



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0113113
(43) 공개일자 2016년09월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7018704
- (22) 출원일자(국제) 2014년11월14일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년07월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2014/091090
- (87) 국제공개번호 WO 2015/085847
국제공개일자 2015년06월18일
- (30) 우선권주장
201310681942.6 2013년12월12일 중국(CN)

- (71) 출원인
상하이 헨그루이 파마수티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드, 279
- 지양수 헨그루이 메디슨 컴퍼니 리미티드
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
- (72) 발명자
위안 지준
중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279
- 취 상동
중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

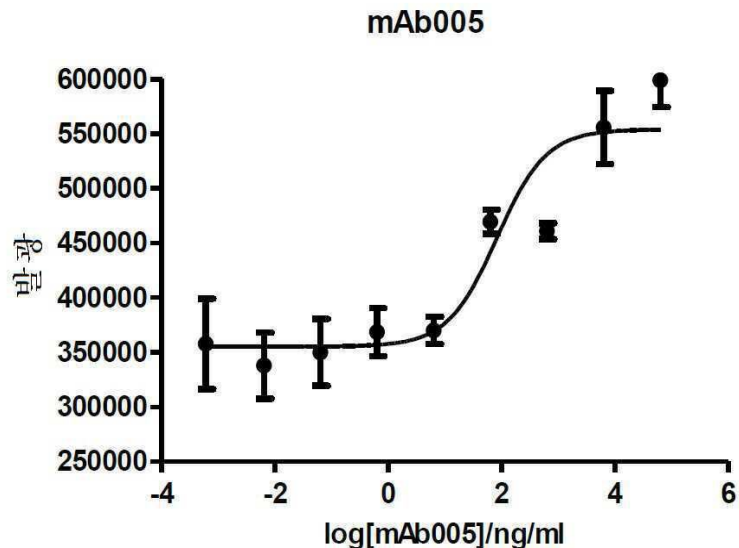
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 PD-1 항체, 이의 항원 결합 단편, 및 이의 의약 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 PD-1 항체, 이의 항원 결합 단편, 및 이의 의약 용도를 제공하고, 항체의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 키메라 항체 및 인간화 항체, 인간 PD-1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물, 및 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 항체의 용도를 추가로 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)
C07K 2317/20 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

린 주팡

중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279

예 신

중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279

차오 귀칭

중국 지양수 222047 쉰원강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 곤룬산 로드 7번지

타오 웨이캉

중국 지양수 222047 쉰원강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 곤룬산 로드 7번지

장 쉰산

중국 지양수 222047 쉰원강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 곤룬산 로드 7번지

장 레이

중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279

양 리

중국 상하이 200245 민항 디스트릭트 웬징 로드 279

명세서

청구범위

청구항 1

PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

서열 번호 6, 서열 번호 7 또는 서열 번호 8에 기재된 서열로부터 선택된 적어도 하나의 LCDR을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 5에 기재된 서열로부터 선택된 적어도 하나의 HCDR 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 6에 기재된 LCDR1을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 7에 기재된 LCDR2를 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8에 기재된 LCDR3을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 3에 기재된 HCDR1을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 4에 기재된 HCDR2를 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 5에 기재된 HCDR3을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 6, 서열 번호 7 및 서열 번호 8에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 3, 서열 번호 4 및 서열 번호 5에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 6, 서열 번호 7 및 서열 번호 8에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 3, 서열 번호 4 및 서열 번호 5에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 이의 항원 결합 단편은 쥐과 항체 또는 이의 단편인, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 이의 항원 결합 단편은 카메라 항체 또는 이의 단편인, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 카메라 항체의 상기 경쇄 가변 영역 서열은 서열 번호 10인, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 카메라 항체의 상기 중쇄 가변 영역 서열은 서열 번호 9인, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 항원 결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 단편인, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체의 상기 경쇄 가변 영역의 상기 경쇄 FR 서열은, IGKV 1-39의 FR1, FR2 및 FR3 및 JK4의 FR4를 포함하는, 서열 번호 14에 기재된 인간 생식선 경쇄 IGKV1-39 및 JK4의 조합 서열로부터 유래한, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 경쇄의 서열은 서열 번호 12에 기재된 서열 또는 이의 변이체이고; 상기 변이체는 바람직하게는 상기 경쇄 가변 영역에서 0개 내지 10개의 아미노산 돌연변이, 더 바람직하게는 A43S를 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 FR, 또는 이의 변이체, 바람직하게는 인간 IgG2 또는 IgG4의 중쇄 FR을 추가로 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체의 상기 중쇄 가변 영역의 상기 중쇄 FR 서열은, IGHV3-7의 FR1, FR2 및 FR3 및 JH6의 FR4를 포함하는, 서열 번호 13에 기재된 인간 생식선 중쇄 IGHV3-7 및 JH6의 조합 서열로부터 유래한, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 중쇄의 서열은 서열 번호 11에 기재된 서열 또는 이의 변이체이고; 상기 변이체는 바람직하게는 상기 중쇄 가변 영역에서 0개 내지 10개의 아미노산 돌연변이, 더 바람직하게는 G44R을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체를 코딩하는 DNA 분자.

청구항 22

제21항에 따른 DNA 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 23

제22항에 따른 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 숙주 세포는 박테리아, 바람직하게는 이. 콜라이(*E. coli*)인, 숙주 세포.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 숙주 세포는 효모, 바람직하게는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)인, 숙주 세포.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

PD-1 매개 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편, 및 제26항에 따른 약제학적 조성물의 용도로서, 상기 질환 또는 장애는 바람직하게는 암, 더 바람직하게는 PD-L1 발현 암, 가장 바람직하게는 유방암, 폐암, 위암, 위장암, 신장암, 흑색종 및 비소세포 폐암, 및 가장 바람직하게는 비소세포 폐암, 흑색종 및 신장암인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PD-1 항체, PD-1 항원 결합 단편, PD-1 항체의 CDR을 포함하는 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 PD-1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물, 및 항암 약물로서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 면역치료제는 오랜 시간 동안 종양 치료학적 분야에서 핫 스팟이고, T 세포 연관 암 면역치료제는 핵심 위치에 있다. 종양 면역치료제는 종양을 가지는 환자에서 세포독성 T 림프구를 전체적으로 이용하고 동원함으로써 종양에 영향을 미치고, 이것은 암 치료에 대한 가장 효과적이고 가장 안전한 방식일 수 있다. 동시에, 종양 도피(tumor escape)는 종양 면역치료제가 직면하는 큰 장애이고, 여기서 암 세포는 면역계에 대한 이의 저해 효과를 통해 종양의 신속한 성장을 촉진한다.

