

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 2월 8일 (08.02.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/026248 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008494
- (22) 국제출원일: 2017년 8월 7일 (07.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0100210 2016년 8월 5일 (05.08.2016) KR  
10-2017-0099672 2017년 8월 7일 (07.08.2017) KR
- (71) 출원인: 주식회사 와이바이오로지스 (**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). 김수영 (**KIM, Soo Young**); 35235 대전시 서구 계룡로491번길 39 102-906, Daejeon (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). 이현경 (**LEE, Hyun Kyung**); 34021 대전시 유성구 배울2로 3 808-502, Daejeon (KR). 김혜난 (**KIM, Hye-Nan**); 34544 대전시 동구 계족로 479-12, Daejeon (KR). 윤진철 (**YOUN, Jin Chul**); 34008 대전시 유성구 봉산로 39 201-603, 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: 이치영 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, 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).

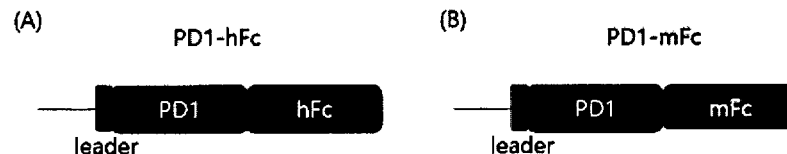
공개:

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

(54) Title: NOVEL ANTIBODY AGAINST PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN (PD-1), AND USE THEREOF

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

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to an antibody against human programmed cell death 1 (PD-1) or an antigen-binding fragment thereof, a nucleic acid for coding same, a vector comprising the nucleic acid, a recombinant microorganism transformed with the vector, a method for preparing the antibody or the antigen-binding fragment thereof, and a composition for cancer prevention or treatment comprising same. The novel PD-1-binding antibody or the antigen-binding fragment of thereof can bind to PD-1 and inhibit the activity thereof and is therefore useful for developing an immunotherapeutic agent for various diseases associated with PD-1.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 프로그램화된 세포 사멸 단백질(Human Programmed Cell Death 1; PD-1)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 PD-1에 결합하는 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-1에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로 PD-1과 연관된 다양한 질환의 면역 치료제의 개발에 유용하다.



WO 2018/026248 A1

## 명세서

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

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 인간 프로그램화된 세포 사멸 단백질(Human Programmed Cell Death 1; PD-1)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 현재 널리 사용되고 있는 1세대 화학항암제, 2세대 표적항암제의 경우 항암제의 독성으로 인한 부작용과 약물의 내성 위험이 높고 특정 유전자 변이가 있는 환자에게만 투여할 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 극복한 제3세대 항암제로 불리는 면역 항암제는 면역세포의 신호전달 경로에 작용하여 면역세포를 활성화시켜 암세포를 공격하여 치료효과를 낸다. 기존의 항암제와 달리 우리 몸의 면역체계를 이용하여 치료하는 방법으로 암을 포함한 다양한 질병에 적용할 수 있으며, 부작용 또한 기존 항암제보다 낮은 것으로 보고되고 있다.
- [4] PD-1 (CD279로도 명명됨)은 CD28/CTLA4 공동 자극/억제 수용체 패밀리 (co-stimulatory/inhibitory receptor family)와 관련된 55 KD의 수용체 단백질이다 (Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314).
- [5] PD-1을 코딩하는 유전자 및 cDNA를 클로닝하여 마우스 및 인간에서의 특징을 살펴본 바 있다 (Ishida et al., 1992 EMBO J 11:3887-3395; Shinohara et al., 1994 Genomics 23:704-706). 전장 PD-1은 288개의 아미노산 잔기 (NCBI accession number: NP\_005009)를 포함한다. 세포외 도메인은 1-167 아미노산 잔기로 구성되고, 세포질 C-말단 꼬리는 191-288 잔기를 포함하며, 이는 2개의 가설적 면역-조절 모티프인 면역수용체 티로신 기반 저해 모티프 (ITIM; Vivier et al., 1997 Immunol Today 18:286-291) 및 면역수용체 티로신 스위치 모티프 (ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173:945-954)를 포함한다.
- [6] 지금까지, 2개의 서열 관련 리간드 PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (B7-DC)는 PD-1과 특이적으로 상호작용하여 세포 내 신호전달을 유도하고, CD3 및 CD28 매개 T-세포 활성화를 저해하는 것으로 확인되었으며(Riley, 2009 Immunol Rev 229:114-125), 결국 T-세포 활성을 조절 예를 들어, 기타 성장 인자 및 사이토카인 분비 뿐 아니라, 세포성장, IL-2 및 IFN- $\gamma$  분비를 감소시키는 것이다.
- [7] PD-1의 발현은 T-세포, B-세포, 단핵세포 및 자연살해(NK) 세포와 같은

면역세포에서 빈번하게 확인되며, 기타 인간 조직, 예를 들어 근육, 상피, 신경 조직 등에서는 거의 발현되지 않는다. 또한, 고 수준의 PD-1 발현은 종종 면역세포의 활성화와 관련이 있다. 예를 들어, 인간 T-세포주인 Jurkat이 PHA (phytohaemagglutinin) 또는 포르볼 에스테르 (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 또는 TPA)에 의해 활성화되면, 웨스턴 블랏에서 보이는바와 같이 PD-1의 발현이 상향 조절되었다. 항-CD3 항체의 자극에 의해, 자극된 마우스 T- 및 B-림프구와 1차 인간 CD4+ T 세포에서 동일한 현상이 관찰되었다. PD-1 발현 증가에 의해 효과 T세포를 자극하고, 활성화된 효과 T세포를 고갈 및 감소된 면역활성 방향으로 다시 안내한다. 따라서, PD-1 매개 저해 신호는 면역 관용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.

- [8] 다양한 암에서 종양 침윤 림프구 (tumor-infiltrating lymphocytes: TILs)의 PD-1 발현 및 종양 세포의 PD-1 리간드 발현 증가가 보고되었고, 다른 유형의 조직 및 기관 예를 들어 폐, 간, 위, 신장, 유방, 난소, 췌장, 멜라노사이트 및 식도가 포함된다. 더욱 빈번하게, 이러한 암에서 PD-1 및 PD-L1의 발현은 환자 생존 결과에 대한 좋지 못한 예후와 연관된다. PD-1 유전자를 녹아웃하여 이종이식 (Xenograft) 암 세포 성장을 억제한 형질전환 마우스를 통해, 암 제거 또는 관용을 위한 면역 시스템 조절에서의 PD-1 신호전달에 대한 중요성을 더욱 자세히 설명하였다.
- [9] PD-1 신호전달의 상향 조절에 의해 면역 관용의 암 증식으로 이어질 뿐 아니라, 인간의 바이러스 감염 및 확장으로도 이어진다. 유행성 간염 바이러스 HBV 및 HCV는 간세포에서 PD-1 리간드의 과발현을 유도하고 효과 T세포에서 PD-1 신호전달을 활성화하여, 바이러스 감염에 대한 T-세포 고갈 및 관용을 야기한다. 마찬가지로, HIV 감염은 유사한 기작으로 인간 면역 시스템을 빈번하게 회피한다. 길항 분자에 의해 PD-1 신호전달을 치료적으로 조절하여 관용으로부터 면역세포를 회복할 수 있고, 재활성시켜 암 및 만성 바이러스 감염을 제거할 수 있다.
- [10] PD-1을 표적으로 하는 약물로는 단일 클론 항체인 니볼루맙 (Nivolumab), 펌브롤리주맙 (Pembrolizumab)이 있으며, 악성 흑색종과 비소세포폐암의 치료제로 사용되고 있으나 생산 단가가 높아 환자의 경제적 부담이 크다는 것과 치료 효능에 대한 정확한 검증이 필요한 것으로 보고되고 있다. 따라서 기존 약물이 가진 한계를 극복한 새로운 개념의 PD-1 표적 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- [11] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 출원의 발명자들은 PD-1에 특이적으로 결합하는 항암 치료용 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 파지 디스플레이 기술을 이용하여 PD-1에 높은 친화력으로 결합하는 항-PD-1 항체를 개발하고, 이러한 항-PD-1 항체가 PD-1/PD-L1의 복합체 형성을 현저히 저해시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[12]

## [13] 발명의 요약

[14] 본 발명의 목적은 PD-1에 대한 신규 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 재조합 미생물 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[18] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 31 내지 서열번호 56으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57 내지 서열번호 79로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 198 내지 서열번호 222로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 223 내지 서열번호 241로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 242 내지 서열번호 269로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[22] 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.

[23] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[24]

### 도면의 간단한 설명

[25] 도 1은 카복시-말단에 인간 Fc 또는 마우스 Fc를 융합시킨 PD-1 발현벡터의 모식도이다.

[26] 도 2는 PD-1 단백질 정제결과를 나타낸 것이다:

[27] 도 2a는 PD1-hFc의 10% SDS-PAGE gel. RE (reducing)과 NR (non-reducing)

- 조건에서의 단백질 확인 결과를 나타낸 것이다;
- [28] 도 2b는 G-3000 SWXL SEC-HPLC 결과를 나타낸 것이다. 유속은 1 ml/min이고 전개용매는 PBS이다;
- [29] 도 2c는 PD1-mFc의 10% SDS-PAGE gel. RE (reducing)과 NR (non-reducing) 조건에서의 단백질 확인 결과를 나타낸 것이다;
- [30] 도 2d는 G-3000 SWXL SEC-HPLC 결과를 나타낸 것이다. 유속은 1 ml/min이고 전개용매는 PBS이다.
- [31] 도 3은 패닝 횟수에 따른 PD-1에 대한 항체의 결합력을 나타낸 것이다.
- [32] 도 4는 PD1-His에 대한 모노 파아지의 결합능 측정을 위한 ELSIA 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 5는 PD-1 항체의 순도 확인을 위한 SDS-PAGE 분석결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 6은 PD-1 항체의 *in vitro* 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [35] 도 7은 PD-1 항체의 농도 의존적인 *in vitro* 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 8은 세포표면에 과발현된 인간 PD-1에 대해 농도 의존적으로 결합된 항체의 결합력을 MFI(mean fluorescence intensity)을 이용하여 나타낸 것이다.
- [37] 도 9는 PD1-hFc와 PD1-45D6, 49A2 간의 키네틱 (kinetics) 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [38] 도 10은 최적화 단일 클론을 선별한 결과를 나타낸 것이다.
- [39] 도 11은 모항체와의 발현을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 12는 본 발명에 따른 PD1 항체의 *in vitro* 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [41] 도 13은 본 발명에 따른 PD1 항체의 농도 의존적인 *in vitro* 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 14는 선별된 PD1 항체 변이체에 대한 단일 클론 항체의 세포 표면에 발현된 PD-1에 대한 결합을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 15는 선별된 PD1 항체 변이체에 대한 단일 클론 항체의 세포 표면에 발현된 PD-1에 대한 결합 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 16은 선별된 항체에서 효소면역흡착을 이용한 PD-1/PD-L1 혹은 PD-1/PD-L2 복합체의 형성을 막는 항체의 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 17은 PD1-hFc 단백질과 PD1-45D6, 49A2 및 49A2(2B9)간의 kinetics 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [46] 도 18은 PD1 변이체의 모식도를 나타낸 것이다.
- [47] 도 19는 선별된 파지 (phage)의 효소면역흡착을 통한 PD-1 변이체들에 대한 결합력을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 결합력이 낮을수록 낮은 값을 나타낸다.
- [48] 도 20은 선별된 항체의 효소면역흡착을 통한 PD-1 변이체들에 대한 결합력을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 21은 효소면역흡착을 통한 결합 특이성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 22는 HEK-293 세포에서의 임시 발현 생산성을 비교한 결과를 나타낸

것이다.

- [51] 도 23은 PD1 단일 클론 항체에 의해 이중 MLR (Mixed Lymphocyte Reaction)에서 활성 증가를 나타냄을 확인한 결과이다.

[52]

- [53] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [54] 달리 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 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [55] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 31 내지 서열번호 56으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57 내지 서열번호 79로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 198 내지 서열번호 222로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 223 내지 서열번호 241로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 242 내지 서열번호 269로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다.

- [56] 본 발명자들은 다양한 암에서 발현되는 것으로 알려진 PD-1에 결합하는 항암 치료용 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 PD-1에 높은 친화력으로 결합하는 항-PD-1 항체를 제조하고, 이러한 항-PD-1 항체가 PD-1의 활성을 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

- [57] 본 발명에서 “프로그래밍된 세포사멸 단백질 1 (programmed cell death 1, PD-1)”은 신호 전달 단백질로, T 세포의 활성화 및 기능을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 종양 미세 환경 내에서 T 세포의 PD-1과 암세포로부터 발현되는 리간드인 PD-L1의 결합은 PD-1 신호전달 경로를 활성화시켜 결과적으로는 T 세포의 불활성화를 유도하며, 이러한 현상은 악성 흑색종, 비소세포폐암, 신장 세포 암 등 다양한 암에서 발견되고 있다.

- [58] 본 명세서에서 사용된 용어, “항체(antibody)”는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항-PD-1 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 PD-1에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

- [59] 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( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.

- [60] 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 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다имер와 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 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [61] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv), Fab이거나, 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), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [62] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 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 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [63] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 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.
- [64] 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.

- [65] 상기 "인간화" 형태의 비-인간 (예: 무린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [66] 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.
- [67] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 중으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 중으로부터 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.
- [68] 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. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [69] "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.
- [70] 본 발명에 있어, 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,
- [71] 서열번호 31 내지 서열번호 56으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및
- [72] 서열번호 57 내지 서열번호 79로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [73] 서열번호 198 내지 서열번호 222로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,
- [74] 서열번호 223 내지 서열번호 241로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및
- [75] 서열번호 242 내지 서열번호 269로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [76] 구체적으로, 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [77] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄

- CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [78] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 59의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [79] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 60의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [80] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 61의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [81] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 62의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [82] 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 34의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 63의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [83] 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 35의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 64의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [84] 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 36의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 65의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [85] 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 37의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 66의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [86] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 67의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [87] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 38의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 68의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [88] 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 39의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 69의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [89] 서열번호 9의 중쇄 CDR1, 서열번호 40의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 70의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [90] 서열번호 10의 중쇄 CDR1, 서열번호 41의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 71의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [91] 서열번호 11의 중쇄 CDR1, 서열번호 42의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 72의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [92] 서열번호 12의 중쇄 CDR1, 서열번호 43의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 73의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [93] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 44의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 74의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [94] 서열번호 14의 중쇄 CDR1, 서열번호 45의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 75의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [95] 서열번호 15의 중쇄 CDR1, 서열번호 46의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 76의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [96] 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 47의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 77의 중쇄

- CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [97] 서열번호 16의 중쇄 CDR1, 서열번호 48의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 78의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [98] 서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [99] 서열번호 18의 중쇄 CDR1, 서열번호 50의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [100] 서열번호 19의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [101] 서열번호 20의 중쇄 CDR1, 서열번호 52의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [102] 서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [103] 서열번호 22의 중쇄 CDR1, 서열번호 53의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [104] 서열번호 23의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [105] 서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 54의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [106] 서열번호 24의 중쇄 CDR1, 서열번호 55의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [107] 서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [108] 서열번호 25의 중쇄 CDR1, 서열번호 56의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [109] 서열번호 26의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [110] 서열번호 27의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [111] 서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [112] 서열번호 29의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [113] 서열번호 30의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,
- [114] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 79의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 또는
- [115] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄

CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- [116] 또한, 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 198의 경쇄 CDR1, 서열번호 223의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 242의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [117] 서열번호 199의 경쇄 CDR1, 서열번호 224의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 243의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [118] 서열번호 200의 경쇄 CDR1, 서열번호 225의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 244의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [119] 서열번호 201의 경쇄 CDR1, 서열번호 226의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 245의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [120] 서열번호 202의 경쇄 CDR1, 서열번호 227의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 246의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [121] 서열번호 203의 경쇄 CDR1, 서열번호 228의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 247의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [122] 서열번호 204의 경쇄 CDR1, 서열번호 229의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 248의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [123] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [124] 서열번호 206의 경쇄 CDR1, 서열번호 231의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 250의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [125] 서열번호 207의 경쇄 CDR1, 서열번호 232의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 251의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [126] 서열번호 208의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [127] 서열번호 209의 경쇄 CDR1, 서열번호 233의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 253의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [128] 서열번호 210의 경쇄 CDR1, 서열번호 234의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 254의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [129] 서열번호 211의 경쇄 CDR1, 서열번호 235의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 255의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [130] 서열번호 212의 경쇄 CDR1, 서열번호 236의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 256의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [131] 서열번호 213의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 257의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [132] 서열번호 214의 경쇄 CDR1, 서열번호 237의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 258의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [133] 서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

- [134] 서열번호 211의 경쇄 CDR1, 서열번호 238의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 259의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [135] 서열번호 216의 경쇄 CDR1, 서열번호 238의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 260의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [136] 서열번호 217의 경쇄 CDR1, 서열번호 239의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 261의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [137] 서열번호 218의 경쇄 CDR1, 서열번호 240의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 262의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [138] 서열번호 219의 경쇄 CDR1, 서열번호 241의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 263의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [139] 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [140] 서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [141] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 264의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [142] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 265의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [143] 서열번호 221의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 266의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [144] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [145] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [146] 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 257의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [147] 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [148] 서열번호 222의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 268의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는
- [149] 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 269의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [150] 구체적으로, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합단편은 다음의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다:
- [151] 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 62의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 201의 경쇄 CDR1, 서열번호 226의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 245의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [152] 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 34의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 63의 중쇄

- CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 202의 경쇄 CDR1, 서열번호 227의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 246의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [153] 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 35의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 64의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 203의 경쇄 CDR1, 서열번호 228의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 247의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [154] 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 36의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 65의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 204의 경쇄 CDR1, 서열번호 229의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 248의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [155] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [156] 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 37의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 66의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 206의 경쇄 CDR1, 서열번호 231의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 250의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [157] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 67의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 207의 경쇄 CDR1, 서열번호 232의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 251의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [158] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 208의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [159] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 38의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 68의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 209의 경쇄 CDR1, 서열번호 233의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 253의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [160] 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 39의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 69의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 210의 경쇄 CDR1, 서열번호 234의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 254의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [161] 서열번호 11의 중쇄 CDR1, 서열번호 42의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 72의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 213의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 257의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [162] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [163] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 44의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 74의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 211의 경쇄 CDR1, 서열번호 238의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 259의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [164] 서열번호 15의 중쇄 CDR1, 서열번호 46의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 76의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 217의 경쇄 CDR1, 서열번호 239의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 336의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는

- [165] 서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 47의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 77의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 218의 경쇄 CDR1, 서열번호 240의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 337의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [166] 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:
- [167] 서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
- [168] 서열번호 18의 중쇄 CDR1, 서열번호 50의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역
- [169] 서열번호 19의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 218의 경쇄 CDR1, 서열번호 240의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 337의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역
- [170] 서열번호 20의 중쇄 CDR1, 서열번호 52의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 264의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역
- [171] 서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 265의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역
- [172] 서열번호 22의 중쇄 CDR1, 서열번호 53의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 221의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 266의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [173] 서열번호 23의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [174] 서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 54의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [175] 서열번호 24의 중쇄 CDR1, 서열번호 55의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [176] 서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [177] 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 221의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의

- [illegible]

- CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는
- [191] 서열번호 30의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [192] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [193] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 80 내지 서열번호 95로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR1,
- [194] 서열번호 96 내지 서열번호 113으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR2,
- [195] 서열번호 114 내지 서열번호 134로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR3, 또는
- [196] 서열번호 135 내지 서열번호 145로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR4를 포함할 수 있다.
- [197] 또한, 서열번호 270 내지 서열번호 294로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR1,
- [198] 서열번호 295 내지 서열번호 315로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR2,
- [199] 서열번호 316 내지 서열번호 355로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR3, 또는
- [200] 서열번호 356 내지 서열번호 367로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR4를 포함할 수 있다.
- [201] "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.
- [202] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [203] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [204] PD-1 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로, PD-1 항체의 결합 친화성은 10<sup>-5</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M 범위 내에 있다. 예를 들어, PD-1 항체의 결합 친화성은 10<sup>-6</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-7</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-8</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-9</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-5</sup>M 내지 10<sup>-11</sup>M, 10<sup>-6</sup>M 내지 10<sup>-11</sup>M, 10<sup>-7</sup>M 내지 10<sup>-11</sup>M

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.

