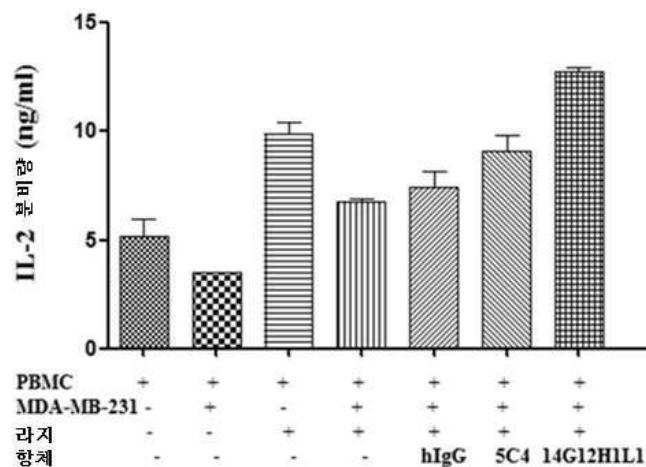
도면9



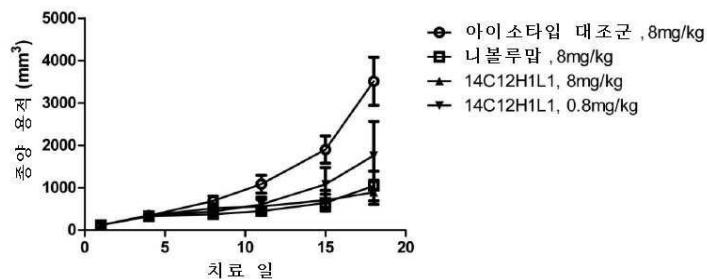
도면10



도면11



## 도면12



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; AKESO BIOPHARMA, INC

&lt;120&gt; ANTI-PD1 MONOClonAL ANTIBODY, PHARMACEUTICAL COMPOSITION THEREOF AND USE THEREOF

&lt;130&gt; WO/2018/036472

&lt;140&gt; PCT/CN2017/098465

&lt;141&gt; 2017-08-22

&lt;150&gt; CN 201610705763.5

&lt;151&gt; 2016-08-23

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn version 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Nucleotide sequence of monoclonal antibody 14C12 heavy chain variable region

&lt;400&gt; 1

gagggtcaaac tggtgagag cggcgccgg ctggtaaagc ccggcggtc actgaaactg 60

agctgcggccg ctccggctt cgccttagc tcctacgaca tgtcatgggt gaggcagacc 120

cctgagaagc gcctggaatg ggtcgctact atcagcgag gcggcgata cacctactat 180

cctgactctg tcaaaggag attcacaatt agtcggata acgccagaaa tactctgtat 240

ctgcagatgt ctagtctgctg gtccgaggat acagctctgt actattgtgc aaaccggcac 300

ggcgaagcat gggttgccta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtctc tgcc 354

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; The amino acid sequence of monoclonal antibody 14C12 heavy chain variable region

&lt;400&gt; 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&gt;&lt;223&gt; Nucleotide sequence of monoclonal antibody 14C12 light chain variable region

&lt;400&gt; 3

gacattaaga tgacacagtc cccttcctca atgtacgcta gcctggcgaa gcgagtgacc 60

ttcacatgca aagcatccca ggacatcaac acataacctgt ctgggttca gcagaagcca 120

ggcaaaagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaatagac tggtgacgg ggtccccagc 180

agattctccg gatctggcag tggcaggat tactccctga ccatcagctc cctggagtat 240

gaagacatgg gcatctacta ttgcctgcag tatgtgagt tccctctgac ctttggagca 300

ggcacaaaac tggaaactg 318

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; The amino acid sequence of monoclonal antibody 14C12 light chain variable region

&lt;400&gt; 4

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt;

DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Nucleotide sequence of monoclonal antibody 14C12H1L1 heavy chain variable region

&lt;400&gt; 5

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ctgggtgcagc ccggcggtc actgcgactg 60

agctgcgcag ctccggatt cgccttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccagggaaagg gactggattt ggtcgctact atctcaggag gccccggatata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaaagcat gtttgccta ttggggcag ggaacctgg tgacagtctc tagt 354

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; The amino acid sequence of monoclonal antibody 14C12H1L1 heavy chain variable region

&lt;400&gt; 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Asn Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Nucleotide sequence of monoclonal antibody 14C12H1L1 light chain variable region

&lt;400&gt; 7

gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtggcgaa cagggtcacc 60

ttcacatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctgggttca gcagaaggcca 120

gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaataagac tggtgtctgg agtcccaagt 180

cggttcagtg gtcagggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcc 240

gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgtatgagt tcccaactgac ctttggcgcc 300  
 gggacaaaac tggagctgaa g 321  
 <210> 8  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> The amino acid sequence of monoclonal antibody 14C12H1L1 light chain variable region  
 <400> 8  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105  
 <210> 9  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> HCDR  
 <400> 9  
 Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp  
 1 5  
 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR

<400> 10

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HCDR

<400> 11

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> LCDR

<400> 12

Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

1 5

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR

<400> 13

Arg Ala Asn

1

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> LCDR

<400> 14

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1

5