[0003] 종양 면역 도피 기전과 종양에 대한 신체의 면역 반응 사이의 관계는 극도로 복잡하다. 종양 면역치료제의 초기 단계에서, 종양 특이적 살해 T 세포는 생물학적 활성을 가지지만, 종양 성장의 마지막 단계에서 살해 기능을 소실한다. 그래서, 종양 면역치료제는 종양에 대한 환자 자체의 면역계의 반응을 극도로 증대시키는 것이다. 종양 면역치료제의 열쇠는 기존의 면역계의 반응을 활성화할 뿐만 아니라, 면역계의 반응의 기간 및 강도를 유지시키는 것이다.

[0004] 생체내 인간 T 세포 활성화는 제1 신호를 제공하기 위해 T 세포에 항원 제시 세포를 통해 MHC-항원 펩타이드를 제출할 필요가 있을 뿐만 아니라, 제2 신호를 제공하기 위해 일련의 공동자극 분자를 필요로 하는 2개의 신호전달 경로 시스템에 의해 실행되고, 이후 T 세포는 정상 면역 반응을 나타낸다. 이 이중 신호전달 시스템은 면역계의 균형에서 중요한 역할을 하고, 내인성 및 외인성 항원에 의해 자극된 상이한 면역 반응을 엄격히 조절한다. 공동자극 분자에 의해 제공된 제2 신호의 부재는 반응 또는 지속적인 특이적 T 세포 면역 반응을 발생시키지 않아서, 결과적으로 관용성을 발생시킬 것이다. 따라서, 제2 신호 경로는 면역 반응의 전체 과정에서 중요한 조절 역할을 한다.

[0005] 1992년에 발견된 프로그래밍된 사멸-1(Programmed death-1: PD-1)은 T 세포 표면에서 발현된 단백질 수용체이고, 세포 아토포시스에 관여한다. PD-1은 CD28 패밀리에 속하고, 세포독성 T 림프구 항원 4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4: CTLA-4)와 아미노산 서열에서 23%의 상동성을 나타내지만, 주로 활성화 T 세포, B 세포 및 골수성 세포에서 발현되고, 이것은 CTLA와 다르다. PD-1은 각각 PD-L1 및 PD-L2의 2개의 리간드를

가진다. PD-L1은 T 세포, B 세포, 대식세포 및 수지상 세포(dendritic cell: DC)에서 주로 발현되고, 발현은 활성화 세포에서 상향조절된다. PD-L2의 발현은 주로 항원 제시 세포, 예컨대 활성화 대식세포 및 수지상 세포로 제한된다.

[0006] 새로운 연구는 인간 종양 조직, 예컨대 유방암, 폐암, 위암, 위장암, 신장암, 흑색종 및 기타에서의 PD-L1 단백질의 높은 발현을 검출하였고, PD-L1의 발현 수준은 환자의 임상 병태 및 예후와 밀접히 관련된다. PD-L1은 제2 신호전달 경로를 통해 T 세포 증식을 저해하여서, PD-L1/PD-1의 결합의 차단은 종양 면역치료제 분야에서 매우 유망한 표적이 된다.

[0007] 현재, PD-L1/PD-1의 결합을 차단함으로써 종양에 대한 환자의 자가 면역 반응을 최대화하고, 연속하여 종양 세포에 대해 사멸 목적을 달성하는, PD-1에 대한 단일클론 항체에 참여하는 여러 다국적 제약 회사가 존재한다(예컨대, W02009114335). BMS 및 머크(Merck)의 PD-1 단일클론 항체의 임상 결과에서, 소정의 반응 속도가 비소세포 폐암, 흑색종 및 신장 암종에서 관찰되었고, 반응 속도는 종양에서 PD-L1 발현과 두드러지게 높은 관련성을 나타내고, 이것은 PD-1 항체가 종양에 긍정적인 효과를 발휘한다는 것을 제시한다.

[0008] 본 발명은 높은 친화도, 높은 선택도 및 높은 생물학적 활성을 가지는 PD-1 항체를 제공한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은

[0010] 서열 번호 6, 서열 번호 7 또는 서열 번호 8에 기재된 서열로부터 선택된 적어도 하나의 LCDR을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

[0011] 서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 5에 기재된 서열로부터 선택된 적어도 하나의 HCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호 6에 기재된 LCDR1을 포함한다.

[0013] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호 7에 기재된 LCDR2를 포함한다.

[0014] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8에 기재된 LCDR3을 포함한다.

[0015] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호 3에 기재된 HCDR1을 포함한다.

[0016] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호 4에 기재된 HCDR2를 포함한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호 5에 기재된 HCDR3을 포함한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 6, 서열 번호 7 및 서열 번호 8에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 3, 서열 번호 4 및 서열 번호 5에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 6, 서열 번호 7 및 서열 번호 8에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 3, 서열 번호 4 및 서열 번호 5에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 따르면, 항체는 κ 및 λ 사슬의 경쇄 FR 또는 이의 단편이다.

[0022] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 κ 및 λ 사슬의 경쇄 FR 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.

- [0023] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 찢과 항체 또는 이의 단편은 찢과 κ , λ 사슬의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 찢과 항체 또는 이의 단편에 따르면, 중쇄 가변 영역은 찢과 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 중쇄 FR 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 찢과 항체 또는 이의 단편은 찢과 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편에 따르면, 항체는 키메라 항체 또는 이의 단편이다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 키메라 항체 또는 이의 단편에 따르면, 키메라 항체의 경쇄 가변 영역 서열은 서열 번호 10이다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 키메라 항체 또는 이의 단편에 따르면, 키메라 항체의 중쇄 가변 영역 서열은 서열 번호 9이다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 키메라 항체 또는 이의 단편은 인간 κ , λ 사슬의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 키메라 항체 또는 이의 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함하고, 바람직하게는 인간 IgG2 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 또는 아미노산 돌연변이 후 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: 항체 의존적 세포 매개 세포독성)을 가지지 않는, IgG1의 것을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편에 따르면, 항체는 인간화 항체 또는 이의 단편이다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체의 경쇄 가변 영역은 인간 κ , λ 사슬의 경쇄 FR 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체의 경쇄 가변 영역의 경쇄 FR 서열은, IGKV 1-39의 FR1, FR2 및 FR3 및 JK4의 FR4를 포함하는, 서열 번호 14에 기재된 인간 생식선 경쇄 IGKV1-39 및 JK4의 조합 서열로부터 유래한다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체 경쇄의 서열은 서열 번호 12 또는 이의 변이체에 기재되어 있다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체 경쇄 가변 영역의 변이체는 경쇄 가변 영역에서 0개 내지 10개의 아미노산 돌연변이, 바람직하게는 A43S를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편은 인간 κ , λ 사슬의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 중쇄 가변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 중쇄 FR, 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체의 중쇄 가변 영역의 중쇄 FR 서열은, IgHV3-7의 FR1, FR2 및 FR3 및 JH6의 FR4를 포함하는, 서열 번호 13에 기재된 인간 생식선 중쇄 IgHV3-7 및 JH6의 조합 서열로부터 유래한다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편에 따르면, 인간화 항체 중쇄의 서열은 서열 번호 11 또는 이의 변이체에 기재되어 있고; 변이체는 바람직하게는 중쇄 가변 영역에서 0개 내지 10개의 아미노산 돌연변이, 더 바람직하게는 G44R을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 인간화 항체 또는 이의 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함하고, 바람직하게는 ADCC를 가지지 않는 인간 IgG2 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 또는 아미노산 돌연변이 후 ADCC(항체 의존적 세포 매개 세포독성)를 가지지

않는 IgG1의 것을 포함한다. 변이체는 바람직하게는 ADCC 감소 또는 결핍을 발생시키는 중쇄 불변 영역 돌연변이, 및 더 바람직하게는 IgG1, IgG2/4 키메라의 N297A, L234A, L235A, 및 IgG4의 F235E 또는 L234A/E235A이다.