- [205] 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 146 내지 서열번호 193으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 146 내지 서열번호 193으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 163, 165, 166, 168, 169, 또는 171 내지 188의 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [206] 또한, 서열번호 368 내지 서열번호 420으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 368 내지 서열번호 420으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 371 내지 380, 383, 385, 386, 388, 389, 또는 391 내지 415의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [207] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 서열번호 151의 중쇄 가변영역 및 서열번호 371의 경쇄 가변영역;
- [208] 서열번호 152의 중쇄 가변영역 및 서열번호 372의 경쇄 가변영역;
- [209] 서열번호 153의 중쇄 가변영역 및 서열번호 373의 경쇄 가변영역;
- [210] 서열번호 154의 중쇄 가변영역 및 서열번호 374의 경쇄 가변영역;
- [211] 서열번호 155의 중쇄 가변영역 및 서열번호 375의 경쇄 가변영역;
- [212] 서열번호 156의 중쇄 가변영역 및 서열번호 376의 경쇄 가변영역;
- [213] 서열번호 157의 중쇄 가변영역 및 서열번호 377의 경쇄 가변영역;
- [214] 서열번호 158의 중쇄 가변영역 및 서열번호 378의 경쇄 가변영역;
- [215] 서열번호 159의 중쇄 가변영역 및 서열번호 379의 경쇄 가변영역;
- [216] 서열번호 160의 중쇄 가변영역 및 서열번호 380의 경쇄 가변영역;
- [217] 서열번호 163의 중쇄 가변영역 및 서열번호 383의 경쇄 가변영역;
- [218] 서열번호 165의 중쇄 가변영역 및 서열번호 385의 경쇄 가변영역;
- [219] 서열번호 166의 중쇄 가변영역 및 서열번호 386의 경쇄 가변영역;
- [220] 서열번호 168의 중쇄 가변영역 및 서열번호 388의 경쇄 가변영역;
- [221] 서열번호 169의 중쇄 가변영역 및 서열번호 389의 경쇄 가변영역;
- [222] 서열번호 171의 중쇄 가변영역 및 서열번호 391의 경쇄 가변영역;
- [223] 서열번호 172의 중쇄 가변영역 및 서열번호 392의 경쇄 가변영역;
- [224] 서열번호 173의 중쇄 가변영역 및 서열번호 393의 경쇄 가변영역;
- [225] 서열번호 174의 중쇄 가변영역 및 서열번호 394의 경쇄 가변영역;

- [226] 서열번호 175의 중쇄 가변영역 및 서열번호 395의 경쇄 가변영역;
- [227] 서열번호 176의 중쇄 가변영역 및 서열번호 396의 경쇄 가변영역;
- [228] 서열번호 177의 중쇄 가변영역 및 서열번호 397의 경쇄 가변영역;
- [229] 서열번호 178의 중쇄 가변영역 및 서열번호 398의 경쇄 가변영역;
- [230] 서열번호 179의 중쇄 가변영역 및 서열번호 399의 경쇄 가변영역;
- [231] 서열번호 180의 중쇄 가변영역 및 서열번호 400의 경쇄 가변영역;
- [232] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 401의 경쇄 가변영역;
- [233] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 402의 경쇄 가변영역;
- [234] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 403의 경쇄 가변영역;
- [235] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 404의 경쇄 가변영역;
- [236] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 405의 경쇄 가변영역;
- [237] 서열번호 182의 중쇄 가변영역 및 서열번호 406의 경쇄 가변영역;
- [238] 서열번호 182의 중쇄 가변영역 및 서열번호 407의 경쇄 가변영역;
- [239] 서열번호 182의 중쇄 가변영역 및 서열번호 408의 경쇄 가변영역;
- [240] 서열번호 182의 중쇄 가변영역 및 서열번호 409의 경쇄 가변영역;
- [241] 서열번호 183의 중쇄 가변영역 및 서열번호 410의 경쇄 가변영역;
- [242] 서열번호 184의 중쇄 가변영역 및 서열번호 411의 경쇄 가변영역;
- [243] 서열번호 185의 중쇄 가변영역 및 서열번호 412의 경쇄 가변영역;
- [244] 서열번호 186의 중쇄 가변영역 및 서열번호 413의 경쇄 가변영역;
- [245] 서열번호 187의 중쇄 가변영역 및 서열번호 414의 경쇄 가변영역; 또는
- [246] 서열번호 188의 중쇄 가변영역 및 서열번호 415의 경쇄 가변영역.
- [247] 구체적 실시예에서, 서열번호 155의 중쇄 가변영역 및 서열번호 375의 경쇄 가변영역;
- [248] 서열번호 158의 중쇄 가변영역 및 서열번호 378의 경쇄 가변영역;
- [249] 서열번호 165의 중쇄 가변영역 및 서열번호 385의 경쇄 가변영역;
- [250] 서열번호 171의 중쇄 가변영역 및 서열번호 391의 경쇄 가변영역;
- [251] 서열번호 175의 중쇄 가변영역 및 서열번호 395의 경쇄 가변영역;
- [252] 서열번호 176의 중쇄 가변영역 및 서열번호 396의 경쇄 가변영역;
- [253] 서열번호 178의 중쇄 가변영역 및 서열번호 398의 경쇄 가변영역;
- [254] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 401의 경쇄 가변영역; 또는
- [255] 서열번호 181의 중쇄 가변영역 및 서열번호 405의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [256] 본 발명에 따른 서열에서 X 또는 Xaa로 표시된 부분은 특정되지 않은 기타 아미노산을 표시하며, 임의의 아미노산이 포함될 수 있음을 나타낸다.
- [257] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질을로서 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. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.

- [258] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드 (예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고친화성으로 결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.
- [259] 섬유상 파지 표면상에서의 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 수많은 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.
- [260] 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 수개월의 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.
- [261] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리 (repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [262] 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.

- [263] 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 형태면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [264] 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.
- [265] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 PD-1을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-PD-1 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [266] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [267] 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.
- [268] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기

변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

- [269] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 핵산은 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [270] 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.
- [271] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 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.
- [272] 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 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [273] "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.
- [274] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL<sub>λ</sub> 프로모터, pR<sub>λ</sub> 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 인간 헤로글로빈

프로모터 및 인간 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아테노바이러스 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.

- [275] 경우에 따라서는, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [276] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [277] 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.
- [278] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [279] 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.
- [280] 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.
- [281] 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 명백한 것이다.
- [282] 본 발명에서 용어 “형질전환”이란, 표적 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는

백터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 핵산이 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질 전환된 핵산은 숙주 세포 내에 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 핵산은 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 핵산은 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 핵산은, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (Expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 핵산에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 핵산은 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

- [283] 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.
- [284] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [285] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 PD-1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 PD-1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [286] 본 발명에 있어서, 상기 암은 흑색종, 폐암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장암, 위암, 유방암, 전이암, 호지킨 림프종, 전립선암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [287] 본 발명에서 용어 "치료"란 조성물의 투여로 암이나 그로부터 야기된 하나 또는 그 이상의 증상을 억제하거나 완화하는 것뿐만 아니라 질환의 증상을 반전시키는 암의 치료 또는 암의 진행을 방지하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 암의 예방 또는 치료는 본 발명에서 확보한 항체가 PD-1과 결합하여 이루어지는 것으로, PD-1에 결합하여 그의 활성을 유의하게 억제하여 암을 예방 또는 치료하는 것이다.
- [288] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고

투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[289] 본 발명의 상기 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입 (inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

[290] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[291] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[292] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[293] 본 발명에서 용어, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의

약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

- [294] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 암 예방 또는 치료용 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 암의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.
- [295] 또한, 본 발명의 치료 방법은 PD-1의 과도한 활성화로 인하여 종양 발달과 신생혈관생성 등의 질병이 발생할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [296] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물이다. 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 PD-1 항체를 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 암을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [297] 본 발명에 따른 PD-1에 대한 항체를 통해 샘플에서의 PD-1 발현 수준을 측정함으로써 암을 진단할 수 있다. 발현 수준은 통상적인 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있으며, 상기 PD-1에 대한 항체를 이용한 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [298] 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.
- [299] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 키트는 본 발명에 따른 PD-1에 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, 루시퍼라아제

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 chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌 (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 (phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[300] 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.

[301] 암 진단을 위해 사용되는 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이를 통해 PD-1 발현을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있다.

[302]

[303] 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.

[304]

[305] 실시예 1: PD-1 항원 발현 및 정제

[306] 1. PD-L1 단백질 발현 벡터 제작

[307] PD-1의 클로닝은 Jurkat 세포 cDNA 라이브러리 (Stratagene, 미국)를 이용하여, 세포의 도메인만을 얻기 위해 5'과 3'에 제한효소 *Sfi*I 사이트가 포함된 PD1에 대한 프라이머 (표 1)를 이용하여 증합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 N293F 벡터를 이용하여 카복시-말단에 인간 Fc (서열번호 196), 마우스 Fc (서열번호 197)를 융합시켜 제작하였다 (도 1).

[308]

[309] [표1]

| 명칭    | 5'→3' 서열                | 서열번호 |
|-------|-------------------------|------|
| PD1-F | ccaggatggttcttagactcccc | 194  |
| PD1-R | caccaggggttgaactggc     | 195  |

[310]

[311] 2. PD-1 항원의 발현 및 정제

[312] 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  $\mu$ g을 넣어 섞어준 후, 추가로 2 mg/ml PEI (Polyethylenimine) (polyplUSA-형질감염, USA) 50  $\mu$ l을 넣어 다시 한 번 섞어 주었다. 폴리플렉스 반응액은 15분 동안 상온에서 반응시킨 후,  $1 \times 10^6$  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 제조합 단백질 A 아가로스 레진과 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다.

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

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

[315] 그 결과, 도 2a 내지 도 2d에 나타난 바와 같이, 정제된 PD1 단백질의 순도는 95% 이상의 순도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[316]

[317] 실시예 2: PD-1 인간항체의 선별

[318] 1. 항원준비

[319] 실시예 1에서 제작한 PD1-hFc, PD1-mFc 및 Sino Biological Inc.에서 구입한 PD1-his (Catalog Number, 10377-H08H) 단백질을 항원 50 $\mu$ g을 면역 흡착(immunosorb) 튜브에 코팅한 후 블로킹 (blocking)을 수행하였다.

[320]

[321] 2. 바이오패닝

[322] 인간항체 라이브러리 파아지는  $2.7 \times 10^{10}$ 의 다양성을 가진 인간 scFv 라이브러리를 박테리아에 감염 시킨 후 박테리아를 30°C에 16시간 동안 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.

[323] 용출된 파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝과정을 통해 양성 파아지의 풀(pool)을 얻고, 첫 번째 라운드의 패닝에서 증폭된 파아지를 가지고 PBST 워싱 단계에서 횟수만 늘리고, 나머지는 동일한 방법으로 2라운드와 3라운드 패닝을 수행하였다.

[324] 그 결과 표 2에 나타난 바와 같이 3라운드 패닝에서 항원에 결합한 파아지 수가 유입(input) 대비 결합(output)이 다소 증가하였음을 확인하였다.

[325]

[326] [표2]

| 패닝횟수 | 파지의 유입수              | 파지의 결합수           |
|------|----------------------|-------------------|
| 1회   | $2 \times 10^{13}$   | $3.6 \times 10^7$ |
| 2회   | $1.2 \times 10^{13}$ | $7 \times 10^7$   |
| 3회   | $2 \times 10^{13}$   | $2 \times 10^9$   |

[327]

[328] 3. 폴리 파아지 ELISA

[329] 실시예 2의 각 라운드의 패닝 과정을 통해 수득한 양성 폴리 scFv-파아지 항체 풀에 대한 항원과의 특이성을 알아보기 위해 폴리 파아지 ELISA(enzyme linked immunoassay)를 수행하였다.

[330] 각 1차부터 3차까지 패닝하여 얼려두었던 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 튜브로 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% 스킴 밀크(skim milk)를 사용하여 각 웰을 블로킹(blocking)하였다.

[331] 각 웰 마다 PBS/T 0.2 ml 사용하여 씻어준 다음 1차~3차 패닝 폴리 scFv-파지를 각 웰에 100  $\mu$ l씩 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.

[332] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 따르면, 항원에 대한 결합능이 두 가지 PD1 항원에 대해 3차 폴리 scFv-파지에서 증강(enrichment) 됨을 ELISA로 확인하였다.

[333]

[334] 4. 양성 파아지 선별

[335] 결합능이 큰 다클론 파아지 항체군 (3차 패닝)에서 얻은 콜로니를 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 배양 하였다. M1 헬퍼 파지를 MOI값이 1:20 되도록 감염하여 2xYTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양 하였다.

[336] 96웰 면역 플레이트에 항원 PD1을 웰당 100 ng씩을 4°C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킵 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/T를 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.

[337] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 각 항원에 대한 결합능이 강한 단일 파아지 클론들은 PD1에 대해 총 수 십개의 단일 파아지 클론을 얻었다.

[338]

[339] 5. 양성 파아지 항체의 염기서열 분석

[340] 상기 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 이용하여 DNA-prep을 수행하여 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠트). 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 15종의 PD1에 특이적인 파아지 항체를 얻었고 이는 하기 표 3에 정리하여 제시하였다.

[341]

[342] [표3]

PD1 단일 클론의 특성

| 클론명           | VH     | 유사성    | VL    | 유사성    | 그룹 |
|---------------|--------|--------|-------|--------|----|
| Nivolumab     | VH3-33 | 91.80% | L6    | 98.90% |    |
| Pembrolizumab | VH1-2  | 79.60% | L25   | 80.80% |    |
| PD1-29A2      | VH3-9  | 91.80% | V2-17 | 86.50% | 1  |
| PD1-29H3      | VH3-9  | 90.80% | V1-11 | 88.50% | 2  |
| PD1-31F3      | VH1-69 | 92.90% | V1-13 | 93.90% | 3  |
| PD1-32A6      | VH1-69 | 87.80% | L5    | 91.60% | 4  |
| PD1-41C9      | VH3-30 | 95.80% | O1    | 92.10% | 5  |
| PD1-42G4      | VH3-11 | 93.80% | O2    | 93.80% | 6  |
| PD1-44B5      | VH3-30 | 99.00% | V1-16 | 85.60% | 7  |
| PD1-45D6      | VH3-30 | 95.80% | O1    | 93.10% | 8  |
| PD1-45F1      | VH1-46 | 91.80% | V2-13 | 93.80% | 9  |
| PD1-45F4      | VH3-9  | 90.80% | V2-1  | 77.70% | 10 |
| PD1-48A9      | VH1-69 | 79.60% | O1    | 96.00% | 11 |
| PD1-49B9      | VH3-9  | 88.70% | V1-2  | 93.90% | 12 |
| PD1-49A2      | VH3-30 | 97.90% | O1    | 93.10% | 13 |
| PD1-51D9      | VH1-3  | 82.70% | A3    | 94.00% | 14 |
| PD1-52E8      | VH3-9  | 91.80% | V2-17 | 90.50% | 15 |

[343]

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

[345]

[346] [표4]

PD1 클론의 중쇄 가변영역

| NAME      | FR1                               | CDR<br>1         | FR2                       | CDR<br>2         | FR3                                            | CDR3                  | FR4                 |
|-----------|-----------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| PD1-45D6  | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQV<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | VPITTFEY              | WGQG<br>SQVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 96                        | 31               | 114                                            | 57                    | 135                 |
| PD1-49A2  | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDN<br>PKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | TTTTTFDS              | WGRG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 115                                            | 58                    | 136                 |
| PD1-27A12 | QVQLVESG<br>GGLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>NDY<br>A | MHWVRQV<br>PGKGLEWV<br>SG | ISW<br>NSG<br>RI | VYADSMKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRAEDTA<br>VYYC | ARSQQQILD<br>Y        | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 81                                | 2                | 98                        | 33               | 116                                            | 59                    | 137                 |
| PD1-27B1  | QVQLVESG<br>GGLVKPGG<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>NDY<br>A | MHWVRQV<br>PGKGLEWV<br>SG | ISW<br>NSG<br>RI | VYADSMKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRAEDTA<br>VYYC | ARSIRQILDY            | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 82                                | 2                | 98                        | 33               | 116                                            | 60                    | 137                 |
| PD1-28D12 | QVQLVESG<br>GGLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>NDY<br>A | MHWVRQV<br>PGKGLEWV<br>SG | ISW<br>NSG<br>RI | VYADSMKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRAEDTA<br>VYYC | ARSLPXSR<br>SLDV      | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 81                                | 2                | 98                        | 33               | 116                                            | 61                    | 137                 |
| PD1-29A2  | QVQLVESG<br>GGLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>NDY<br>A | MHWVRQV<br>PGKGLEWV<br>SG | ISW<br>NSG<br>RI | VYADSMKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRAEDTA<br>VYYC | ARAXTSPLD<br>MSLDY    | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 81                                | 2                | 98                        | 33               | 116                                            | 62                    | 137                 |
| PD1-29H3  | QMQLVESG<br>GNLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>DDY<br>G | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>SS | ISW<br>NSG<br>TI | GYADSVKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRSEDTAV<br>YYC | ARLLHQMN<br>EHEFMDV   | WGQG<br>TTVTV<br>SS |
| 서열번호      | 83                                | 3                | 99                        | 34               | 117                                            | 63                    | 138                 |
| PD1-31F3  | QVQLVQSG<br>AEVKKPGSS<br>VKVSKAS  | GGT<br>FSSY<br>A | ISWVRQAP<br>GQGLEWM<br>GG | IIPLF<br>STA     | HSAQKFQGRVTITADESS<br>STAYMELSSLRSEDTAV<br>YC  | AKHKGLPFD<br>WSPDGFDT | WGQG<br>TMVTV<br>SS |
| 서열번호      | 84                                | 5                | 101                       | 36               | 119                                            | 65                    | 139                 |
| PD1-41C9  | QMQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRSEDTAV<br>YYC | TTTTTFDS              | WGQG<br>TLITVS<br>S |

[347]

|          |                                   |                  |                            |                  |                                                    |                            |                     |
|----------|-----------------------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| 서열번호     | 85                                | 1                | 97                         | 32               | 120                                                | 58                         | 140                 |
| PD1-42G4 | QVQLVESG<br>GGLVKPGG<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SDY<br>Y | MSWIRQAP<br>GKGLEWVS<br>D  | ISAS<br>GNSI     | YYADSVKRRFTISRDN<br>NSLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC       | VTSGPFGEF<br>RN            | WGLG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호     | 82                                | 6                | 102                        | 37               | 121                                                | 66                         | 141                 |
| PD1-44B5 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKLEWV<br>AV   | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDN<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC       | ARLMHTFSV<br>QYFLDV        | WGQG<br>TTVTV<br>SS |
| 서열번호     | 80                                | 1                | 97                         | 32               | 114                                                | 67                         | 138                 |
| PD1-45D6 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQV<br>PGKLEWV<br>AV   | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC       | VPTTFEY                    | WGQG<br>SQVTV<br>SS |
| 서열번호     | 80                                | 1                | 96                         | 31               | 114                                                | 57                         | 135                 |
| PD1-45F1 | QVQLVQSG<br>AEVKKPGA<br>SVKLSCAKS | GYT<br>FNS<br>YY | VIIWVRQA<br>PGQGLEW<br>MGI | INPS<br>DGS<br>A | TYAQKFQGRVTMTSDTS<br>TSSVYMELSSLRSED<br>TAV<br>YYC | ARDGNYYD<br>SRGYYDTF<br>DM | WGQG<br>TLITVS<br>S |
| 서열번호     | 86                                | 7                | 103                        | 38               | 122                                                | 68                         | 140                 |
| PD1-45F4 | QMQLVESG<br>GGLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>DDY<br>A | MHWVRQA<br>PGQGLEWV<br>SG  | ISW<br>NSN<br>NI | KYADSVKGRFTISRDN<br>NSLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC       | ARGALPLD<br>V              | WGQG<br>TPVTV<br>SS |
| 서열번호     | 87                                | 8                | 104                        | 39               | 123                                                | 69                         | 142                 |
| PD1-47B8 | QMQLVQSG<br>AEVKKPGA<br>SVKVSCKAS | GYT<br>FTSY<br>D | INWVRQAS<br>GQAPPEWM<br>GW | LHA<br>DSG<br>KT | GYAQTFQGRVTMTSDTS<br>DTAYLELSSLRSED<br>TAV<br>YC   | ARGTHWLD<br>S              | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호     | 88                                | 9                | 105                        | 40               | 124                                                | 70                         | 137                 |
| PD1-48A6 | QVQLVQSG<br>GGLIQPGGS<br>LRLSCAAS | GFT<br>VSR<br>NS | MNWVRQT<br>PGKGPEWV<br>SL  | IFSG<br>GTT<br>K | YKDSVKGRFTISRDN<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YCA        | AREEQFLIAL<br>AGRYFDY      | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호     | 89                                | 10               | 106                        | 41               | 125                                                | 71                         | 138                 |
| PD1-48A9 | QMQLVQSG<br>AEVKKPGSS<br>VKVSCKAS | GDT<br>FTR<br>YI | INWVRQAP<br>GQGLEWM<br>GR  | VIPT<br>LGL<br>T | TYAQNFQDTVTIADKST<br>NTAYMELKNLRSED<br>TAV<br>YYC  | ARGYGSGAF<br>DI            | WGQG<br>TMITV<br>SS |
| 서열번호     | 90                                | 11               | 107                        | 42               | 126                                                | 72                         | 143                 |
| PD1-48G6 | QMQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SHY<br>A | MHWVRQA<br>PGKLEWV<br>AV   | ISYD<br>GSKI     | YYADSVKGRFTVSRDN<br>KNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>VYYC     | ARIGYKDAF<br>DI            | WGQG<br>TMVTV<br>SS |