- [0041] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편에 따르면, 항원 결합 단편은 Fab, Fv, sFv 또는 F(ab')₂이다.
- [0042] 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 DNA 분자를 추가로 제공한다.
- [0043] 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 DNA 분자를 포함하는 발현 벡터를 추가로 제공한다.
- [0044] 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포를 추가로 제공한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 숙주 세포에 따르면, 숙주 세포는 박테리아, 바람직하게는 이. 콜라이(*E. coli*)이다.
- [0046] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 숙주 세포는 효모, 바람직하게는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)이다.
- [0047] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다.
- [0048] 본 발명은 PD-1 매개 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서의 상기 PD-1 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물의 용도를 추가로 제공하고; 질환은 바람직하게는 암, 더 바람직하게는 PD-L1 발현 암이고; 암은 바람직하게는 유방암, 폐암, 위암, 위장암, 신장암, 흑색종, 및 가장 바람직하게는 비소세포 폐암, 흑색종 및 신장암이다.
- [0049] 본 발명은 본 발명에 따른 치료학적 유효량의 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 PD-1 매개 질환 또는 장애를 치료하고 예방하는 방법을 추가로 제공하고; 질환은 바람직하게는 암, 더 바람직하게는 PD-L1 발현 암이고; 암은 바람직하게는 유방암, 폐암, 위암, 위장암, 신장암, 흑색종, 비소세포 폐암, 및 가장 바람직하게는 비소세포 폐암, 흑색종 및 신장암이다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1: 인간 말초 혈액 단핵 세포 증식 검정. 결과는 시험 PD-1 항체 mAb005가 83ng/ml의 EC50으로 인간 말초 혈액 단핵 세포의 증식을 효과적으로 자극할 수 있다는 것을 보여준다.
- 도 2: 인간 말초 혈액 단핵 세포 사이토카인 IFN- γ 분비 시험. 결과는 시험 PD-1 항체 mAb005가 13ng/ml의 EC50으로 PBMC 증식을 자극하고, 동시에 사이토카인 IFN- γ 의 분비를 효과적으로 자극할 수 있다는 것을 보여준다.
- 도 3: 신경교종 세포의 성장에 대한 PD-1 항체 H005-1의 저해 효과.
- 도 4: 치료 후 종양 용적 변화를 보여주는 다이어그램.
- 도 5: 치료 후 마우스의 체중 변화를 보여주는 다이어그램.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 1. 정의
- [0052] 본 발명을 더 용이하게 이해하기 위해, 소정의 기술 용어 및 과학 용어는 하기 구체적으로 정의되어 있다. 본 문헌에 그 외 구체적으로 정의되지 않으면, 본 명세서에 사용된 모든 다른 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 당업자에 의해 흔히 이해되는 의미를 가진다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 바대로, 아미노산에 대한 1철자 코드 및 3 철자 코드는 문헌[J. biol. chem, 243, (1968) p3558]에 기재되어 있다.
- [0054] 본 명세서에 사용된 바대로, "항체"는 2개의 동일한 중쇄와 2개의 동일한 경쇄 사이의 다이설파이드 결합에 의해 함께 연결된 4개의 펩타이드 사슬 구조인 면역글로불린을 의미한다. 상이한 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 상이한 아미노산 조성 및 순위를 나타내어서, 상이한 종류의 항원성을 제시한다. 따라서, 면역글로불린은 면역

글로불린 아아이소타입, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE라 불리는 5개의 카테고리 분할될 수 있고, 이들의 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ϵ 사슬이다. 힌지 영역의 이의 아미노산 조성 및 중쇄 다이설파이드 결합의 수 및 위치에 따라, 동일한 유형의 Ig는 상이한 하위카테고리로 분할될 수 있고, 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분할될 수 있다. 경쇄는 상이한 불변 영역을 고려하여 κ 또는 λ 사슬로 분할될 수 있다. 5개의 Ig의 각각은 κ 또는 λ 사슬을 가질 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 본 명세서에 언급된 항체 경쇄 가변 영역은 인간 또는 쥐과 κ , λ 사슬을 포함하는 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.

[0056] 본 발명에서, 본 명세서에 언급된 항체 중쇄 가변 영역은 인간 또는 쥐과 IgG1, 2, 3, 4를 포함하는 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.

[0057] 항체 중쇄 및 경쇄의 N 말단 서열 근처에서 가변 영역(V 영역)으로 공지된 약 110개의 아미노산 서열은 크게 변하고; C 말단 근처에서 불변 영역(C 영역)으로 공지된 아미노산 서열의 나머지는 비교적 안정하다. 가변 영역은 3개의 초가변 영역(hypervariable region: HVR) 및 4개의 비교적 보존된 서열 프레임워크 영역(framework region: FR)을 포함한다. 3개의 초가변 영역은 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)으로 또한 공지된 항체의 특이성을 결정한다. 각각의 경쇄 가변 영역(light chain variable region: LCVR) 및 각각의 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region: HCVR)은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어지고, 아미노 말단으로부터 카복실 말단으로의 순차적인 순서는 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4이다. 3개의 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 의미하고; 3개의 중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 의미한다. 본 명세서에서 항체 또는 항원 결합 단편의 LCVR 및 HCVR에서의 CDR 아미노산 잔기의 수 및 위치는 공지된 카바트(Kabat) 넘버링 기준(LCDR1-3, HCDE2-3)에 상응하거나, 카바트 및 초티아(chothia) 넘버링 기준(HCDR1)에 상응한다.

[0058] 용어 "쥐과 항체"는 본 발명에서 당해 분야의 지식 및 기술에 따라 제조된 항-인간-PD-1 단일클론 항체를 의미한다. 제조 동안, 시험 물체에 PD-1 항원을 주입하고, 이후 원하는 서열 또는 기능적 특징을 보유하는 항체를 발현하는 하이브리도마를 분리한다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 쥐과 PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 쥐과 κ , λ 사슬의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함하거나, 쥐과 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다.

[0059] 용어 "키메라 항체"는 쥐과 항체의 가변 영역을 인간 항체의 불변 영역과 융합함으로써 형성된 항체이고, 키메라 항체는 쥐과 항체 유도된 면역 반응을 경감시킬 수 있다. 키메라 항체를 확립하기 위해, 특이적 쥐과 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 처음에 확립하고, 마우스 하이브리도마 세포로부터 가변 영역 유전자를 클로닝하고, 이후 인간 항체의 불변 영역 유전자를 원하는 바대로 클로닝하고, 마우스 가변 영역 유전자를 인간 불변 영역 유전자와 결합하여, 인간 벡터로 삽입될 수 있는 키메라 유전자를 형성하고, 마지막으로 키메라 항체 분자는 진핵생물 또는 원핵생물 산업 시스템에서 발현된다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 키메라 항체의 경쇄 가변 영역은 쥐과 κ , λ 사슬의 경쇄 FR 또는 이의 변이체를 추가로 포함하고, 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호 10에 기재되어 있다. PD-1 키메라 항체의 중쇄 가변 영역은 쥐과 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 중쇄 FR 또는 이의 변이체를 추가로 포함하고, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호 10에 기재되어 있다. 인간 항체의 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체로부터 선택되고, 바람직하게는 인간 IgG2 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 또는 아미노산 돌연변이 후 ADCC(항체 의존적 세포 매개 세포독성)를 가지지 않는 IgG1의 것을 포함한다.

[0060] CDR 그래프팅된 항체로 또한 공지된 용어 "인간화 항체"는 쥐과 CDR 서열을 인간 항체의 가변 영역 프레임워크로 그래프팅함으로써 생성된 항체, 즉 상이한 유형의 인간 생식선 항체 프레임워크의 서열을 의미한다. 인간화 항체는 많은 양의 쥐과 단백질 성분을 보유하는 키메라 항체에 의해 유도된 불리하게 강한 항체 반응을 극복한다. 이러한 프레임워크 서열은 생식선 항체 유전자 서열을 다루는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개 참조문헌으로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식선 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식선 서열 데이터베이스(웹 www.mrccep.com.ac.uk/vbase에서 입수 가능)에서 발견될 수 있을 뿐만 아니라, 문헌 [Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed]에서 발견될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, PD-1 인간화 항체의 쥐과 CDR 서열은 서열 번호 3, 4, 5, 6, 7, 8로부터 선택된다. 항체 경쇄 가변 영역의 경쇄 FR 서열이, IGKV 1-39의 FR1, FR2 및 FR3 및 JK4의 FR4을 포함하는, 서열 번호 14의, 인간 생식선 경쇄 IGKV1-39 및 JK4의 조합 서열로부터 유래하고; 항체 중쇄 가변 영역의 중쇄 FR 서열이,IGHV3-7의 FR1, FR2 및 FR3 및 JH6의 FR4를 포함하는, 서열 번호 13의, 인간 생식선 중쇄 IGHV3-7 및 JH6의 조합 서열로부터 유래하도록, 인간 항체 가변 영역 프레임워크가 설계되고 선택된다. 면역원성 감소 동안 항

성 감소를 피하기 위해, 인간 항체의 가변 영역은 활성을 유지하기 위해 최소 역돌연변이로 처리된다.

- [0061] 본 명세서에 사용된 바대로, "항원 결합 단편"은, 서열 번호 3 내지 서열 번호 8로 이루어진 군으로부터 선택된, 본 발명에 기재된 항체의 하나 이상의 CDR 영역을 포함하는, Fab 단편, Fab' 단편, 항원 결합 활성을 가지는 F(ab')₂ 단편, 및 인간 PD-1을 가지는 Fv 단편 sFv 단편 결합을 의미한다. Fv 단편은 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 및 불변 영역이 없는 모든 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 일반적으로, Fv 항체는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함하고, 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있다. 또한, 일명 단쇄 항체 또는 단쇄 Fv(sFv)인 폴리펩타이드를 형성하기 위해 2개의 항체의 가변 영역을 연결하기 위해 상이한 링커를 사용할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "PD-1과의 결합"은 인간 PD-1과 상호작용하는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바대로, 본 발명의 용어 "항원 결정부위"는, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 인식한, 항원 상의 불연속 3차원 부위를 의미한다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "ADCC", 즉 항체 의존적 세포 매개 세포독성은 Fc 수용체를 발현하는 세포가 항체의 Fc 분절의 인식을 통해 항체에 의해 코팅된 표적 세포를 직접적으로 사멸한다는 것을 의미한다. 항체의 ADCC 이펙터 기능은 IgG에서 Fc 분절의 변형을 통해 감소하거나 제거될 수 있다. 변형은 항체 중쇄 불변 영역의 돌연변이, 예컨대 IgG1; IgG2/4 키메라에서 N297A, L234A, L235A; IgG4에서 F235E, 또는 L234A/E235A 돌연변이로부터 선택된 돌연변이를 의미한다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 바대로, 본 발명에 기재된 융합 단백질은 재조합 DNA 기술을 통해 2개의 유전자를 동시발현 시킴으로써 얻은 단백질 생성물이다. 재조합 PD-1 세포의 도메인 Fc 융합 단백질은 재조합 DNA 기술을 통해 PD-1 세포의 도메인 및 인간 항체 Fc 단편을 동시발현시킴으로써 얻어진다. PD-1 세포의 도메인은 세포막 외부의 PD-1의 모이머를 의미하고, 이의 서열은 하기 서열 번호 1의 스크라이빙 영역이다.
- [0064] 항체 및 항원 결합 단편을 제조하고 정제하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor, Chapter 5-8 and 15]에서 확인될 수 있다. 예를 들어, 마우스는 인간 PD-1, 또는 이의 단편에 의해 면역화될 수 있고, 생성된 항체는 이후 당해 분야에 널리 공지된 종래의 방법을 이용하여 재생되고 정제되고 서열분석될 수 있다. 항원 결합 단편은 종래의 방법에 의해 또한 제조될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 비인간 유래 CDR에 하나 이상의 인간 프레임워크 영역(FR)을 도입하도록 유전적으로 조작된다. 인간 FR 생식선 서열은 <http://imgt.cines.fr>의 웹사이트를 통해 ImMunoGeneTics(IMGt), 또는 Immunoglobulin FactsBook, 2001ISBN012441351로부터 얻어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에서 사용하기 위한 경쇄 FR 생식선은 A3 및 O2를 포함한다. 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에서 사용하기 위한 특정한 중쇄 FR 생식선은 VH3-21 및 VH3-23을 포함한다.
- [0065] 본 발명의 조작된 항체 또는 항원 결합 단편은 종래의 방법을 이용하여 제조되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 중쇄(서열 번호 11) 및 경쇄(서열 번호 12)를 코딩하는 cDNA 서열은 GS 발현 벡터로 클로닝되고 재조합될 수 있다. 재조합된 면역글로블린 발현 벡터는 이후 CHO 세포를 안정하게 형질감염시킬 수 있다. 당해 분야에 널리 공지된 더욱 추천되는 방법으로서, 항체의 포유동물 발현은 통상적으로 FC 영역에서 매우 보존된 N 말단에서 글라이코실화를 생성시킬 것이다. 안정한 클론은 인간 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체의 발현을 통해 얻어질 수 있다. 양성 클론을 생물반응기에서의 항체 제조를 위해 혈청 비함유 배양 배지 중에 성장시킬 수 있다. 종래의 기법에 의해 항체가 분비되는 배양 배지를 정제할 수 있다. 예를 들어, 상용성 완충제와 평형화된 단백질 A 또는 G 세파로스 FF 칼럼에 배지를 편리하게 적용할 수 있다. 칼럼을 세척하여 비특이적 결합 성분을 제거한다. 결합 항체를 PH 구배에 의해 용리시키고, 항체 단편을 SDS-PAGE에 의해 검출하고, 이후 혼중한다. 항체를 여과시키고 일반 기법을 이용하여 농축시킬 수 있다. 크기 배제 또는 이온 교환을 포함하는 일반 기법에 의해 가용성 응집물 및 다합체를 효과적으로 제거할 수 있다. 얻어진 생성물을 예를 들어 -70°C에서 즉시 냉동시킬 수 있거나, 동결건조시킬 수 있다.
- [0066] 본 발명의 항체는 단일클론 항체이다. 단일클론 항체 또는 mAb는, 본 명세서에 사용된 바대로, 임의의 진핵생물, 원핵생물, 또는 파지 클론(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 단일 클론으로부터 유래한 항체를 의미한다. 단일클론 항체 및 이의 항원 결합 단편은 예를 들어 하이브리도마 기술, 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술(예를 들어, CDR 그래프팅), 또는 당해 분야에 공지된 다른 기술에 의해 재조합될 수 있다.
- [0067] "투여" 및 "치료"는, 이것이 동물, 인간, 실험 대상체, 세포, 조직, 장기 또는 생물학적 유체에 적용되면서, 외인성 약제학적, 치료학적, 진단학적 물질 또는 조성물을 동물, 인간, 대상체, 세포, 조직, 장기 또는 생물학적 유체와 접촉시키는 것을 의미한다. "투여" 및 "치료"는 예를 들어 치료학적, 약동학적, 진단학적, 조사 및 실험 방법을 의미할 수 있다. 세포의 치료는 시약을 세포와 접촉시키는 것, 및 시약을 유체와 접촉시키는 것을 포함