[348]

|           |                                   |                  |                           |                  |                                                |                        |                     |
|-----------|-----------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------------------------------------|------------------------|---------------------|
| 서열번호      | 85                                | 12               | 97                        | 43               | 127                                            | 73                     | 139                 |
| PD1-49A2  | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNPK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | TTTTFDS                | WGRG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 115                                            | 58                     | 136                 |
| PD1-49B9  | QMQLVESG<br>GGLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>EDY<br>A | MHWVRQP<br>PGKGLEWV<br>SS | ISW<br>NSH<br>NI | AYADSVKGRFTISRDNPK<br>NSLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | STSGLGVHA              | WGQG<br>TMVTV<br>SS |
| 서열번호      | 87                                | 13               | 108                       | 44               | 128                                            | 74                     | 139                 |
| PD1-51A6  | QVQLVESG<br>GGLVQPGG<br>SLRLSCAAS | GLSF<br>SSY<br>W | MTWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AN | IKQ<br>DGS<br>EK | YYVDSVKGRFTISRDNPK<br>NSLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | ARDSFGGHL<br>DL        | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 91                                | 14               | 109                       | 45               | 129                                            | 75                     | 137                 |
| PD1-51D9  | QVQLVESG<br>AEVKKPGA<br>SVKLSCKAS | GYT<br>FSSY<br>W | MHWVRQA<br>PGQRLEWM<br>GE | INPG<br>NGH<br>T | NYNEKFKSRVTITVDKSA<br>STAYMELSSLRSEDATVY<br>YC | AREGDGSY<br>WGYFDS     | WGQG<br>TPITVS<br>S |
| 서열번호      | 92                                | 15               | 110                       | 46               | 130                                            | 76                     | 144                 |
| PD1-52E8  | QVQLVQSG<br>GNLVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>DDY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>SG | ISW<br>NSG<br>TP | GYADSVQGRFTISRDNPK<br>NSLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | ARGHNYLDS<br>SYYDY     | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 93                                | 8                | 111                       | 47               | 131                                            | 77                     | 137                 |
| PD1-62E1  | QVQLVESG<br>GDLVKPGR<br>SLRLSCTGS | GFTF<br>GDH<br>P | LTWVRQIP<br>GKGLEWV<br>GF | IRSK<br>AYG<br>E | TTEYAASVKGRFTISRDD<br>SKSIAYLQMNSLRAEDTA<br>VY | ASVSYCSGG<br>SCYQGTFDY | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 94                                | 16               | 112                       | 48               | 132                                            | 78                     | 137                 |
| PD1-72D10 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNPK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | TTTTFDS                | WGQG<br>TLVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 114                                            | 58                     | 137                 |
| PD1-74A11 | QVQLVQSG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNPK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | ARTTFDY                | WGQG<br>TLITVS<br>S |
| 서열번호      | 95                                | 1                | 97                        | 32               | 114                                            | 79                     | 140                 |
| PD1-75C10 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNPK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYC | VPTTFEY                | WGQG<br>SQVTV<br>SS |

[349]

|           |                                   |                  |                           |                  |                                                   |          |                     |
|-----------|-----------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|---------------------------------------------------|----------|---------------------|
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 114                                               | 57       | 135                 |
| PD1-74A01 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNK<br>NTLYLQMNSLRSED<br>TAV<br>YYC | VPITTFEY | WGQG<br>SQVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 133                                               | 57       | 135                 |
| PD1-74H12 | QVQLVESG<br>GGVVQPGR<br>SLRLSCAAS | GFTF<br>SSY<br>A | MHWVRQA<br>PGKGLEWV<br>AV | ISYD<br>GSN<br>K | YYADSVKGRFTISRDNK<br>NMLYLEMNSLRAED<br>TAV<br>YYC | VPITTFEY | WGQG<br>SQVTV<br>SS |
| 서열번호      | 80                                | 1                | 97                        | 32               | 134                                               | 57       | 135                 |

[350]

[351] [표5]

## PD1 클론의 경쇄 가변영역

| NAME      | FR1                                | CDR1                 | FR2                       | CDR2 | FR3                                           | CDR3                | FR4            |
|-----------|------------------------------------|----------------------|---------------------------|------|-----------------------------------------------|---------------------|----------------|
| PD1-27A12 | DIQMTQSPSSV<br>SASVGDRTTIT<br>CRAS | RDISRW               | LAWYQQKP<br>GEAPKLLIY     | GAS  | SLRSGVSSRFSGSGS<br>GTDFTLTISLQPEDF<br>ATYFC   | QQGKS<br>FPYT       | FGQGT<br>KVDIK |
| 서열번호      | 270                                | 198                  | 295                       | 223  | 316                                           | 242                 | 356            |
| PD1-27B1  | DIVMTQTPLSS<br>PVTLGQPASIS<br>CRSS | QSLVH                | LNWFHQRP<br>GQPPRLLIH     | KIS  | NRVSGVPDRFSGSGS<br>AGTDFTLKISRVEAE<br>DVGYYC  | MQSTQ<br>FPYT       | FGQGT<br>KVDIK |
| 서열번호      | 271                                | 199                  | 296                       | 224  | 317                                           | 243                 | 356            |
| PD1-28D12 | DIQMTQSPSSV<br>SASLGDRVTIT<br>CRAS | QAISNW               | LTWYQQKP<br>GKAPKLLIY     | ATS  | SLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISLQPEDV<br>ATYYC   | QQTDSF<br>PLT       | FGGGT<br>KVDIK |
| 서열번호      | 272                                | 200                  | 297                       | 225  | 318                                           | 244                 | 357            |
| PD1-29A2  | SYELTQSPSVS<br>MSPGQTARITC<br>SGD  | ALSKQ<br>Y           | ASWYQLKP<br>GQAPVVVM<br>Y | KDT  | ERPSGIPDRFSGSSSG<br>TTVTLTISGVQAEDG<br>ADYYC  | QSTIDK<br>SGTDVI    | FGGGT<br>KLTVL |
| 서열번호      | 273                                | 201                  | 298                       | 226  | 319                                           | 245                 | 358            |
| PD1-29H3  | QLVLTQPSMS<br>EAPGQRVTISC<br>SGG   | TSNIGT<br>NA         | VNWWYQPP<br>GKAPILLIY     | YDD  | RLTSGVSDRFSGSKS<br>GTSASLAISRLQSED<br>EADYYC  | AAWDD<br>SLNGW<br>V | FGGGT<br>KLTVL |
| 서열번호      | 274                                | 202                  | 299                       | 227  | 320                                           | 246                 | 358            |
| PD1-31F3  | QFVLTQPPSVS<br>GAPGQRVTISC<br>TGS  | SSNIGA<br>GYD        | VHWWYQLP<br>GTAPKVLIIY    | GNS  | DRPSGVDPDRFSASKS<br>ATSASLAITGLQAED<br>EADYYC | QSYDSS<br>LSGYV     | FGTGT<br>KVTVL |
| 서열번호      | 275                                | 203                  | 300                       | 228  | 321                                           | 247                 | 359            |
| PD1-32A6  | DIQMTQSPSSV<br>SASVGDRTTIT<br>CRAS | QGIVSW               | LAWYQQKP<br>GKAPRLIIY     | RAS  | DLETGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISLQPEDV<br>ATYYC   | QQADS<br>FPLT       | FGGGT<br>KVEIK |
| 서열번호      | 270                                | 204                  | 301                       | 229  | 322                                           | 248                 | 360            |
| PD1-41C9  | DIVMTQTPLSL<br>PVTPEAAASIS<br>CRSS | QSLIDS<br>EDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY     | TLS  | HRASGVDPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVAEED<br>VGLYYC | LQRMG<br>FPYT       | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호      | 276                                | 205                  | 302                       | 230  | 323                                           | 249                 | 361            |
| PD1-42G4  | DIQMTQSPSSL<br>SASVGDRTTIT<br>CRAS | QGISSY               | LAWYQQKP<br>GKAPKLLIY     | AAS  | TLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISLQPEDF<br>ATYFC   | QQSYTS<br>PRT       | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호      | 277                                | 206                  | 303                       | 231  | 324                                           | 250                 | 361            |
| PD1-44B5  | QFVLTQSPSAS<br>GTPGQNVISC<br>SAS   | TFNIGT<br>TT         | VNWWYQRLP<br>GTAPKLLIY    | NYD  | QRPSGVDPDRFSGSKS<br>GTSASLAISGLQSED<br>EADYYC | AAWDD<br>SLNAW<br>L | FGGGT<br>KLTVL |
| 서열번호      | 278                                | 207                  | 304                       | 232  | 325                                           | 251                 | 358            |

[352]

|          |                                    |                      |                          |     |                                              |                     |                    |
|----------|------------------------------------|----------------------|--------------------------|-----|----------------------------------------------|---------------------|--------------------|
| 서열번호     | 276                                | 208                  | 302                      | 230 | 326                                          | 252                 | 361                |
| PD1-45F1 | SYELTQDPAVS<br>VALGQTVRITC<br>QGD  | SLRTYY               | ASWYQQKP<br>GQAPILVIY    | GKN | NRPSGIPDRFSGSSSG<br>NTASLTTAAQAEDE<br>ADYYC  | NSRDSS<br>GKSLV     | FGGGT<br>KLTVL     |
| 서열번호     | 279                                | 209                  | 305                      | 233 | 327                                          | 253                 | 358                |
| PD1-45F4 | SYELTQAPSL<br>VSPGQTANIICS<br>GD   | NLRKY                | VSWYQQKP<br>GQSPLLVIY    | QDT | RRPSGIPARFSGSNSG<br>NTATLTISGTQTRDES<br>TYYC | MTWDV<br>DITSMI     | FGGGT<br>KLTVL     |
| 서열번호     | 280                                | 210                  | 306                      | 234 | 328                                          | 254                 | 358                |
| PD1-47B8 | QSALTQPASVS<br>GSPGQSITISCT<br>GT  | SSDVGG<br>YNY        | VSWYQQHP<br>GKAPKLMY     | DVS | KRPSGVSNRFSGSKS<br>GNTASLTISGLQAED<br>EADYYC | SSFTSSS<br>TVV      | FGGGT<br>KLTVL     |
| 서열번호     | 281                                | 211                  | 307                      | 235 | 329                                          | 255                 | 358                |
| PD1-48A6 | QFVLTPPPSVS<br>GAPGQRVITISC<br>TGS | RSNFGA<br>GHD        | VHWCQQLP<br>GTAPKLLIY    | GNN | NRPSGVPDRFSGSKS<br>GTSASLAITGLQAED<br>EAEYYC | QSYDSS<br>LSAWG     | VRRR<br>DQAD<br>RP |
| 서열번호     | 282                                | 212                  | 308                      | 236 | 330                                          | 256                 | 362                |
| PD1-48A9 | DIVMTQTPLSL<br>PVTPGEPASISC<br>RSS | QSLDS<br>HDGNT<br>Y  | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY    | TLS | HRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGLYYC | MQRIDF<br>PYT       | FGQGT<br>KVEIK     |
| 서열번호     | 283                                | 213                  | 302                      | 230 | 331                                          | 257                 | 363                |
| PD1-48G6 | NFMLTQPPSTS<br>GTPGQRVITISC<br>SGR | SSNIGIN<br>T         | VTWYQQLP<br>GTAPKVL<br>Y | RDD | QRPSGVPDRFSGSRS<br>GISASLAISGLQSEDE<br>ADYYC | ASWDD<br>TLNGW<br>V | FGGGT<br>KLTVL     |
| 서열번호     | 284                                | 214                  | 309                      | 237 | 332                                          | 258                 | 358                |
| PD1-49A2 | DIVMTQSPLSL<br>PVTPGEPASISC<br>RSS | QSLFDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY    | TLS | HRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGIYYC | LQRMG<br>FPYT       | FGQGT<br>KVEIK     |
| 서열번호     | 285                                | 215                  | 302                      | 230 | 333                                          | 249                 | 363                |
| PD1-49B9 | QSALTQPPSAS<br>GSPGQSVTISC<br>TGT  | SSDVGG<br>YNY        | VSWYQQHP<br>GKAPKLMY     | EVS | KRPSGVPDRFSGSKS<br>GNTASLTVSGLQPED<br>EADYYC | SSFARN<br>SNYV      | FGTGT<br>KVTVL     |
| 서열번호     | 286                                | 211                  | 307                      | 238 | 334                                          | 259                 | 359                |
| PD1-51A6 | DIVMTQTPLSL<br>SVTPGQPASIS<br>CKSS | QSLLYI<br>DGETY      | LFWYLQKP<br>GQSPQLLIY    | EVS | SRFSGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGVYYC | MQGIHL<br>PLT       | FGQGT<br>RLEIK     |
| 서열번호     | 287                                | 216                  | 310                      | 238 | 335                                          | 260                 | 364                |
| PD1-51D9 | DIVMTQTPLSL<br>PVTPGEPASISC<br>RSS | QSLHLS<br>NGNNY      | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY    | LGS | YRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGLYYC | MQGLQI<br>PST       | FGPGT<br>KVDIK     |
| 서열번호     | 283                                | 217                  | 302                      | 239 | 336                                          | 261                 | 365                |

[353]

|           |                                     |                      |                         |     |                                                |                |                |
|-----------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----|------------------------------------------------|----------------|----------------|
| PD1-52E8  | SYELTQPLSL<br>VAPGQTARITC<br>SGD    | ALSKEY               | SYWYQKP<br>GQAPVLV<br>Y | KDS | ERPSGIPERFSGSSSG<br>TTVTLTISGVQAEDE<br>ADYYC   | QSVDS<br>DTSVV | FGGGT<br>KLTVL |
| 서열번호      | 288                                 | 218                  | 311                     | 240 | 337                                            | 262            | 358            |
| PD1-62E1  | DIQMTQSPAIL<br>SLSPGERATLS<br>CRAS  | QSVTSD               | VAWYQHIR<br>GQAPRLIY    | DAS | NRASGIPARFSGGGS<br>GTEFTLTISSEPEDF<br>AVYYC    | QQYNN<br>WPLT  | FGGGT<br>KVEIK |
| 서열번호      | 289                                 | 219                  | 312                     | 241 | 338                                            | 263            | 360            |
| PD1-72D10 | DIVMTQTPLSL<br>PVTGPGEAASIS<br>CRSS | QSLIDS<br>EDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY   | TLS | HRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGIYYC   | MQRVE<br>FPFT  | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호      | 276                                 | 205                  | 302                     | 230 | 333                                            | 252            | 366            |
| PD1-74A11 | DIVMTQTPLSL<br>PVTGPGEASISC<br>RSS  | QSLFDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY   | TLS | YRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVAEED<br>VGIYYC   | MQRVE<br>FPFT  | FGQGT<br>KVDIK |
| 서열번호      | 283                                 | 215                  | 302                     | 230 | 353                                            | 252            | 356            |
| PD1-75C10 | DIVMTQTPLSL<br>PVTGPGEAASIS<br>CRSS | QSLIDS<br>EDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY   | TLS | HRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGVIYYC  | MQRIF<br>PYT   | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호      | 276                                 | 205                  | 302                     | 230 | 354                                            | 264            | 366            |
| PD1-74A01 | DIVMTQTPLSL<br>PVTGPGEASISC<br>RSS  | QSLIDR<br>GGGHT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY   | TLS | HRASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLKISRVEAED<br>VGIYYC   | MQRKE<br>FPLT  | FGPGT<br>KLEIK |
| 서열번호      | 283                                 | 222                  | 302                     | 230 | 333                                            | 268            | 367            |
| PD1-74H12 | DIVMTQTPLSL<br>SVTPGEASISC<br>RSS   | QSLIDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY   | TLS | HRASGVPDRFSGRG<br>SHTDFTLTISSEVEAED<br>VGVIYYC | MQRHF<br>PLT   | FGQGT<br>RLEIK |
| 서열번호      | 294                                 | 220                  | 302                     | 230 | 355                                            | 269            | 364            |

[354]

[355] 실시예 3: PD-1 인간항체의 생산

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

[357] 선별된 15종의 PD1에 대한 단일 클론 파아지 항체들을 파아지에서 IgG 전체 벡터 (whole vector)로 전환하기 위해 중쇄와 경쇄에 대해 PCR (iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행 하였다. 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, 증류수를 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.

- [358] 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 (솔젠트).
- [359] 그 결과, 전체 IgG로 전환한 PD1에 대한 15개의 클론의 중쇄와 경쇄의 서열이 표 3의 15개의 클론의 파아지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. HEK 293F 세포에 형질감염 하기 위해, 전체 IgG로 전환한 각 클론의 중쇄와 경쇄는 LB Amp 100 ml 배지에 키워 midi-prep kit (QIAGEN)을 이용하여 DNA를 얻었다.
- [360]
- [361] 2. 인간항체 생산
- [362] 클로닝된 pNATVH와 pNATVL 벡터는 6:4의 비율로 HEK293F 세포에 동시 형질감염(co-형질감염)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22  $\mu$ m 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  $\mu$ g씩 로딩하여 SDS-PAGE 분석하여 정제 단백질의 순도 및 이동도 (mobility) 상태를 확인하였다 (도 5).
- [363] 그 결과, 도 5에 따르면, 15종 항체 모두 비환원 조건에서는 150 kDa이상의 크기에서 검출되었고 대조 항체로 Nivolumab을 생산하였다.
- [364]
- [365] 실시예 4: PD-1 단일 클론 항체의 특성
- [366] 1. 항체의 활성 평가
- [367] 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 루시퍼라제 (luciferase)가 기질을 분해하여 나오는 발광세기로 알 수 있고 분광광도계 (SpectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, 미국)로 측정하였다. 대조 항체를 포함하는 16종의 PD-1 항체는 PD-1/PD-L1 복합체 형성으로 감소되어 있던 시그널을 회복시키는 값으로 항체의 활성을 확인하였고, 41C9, 45D6, 49A2가 대조 항체 대비 비슷한 활성도를 보였다 (도 6).
- [368] PD-1 항체 41C9, 45D6, 49A2의 활성 평가를 농도 의존적으로 측정하기 위해 단계 희석을 하여 PD1/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.

[369]

[370] 2. 과발현 세포에 대한 PD1 항체의 친화도

[371] PD-1을 고발현하는 형질전환 세포 풀은 인간 PD-1 (NM\_005018.2)을 포함하고 있는 pcDNA3.1 플라스미드를 HEK293E에 형질전환 시키고, 150 ug/ml Zeocin (#R25001, Thermo Fisher)이 들어있는 선택적 배지에서 선별하였다. 각 세포 풀은 각 anti-PD-1 (#557860, BD)을 이용한 FACS (fluorescence activated cell sorting) 분석을 통해 확인되고 선택되었고, FACS 결합 어세이나 FACS 경쟁 어세이와 같은 기능 평가법에 사용되었다.

[372] 인간 PD-1을 고발현하는 형질전환 세포 풀 각각을 시료당  $0.5-1 \times 10^6$ 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 현탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다. 그 결과로 PD-1 항체 3종 모두 특이적으로 결합하였고, 그 결합력은 평형해리상수(equilibrium dissociation constant, Kd)를 Graphpad Prism6의 분석함수를 통하여 구하였다.

[373] 그 결과, 도 8에 따르면, 세포표면에 과발현된 인간 PD-1에 대해 농도 의존적으로 결합된 항체의 결합력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 알 수 있다.

[374]

[375] 3. 양성 파아지 항체에서 PD1-45D6, 49A2 유사 서열을 가진 것을 선별

[376] 활성도 평가 및 FACS에서의 결합력이 우수한 것으로 평가된 41C9 이외에도 45D6과 49A2에 대하여 추가 항체 선별을 진행하였다.

[377] 실시예 2와 동일한 과정을 통해 PD1-45D6, 49A2 유사 서열을 가진 것을 추가적으로 선별하였다. 아래 표 6에 특성을 정리하였다.

[378]

[379] [표6]

추가적으로 선별된 45D6, 49A2 유사 항체 클론의 특성

| 클론명       | VH     | 유사도    | VL | 유사도 2  | 그룹 |
|-----------|--------|--------|----|--------|----|
| PD1-72D10 | VH3-30 | 96.90% | 01 | 94.10% | 1  |
| PD1-74A11 | VH3-30 | 97.96% | 01 | 95.05% | 2  |
| PD1-75C10 | VH3-30 | 96.94% | 01 | 95.05% | 3  |
| PD1-74A01 | VH3-30 | 95.92% | 01 | 92.08% | 4  |
| PD1-74H12 | VH3-30 | 94.90% | 01 | 92.08% | 5  |

[380]

[381] 4. ProteOn XPR36을 이용한 PD1 항체의 친화도

[382] 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 PD1-hFc을 주입시켜 GLC 센서칩에 고정화시켰다.

[383] PD1 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.

[384] 평형상태에서의 센소그램 데이터를 농도에 따라 플로팅 (plotting) 및 피팅 (fitting)하여 평형 해리상수 (KD) 계산한 결과 45D6은 0.001 nM, 49A2는 0.019 nM로 PD1 항원에 대해 높은 친화도를 보였다 (도 9).

[385]

[386] 실시예 5: PD1항체 45D6, 49A2에 대한 항체 최적화

[387] 1. PD1-45D6, 49A2 항체의 최적화를 위한 라이브러리 제작

[388] 항체 최적화는 중쇄는 고정하고 와이바이오로직스에서 보유하고 있는  $10^5$ - $10^6$  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 패킹 (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 서플링등 3가지 방법으로 진행을 하였다.

- [389] LC 서플링 라이브러리를 제작하기 위해 45D6, 49A2 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 형질전환을 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.
- [390] Core 패킹 + LC 서플링 라이브러리를 제작하기 위해 45D6, 49A2 항체의 frame work (FR) 부분을 보존 (conserved)된 아마노산 서열로 치환한 뒤 LC 유전자를 BstX I으로 절단 한 다음 벡터로 사용하고, 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환된 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.
- [391] CDR 핫스팟 + LC 서플링 라이브러리를 제작하기 위해 45D6 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 라이게이션 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 아마노산이 랜덤하게 변이되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.
- [392]
- [393] 실시예 6: PD1 인간 항체의 선별
- [394] 1. 항원 준비
- [395] 와이바이오로직스에서 생산한 PD1-hFc, PD1-mFc와 Sino Biological Inc.에서 구입한 PD1-his (Catalog Number, 10377-H08H) 단백질을 항원 50 ug을 immunosorb tube에서 코팅한 후 블로킹 (blocking)을 수행하였다.
- [396]
- [397] 2. 바이오-패닝
- [398] 인간항체 라이브러리 파아지는  $2.7 \times 10^{10}$ 의 다양성을 가진 인간 scFv 라이브러리를 박테리아에 감염시킨 후 박테리아를 30°C에 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 워싱 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지들만 용출하였다.