하고, 여기서 유체는 세포와 접촉한다. "투여" 및 "치료"는 시약, 진단학적, 결합 화합물, 또는 또 다른 세포에 의한 예를 들어 세포의 실험실내 및 생체의 치료를 또한 의미한다. "치료"는, 이것이 인간, 수의 또는 조사 대상체에 적용되면서, 조사 및 진단학적 분야에 대한 치료학적 치료, 예방적 또는 예방학적 조치를 의미한다.

[0068] "치료한다"는, 내부적으로 또는 외부적으로, 본 발명의 임의의 결합 화합물을 포함하는 치료제, 예컨대 조성물을 이 물질이 공지된 치료학적 활성을 가지는 하나 이상의 질환 증상을 가지는 환자에 투여하는 것을 의미한다. 통상적으로, 이 물질은 임의의 임상적으로 측정 가능한 정도로 이러한 증상(들)의 진행의 회귀를 유도함으로써 또는 이를 저해함으로써 치료된 환자 또는 집단에서 하나 이상의 질환 증상을 경감시키기에 효과적인 양으로 투여된다. 임의의 특정한 질환 증상을 경감시키기에 효과적인 치료제의 양(또한 "치료학적 유효량"으로 언급됨)은 환자의 질환 상태, 연령 및 체중, 및 환자에서 원하는 반응을 발생시키는 약물의 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 질환 증상이 경감되는지의 여부는 그 증상의 중증도 또는 진행 상태를 평가하기 위해 의사 또는 다른 숙련된 건강관리 제공자가 통상적으로 사용하는 임의의 임상 측정에 의해 평가될 수 있다. 본 발명의 실시형태(예를 들어, 치료 방법 또는 제조 물품)가 모든 환자에서 관심 있는 질환 증상(들)을 경감시키는 데 있어서 효과적이지 않을 수 있지만, 이것은 당해 분야에 공지된 임의의 통계 시험, 예컨대 스튜던트 t-시험, 카이제곱(chi-square) 시험, 만(Mann) 및 휘트니(Whitney)에 따른 U-시험, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 시험(H-시험), 존키어-터프스프라(Jonckheere-Terpstra) 시험 및 윌콕슨(Wilcoxon) 시험에 의해 결정되는 바대로 통계학적으로 유의적인 수의 환자에서 관심 있는 표적 질환 증상(들)을 경감시켜야 한다.

[0069] "보존적 변형" 또는 "보존적 대체 또는 치환"은, 단백질의 생물학적 활성을 변경하지 않으면서 변화가 흔히 이루어질 수 있도록, 단백질에서의 유사한 특징(예를 들어, 전하, 부사슬 크기, 소수화도/친수화도, 골격 입체구성 및 경직도 등)을 가지는 다른 아미노산에 의한 아미노산의 치환을 의미한다. 당해 분야의 당업자는, 일반적으로, 폴리펩타이드의 비필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는다는 것을 인식한다(예를 들어, 문헌[Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)] 참조). 또한, 구조적으로 또는 기능적으로 유사한 아미노산의 치환은 생물학적 활성을 덜 파괴할 것이다.

[0070] 본 명세서 및 청구항에 걸쳐 사용되는 바대로, "본질적으로 이루어진" 또는 이의 변형어는 임의의 인용된 요소 또는 요소의 그룹의 포함, 및 규정된 투약 섭생, 방법 또는 조성의 기본적인 또는 새로운 특성을 상당히 변경하지 않는, 기재된 부재와 유사한 또는 상이한 성질의 다른 요소의 선택적 포함을 의미한다. 비제한적인 예로서, 기재된 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진 결합 화합물은 결합 화합물의 특성에 상당히 영향을 미치지 않는 하나 이상의 아미노산을 또한 포함할 수 있다.