- [399] 용출된 파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝과정을 통해 양성 파아지의 풀 (pool)을 얻었고, 항체 최적화를 위한 패닝은 첫 번째 라운드만 진행하였다. 그 결과, 표 7과 같이 1라운드 패닝에서 항원에 결합한 파아지 수가 유입 (input) 대비 결합 (output)이 다소 증가하였음을 확인 하였다.

[400]

[401] [표7]

최적화 패닝에 따른 항체의 역가비교

| 샘플                      | 파지의 유입수              | 파지의 결합수           |
|-------------------------|----------------------|-------------------|
| 45D6 (LS)               | $1.3 \times 10^{13}$ | $2.8 \times 10^7$ |
| 45D6 (Core packing +LS) | $1.1 \times 10^{13}$ | $4.8 \times 10^7$ |
| 45D6 (CDR hotspot +LS)  | $1.1 \times 10^{13}$ | $3.6 \times 10^6$ |
| 49A2 (LS)               | $1.3 \times 10^{13}$ | $1.8 \times 10^7$ |
| 49A2 (CDR hotspot +LS)  | $1.1 \times 10^{13}$ | $1.6 \times 10^6$ |

[402]

[403] 3. 양성 파아지 선별

- [404] 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.

- [405] 96웰 면역 플레이트에 항원 PD1을 well당 100 ng씩을 4°C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킵 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/T를 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.

- [406] 그 결과, 모항체 (49A2 또는 45D6) 보다 각 항원에 대한 결합능이 강한 수십개의 단일 파아지 클론을 얻었고, 도 10과 같다.

[407]

[408] 4. 양성 파아지 항체의 염기서열 분석

- [409] 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 이용하여

DNA-prep을 수행하여 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠트). 서열 분석 결과를 보고, 선별된 항체의  $V_H$ 와  $V_L$ 의 CDR region을 확인하였고 이들 항체와 germ line 항체군의 유사성을 NCBI의 웹페이지

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 조사하여 그 결과 25종 (49A2: 10종, 45D6: 15종)의 모항체보다 결합력이 높은 특이적인 파아지 항체를 얻었고 이는 하기 표 8에서 정리하여 제시하였다.

[410]

[411] [표8]

최적화 과정을 통해 선별된 PD1 항체 변이체의 단일 클론의 특성

| 클론명              | VH     | 유사도    | VL | 유사도 2  | 그룹 |
|------------------|--------|--------|----|--------|----|
| PD1-49A2(A/1B2)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 93.07% | 1  |
| PD1-49A2(A/1D11) | VH3-30 | 91.84% | O1 | 97.03% | 2  |
| PD1-49A2(A/1F12) | VH3-30 | 92.86% | O1 | 93.07% | 3  |
| PD1-49A2(A/1H4)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 92.08% | 4  |
| PD1-49A2(A/1H8)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 90.10% | 5  |
| PD1-49A2(A/2A6)  | VH3-30 | 91.84% | O1 | 89.11% | 6  |
| PD1-49A2(A/2A11) | VH3-30 | 93.88% | O1 | 90.10% | 7  |
| PD1-49A2(A/2B9)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 93.07% | 8  |
| PD1-49A2(A/2B10) | VH3-30 | 93.88% | O1 | 95.05% | 9  |
| PD1-45D6(A/3D2)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 94.06% | 10 |
| PD1-45D6(A/3G1)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 95.05% | 11 |
| PD1-45D6(A/3H4)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 93.07% | 12 |
| PD1-45D6(A/3H6)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 95.05% | 13 |
| PD1-45D6(A/3H7)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 92.08% | 14 |
| PD1-45D6(A/4C1)  | VH3-30 | 94.90% | O1 | 96.04% | 15 |
| PD1-45D6(A/4C9)  | VH3-30 | 94.90% | O1 | 93.07% | 16 |
| PD1-45D6(A/4D4)  | VH3-30 | 94.90% | O1 | 92.08% | 17 |
| PD1-45D6(A/4H6)  | VH3-30 | 94.90% | O1 | 95.05% | 18 |
| PD1-49A2(A/2D7)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 95.05% | 19 |
| PD1-45D6(A/5A6)  | VH3-30 | 91.84% | O1 | 96.04% | 20 |
| PD1-45D6(A/5B2)  | VH3-30 | 93.88% | O1 | 94.06% | 21 |
| PD1-45D6(A/5B5)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 92.08% | 22 |
| PD1-45D6(A/5B12) | VH3-30 | 93.88% | O1 | 94.06% | 23 |
| PD1-45D6(A/5C8)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 95.05% | 24 |
| PD1-45D6(A/5H9)  | VH3-30 | 92.86% | O1 | 94.06% | 25 |

[412]

[413] 선별된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 9 및 표 10과 같다.

[414]

[415] [표9]

PD1 인간항체의 중쇄 가변영역

| NAME             | FR1                           | CDR1             | FR2                       | CDR2             | FR3                                             | CDR3            | FR4             |
|------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|-------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| PD1-49A2(A/1B2)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>LRYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GQD<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGRGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 17               | 97                        | 49               | 114                                             | 58              | 136             |
| PD1-49A2(A/1D11) | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>KNN<br>A | MIWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GRH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 18               | 97                        | 50               | 114                                             | 58              | 137             |
| PD1-49A2(A/1F12) | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>RNY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GQH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WSQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 19               | 97                        | 51               | 114                                             | 58              | 145             |
| PD1-49A2(A/1H4)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>PIYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GAH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 20               | 97                        | 52               | 114                                             | 58              | 137             |
| PD1-49A2(A/1H8)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>KTY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GQH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 21               | 97                        | 51               | 114                                             | 58              | 137             |
| PD1-49A2(A/2A6)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>KYY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVT<br>V | ISYD<br>GQY<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 22               | 113                       | 53               | 114                                             | 58              | 137             |
| PD1-49A2(A/2A11) | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>RSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GQD<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 23               | 97                        | 49               | 114                                             | 58              | 137             |
| PD1-49A2(A/2B9)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>LRYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GRY<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 17               | 97                        | 54               | 114                                             | 58              | 137             |

[416]

|                  |                               |                  |                           |                  |                                                 |                 |                     |
|------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|-------------------------------------------------|-----------------|---------------------|
| PD1-49A2(A/2B10) | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>LVY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GSH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS     |
| 서열번호             | 80                            | 24               | 97                        | 55               | 114                                             | 58              | 137                 |
| PD1-49A2(A/2D7)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>KTY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GQH<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | TTT<br>TFD<br>S | WGQGT<br>LVTVSS     |
| 서열번호             | 80                            | 21               | 97                        | 51               | 114                                             | 58              | 137                 |
| PD1-45D6(A/3D2)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQVP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGS<br>QVTVS<br>S |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 96                        | 31               | 114                                             | 57              | 135                 |
| PD1-45D6(A/3G1)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQVP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGS<br>QVTVS<br>S |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 96                        | 31               | 114                                             | 57              | 135                 |
| PD1-45D6(A/3H4)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQVP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGS<br>QVTVS<br>S |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 96                        | 31               | 114                                             | 57              | 135                 |
| PD1-45D6(A/3H6)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQVP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGS<br>QVTVS<br>S |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 96                        | 31               | 114                                             | 57              | 135                 |
| PD1-45D6(A/3H7)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQVP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGS<br>QVTVS<br>S |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 96                        | 31               | 114                                             | 57              | 135                 |
| PD1-45D6(A/4C1)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS     |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137                 |
| PD1-45D6(A/4C9)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS     |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137                 |

[417]

|                  |                               |                  |                           |                  |                                                 |                 |                 |
|------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------|------------------|-------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| PD1-45D6(A/4C9)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/4D4)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/4H6)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SSYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 1                | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5A6)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>RLYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISHD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 25               | 97                        | 56               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5B2)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SFYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 26               | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5B5)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>RTYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 27               | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5B12) | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>SVYA     | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 28               | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5C8)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>MRY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 29               | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |
| PD1-45D6(A/5H9)  | QVQLVESGGGVV<br>QPGRSLRLSCAAS | GFTF<br>WTY<br>A | MHWVRQAP<br>GKGLEWVA<br>V | ISYD<br>GND<br>K | YYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C | VPT<br>TFE<br>Y | WGQGT<br>LVTVSS |
| 서열번호             | 80                            | 30               | 97                        | 31               | 114                                             | 57              | 137             |

[418]

[419] [표10]

## PD1 인간항체의 경쇄 가변영역

| NAME             | FR1                             | CDR1                 | FR2                   | CD R2 | FR3                                           | CDR3          | FR4            |
|------------------|---------------------------------|----------------------|-----------------------|-------|-----------------------------------------------|---------------|----------------|
| PD1-49A2(A/1B2)  | DIVMTQITPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS   | HRASGVDPDRFSGSGSGT<br>EFNLRISRVEAEDVGIYY<br>C | MQRV<br>EFPFT | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호             | 283                             | 220                  | 302                   | 230   | 339                                           | 252           | 366            |
| PD1-49A2(A/1D11) | DIVMTQITPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS   | YRASGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVGVY<br>YC | MQRV<br>EFPFT | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호             | 283                             | 215                  | 302                   | 230   | 340                                           | 252           | 366            |
| PD1-49A2(A/1F12) | DIVMTQITPHSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS   | HRALGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDSGIYY<br>C | MQRI<br>EFPYT | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호             | 290                             | 205                  | 302                   | 230   | 341                                           | 264           | 366            |
| PD1-49A2(A/1H4)  | DIVMTQSPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS  | QSLIDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS   | HRASGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDSGIYY<br>C | MQRV<br>EFPYT | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호             | 291                             | 205                  | 302                   | 230   | 342                                           | 265           | 361            |
| PD1-49A2(A/1H8)  | DIVMTQITPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDR<br>DGGHT<br>Y | VDWYLQKP<br>GQSPRLLIY | TLS   | HRALGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEADDVGLY<br>YC | MQRI<br>EFPFT | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호             | 283                             | 221                  | 313                   | 230   | 343                                           | 266           | 363            |
| PD1-49A2(A/2A6)  | DIVMTQITPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSLIDS<br>EDGNTY     | LDWYLQRP<br>GQSPQLLIY | TLS   | HRASGVPGRFSGSGSGT<br>EFNLRISRVEAEDVGIYY<br>C  | MQRV<br>EFPFT | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호             | 276                             | 205                  | 314                   | 230   | 344                                           | 252           | 363            |
| PD1-49A2(A/2A11) | DIVMTQITPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPRLLIY | TLS   | HRALGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVAEEDVGLY<br>YC | LQRM<br>GFPT  | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호             | 283                             | 215                  | 315                   | 230   | 345                                           | 249           | 366            |

[420]

|                  |                                |                       |                       |     |                                                   |               |                 |
|------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----|---------------------------------------------------|---------------|-----------------|
| PD1-49A2(A/2B9)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSL LDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLEISRVEAEDVG<br>VY<br>YC  | MQRR<br>DFPFT | FGQGT<br>KV DIK |
| 서열번호             | 276                            | 205                   | 302                   | 230 | 346                                               | 267           | 356             |
| PD1-49A2(A/2B10) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSL LDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVA AEDV<br>GLY<br>YC | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KL DIK |
| 서열번호             | 283                            | 220                   | 302                   | 230 | 323                                               | 252           | 361             |
| PD1-49A2(A/2D7)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSL LDR<br>DGGHT<br>Y | VDWYLQKP<br>GQSPRLLIY | TLS | HRALGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEADNV<br>GLY<br>YC  | MQRI<br>BFPFT | FGQGT<br>KV EIK |
| 서열번호             | 283                            | 221                   | 313                   | 230 | 347                                               | 266           | 363             |
| PD1-45D6(A/3D2)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSL LDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDV<br>GIYY<br>C  | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KV EIK |
| 서열번호             | 276                            | 205                   | 302                   | 230 | 333                                               | 252           | 363             |
| PD1-45D6(A/3G1)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSL LDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLEISRVEAEDV<br>GVY<br>YC  | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KL DIK |
| 서열번호             | 283                            | 205                   | 302                   | 230 | 346                                               | 252           | 361             |
| PD1-45D6(A/3H4)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSL FDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVSDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDS<br>GIYY<br>C  | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KL DIK |
| 서열번호             | 283                            | 215                   | 302                   | 230 | 348                                               | 252           | 361             |
| PD1-45D6(A/3H6)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSL LDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDV<br>GVY<br>YC  | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KL EIK |
| 서열번호             | 276                            | 205                   | 302                   | 230 | 349                                               | 252           | 366             |
| PD1-45D6(A/3H7)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSL LDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPGRFSGSGSGT<br>EFNL RISRVEAEDV<br>GIYY<br>C | MQRV<br>BFPFT | FGQGT<br>KL EIK |

[421]

|                 |                                |                      |                       |     |                                               |                   |                |
|-----------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------|-----|-----------------------------------------------|-------------------|----------------|
| 서열번호            | 283                            | 220                  | 302                   | 230 | 344                                           | 252               | 366            |
| PD1-45D6(A/4C1) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLLDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVGIYY<br>C  | MQRV<br>EFPFT     | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호            | 283                            | 220                  | 302                   | 230 | 333                                           | 252               | 361            |
| PD1-45D6(A/4C9) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSLLDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVAEDVGIYY<br>C   | MQRV<br>EFPFT     | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호            | 276                            | 205                  | 302                   | 230 | 350                                           | 252               | 366            |
| PD1-45D6(A/4D4) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLLDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>EFNLKISRVEAEDVGIYY<br>C  | MQRV<br>EFPFT     | FGQGT<br>KVDIK |
| 서열번호            | 283                            | 205                  | 302                   | 230 | 339                                           | 252               | 356            |
| PD1-45D6(A/4H6) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLFDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVG<br>LYC   | MQRV<br>EFPFT     | FGQGT<br>KLEIK |
| 서열번호            | 283                            | 215                  | 302                   | 230 | 331                                           | 252               | 366            |
| PD1-45D6(A/5A6) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLLDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVG<br>VYYC  | MQRV<br>DFPY<br>T | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호            | 283                            | 205                  | 302                   | 230 | 349                                           | 257               | 361            |
| PD1-45D6(A/5B2) | DIVMTQTPLSPPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLLDS<br>DDGNT<br>Y | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLEISRVEAEDVG<br>VYYC  | MQRR<br>DFPFT     | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호            | 292                            | 220                  | 302                   | 230 | 346                                           | 267               | 361            |
| PD1-45D6(A/5B5) | DIVMTQTPLSLPV<br>MPGEAASISCRSS | QSLLDS<br>EDGNTY     | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAD<br>DVGIIYYC | MQRV<br>EFPFT     | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호            | 293                            | 205                  | 302                   | 230 | 351                                           | 252               | 363            |

[422]

|                  |                                |                  |                       |     |                                               |               |                |
|------------------|--------------------------------|------------------|-----------------------|-----|-----------------------------------------------|---------------|----------------|
| PD1-45D6(A/5B12) | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEAASISCRSS | QSLIDS<br>EDGNTY | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVGIYY<br>C | MQRV<br>EFPFT | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호             | 276                            | 205              | 302                   | 230 | 333                                           | 252           | 363            |
| PD1-45D6(A/5C8)  | DIVMTQSPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>EDGNTY | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVDPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVGVY<br>YC | MQRV<br>EFPFT | FGQGT<br>KLDIK |
| 서열번호             | 285                            | 205              | 302                   | 230 | 349                                           | 252           | 361            |
| PD1-45D6(A/5H9)  | DIVMTQTPLSLPV<br>TPGEPASISCRSS | QSLIDS<br>DDGNTY | LDWYLQKP<br>GQSPQLLIY | TLS | HRASGVSDRFSGSGSGT<br>DFTLEISRVEAEDVGVY<br>YC  | MQRR<br>DFPFT | FGQGT<br>KVEIK |
| 서열번호             | 283                            | 220              | 302                   | 230 | 352                                           | 267           | 363            |

[423]

[424] 실시예 7: PD1 인간항체의 생산

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

[426] 선별된 25종의 PD1에 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, 증류수를 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.

[427] 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 (솔젠트).

[428] 그 결과, 전체 IgG로 전환한 PD1에 대한 25개의 클론의 중쇄와 경쇄의 서열이 파아지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다. HEK 293F 세포에 형질감염 하기 위해, 전체 IgG로 전환한 각 클론의 중쇄와 경쇄는 LB Amp 100 ml 배지에 키워 midi-prep kit (QIAGEN)을 이용하여 DNA를 얻었다.

[429]

[430] 2. 인간항체 생산

[431] 클로닝된 pNATVH와 pNATVL 벡터는 6:4의 비율로 HEK293F 세포에 동시

형질감염(co-형질감염)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22  $\mu$ m 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, 25종의 항체를 환원, 비-환원 조건에서 각 5  $\mu$ g씩 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 증가하였고, 그 결과는 도 11에서 확인할 수 있다.

[432]

[433] 실시예 8: PD1 단일 클론 항체의 특성

[434] 1. 항체의 활성 평가

[435] 선별된 항체의 활성 평가 실험은 PD1/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. 24종의 PD-1 항체는 PD-1/PD-L1 복합체 형성으로 감소되어 있던 시그널을 회복시키는 값으로 항체의 활성을 확인하였고, 45D6 항체에서는 45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2, 45D6-5B5가 49A2 항체에서는 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6, 49A2-2B9가 모항체 대비 활성이 증가하였고 대조 항체 대비 비슷한 활성도를 보였다(도 12).

[436] PD-1 항체 8종(45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2, 45D6-5B5, 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6, 49A2-2B9)에 대해 다시 활성 평가를 농도 의존적으로 측정하기 위해 단계 희석을 하여 PD1/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 저해 회복 능력은 49A2-1B2가 가장 높게 나왔다(도 13, 표 11).

[437]

[438] [표11]

선별된 PD1 항체 변이체의 단일 클론의 활성

| 항체               | EC50 [nM] |
|------------------|-----------|
| PD-1-41C9        | 3.91      |
| PD-1-45D6        | 2         |
| PD-1-45D6-A-3D2  | 2.16      |
| PD-1-45D6-A-3G1  | 0.98      |
| PD-1-45D6-A-3H4  | 1.67      |
| PD-1-45D6-A-3H6  | 1.49      |
| PD-1-45D6-A-3H7  | 1.98      |
| PD-1-45D6-A-4C1  | 1.76      |
| PD-1-45D6-A-4C9  | 2.72      |
| PD-1-45D6-A-4D4  | 1.74      |
| PD-1-45D6-A-4H6  | 1.19      |
| PD-1-45D6-A-5A6  | 0.92      |
| PD-1-45D6-A-5B12 | 0.8       |
| PD-1-45D6-A-5B2  | 1.48      |
| PD-1-45D6-A-5B5  | 1.68      |
| PD-1-45D6-A-5C8  | 1.44      |
| PD-1-45D6-A-5H9  | 2         |
| PD-1-48A9        | 8.64      |
| PD-1-49A2        | 3.78      |
| PD-1-49A2-A-1B2  | 1.3       |
| PD-1-49A2-A-1D11 | 2.89      |
| PD-1-49A2-A-1F12 | 1.03      |
| PD-1-49A2-A-1H4  | 0.84      |
| PD-1-49A2-A-1H8  | 1.21      |
| PD-1-49A2-A-2A11 | 0.79      |
| PD-1-49A2-A-2A6  | 1.51      |
| PD-1-49A2-A-2B10 | 0.65      |
| PD-1-49A2-A-2B9  | 1.23      |

|           |              |
|-----------|--------------|
| PD-1-51D9 | ~ 4.695e+010 |
| PD-1-52E8 | 8.43         |
| PD-1-62E1 | 2.73         |
| PD1-72D10 | 1.21         |
| PD1-74A11 | 1.31         |
| PD1-75C10 | 0.81         |
| PD1-74A01 | 1.01         |
| PD1-74H12 | 0.98         |

[439]

[440] 2. 과발현 세포에 대한 PD1 항체의 친화도

[441] 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 PD1을 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 현탁 시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다.

[442] 인간의 PD-1을 고발현하는 형질전환 세포 풀 각각을 시료당 0.5x10<sup>6</sup>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 현탁시킨 후, 유세포 분석기인 FACSCanto II flow cytometer(BD Biosciences, 미국)을 사용하여 분석하였다. 결합력은 평형해리상수(equilibrium dissociation constant, Kd)를 Graphpad Prism6의 분석함수를 통하여 구하였다. 도 15에 따르면, 세포표면에 과발현된

인간 PD-1에 대해 농도 의존적으로 결합된 항체의 결합력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 알 수 있다. 도 14 및 도 15에 따르면, 49A2 (Parent 49A2)를 제외한 나머지 항체들이 비슷한 결합력을 보였다.

[443]

[444] 3. 효소면역흡착을 이용한 PD-1/PD-L1 혹은 PD-1/PD-L2 복합체의 형성을 막는 항체의 저해능력

[445] 인간 PD-1-Fc(S1420, Y-Biologics) 혹은 PD-L2-Fc(#10292-H02H, Sino)를 96-웰면역 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% 스킴 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) 혹은 PD-1-His(S1352, 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 16에 나타내었다.