[0071] "유효량"은 의학 병태의 증상 또는 징후를 경감시키거나 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 유효량은 진단을 허용하거나 수월하게 하기에 충분한 양을 또한 의미한다. 특정한 환자 또는 수의 대상체에 대한 유효량은 치료되는 병태, 환자의 일반 건강, 투여의 경로 및 용량, 및 부작용의 중증도와 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 유효량은 상당한 부작용 또는 독성 효과를 피하는 최대 용량 또는 투약 프로토콜일 수 있다.

[0072] "외인성"은 문맥에 따라 유기체, 세포 또는 인간 신체 외부에서 생성된 물질을 의미한다. "내인성"은 문맥에 따라 세포, 유기체 또는 인간 신체 외부에서 생성된 물질을 의미한다.

[0073] "상동성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 또는 2개의 폴리펩타이드 사이의 서열 유사성을 의미한다. 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 아단위가 2개의 비교된 서열의 둘 다에서의 위치를 점유할 때, 예를 들어 아데닌이 2개의 DNA 분자의 각각에서의 위치를 점유하면, 분자는 그 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이의 상동성의 백분율은 2개의 서열이 공유하는 일치하는 또는 상동성 위치의 수를 비교된 위치의 수로 나누고 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 서열이 최적으로 정렬될 때 2개의 서열에서 10개 중 6개의 위치가 일치하거나 상동성인 경우, 2개의 서열은 60%의 상동성이다. 일반적으로, 최대 상동성 백분율을 생성하기 위해 2개의 서열이 정렬될 때 비교가 이루어진다.

[0074] 본 명세서에 사용된 바대로, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 이러한 지칭은 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"의 단어는 1차 해당 세포 및 전달의 수를 고려하지 않으면서 이로부터 유래한 배양물을 포함한다. 모든 자손이 고의적인 또는 우연한 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확히 동일하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 원래대로 형질전환된 세포에 대해 스크리닝되는 것처럼 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 가지는 돌연변이체 자손이 포함된다. 명확한 지칭이 포함되는 경우, 이것은 문맥으로부터 명확할 것이다.

[0075] 본 명세서에 사용된 바대로, "중합효소 사슬 반응" 또는 "PCR"은 핵산, RNA 및/또는 DNA의 소량의 특이적 모이어티가 예를 들어 미국 특허 제4,683,195호에 기재된 바대로 증폭되는 절차 또는 기법을 의미한다. 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 설계될 수 있도록 관심 있는 영역의 말단으로부터의 또는 이를 넘는 서열 정보가 입수될 필요가 있고; 이 프라이머는 증폭시키고자 하는 주형의 상응하는 가닥에 서열이 동일하거나 유사할 것이다. 2개의 프라이머의 5' 말단 뉴클레오타이드는 증폭시키고자 하는 물질의 말단과 동일할 수 있다. 특이적 RNA 서열, 전체 게놈 DNA로부터의 특이적 DNA 서열, 및 전체 세포 RNA로부터 전사된 cDNA, 박테리오파지 또는 플라스미드 서열 등을 증폭시키기 위해 PCR을 이용할 수 있다. 일반적으로 문헌[Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)]을 참조한다. 본 명세서에 사용된 바대로, PCR은 핵산의 특이적 모이어티를 증폭시키거나 생성하기 위해 프라이머로서의 공지된 핵산 및 핵산 중합효소의 사용을 포함하는, 핵산 시험 샘플을 증폭시키기 위한 핵산 중합효소 반응 방법의 하나(그러나 오직 하나는 아님)의 예로서 고려된다.

[0076] "선택적" 또는 "선택적으로"는 뒤에 있는 사건 또는 상황이 발생할 수 있지만, 반드시 발행할 필요는 없다는 것을 의미하고, 설명은 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우를 포함한다. 예를 들어, "1-3개의 항체 중쇄 가변 영역을 선택적으로 포함한다"는 특정한 서열을 가지는 항체 중쇄 가변 영역이 존재할 수 있지만, 반드시 존재할 필요는 없다는 것을 의미한다.

[0077] "약제학적 조성물"은 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물 또는 이의 생리학적으로/약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭과 다른 화학 성분, 및 부가적인 성분, 예컨대 생리학적으로/약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제의 혼합물을 함유하는 것을 의미한다. 약제학적 조성물은 유기체에 대한 투여를 촉진하는 것, 활성 물질의 흡수를 수월하게 하는 것 및 이로써 생물학적 효과를 발휘하는 것을 목표로 한다.

[0078] **발명의 상세한 설명**

[0079] 이하, 본 발명은 실시예를 참조하여 추가로 기재되어 있지만, 본 발명의 범위는 이것으로 제한되지 않는다. 특정 조건이 기재되지 않은 본 발명의 실시예에서, 문헌[Antibody Tchnology Laboratory Manual and Mecular Cloning Manual of Cold Spring Harbor]에 기재된 바대로 종래의 조건 하에, 또는 재료 또는 제품 제조사가 제안한 조건 하에 실험을 일반적으로 수행한다. 시약의 공급원이 구체적으로 제공되지 않은 경우, 시약은 상업적으로 구입 가능한 종래의 시약이다.

[0080] **실시예 1 항체 제조**

[0081] 인간 PD-1에 대한 릫과 단일클론 항체를 생성하였다. 정제된 재조합 PD-1 세포의 도메인 Fc 융합 단백질(PD-1 Fc)(서열 번호 1); 또는 PD-1에 의해 형질감염된 CHO 세포(서열 번호 2)를 항원으로서 사용하여 Balb/C 마우스 및 SJL 마우스를 면역화하였다. 오리진(ORIGENE)(카탈로그 SC117011호, NCBI 기준 서열: NM_005018.1)로부터 인간 PD-1 항원을 구입하였다.

[0082] PD-1 Fc, 재조합 PD-1 세포의 도메인 Fc 융합 단백질(서열 번호 1):

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPFTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWyRMSpSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGYLcGAIslAPKAQIKESLRAELRVtERRAEVPTAHpSPSPR
PAGQFQTLVdKtHTcPPcAPEllGGpSVflFPKPKDtlMISrTPEVtCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVhNAKtKPREEQYNStYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKtISKAKGQPREPQVYtLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYktTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVfSCS
VMHEALHNHYtQKSLSlSPGK.

[0083]

[0084] PD-1, PD-1 항원 형질감염 세포(서열 번호 2):

MQIPQAPWPVvWAVLqLgWRPGWFLDSPDRPWNPPFTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWyRMSpSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGYLcGAIslAPKAQIKESLRAELRVtERRAEVPTAHpSPSPRP
AGQFQTLVvGVVgLLgSLVllVwVlAVICsRAARGtIGARRtGQPLKEDPSAV
PVfSVdYgELDFQwREKtPEPPVPCVPEQTEYAtIVfPSGMGTSSPARRGSADGP
RSaQLRPEDGHCSWPL.