[446]

[447] 4. ProteOn XPR36을 이용한 PD1 항체의 친화도

[448] 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 PD1-hFc를 주입시켜 GLC 센서칩에 고정화시켰다.

[449] PD1 단백질과 반응하지 않고 남아있는 활성화된 카르복시 그룹을 비활성화시키기 위해 1 M 에탄올아민을 흘려주었고, 센서칩에 결합되지 않은 단백질을 세척하기 위해 10 mM 글리신 (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.

[450] 평형상태에서의 센소그램 데이터를 농도에 따라 플로팅 (plotting) 및 피팅 (fitting)을 하여 평형 해리상수 (KD) 계산한 결과 49A2(2B9)은 0.001 nM로 PD1

항원에 대해 높은 친화도를 보였다 (도 17).

[451] 다른 항체의 인간 PD-1 단백질에 대한 친화도, 원숭이의 PD-1 단백질에 대한 친화도 및 생쥐의 PD-1 단백질에 대한 친화도는 표 12 내지 표 14에 기재한 바와 같다.

[452]

[453] [표12]

인간 PD1 단백질과 선별된 항체 간의 결합 kinetics

| Ab           | KD(M)                   | Ka(1/Ms)            | Kd(1/s)                |
|--------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| PD1 49A2     | $2.371 \times 10^{-10}$ | $3.953 \times 10^5$ | $9.372 \times 10^{-5}$ |
| PD1 49A2 1H8 | $1.245 \times 10^{-11}$ | $2.201 \times 10^5$ | $2.741 \times 10^{-6}$ |
| PD1 49A2 1B2 | $1.659 \times 10^{-10}$ | $3.853 \times 10^5$ | $6.390 \times 10^{-5}$ |
| PD1 49A2 2A6 | $6.907 \times 10^{-11}$ | $3.101 \times 10^5$ | $2.142 \times 10^{-5}$ |
| PD1 49A2 2B9 | $1.0 \times 10^{-12}$   | $3.774 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^{-7}$   |
| PD1 45D6     | $1.0 \times 10^{-12}$   | $2.701 \times 10^5$ | $1.07 \times 10^{-7}$  |
| PD1 45D6 3D2 | $1.0 \times 10^{-12}$   | $1.81 \times 10^5$  | $1.0 \times 10^{-7}$   |
| PD1 45D6 3H7 | $2.53 \times 10^{-11}$  | $3.076 \times 10^5$ | $7.781 \times 10^{-6}$ |
| PD1 45D6 5B2 | $5.818 \times 10^{-11}$ | $3.315 \times 10^5$ | $1.928 \times 10^{-5}$ |
| PD1 45D6 5B5 | $4.773 \times 10^{-11}$ | $2.96 \times 10^5$  | $1.413 \times 10^{-5}$ |

[454]

[455] [표13]

원숭이의 PD1 단백질과 선별된 항체 간의 결합 kinetics

| Ab            | KD(M)                 | Ka(1/Ms)            | Kd(1/s)              |
|---------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| PD-1-49A2     | $1.0 \times 10^{-12}$ | $1.683 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^{-7}$ |
| PD-1-49A2-2B9 | $1.0 \times 10^{-12}$ | $1.853 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^{-7}$ |
| PD-1-45D6     | $1.0 \times 10^{-12}$ | $1.535 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^{-7}$ |
| PD-1-45D6-5B2 | $1.0 \times 10^{-12}$ | $2.078 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^{-7}$ |

[456]

[457] [표14]

생쥐의 PD1 단백질과 선별된 항체 간의 결합 kinetics 측정

| Ab            | KD(M)                  | Ka(1/Ms)            | Kd(1/s)                |
|---------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| PD-1-49A2-2B9 | $4.231 \times 10^{-9}$ | $1.478 \times 10^5$ | $6.252 \times 10^{-4}$ |
| PD-1-45D6     | $2.391 \times 10^{-9}$ | $5.544 \times 10^4$ | $1.326 \times 10^{-4}$ |
| PD-1-45D6-5B2 | $4.590 \times 10^{-9}$ | $1.879 \times 10^5$ | $8.626 \times 10^{-4}$ |

[458]

[459] 실시예 9: PD1 단일 클론 항체의 에피토프 (epitope) 결정

[460] PD1 항원에 결합하는 단일 클론 scFv-phage를 2xYTCM, 2% 글루코스 (glucose), 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 37°C에서 16시간 배양 하였다. 이렇게 키운 세포에서 OD<sub>600</sub>에서 값이 0.1이 되도록 2xYTCM, 2% 글루코스, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 넣은 다음, 37°C에서 OD<sub>600</sub>에서 그 값이 0.5~0.7 되도록 2~3 시간 배양 하였다. M1 헬퍼 파지 (helper phage)를 MOI값이 1:20 되도록 감염하여 2xYTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양하였다.

[461] 96-웰 면역-플레이트에 항원 PD1 wild type (WT) 또는 여러 변이체 (mutants: 도 18)를 웰 당 100 ng씩 4 °C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킴 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  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T를 사용하여 4번 씻어준 후 2차 항체 (second antibody)인 anti-M13-HRP를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[462] 그 결과, 선택된 단일클론 scFv-phage, 대조 scFv-phage와 PD-1 변이체들에 대해 다른 결합양상을 보이므로 다른 에피토프를 갖는 것을 확인할 수 있었다 (도 19).

[463] 96-웰 면역-플레이트에 항원 PD1 야생형 (PD1 wild type : WT) 또는 여러 변이체들(도 18)을 웰당 100 ng씩을 4 °C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킴 밀크를 사용하여 각 웰을 차단 (blocking)하였다. 각 웰마다 0.2 ml PBS/T 사용하여 씻어준 뒤 16시간 동안 배양한 단일클론 항체를 각 웰에 100  $\mu$ l(1ug/ml)씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T를 사용하여 4번 씻어준 후 이차 항체인 anti-Fab를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[464] 그 결과, 대조 항체와 PD-1 변이체들에 대해 다른 결합 양상을 보이므로 다른 에피토프를 갖는 것을 확인할 수 있었다 (도 20).

[465]

[466] 실시예 10: PD1 모항체의 특이적 결합 (specific binding)

[467] PD1 모항체와 대조 항체 (Nivolumab)에 대해 PD1 항원 외에 다른 여러 항원(표 15)들과의 결합력을 보기 위해 정제된 90여 개의 불특정 항원들을 96 웰 면역-플레이트에 웰 당 100 ng씩을 4°C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 스킵 밀크를 사용하여 각 웰을 차단 (blocking)하였다. 각 웰마다 0.2 ml PBS/T 사용하여 씻어준 뒤 모항체 및 대조 항체를 각 웰에 100 ng씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 0.2 ml PBS/T를 사용하여 4번 씻어준 후 이차 항체인 anti-kappa-HRP를 1/1000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 0.2 ml PBS/T로 씻어준 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[468]

[469] [표 15]

|         |         |        |        |        |         |         |        |         |        |         |        |
|---------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| Fc      | GP1BA   | LRRN4  | TLR3   | LRTM1  | TPBG    | SEMA6A  | SEMA5A | SLITRK5 | EPYC   | LINGO1  | OGN    |
| OPTC    | RTN4RL1 | LRRC4C | LRRTM2 | TLR4   | TLR7    | TLR9    | LRRN1  | SLITRK2 | FZD10  | C2orf28 | SUSD1  |
| FSTL3   | SPOCK1  | CD209  | CD97   | SCARF1 | WIF1    | TNR     | EMR1   | SPARC   | DNER   | BAMBI   | FSTL1  |
| Kremen1 | CFC1    | TMEFF2 | NRG4   | SPOCK2 | CD40LG  | FASLG   | TNFSF4 | GREM1   | Fc     | LRP11   | LRP12  |
| APCDD1  | CHRD1   | DKK4   | DMP1   | LRP6   | TNFSF9  | TNFSF8  | TNF    | TNFSF12 | TMED1  | CD320   | SOST   |
| C18orf1 | OSTM1   | NBL1   | DKK3   | ECM1   | TNFSF18 | TNFSF13 | DKK1   | SELP    | HAPLN4 | ULBP1   | SPINT2 |
| PLXDC1  | PLXDC2  | PODXL  | CDCP1  | PI3    | WFDC2   | AGR2    | AGR3   | CREG1   | EVI2A  | RAET1E  | MICA   |
| CD86    | ICOSLG  | CD276  | PDCD1  | BTN2A1 | BTN3A2  | BTN3A1  | BTNL9  | BTN3A3  | BTN1A1 | Fc      | blank  |

[470]

[471] 그 결과, 대조 항체와 모항체 모두 불특정 항원에는 결합을 하지 않고 PD1 항원에만 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다 (도 21).

[472]

[473] 실시예 11: PD1 단일 클론 항체의 임시 발현 시스템에서의 생산성 비교

[474] 최적화된 항체를 임시발현시스템을 통해 생산, 정제시에 뛰어난 물성으로 인해 비교적 균일하면서도 높은 생산량을 가지는 것을 알 수 있다. 일부 항체는 기존에 상용화된 항체보다 높은 생산을 가지는 것을 알 수 있다(도 22).

[475]

[476] 실시예 12: PD1 단일 클론 항체의 이종 MLR (allogenic MLR) 반응에서의 활성 증가

[477] 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 45D6, 49A2의 모항체를 넣어준 것에서 농도에 의존적으로 인터페론 감마의 양이 증가함을 확인하였다 (도 23).

[478]

[479] 실시예 13: PD1 단일 클론 항체의 열 안정성 테스트

[480] 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 25°C에서 30초 반응 후, 99°C까지 1도씩

증가시키되 각 온도에 1분간 반응시키고 마지막 25°C 10초 반응을 시켜 마무리 하였다. 항체 구조가 풀리는 속도 상수로는 Tm (Melting temperature, 용융 온도)을 사용하였다. 그 결과는 아래 표 16과 같다.

[481]

[482] [표16]

| Sample        | Tm |
|---------------|----|
| Pembrolizumab | 63 |
| Opdivo        | 64 |
| 45D6          | 63 |
| 49A2          | 63 |
| 49A2-2B9      | 64 |

[483]

### 산업상 이용가능성

[484] 본 발명의 PD-1에 결합하는 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-1에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로 PD-1과 연관된 다양한 질환의 면역 치료제의 개발에 유용하다.

[485]

[486] 이상으로 본 발명 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.

[487]

### 서열목록 Free Text

[488] 전자파일 첨부하였음.

## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 30으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 31 내지 서열번호 56으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57 내지 서열번호 79로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 198 내지 서열번호 222로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 223 내지 서열번호 241로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 242 내지 서열번호 269로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,  
 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 59의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 60의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 61의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 2의 중쇄 CDR1, 서열번호 33의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 62의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 3의 중쇄 CDR1, 서열번호 34의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 63의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 4의 중쇄 CDR1, 서열번호 35의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 64의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 5의 중쇄 CDR1, 서열번호 36의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 65의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 6의 중쇄 CDR1, 서열번호 37의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 66의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,

서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 67의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 38의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 68의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 39의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 69의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 9의 중쇄 CDR1, 서열번호 40의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 70의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 10의 중쇄 CDR1, 서열번호 41의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 71의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 11의 중쇄 CDR1, 서열번호 42의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 72의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 12의 중쇄 CDR1, 서열번호 43의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 73의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 44의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 74의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 14의 중쇄 CDR1, 서열번호 45의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 75의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 15의 중쇄 CDR1, 서열번호 46의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 76의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 8의 중쇄 CDR1, 서열번호 47의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 77의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 16의 중쇄 CDR1, 서열번호 48의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 78의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 18의 중쇄 CDR1, 서열번호 50의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 19의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 20의 중쇄 CDR1, 서열번호 52의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 22의 중쇄 CDR1, 서열번호 53의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
서열번호 23의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,

서열번호 17의 중쇄 CDR1, 서열번호 54의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 24의 중쇄 CDR1, 서열번호 55의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 21의 중쇄 CDR1, 서열번호 51의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 58의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 25의 중쇄 CDR1, 서열번호 56의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 26의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 27의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 29의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 30의 중쇄 CDR1, 서열번호 31의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역,  
 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 79의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 또는  
 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 57의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

[청구항 3]

제 1항에 있어서,  
 서열번호 198의 경쇄 CDR1, 서열번호 223의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 242의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 199의 경쇄 CDR1, 서열번호 224의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 243의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 200의 경쇄 CDR1, 서열번호 225의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 244의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 201의 경쇄 CDR1, 서열번호 226의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 245의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 202의 경쇄 CDR1, 서열번호 227의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 246의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 203의 경쇄 CDR1, 서열번호 228의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 247의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 204의 경쇄 CDR1, 서열번호 229의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 248의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 206의 경쇄 CDR1, 서열번호 231의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 250의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 207의 경쇄 CDR1, 서열번호 232의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 251의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 208의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 209의 경쇄 CDR1, 서열번호 233의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 253의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 210의 경쇄 CDR1, 서열번호 234의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 254의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 211의 경쇄 CDR1, 서열번호 235의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 255의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 212의 경쇄 CDR1, 서열번호 236의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 256의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 213의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 257의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 214의 경쇄 CDR1, 서열번호 237의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 258의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 249의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 211의 경쇄 CDR1, 서열번호 238의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 259의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 216의 경쇄 CDR1, 서열번호 238의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 260의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 217의 경쇄 CDR1, 서열번호 239의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 261의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 218의 경쇄 CDR1, 서열번호 240의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 262의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 219의 경쇄 CDR1, 서열번호 241의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 263의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 215의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 264의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 265의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 221의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 266의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 252의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 205의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 257의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 267의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,  
 서열번호 222의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 268의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는  
 서열번호 220의 경쇄 CDR1, 서열번호 230의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 269의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 서열번호 80 내지 서열번호 95로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR1,  
 서열번호 96 내지 서열번호 113으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR2,  
 서열번호 114 내지 서열번호 134로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR3, 또는  
 서열번호 135 내지 서열번호 145로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 FR4를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 서열번호 270 내지 서열번호 294로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR1,  
 서열번호 295 내지 서열번호 315로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR2,  
 서열번호 316 내지 서열번호 355로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR3, 또는  
 서열번호 356 내지 서열번호 367로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역 FR4를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 서열번호 146 내지 서열번호 193으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 서열번호 368 내지 서열번호 420으로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는

- 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 9] 제 8항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 10] 제 9항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 11] 다음 단계를 포함하는 PD-1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법:  
 (a) 제 10항의 세포를 배양하는 단계; 및  
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [청구항 12] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 폐암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

[도1]

(A)

PD1-hFc

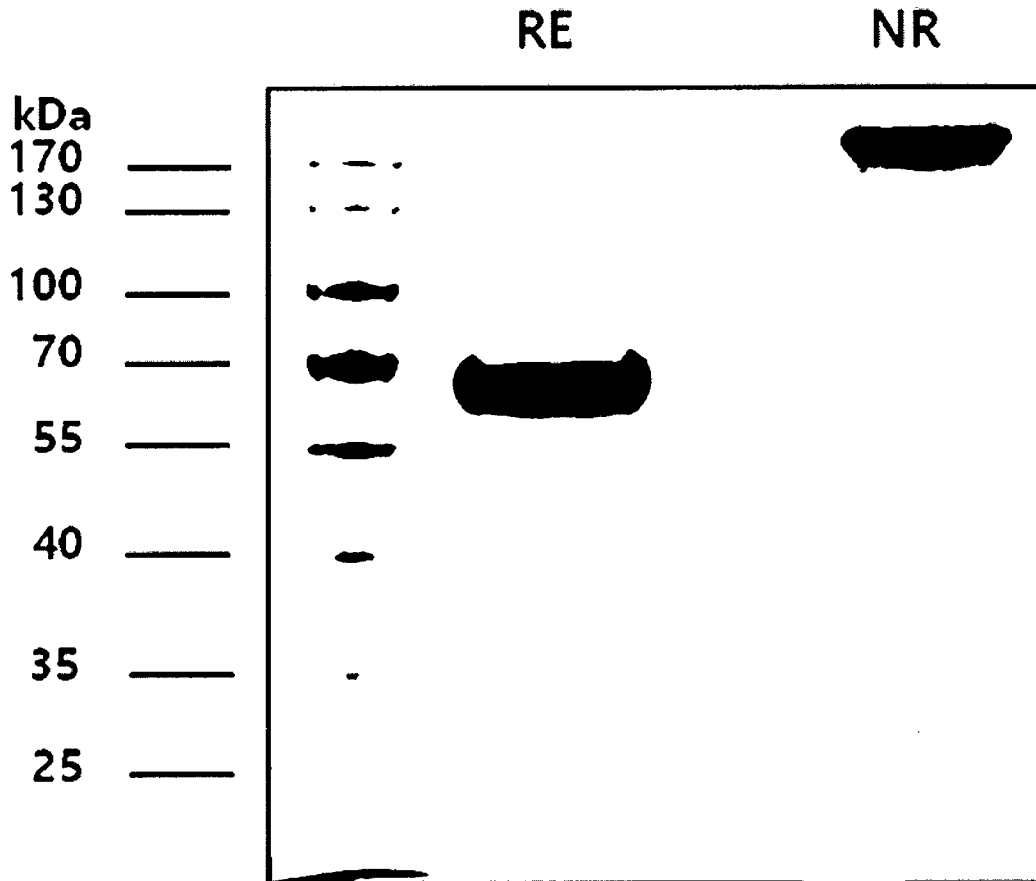


(B)

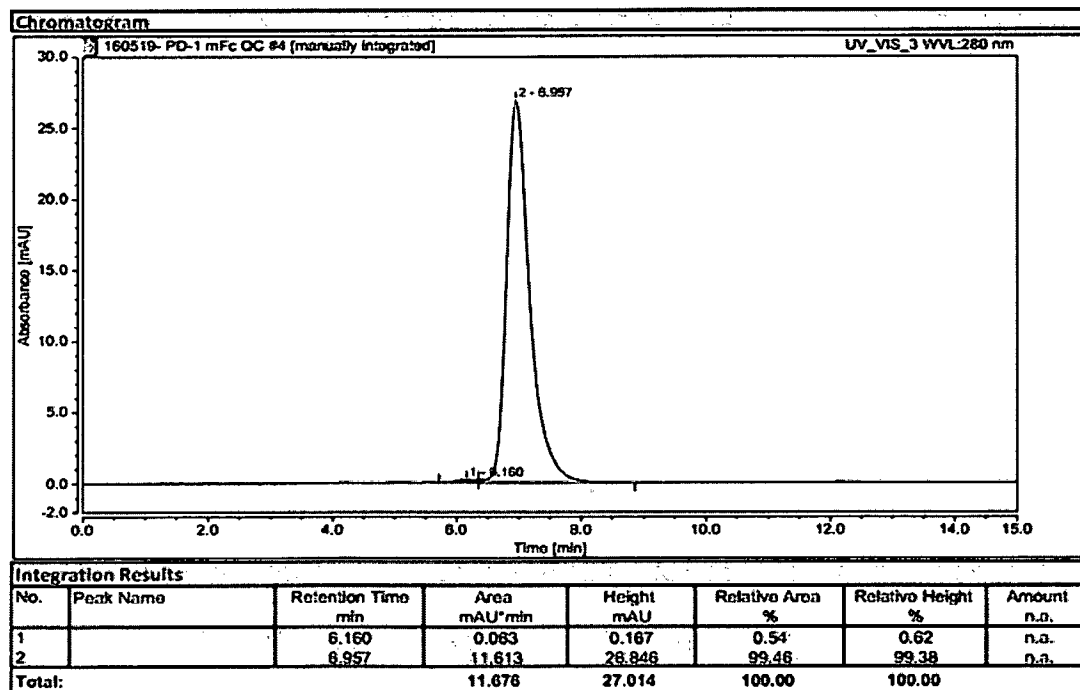
PD1-mFc



[도2a]