[0085]

[0086] PD-1 세포외 도메인-Fc 융합 단백질에 의한 면역화는 정제된 항원의 고용량(50 μ g) 및 저용량(10 μ g)으로 분할되고, PD-1 형질감염된 CHO 세포에 의한 면역화는 0.5-1 \times 10⁷ 개의 세포를 이용하였다. 완전 프로인트(Freund) 아주번트에 의해 각각 0일, 14일 및 35일에 면역화를 수행하고, 혈액을 눈 뒤(retro-orbital) 부위에서 샘플링하여 면역 반응을 모니터링하였다. 항-PD-1 인간 면역글로불린 역가를 가지는 마우스를 혈장 스크리닝 ELISA에 의해 얻었다. 56일에, 최고 항-PD-1 인간 면역글로불린 역가를 가지는 마우스를 부스트 면역화로 처리하였다. 3일 후, 마우스를 희생시키고, 비장을 융합을 위해 제거하였다. 하이브리도마 융합을 스크리닝하고, 첫과 단일클론 항체 mAb005를 얻었다. 첫과 단일클론 항체 mAb005의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열은 하기와 같다:

mAb005 HCVR
 EVMLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSSYMMSWVRQTPEKRLEWVATISG
 GGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTALYYCARQLYYFDYW
 GQGTLTVSS
 서열 번호 9

mAb005 LCVR
 DIQMTQSPASQSASLGEVITITCLASQTIGTWLWYQOKPGKSPQLLIYTATSLA
 DGVPSRFSGSGSGTKFSFKISLQAEDFVITYCQVYSIPWTFGGGKLEIK
 서열 번호 10

[0087]

[0088] CDR 서열은 하기와 같다:

| 명칭 | 서열 | 넘버링 |
|-------|-------------------|---------|
| HCDR1 | SYMMS | 서열 번호 3 |
| HCDR2 | TISGGGANTYYPDSVKG | 서열 번호 4 |
| HCDR3 | QLYYFDY | 서열 번호 5 |
| LCDR1 | LASQTIGTWLT | 서열 번호 6 |
| LCDR2 | TATSLAD | 서열 번호 7 |
| LCDR3 | QQVYSIPWT | 서열 번호 8 |

[0089]

실시예 2: 항체 스크리닝

[0090]

실험실내 PD-1 항체ELISA 결합 검정:

[0091]

[0092] PD-1 항체는 PD-1 세포외 도메인에 대한 결합에 의해 PD-1 및 이의 리간드의 신호전달 경로를 차단한다. 실험실내 ELISA 검정을 이용하여 PD-1 항체의 결합 특성을 검출한다. 비오틴화된 PD-1 세포외 도메인 FC 융합 단백질(PD-1 FC)을 중화 아비딘에 대한 결합에 의해 96웰 플레이트에 코팅한다. 항체의 첨가 후 신호 강도를 이용하여 항체 및 PD-1의 결합 특성을 결정한다.

[0093]

중화 아비딘(비오틴에 대한 결합)을 PBS 완충제에 의해 1 μ l/ml로 희석하고, 100 μ l/웰로 96웰 플레이트에 피펫팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 16시간-20시간 동안 정치시켰다. 96웰 플레이트를 PBS 완충제를 제거한 후 PBST(PH 7.4 PBS, 0.05% 트윈(tween) 20 함유)에 의해 1회 세척하고, 이후 플레이트를 항온처리하고 120 μ l/웰의 PBST/1%의 젖의 첨가에 의해 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 용액의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 세척한 후, PBST/1%의 젖에 의해 희석된 1 μ g/ml의 비오틴 라벨링된 PD1-FC를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 차단 용액의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 3회 동안 세척한 후, PBST/1%의 젖에 의해 적합한 농도로 희석된 시험 PD-1 항체를 첨가하고, 실온에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 반응 시스템의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 3회 동안 세척한 후, PBST/1%의 젖에 의해 희석된 100 μ l/웰의 HRP 라벨링된 항-젖과 2차 항체(더 잭슨 래버러토리즈(The Jackson Laboratory))를 첨가한 후, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. PBST에 의해 3회 동안 세척한 후, 플레이트를 100 μ l/웰의 TMB에 의해 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 항온처리하였다. 이후, 반응을 100 μ l/웰의 1M H₂SO₄의 첨가에 의해 종결시켰다. 450nm에서의 흡광도 값을 NOVOSTar 마이크로플레이트 판독기에서 판독하고; ELISA 결합 EC₅₀ 값을 계산하였다.

| 시험 항체 | ELISA, EC50, nM | |
|--------|-----------------|----------|
| | 인간 PD-1 | 사이노 PD-1 |
| mAb005 | 0.25 | 0.27 |

[0094]

[0095] 결과는 항체 mAb005가 인간 PD-1Fc(인간 PD-1) 및 사이노몰거스 PD-1Fc(사이노 PD-1)에 훌륭한 결합 활성을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0096] PD-1 항체 및 PD-1 리간드의 결합의 실험실내 차단 검정:

[0097] 종양 세포의 표면에서의 PD-L1은 T 세포의 표면에서 PD-1에 대한 결합에 의해 T 세포의 증식에 대한 억제 효과를 나타낸다. PD-1 항체는 PD-1에 대한 결합에 의해 PD-L1/PD-1 신호전달 경로를 차단하여서 T 세포 증식을 자극한다. PD-1/PD-L1 결합 차단 검정을 이용하여 신호전달 경로에서 PD-1 항체의 차단 활성을 검출한다.

[0098] 이 실험에서, 96웰 플레이트를 FC에 용합된 세포의 도메인을 가지는 PD-1 단백질(PD-1-FC)에 의해 코팅하고, 시험 PD-1 항체와 항온처리하고, 이후 비오틴 라벨링된 PD-L1을 항온처리를 위해 첨가하였다. 플레이트를 세척한 후, 비오틴 라벨링된 PD-L1의 결합 양을 검출하고, 리간드 PD-L1 결합에 대한 PD-1 항체의 차단 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0099] PD-1-FC를 PH 9.6 CB 완충제(1.59g의 Na₂CO₃ 및 2.93g의 NaHCO₃을 1 l의 증류수 중에 용해시킴)에 의해 1μg/ml로 희석하고, 100μl/웰로 96웰 플레이트로 피펫팅하고, 4℃에서 16시간-20시간 동안 정치시켰다. 96웰 플레이트를 PBST(PH 7.4 PBS, 0.05% 트윈 20 함유)에 의해 세척한 후, PBS 완충제를 제거하고, 이후 플레이트를 항온처리하고, 120μl/웰의 PBST/1%의 젖에 의해 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 용액의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 1회 세척한 후, 샘플 희석제(5% BSA, 0.05% 트윈 20 함유하는 PH 7.4 PBS)에 의해 적합한 농도로 희석된 90μl의 시험 PD-1 항체를 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후, 10배 농도의 비오틴 라벨링된 PD-L1(Beijing Sino Biological Inc.)(10μg/ml)을 10μl/웰로 플레이트에 첨가하고, 오실레이터(oscillator)에 의해 진동시키고 혼합하고, 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응 시스템의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 6회 동안 세척한 후, 1:400의 비율로 PBST에 의해 희석된 100μl/웰의 스트렙타비딘-퍼옥시다제 중합체를 첨가하고, 실온에서 50분 동안 진동 하에 항온처리하였다. PBST에 의해 6회 동안 세척한 후, 플레이트를 100μl/웰의 TMB에 의해 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 항온처리하였다. 이후, 반응을 100μl/웰의 1M H₂SO₄를 첨가하여 종결시켰다. 450nm에서의 흡광도 값을 NOVOSTar 마이크로플레이트 판독기에서 판독하고, 리간드 PD-L1 결합에 대한 PD-1의 차단 IC₅₀ 값을 계산하였다.