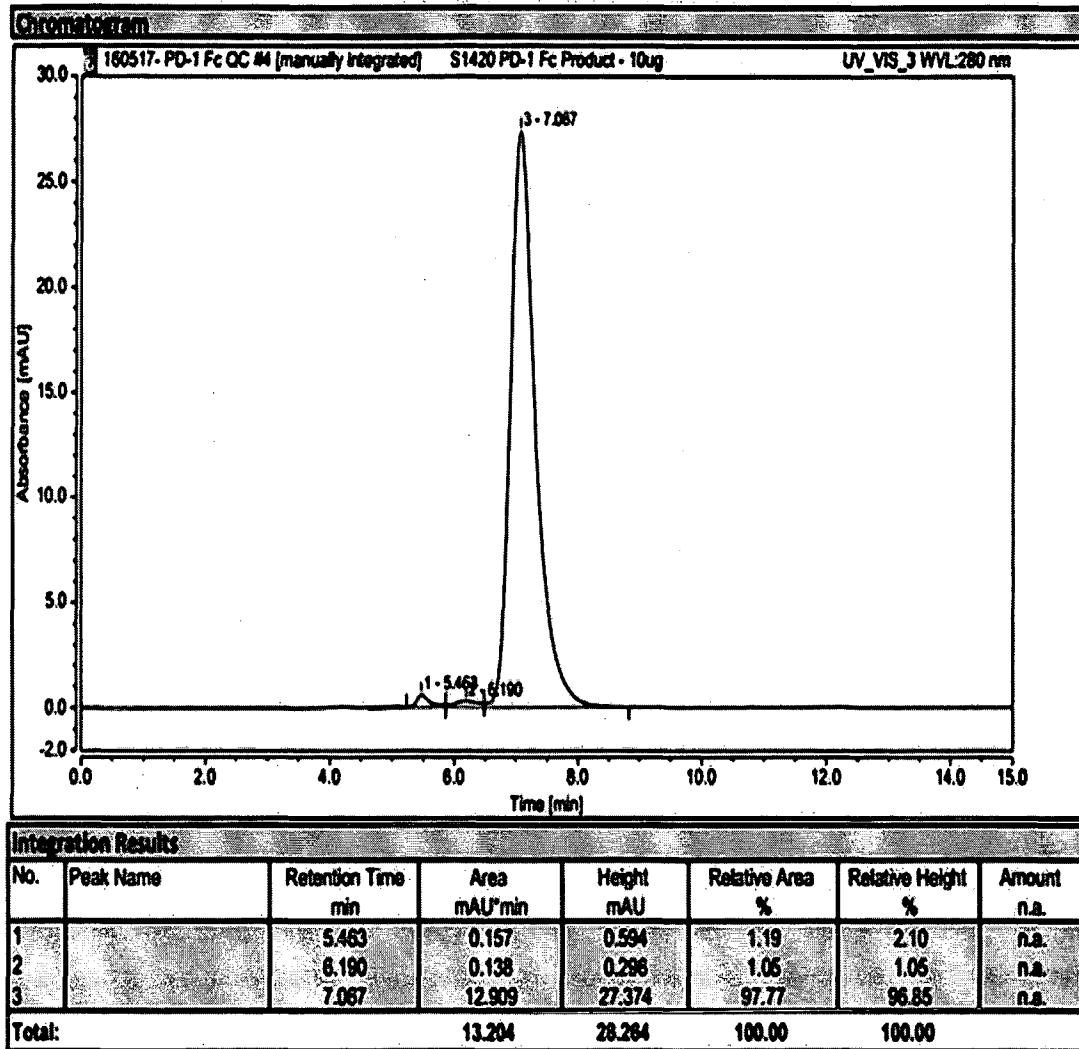
[도2b]



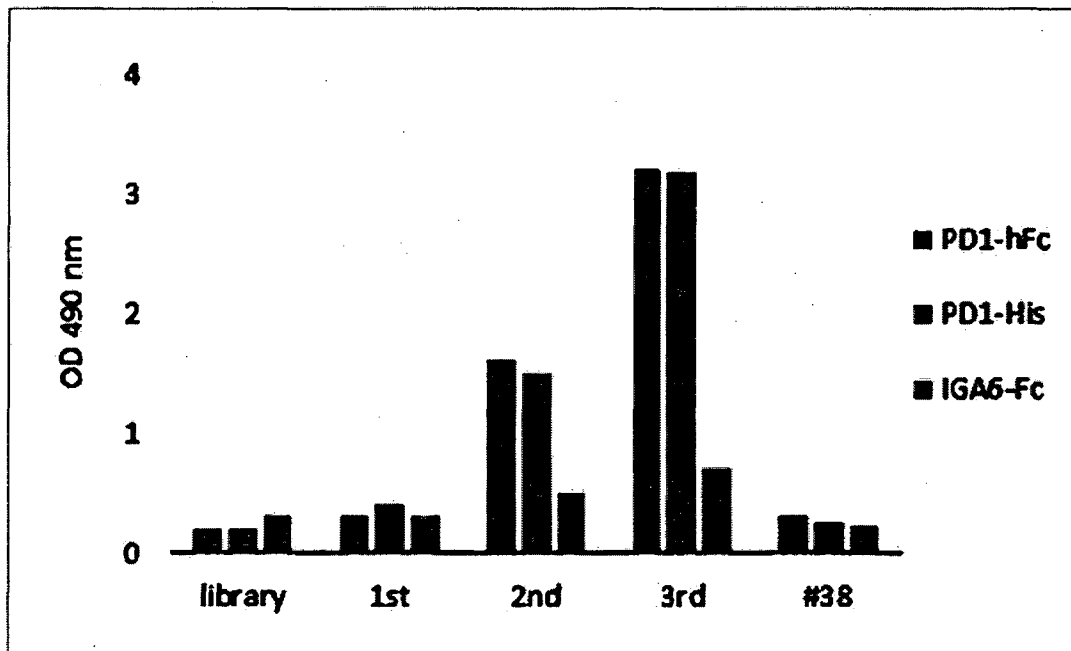
[도2c]



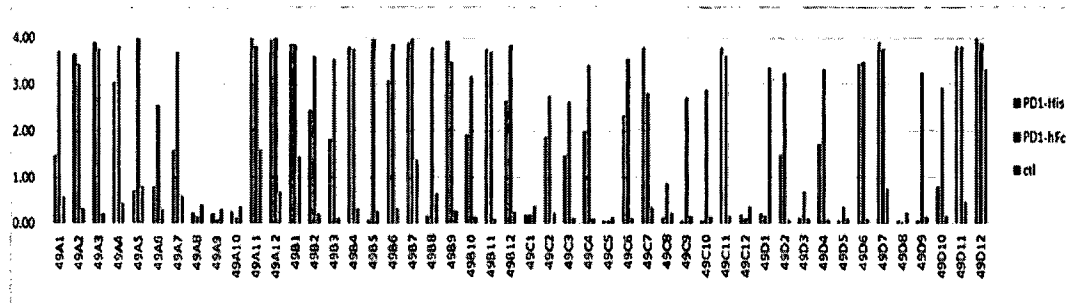
[도2d]



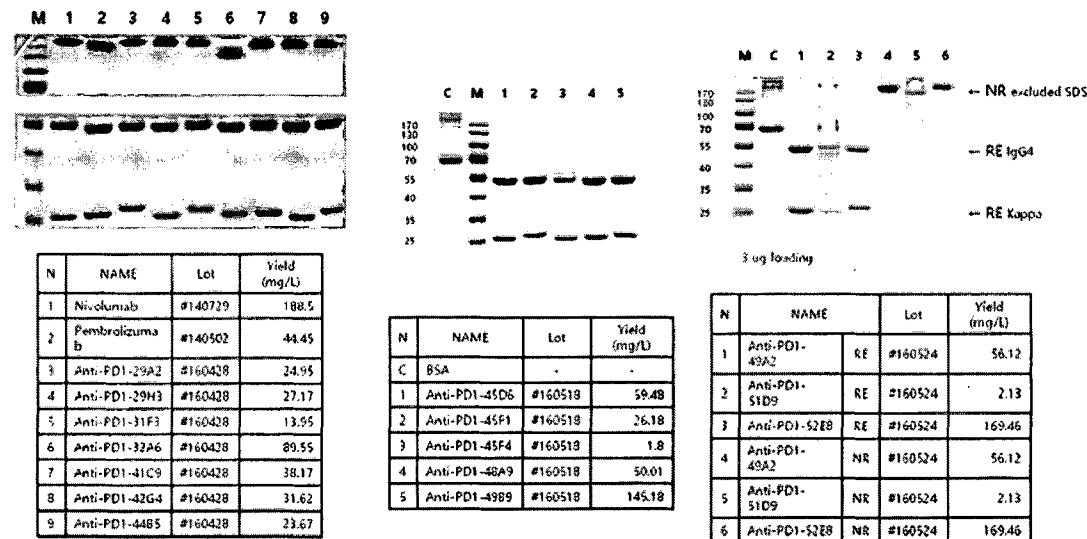
[도3]



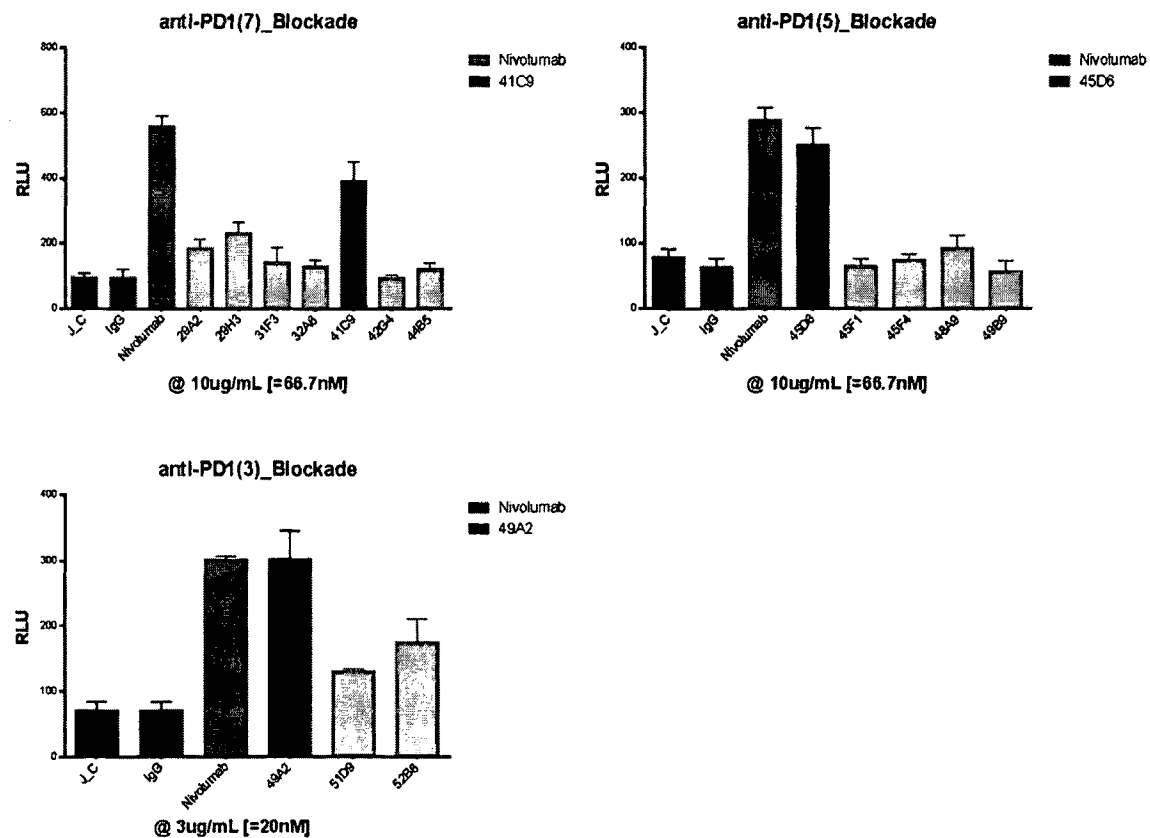
[도4]



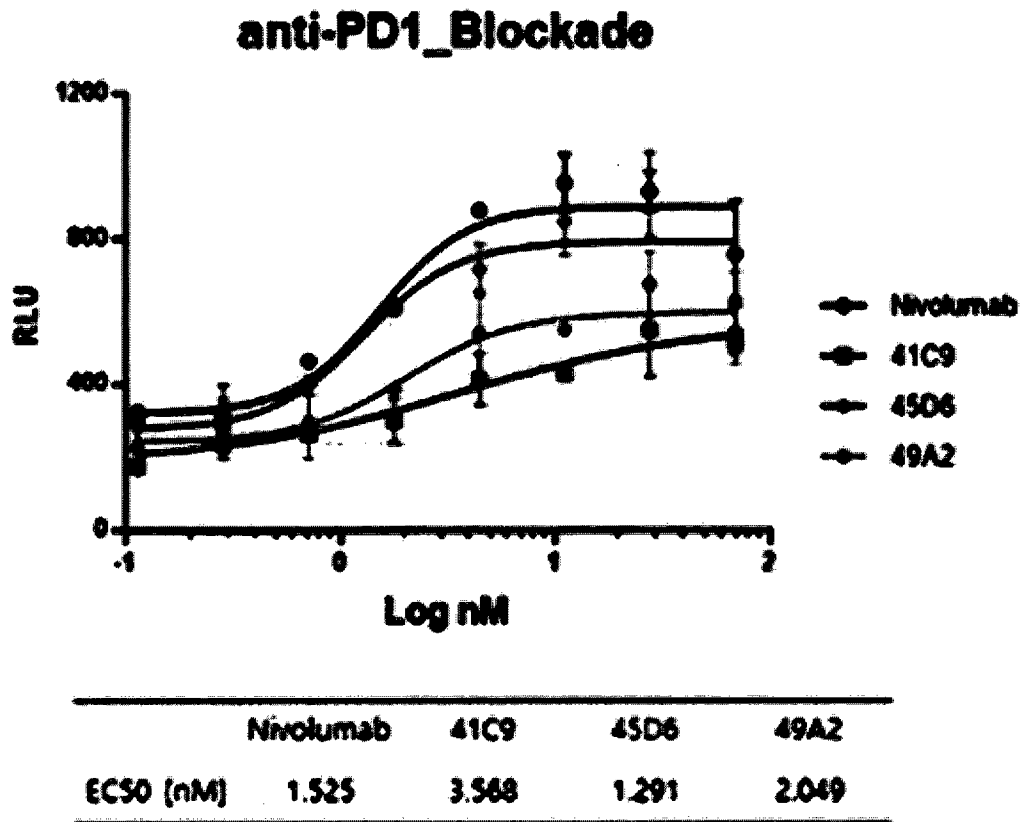
[도5]



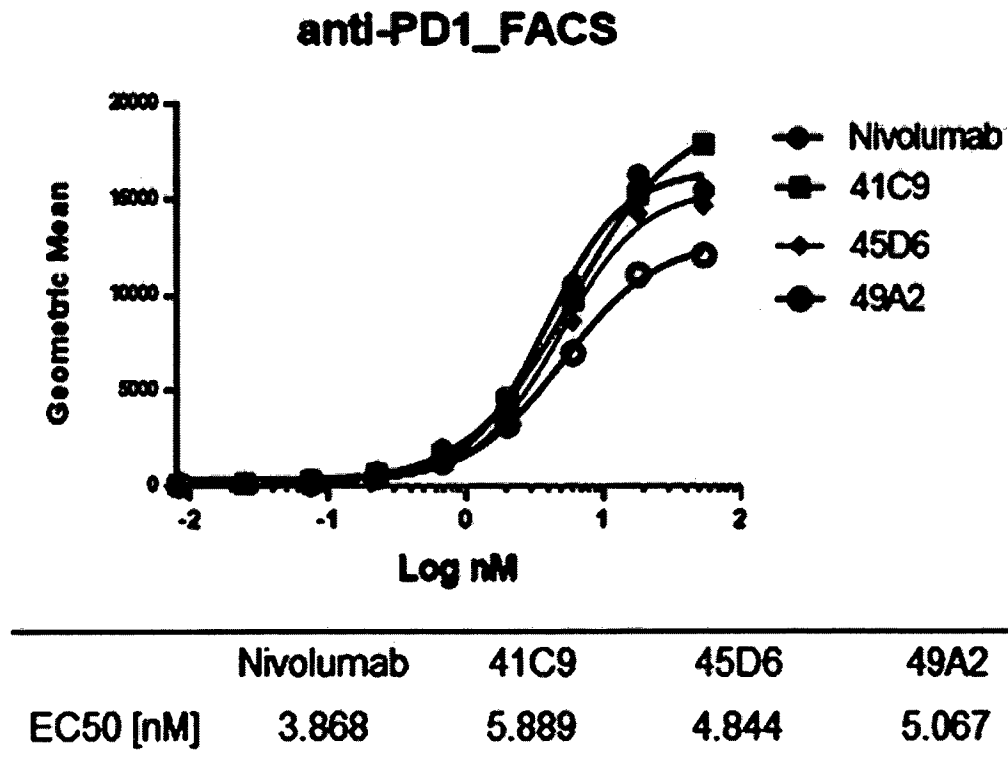
[도6]



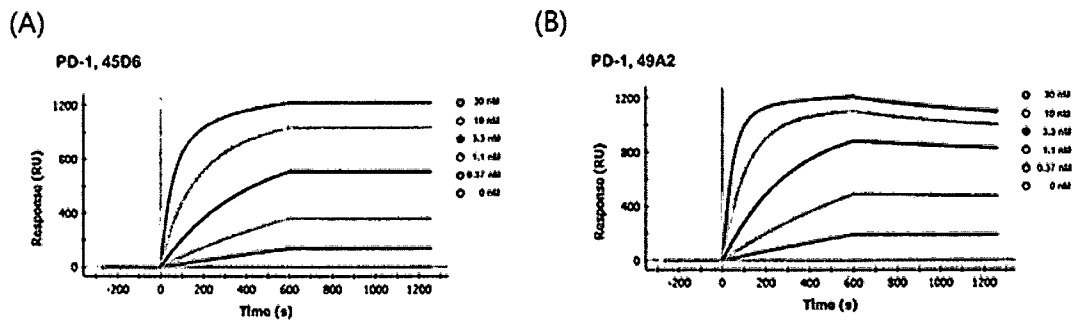
[도7]



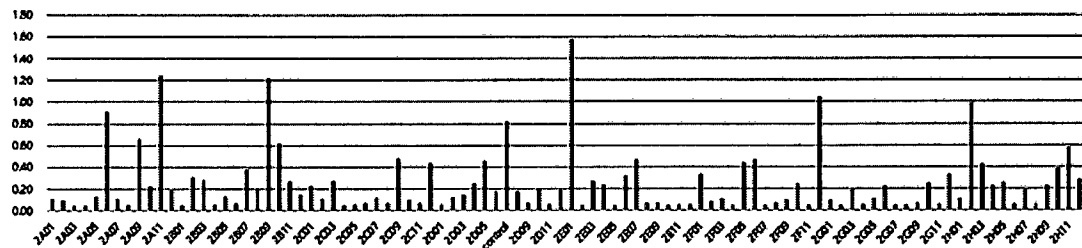
[도8]



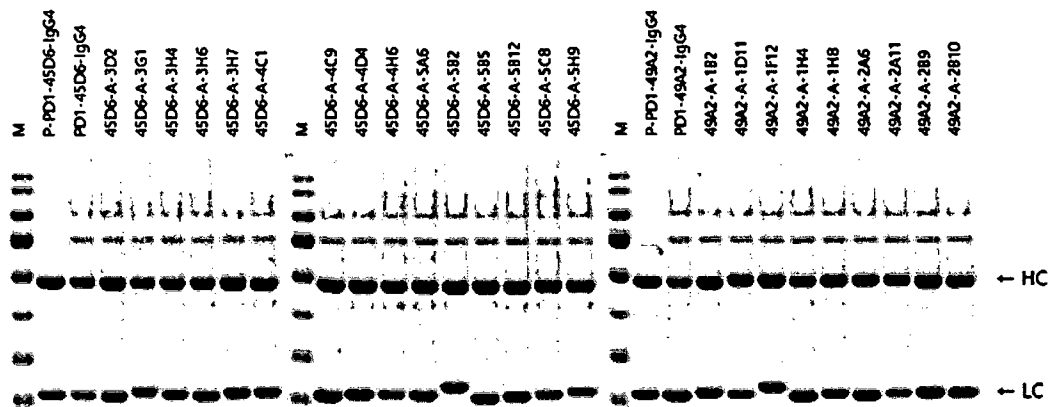
[도9]



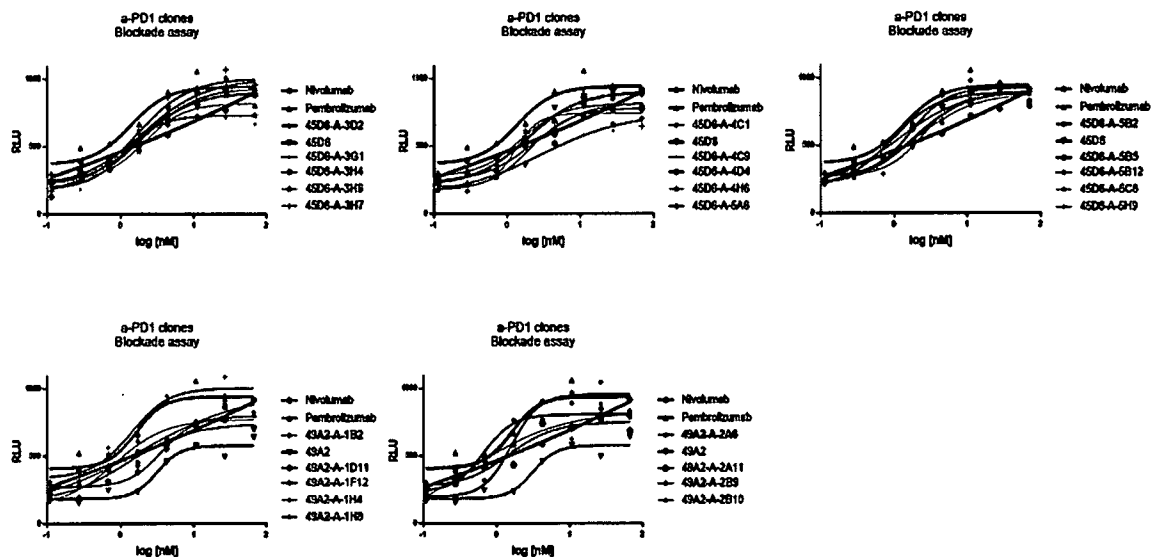
[도10]



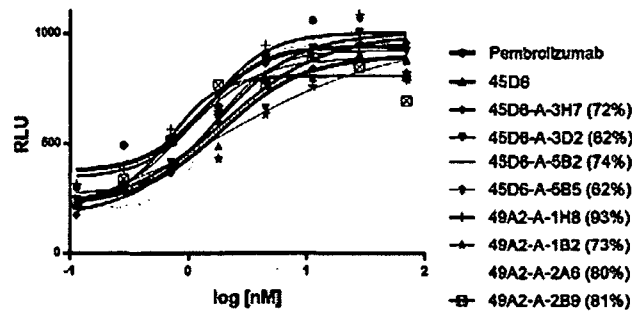
[도11]



[도12]

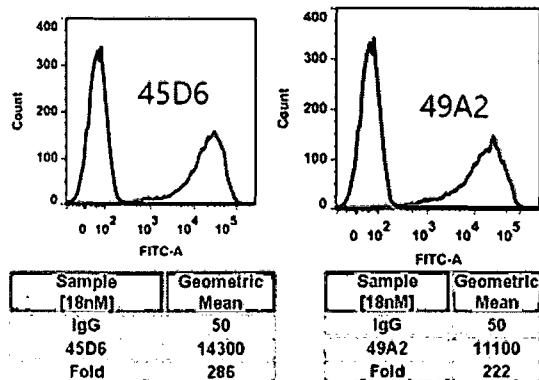


[도13]

 $\alpha$ -PD1 clones Blockade assay

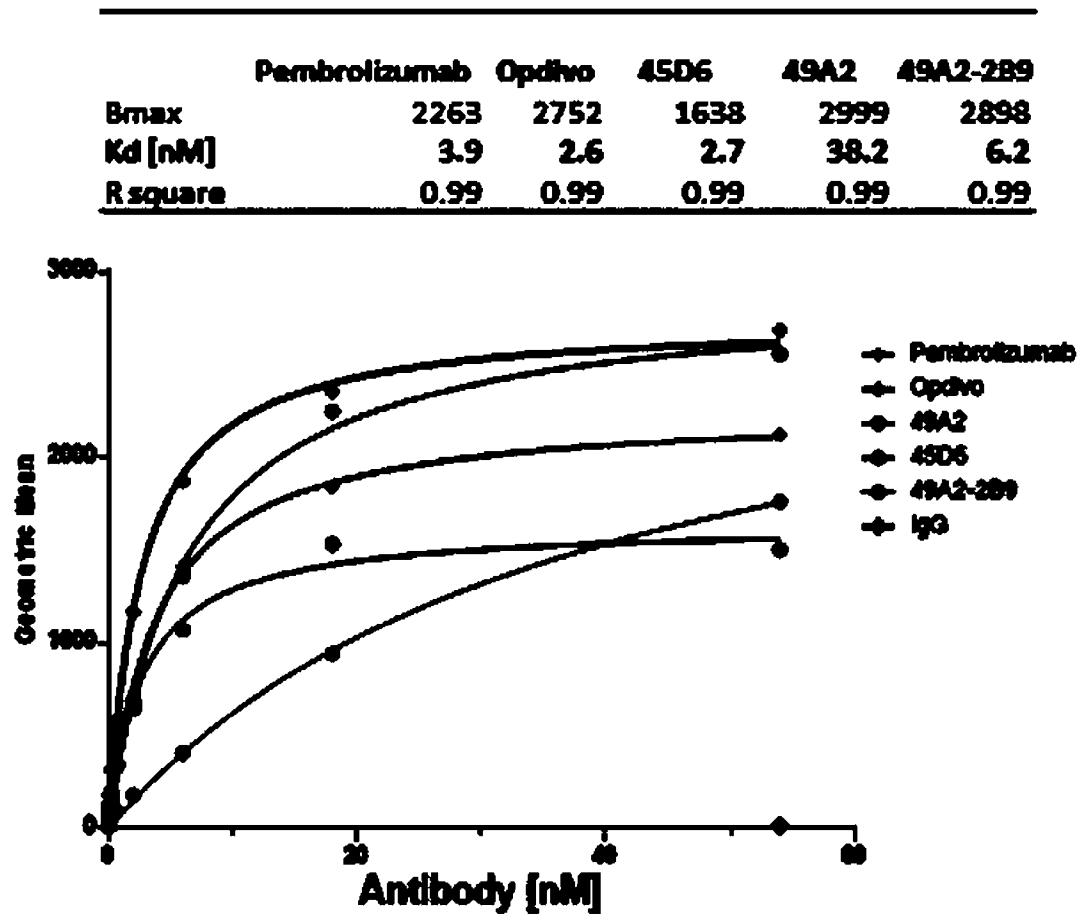
|              | Pembrolizumab | 45D6   | 45D6-A-3D2 | 45D6-A-3H7 | 45D6-A-5B2 | 45D6-A-5B5 | 49A2-A-1B2 | 49A2-A-1H8 | 49A2-A-2A6 | 49A2-A-2B9 |
|--------------|---------------|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Bottom       | 370.3         | 218.1  | 198        | 187.1      | 270.5      | 183.6      | 121.5      | 341.3      | 188.8      | 236.6      |
| Top          | 843.9         | 800.7  | 1002       | 1006       | 925.8      | 891.3      | 988.9      | 1008       | 957.3      | 807.4      |
| EC50         | 1.387         | 1.878  | 2.005      | 1.835      | 1.68       | 0.9084     | 2.033      | 1.454      | 1.689      | 0.8888     |
| R square     | 0.8881        | 0.9796 | 0.9687     | 0.9702     | 0.9556     | 0.9583     | 0.928      | 0.8804     | 0.9708     | 0.9406     |
| productivity |               |        | 100.3      | 141        | 124.8      | 144.6      | 108.3      | 67.3       | 3.8        | 128        |

[도14]

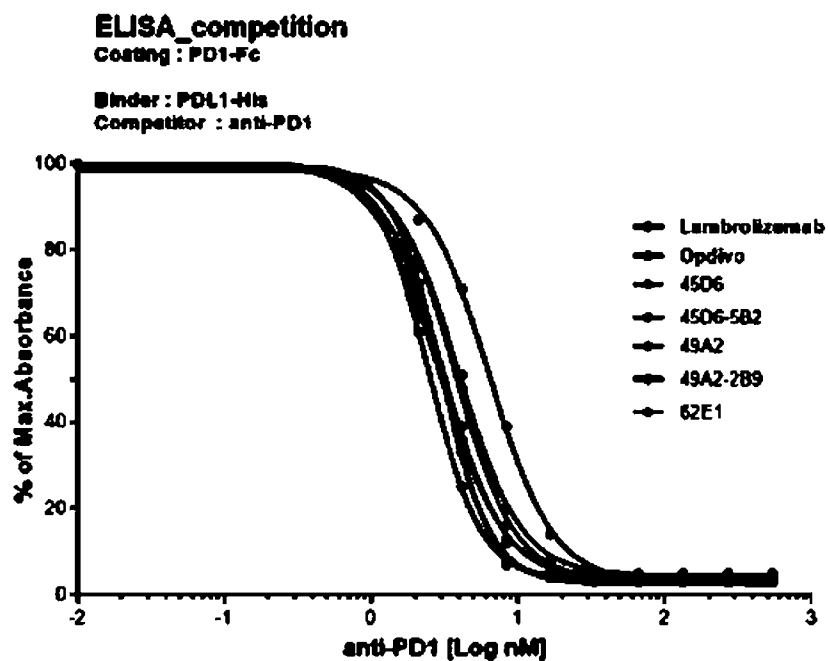


| antibody       | Binding at 2 ~ 10 ug/ml          |
|----------------|----------------------------------|
|                | Yes(Y)/No(N)/not determined (nd) |
| PD1-29A2       | Y                                |
| PD1-29H3       | Y                                |
| PD1-31F3       | Y                                |
| PD1-32A6       | N                                |
| PD1-42G4       | Y                                |
| PD1-44B5       | Y                                |
| PD1-45D6       | Y                                |
| PD1-45D6-A-3D2 | nd                               |
| PD1-45D6-A-3H7 | nd                               |
| PD1-45D6-A-5B2 | nd                               |
| PD1-45D6-A-5B5 | nd                               |
| PD1-45F1       | N                                |
| PD1-45F4       | N                                |
| PD1-48A9       | Y                                |
| PD1-49A2       | Y                                |
| PD1-49A2-A-1B2 | nd                               |
| PD1-49A2-A-1H8 | nd                               |
| PD1-49A2-A-2B9 | Y                                |
| PD1-49B9       | N                                |
| PD1-51D9       | Y                                |
| PD1-52E8       | Y                                |
| PD1-72D10      | Y                                |
| PD1-74A11      | Y                                |
| PD1-75C10      | Y                                |
| PD1-74A01      | Y                                |
| PD1-74H12      | Y                                |

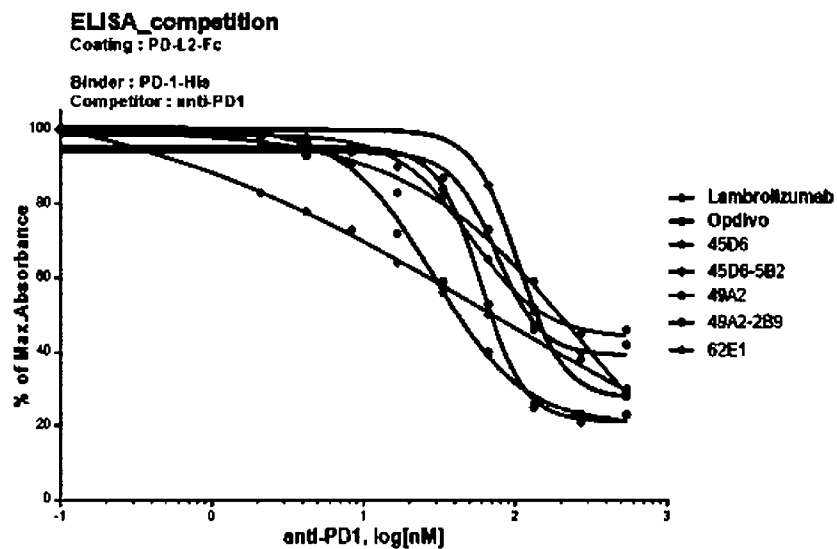
[도15]



[도16]



|           | Lambrolizumab | Opdivo | 45D6 | 45D6-5B2 | 49A2 | 49A2-2B9 | 62E1 |
|-----------|---------------|--------|------|----------|------|----------|------|
| IC50 [nM] | 3.01          | 2.46   | 3.72 | 3.09     | 3.92 | 6.38     | 2.89 |
| R square  | 1.00          | 1.00   | 1.00 | 1.00     | 1.00 | 1.00     | 1.00 |



|           | Lambrolizumab | Opdivo | 45D6 | 45D6-5B2 | 49A2 | 49A2-2B9 | 62E1  |
|-----------|---------------|--------|------|----------|------|----------|-------|
| IC50 [nM] | 104.7         | 28.5   | 49.6 | 75.4     | 59.7 | 59.0     | 314.2 |
| R square  | 1.00          | 0.99   | 1.00 | 0.99     | 1.00 | 0.99     | 0.99  |

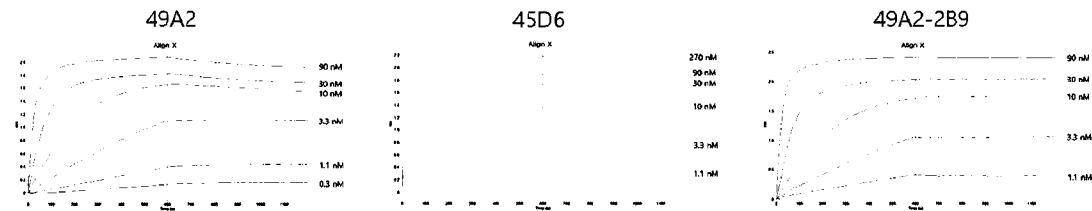
[도17]

| Analyte Immobilize | PD1-49A2 | PD1-45D6 | PD1-49A2-2B9 |
|--------------------|----------|----------|--------------|
|--------------------|----------|----------|--------------|

PD-1 C-his  $K_{on}$  (1/Ms) :  $3.953 \times 10^5$   $K_{dis}$  (1/s) :  $9.372 \times 10^{-5}$   $K_D$  (M) :  $2.371 \times 10^{-10}$

$K_{on}$  (1/Ms) :  $2.701 \times 10^5$   $K_{dis}$  (1/s) :  $<1.07 \times 10^{-7}$   $K_D$  (M) :  $<1.0 \times 10^{-12}$

$K_{on}$  (1/Ms) :  $3.774 \times 10^5$   $K_{dis}$  (1/s) :  $<1.0 \times 10^{-7}$   $K_D$  (M) :  $<1.0 \times 10^{-12}$



[도18]

hPD-1  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M1-1  
 SALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M1-2  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M1  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M2-1  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M2-2  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M3  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M4  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M11  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M5  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M5-1  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M5-2  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M6  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M12  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M13  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M14  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M7-1  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M7-2  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M7  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M8  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M9  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG  
 M10  
 PD1LQSPDRPNPTTSALLVVTGGNATFTCSFNTSESEVLNWRMSPNQDTKLAAPFEDRSQPGQDCRRVVTQLNGRDFHISVVRARNDSGTYLQAI SLAPKAQIKESLRABLVTERRAEVPTAHPSDEPRAGQFQTLVVG/VG

\* Mutated Amino acid marked with Red

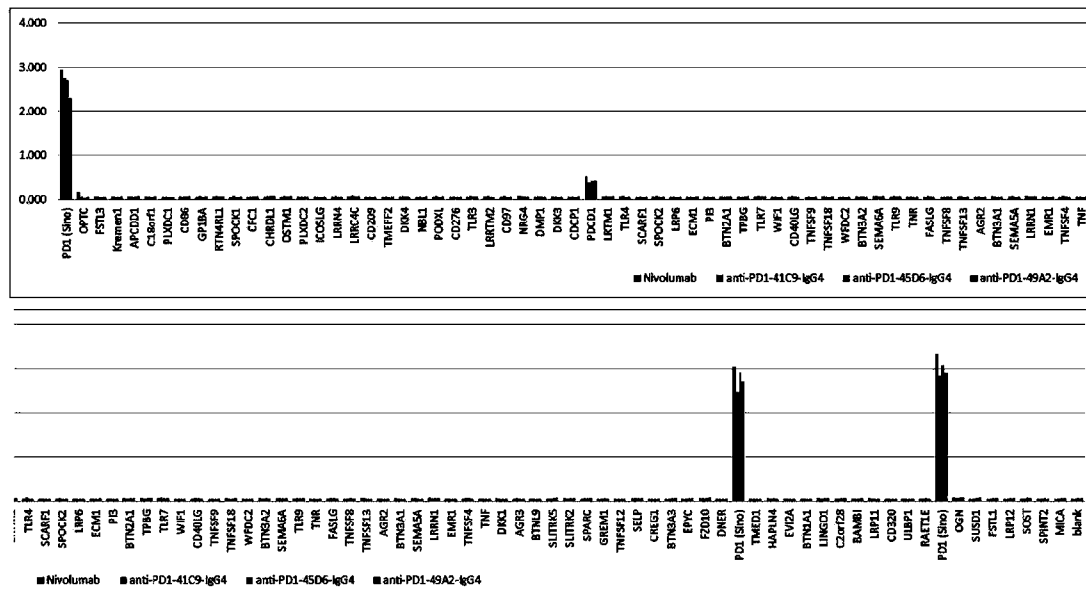
[도19]

|           | WT  | M1  | M1-1 | M1-2 | M2  | M2-1 | M2-2 | M3  | M4  | M11 | M5  | M5-1 | M5-2 | M6  | M12 | M13 | M14 | M7  | M7-1 | M7-2 | M8  | M9  | M10 | ITGA6- |
|-----------|-----|-----|------|------|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|--------|
| PD1-FC    | 3.9 | 3.9 | 3.8  | 3.9  | 0.4 | 3.9  | 3.9  | 3.9 | 3.9 | 4.0 | 1.4 | 0.4  | 3.8  | 4.0 | 4.0 | 3.9 | 4.0 | 3.9 | 3.9  | 3.9  | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 0.3    |
| Nivolumab | 3.3 | 3.3 | 3.3  | 2.5  | 0.1 | 3.3  | 3.4  | 3.4 | 3.4 | 2.3 | 3.2 | 3.2  | 3.5  | 3.2 | 3.0 | 3.3 | 3.3 | 3.1 | 3.3  | 3.2  | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 0.3    |
| Pembroliz | 3.3 | 2.8 | 2.8  | 3.1  | 0.1 | 3.1  | 2.8  | 2.3 | 3.0 | 0.3 | 1.1 | 0.1  | 3.5  | 3.1 | 2.9 | 3.2 | 2.7 | 2.6 | 2.8  | 2.9  | 2.8 | 2.5 | 2.5 | 0.1    |
| 29A2      | 2.2 | 2.7 | 2.7  | 3.2  | 0.6 | 3.2  | 3.1  | 1.7 | 2.8 | 0.8 | 1.6 | 1.9  | 3.3  | 3.4 | 3.0 | 3.4 | 3.4 | 1.1 | 1.4  | 3.3  | 3.9 | 3.2 | 2.8 | 0.4    |
| 29H3      | 3.6 | 1.5 | 3.2  | 0.6  | 0.7 | 2.8  | 3.2  | 2.3 | 3.3 | 1.0 | 2.0 | 2.0  | 3.7  | 3.5 | 3.0 | 3.5 | 3.5 | 1.4 | 1.5  | 3.1  | 2.2 | 3.4 | 3.3 | 0.3    |
| 31F3      | 2.0 | 3.0 | 3.0  | 3.2  | 0.7 | 3.5  | 3.3  | 1.9 | 2.7 | 0.8 | 1.1 | 1.3  | 3.4  | 3.3 | 2.6 | 3.3 | 3.4 | 0.7 | 0.8  | 1.5  | 1.7 | 3.2 | 3.3 | 0.4    |
| 32A6      | 3.5 | 2.4 | 2.6  | 2.8  | 3.2 | 2.8  | 2.7  | 3.0 | 2.4 | 3.3 | 2.9 | 3.6  | 2.8  | 2.9 | 2.7 | 0.5 | 1.7 | 3.2 | 3.3  | 2.8  | 3.1 | 2.4 | 2.5 | 0.3    |
| 41C9      | 3.2 | 3.4 | 3.1  | 3.4  | 0.8 | 3.4  | 3.2  | 2.3 | 3.2 | 0.9 | 2.3 | 2.8  | 3.6  | 3.6 | 3.1 | 3.6 | 3.5 | 0.8 | 1.2  | 3.0  | 2.5 | 3.3 | 3.4 | 0.5    |
| 42G4      | 2.8 | 1.8 | 2.9  | 0.6  | 0.5 | 0.6  | 3.0  | 2.0 | 1.9 | 1.7 | 1.6 | 1.9  | 3.5  | 3.3 | 2.7 | 3.7 | 3.7 | 2.5 | 2.9  | 2.7  | 2.1 | 3.4 | 3.1 | 0.4    |
| 44B5      | 3.8 | 3.8 | 3.6  | 0.3  | 3.7 | 3.6  | 3.7  | 3.7 | 3.6 | 3.8 | 3.7 | 3.7  | 3.8  | 3.7 | 3.6 | 3.7 | 3.7 | 3.6 | 3.7  | 3.7  | 3.5 | 3.7 | 3.7 | 0.3    |
| 45D6      | 3.8 | 4.0 | 3.8  | 3.9  | 0.4 | 3.9  | 3.8  | 3.8 | 3.9 | 0.7 | 3.6 | 3.8  | 3.9  | 3.9 | 3.9 | 4.0 | 3.9 | 0.5 | 1.3  | 4.0  | 3.8 | 3.8 | 3.9 | 0.5    |
| 45F1      | 4.0 | 3.9 | 3.9  | 3.8  | 3.9 | 4.0  | 3.8  | 3.9 | 3.8 | 3.8 | 3.9 | 3.9  | 4.0  | 0.4 | 2.2 | 3.8 | 3.8 | 3.9 | 3.9  | 3.9  | 3.9 | 3.8 | 3.8 | 0.1    |
| 45F4      | 3.8 | 2.6 | 2.5  | 3.6  | 2.9 | 3.0  | 2.5  | 3.7 | 2.7 | 0.3 | 0.1 | 0.1  | 3.1  | 3.7 | 3.7 | 3.5 | 1.8 | 3.5 | 3.5  | 3.4  | 3.6 | 3.3 | 3.3 | 0.1    |
| 48A9      | 3.1 | 3.7 | 3.8  | 3.9  | 0.3 | 3.8  | 3.9  | 2.0 | 3.9 | 0.3 | 1.3 | 0.6  | 3.9  | 3.9 | 3.9 | 4.0 | 4.0 | 0.3 | 0.4  | 0.4  | 1.7 | 3.9 | 3.8 | 0.3    |
| 49B9      | 3.9 | 3.9 | 3.8  | 3.9  | 3.9 | 3.8  | 3.9  | 3.9 | 3.8 | 1.4 | 3.9 | 3.9  | 4.0  | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9  | 3.9  | 4.0 | 3.9 | 3.9 | 0.3    |
| 49A2      | 3.6 | 3.0 | 3.4  | 3.8  | 0.3 | 3.7  | 3.8  | 3.4 | 3.9 | 0.4 | 1.2 | 0.7  | 3.8  | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 0.4 | 0.5  | 2.2  | 3.0 | 3.7 | 2.6 | 0.2    |
| 51D9      | 0.1 | 0.2 | 0.2  | 0.4  | 0.1 | 0.4  | 0.6  | 0.3 | 1.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1  | 0.6  | 0.3 | 0.3 | 0.7 | 0.8 | 0.1 | 0.1  | 0.3  | 0.1 | 0.3 | 0.1 | 0.1    |
| 52E8      | 0.4 | 1.4 | 1.5  | 3.6  | 0.2 | 2.9  | 3.4  | 1.5 | 3.7 | 0.2 | 0.5 | 0.3  | 3.5  | 3.4 | 3.2 | 3.9 | 2.6 | 1.0 | 1.1  | 3.9  | 0.6 | 2.4 | 1.0 | 0.1    |

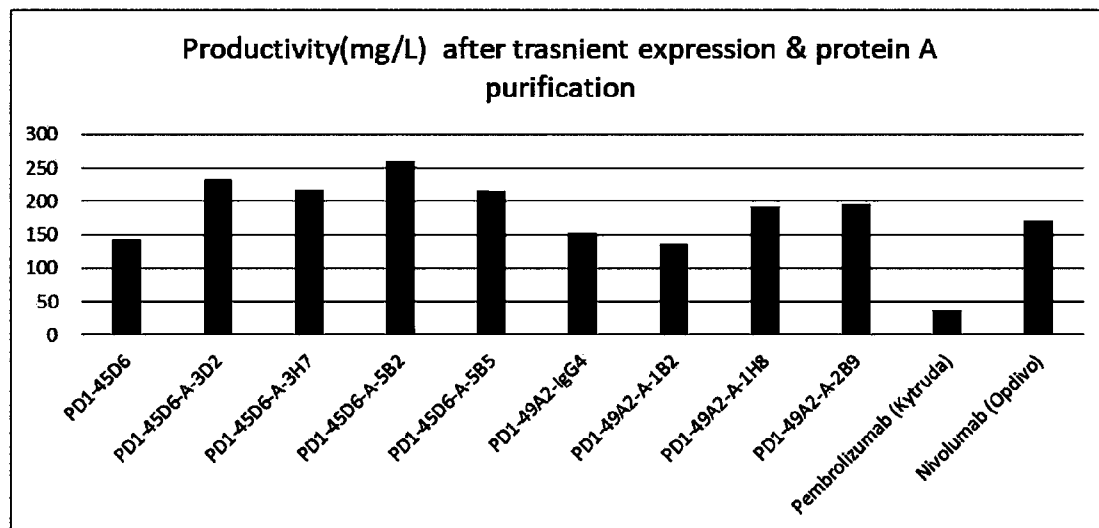
[도20]

|               | PD1-FC | M1    | M1-1  | M1-2  | M2    | M2-1  | M2-2  | M3    | M4    | M11   | M5    | M5-1  | M5-2  | M6    | M12   | M13   | M14   | M7    | M7-1  | M7-2  | M8    | M9    | M10   | ITGA6- |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| PD1-FC        | 3.9    | 3.9   | 3.8   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 4.0   | 1.4   | 0.4   | 3.8   | 4.0   | 4.0   | 3.9   | 4.0   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 0.3    |
| M1            | 3.1    | 3.1   | 3.6   | 3.6   | 2.5   | 3.5   | 3.5   | 3.5   | 3.5   | 1.7   | 2.4   | 2.7   | 3.7   | 3.6   | 3.5   | 3.5   | 3.6   | 3.4   | 3.4   | 3.2   | 3.2   | 3.2   | 3.0   | 0.1    |
| Nivolumab     | 3.3    | 3.9   | 3.8   | 3.8   | 2.5   | 3.3   | 3.4   | 3.4   | 3.4   | 2.3   | 3.2   | 3.2   | 3.5   | 3.2   | 3.0   | 3.3   | 3.3   | 3.1   | 3.3   | 3.2   | 3.3   | 3.3   | 3.3   | 0.3    |
| Pembrolizumab | 3.3    | 2.8   | 2.8   | 3.1   | 0.1   | 3.1   | 2.8   | 2.3   | 3.0   | 0.3   | 1.1   | 0.1   | 3.5   | 3.1   | 2.9   | 3.2   | 2.7   | 2.6   | 2.8   | 2.9   | 2.8   | 2.5   | 2.5   | 0.1    |
| 29A2          | 3.2    | 4.0   | 3.2   | 3.1   | 3.2   | 3.4   | 3.2   | 2.3   | 3.2   | 0.9   | 2.3   | 2.8   | 3.6   | 3.6   | 3.1   | 3.6   | 3.5   | 0.8   | 1.2   | 3.0   | 2.5   | 3.3   | 3.4   | 0.5    |
| 29H3          | 3.6    | 3.8   | 3.8   | 4.0   | 3.8   | 3.9   | 3.9   | 3.8   | 3.8   | 3.9   | 0.7   | 3.8   | 3.8   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 4.0   | 3.9   | 0.5   | 1.3   | 4.0   | 3.8   | 3.8   | 0.5    |
| 31F3          | 3.6    | 3.9   | 3.0   | 3.4   | 3.8   | 3.7   | 3.8   | 3.4   | 3.9   | 0.4   | 1.2   | 0.7   | 3.8   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 3.9   | 0.4   | 0.5   | 2.2   | 3.0   | 3.7   | 2.6   | 0.2    |
| 32A6          | 0.4    | 3.7   | 1.4   | 1.5   | 3.6   | 2.9   | 3.4   | 1.5   | 3.7   | 0.2   | 0.5   | 0.3   | 3.5   | 3.4   | 3.2   | 3.9   | 2.6   | 1.0   | 1.1   | 3.9   | 0.6   | 2.4   | 1.0   | 0.1    |
| 41C9          | 0.084  | 2.575 | 2.449 | 2.403 | 2.258 | 2.081 | 2.256 | 2.094 | 2.185 | 0.446 | 2.313 | 2.242 | 2.695 | 2.314 | 2.492 | 2.300 | 2.333 | 0.238 | 1.892 | 3.237 | 2.522 | 2.667 | 2.741 | 0.124  |
| 49A2-2B9      | 0.067  | 2.300 | 1.906 | 1.975 | 2.284 | 2.254 | 2.232 | 1.982 | 2.128 | 0.413 | 2.015 | 1.945 | 2.282 | 2.224 | 2.266 | 2.065 | 2.051 | 0.083 | 1.808 | 2.833 | 2.520 | 2.650 | 2.433 | 0.100  |

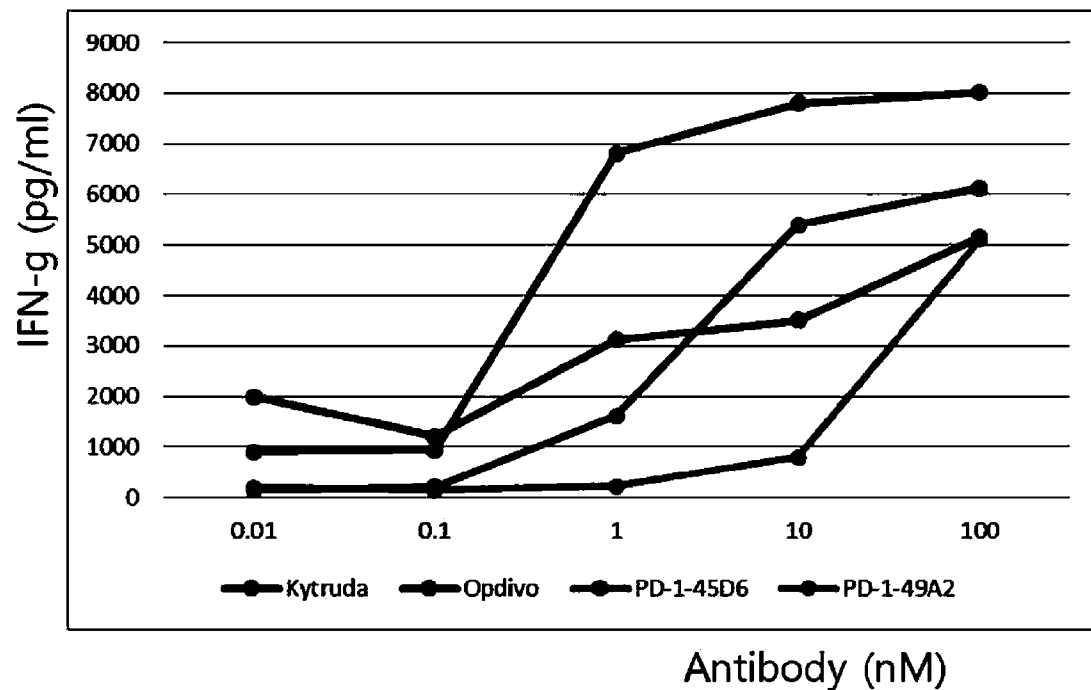
[도21]



[도22]



[도23]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008494

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/395(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 45/06; C07K 16/46; C12N 15/13; G01N 33/68; C07K 16/30; A61K 39/395

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) &amp; Keywords: PD-I antibody, cancer 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 2014-0294852 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 02 October 2014<br>See abstract; claim 1; and paragraphs [0009], [0016], [0131]-[0133], [0470]-[0471]. | 1-13                  |
| X         | WO 2016-015685 A1 (LIVZON MABPHARM INC.) 04 February 2016<br>See abstract; and claims 1-13.                                                                     | 1-13                  |
| X         | US 2016-0222113 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 04 August 2016<br>See abstract; and claims 1-15.                                                                         | 1-13                  |
| X         | US 2015-0203579 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 23 July 2015<br>See abstract; and claims 57-82.                                                            | 1-13                  |
| X         | CN 105566496 A (DAQING DZM BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 11 May 2016<br>See abstract; and claims 1-11.                                                               | 1-13                  |



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

10 NOVEMBER 2017 (10.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-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/KR2017/008494**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| US 2014-0294852 A1                        | 02/10/2014          | AU 2006-244885 A1       | 16/11/2006          |
|                                           |                     | AU 2006-244885 B2       | 31/03/2011          |
|                                           |                     | CA 2607147 A1           | 16/11/2006          |
|                                           |                     | CA 2970873 A1           | 16/11/2006          |
|                                           |                     | CN 101213297 A          | 02/07/2008          |
|                                           |                     | CN 101213297 B          | 13/02/2013          |
|                                           |                     | CN 103059138 A          | 24/04/2013          |
|                                           |                     | CN 103059138 B          | 28/10/2015          |
|                                           |                     | CN 105315373 A          | 10/02/2016          |
|                                           |                     | EP 1896582 A1           | 12/03/2008          |
|                                           |                     | EP 2161336 A1           | 10/03/2010          |
|                                           |                     | EP 2161336 B1           | 31/07/2013          |
|                                           |                     | EP 2161336 B2           | 29/03/2017          |
|                                           |                     | EP 2418278 A2           | 15/02/2012          |
|                                           |                     | EP 2418278 A3           | 04/07/2012          |
|                                           |                     | EP 2439272 A2           | 11/04/2012          |
|                                           |                     | EP 2439272 A3           | 31/07/2013          |
|                                           |                     | EP 2439273 A2           | 11/04/2012          |
|                                           |                     | EP 2439273 A3           | 03/10/2012          |
|                                           |                     | HK 1140793 A1           | 27/06/2014          |
|                                           |                     | IL 187108 A             | 30/06/2011          |
|                                           |                     | IL 208642 A             | 30/08/2012          |
|                                           |                     | JP 2006-340714 A        | 21/12/2006          |
|                                           |                     | JP 2009-155338 A        | 16/07/2009          |
|                                           |                     | JP 2012-158605 A        | 23/08/2012          |
|                                           |                     | JP 2014-077015 A        | 01/05/2014          |
|                                           |                     | JP 2016-033135 A        | 10/03/2016          |
|                                           |                     | JP 2017-052784 A        | 16/03/2017          |
|                                           |                     | JP 4361545 B2           | 11/11/2009          |
|                                           |                     | JP 5028700 B2           | 19/09/2012          |
|                                           |                     | JP 5872377 B2           | 01/03/2016          |
|                                           |                     | JP 6185971 B2           | 23/08/2017          |
|                                           |                     | KR 10-1318469 B1        | 23/10/2013          |
|                                           |                     | KR 10-1339628 B1        | 09/12/2013          |
|                                           |                     | KR 10-1498834 B1        | 05/03/2015          |
|                                           |                     | KR 10-2008-0011428 A    | 04/02/2008          |
|                                           |                     | KR 10-2013-0032908 A    | 02/04/2013          |
|                                           |                     | KR 10-2013-0114226 A    | 16/10/2013          |
|                                           |                     | NO 20075697 A           | 11/02/2008          |
|                                           |                     | NZ 563193 A             | 28/05/2010          |
|                                           |                     | PT 2161336 E            | 03/10/2013          |
|                                           |                     | RU 2010-135087 A        | 27/02/2012          |
|                                           |                     | RU 2013-133714 A        | 27/01/2015          |
|                                           |                     | RU 2494107 C2           | 27/09/2013          |
|                                           |                     | RU 2599417 C2           | 10/10/2016          |
|                                           |                     | TW 2007-16743 A         | 01/05/2007          |
|                                           |                     | TW 1379898 B            | 21/12/2012          |
|                                           |                     | US 2009-0217401 A1      | 27/08/2009          |
|                                           |                     | US 2013-0133091 A1      | 23/05/2013          |

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

International application No.

**PCT/KR2017/008494**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
|                                           |                     | US 2014-0212422 A1      | 31/07/2014          |
|                                           |                     | US 2014-0328833 A1      | 06/11/2014          |
|                                           |                     | US 2014-0348743 A1      | 27/11/2014          |
|                                           |                     | US 2015-0165025 A1      | 18/06/2015          |
|                                           |                     | US 2017-0088615 A1      | 30/03/2017          |
|                                           |                     | US 8008449 B2           | 30/08/2011          |
|                                           |                     | US 8779105 B2           | 15/07/2014          |
|                                           |                     | US 9084776 B2           | 21/07/2015          |
|                                           |                     | US 9358289 B2           | 07/06/2016          |
|                                           |                     | US 9387247 B2           | 12/07/2016          |
|                                           |                     | US 9492539 B2           | 15/11/2016          |
|                                           |                     | US 9492540 B2           | 15/11/2016          |
|                                           |                     | WO 2006-121168 A1       | 16/11/2006          |
| WO 2016-015685 A1                         | 04/02/2016          | AU 2015-295946 A1       | 04/02/2016          |
|                                           |                     | CA 2955541 A1           | 04/02/2016          |
|                                           |                     | CN 105330740 A          | 17/02/2016          |
|                                           |                     | EP 3176180 A1           | 07/06/2017          |
|                                           |                     | US 2017-0210806 A1      | 27/07/2017          |
| US 2016-0222113 A1                        | 04/08/2016          | WO 2015-036394 A1       | 19/03/2015          |
| US 2015-0203579 A1                        | 23/07/2015          | AU 2015-209233 A1       | 30/07/2015          |
|                                           |                     | AU 2015-276978 A1       | 23/12/2015          |
|                                           |                     | CA 2936075 A1           | 30/07/2015          |
|                                           |                     | CN 106068275 A          | 02/11/2016          |
|                                           |                     | EA 201691482 A1         | 30/11/2016          |
|                                           |                     | EP 3097119 A1           | 30/11/2016          |
|                                           |                     | EP 3157956 A1           | 26/04/2017          |
|                                           |                     | IL 249145 A             | 31/01/2017          |
|                                           |                     | JP 2017-505125 A        | 16/02/2017          |
|                                           |                     | KR 10-2016-0132010 A    | 16/11/2016          |
|                                           |                     | KR 10-2017-0020365 A    | 22/02/2017          |
|                                           |                     | MX 2016-009554 A        | 17/11/2016          |
|                                           |                     | TW 2015-40726 A         | 01/11/2015          |
|                                           |                     | US 2015-0366174 A1      | 24/12/2015          |
|                                           |                     | UY 35964 A              | 31/08/2015          |
|                                           |                     | WO 2015-112800 A1       | 30/07/2015          |
|                                           |                     | WO 2015-196051 A1       | 23/12/2015          |
| CN 105566496 A                            | 11/05/2016          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

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

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; A61K 45/06; C07K 16/46; C12N 15/13; G01N 33/68; C07K 16/30; A61K 39/395

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PD-1 항체, 암 치료, CDR

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                         | 관련 청구항 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| X     | US 2014-0294852 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. 등) 2014.10.02<br>요약; 청구항 1; 및 문단 [0009], [0016], [0131]-[0133], [0470]-[0471] 참조. | 1-13   |
| X     | WO 2016-015685 A1 (LIVZON MABPHARM INC.) 2016.02.04<br>요약; 및 청구항 1-13 참조.                                                          | 1-13   |
| X     | US 2016-0222113 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 2016.08.04<br>요약; 및 청구항 1-15 참조.                                                            | 1-13   |
| X     | US 2015-0203579 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2015.07.23<br>요약; 및 청구항 57-82 참조.                                             | 1-13   |
| X     | CN 105566496 A (DAQING DZM BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 2016.05.11<br>요약; 및 청구항 1-11 참조.                                               | 1-13   |

☐ 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

“&” 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 10일 (10.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



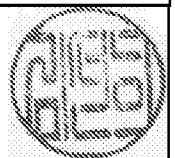
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2014-0294852 A1

2014/10/02

AU 2006-244885 A1

2006/11/16

AU 2006-244885 B2

2011/03/31

CA 2607147 A1

2006/11/16

CA 2970873 A1

2006/11/16

CN 101213297 A

2008/07/02

CN 101213297 B

2013/02/13

CN 103059138 A

2013/04/24

CN 103059138 B

2015/10/28

CN 105315373 A

2016/02/10

EP 1896582 A1

2008/03/12

EP 2161336 A1

2010/03/10

EP 2161336 B1

2013/07/31

EP 2161336 B2

2017/03/29

EP 2418278 A2

2012/02/15

EP 2418278 A3

2012/07/04

EP 2439272 A2

2012/04/11

EP 2439272 A3

2013/07/31

EP 2439273 A2

2012/04/11

EP 2439273 A3

2012/10/03

HK 1140793 A1

2014/06/27

IL 187108 A

2011/06/30

IL 208642 A

2012/08/30

JP 2006-340714 A

2006/12/21

JP 2009-155338 A

2009/07/16

JP 2012-158605 A

2012/08/23

JP 2014-077015 A

2014/05/01

JP 2016-033135 A

2016/03/10

JP 2017-052784 A

2017/03/16

JP 4361545 B2

2009/11/11

JP 5028700 B2

2012/09/19

JP 5872377 B2

2016/03/01

JP 6185971 B2

2017/08/23

KR 10-1318469 B1

2013/10/23

KR 10-1339628 B1

2013/12/09

KR 10-1498834 B1

2015/03/05

KR 10-2008-0011428 A

2008/02/04

KR 10-2013-0032908 A

2013/04/02

KR 10-2013-0114226 A

2013/10/16

NO 20075697 A

2008/02/11

NZ 563193 A

2010/05/28

PT 2161336 E

2013/10/03

RU 2010-135087 A

2012/02/27

RU 2013-133714 A

2015/01/27

RU 2494107 C2

2013/09/27

RU 2599417 C2

2016/10/10

TW 2007-16743 A

2007/05/01

TW I379898 B

2012/12/21

US 2009-0217401 A1

2009/08/27

US 2013-0133091 A1

2013/05/23

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌               | 공개일        |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
|                       |            | US 2014-0212422 A1   | 2014/07/31 |
|                       |            | US 2014-0328833 A1   | 2014/11/06 |
|                       |            | US 2014-0348743 A1   | 2014/11/27 |
|                       |            | US 2015-0165025 A1   | 2015/06/18 |
|                       |            | US 2017-0088615 A1   | 2017/03/30 |
|                       |            | US 8008449 B2        | 2011/08/30 |
|                       |            | US 8779105 B2        | 2014/07/15 |
|                       |            | US 9084776 B2        | 2015/07/21 |
|                       |            | US 9358289 B2        | 2016/06/07 |
|                       |            | US 9387247 B2        | 2016/07/12 |
|                       |            | US 9492539 B2        | 2016/11/15 |
|                       |            | US 9492540 B2        | 2016/11/15 |
|                       |            | WO 2006-121168 A1    | 2006/11/16 |
| WO 2016-015685 A1     | 2016/02/04 | AU 2015-295946 A1    | 2016/02/04 |
|                       |            | CA 2955541 A1        | 2016/02/04 |
|                       |            | CN 105330740 A       | 2016/02/17 |
|                       |            | EP 3176180 A1        | 2017/06/07 |
|                       |            | US 2017-0210806 A1   | 2017/07/27 |
| US 2016-0222113 A1    | 2016/08/04 | WO 2015-036394 A1    | 2015/03/19 |
| US 2015-0203579 A1    | 2015/07/23 | AU 2015-209233 A1    | 2015/07/30 |
|                       |            | AU 2015-276978 A1    | 2015/12/23 |
|                       |            | CA 2936075 A1        | 2015/07/30 |
|                       |            | CN 106068275 A       | 2016/11/02 |
|                       |            | EA 201691482 A1      | 2016/11/30 |
|                       |            | EP 3097119 A1        | 2016/11/30 |
|                       |            | EP 3157956 A1        | 2017/04/26 |
|                       |            | IL 249145 A          | 2017/01/31 |
|                       |            | JP 2017-505125 A     | 2017/02/16 |
|                       |            | KR 10-2016-0132010 A | 2016/11/16 |
|                       |            | KR 10-2017-0020365 A | 2017/02/22 |
|                       |            | MX 2016-009554 A     | 2016/11/17 |
|                       |            | TW 2015-40726 A      | 2015/11/01 |
|                       |            | US 2015-0366174 A1   | 2015/12/24 |
|                       |            | UY 35964 A           | 2015/08/31 |
|                       |            | WO 2015-112800 A1    | 2015/07/30 |
|                       |            | WO 2015-196051 A1    | 2015/12/23 |
| CN 105566496 A        | 2016/05/11 | 없음                   |            |