| 시험 항체 | LBB 검정 |
|--------|----------|
| | IC50, nM |
| mAb005 | 1.13 |

[0100]

[0101] 결과는 항체 mAb005가 PD-L1과 PD-1의 결합을 차단하는 데 매우 효과적이라는 것을 보여준다.

[0102] **실시예 3: 실험실내 PD-1 항체의 결합 선택도 검정**

[0103] PD-1 패밀리의 다른 단백질에 대한 PD-1 항체의 특이적 결합 활성을 검출하기 위해, 인간 CTLA4 및 인간 CD28을 결합 검정에 사용하였다. 한편, 마우스의 PD-1을 결합 검정에 또한 사용하여 인간/원숭이 이외의 상이한 종에 대해 PD-1 항체의 다양성을 결정하였다.

[0104] 선택적인 결합 단백질: 인간 PD-1, 인간 ICOS, 인간 CTLA4, 인간 CD28 및 마우스 PD-1(Beijing Sino Biological Inc.)을 각각 PBS 완충제에 의해 1μg/ml로 희석하고, 100μl/웰로 96웰 플레이트에 피펫팅하고 4℃에서 16시간-20시간 동안 정치시켰다. 96웰 플레이트를 PBST(PH 7.4 PBS, 0.05% 트윈 20 함유)에 의해 1회 세척한 후, PBS 완충제를 제거하고, 이후 플레이트를 항온처리하고 120μl/웰의 PBST/1%의 젖에 의해 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 용액의 제거 후, 플레이트를 PBST 완충제에 의해 3회 동안 세척한 후, 시험 PD-1 항체를 첨가하고, 실온에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 반응 시스템의 제거 후, 플레이트를 PBST에 의해 3회 동안

세척한 후, PBST/1%의 젓에 의해 희석된 100 μ l/웰의 HRP 라벨링된 항-젓과 2차 항체(더 잭슨 래버러토리즈)를 첨가한 후, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 PBST에 의해 3회 동안 세척한 후, 100 μ l/웰의 TMB를 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 항온처리하였다. 이후, 반응을 100 μ l/웰의 1M H₂SO₄의 첨가에 의해 종결시켰다. 450nm에서의 흡광도 값을 NOVOStar 마이크로플레이트 판독기에서 판독하였다.

| 시험 항체 | 인간 PD1-FC | 마우스 PD1-Fc | 인간 ICOS/Fc | 인간 CTLA4 | 인간 CD28 |
|--------|-----------|------------|------------|----------|---------|
| mAb005 | 2.64 | 0.07 | 0.15 | 0.17 | 0.12 |

[0105]

[0106]

결과는 mAb005 항체가 PD-1 패밀리의 다른 단백질에 대한 특이적 결합 활성을 나타내지 않는다는 것을 입증하였다. 한편, mAb는 젓과 PD-1에 대해 중 교차반응성을 가지지 않았다.

[0107]

실시예 4: PD-1 항체의 실험실내 세포 결합 검정

[0108]

FACS(fluorescence-activated cell sorter: 형광 활성화 셀 분류기)는 단백질 및 세포의 상호작용을 검출하기 위한 시험 방법이다. 세포 표면에서 발현된 네이티브 PD-1에 대한 PD-1 항체의 결합 활성을 검출하기 위해 시험을 이용한다. 시험에서 이용된 세포는 PD-1을 높게 발현하는 CHO 세포이다(실시예 1, PD-1에 의해 형질감염된 CHO 세포(서열 번호 2) 참조).

[0109]

PD-1을 높게 발현하는 CHO 세포를 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 펠렛을 수집하고, 세포 계수를 위해 10-15ml의 예비냉각된 흐름 완충제 중에 현탁시켰다. 세포를 1000rpm에서 50ml의 원심분리기 관에서 5분 동안 원심분리하고 수집하였다. 상청액의 제거 후, 펠렛을 0.5-1.0 \times 10⁷ 세포/ml의 밀도로 예비냉각된 차단 완충제에 의해 재현탁시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 항온처리 후, 재현탁액을 100 μ l/웰로 96웰 플레이트에 피펫팅하였다. 96웰 플레이트를 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 1차 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 재현탁시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 암소에서 60분 동안 항온처리하였다. 원심분리하고 상청액을 버린 후, 1:400으로 희석된 100 μ l의 FITC 라벨링된 2차 항체(BD Biosciences)를 첨가하였다. 세포를 재현탁시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 암소에서 60분 동안 항온처리하였다. 세포를 흐름 완충제에 의해 2회 세척하고, 재현탁시키고, 유동 세포계수 검정을 위해 1% 파라포름알데하이드에 의해 고정시켰다.

| 시험 항체 | MFI | | | |
|--------|------|-----|-------|--------|
| | 50nM | 5nM | 0.5nM | 0.05nM |
| mAb005 | 468 | 319 | 71.2 | 14 |

[0110]

[0111]

결과는 mAb005 항체가 세포 표면에서 PD-1에 또한 결합할 수 있다는 것을 보여준다.

[0112]

실시예 5: 실험실내 결합 친화도 및 동역학적 검정

[0113]

비아코어(Biacore) 방법은 단백질의 상호작용 친화도 및 동역학을 객관적으로 측정하는 인정된 검정이다. 본 발명자들은 비아코어(GE)에 의해 본 발명의 시험 PD-1 항체의 규명된 친화도 및 결합 동역학을 분석하였다.

[0114]

비아코어에 의해 제공된 키트의 지시에 따르면, 본 발명의 시험 PD-1 항체를 표준 아미노 커플링 방법을 이용하여 CM5(GE) 칩에 공유 연결시켰다. 이후, 동일한 완충제 중에 희석된 PD-1 His 단백질(Beijing Sino Biological Inc.)의 일련의 구배 농도를 연속하여 각각의 사이클에 로딩하였다. 이후, 샘플을 키트에서 재생된 시약에 의해 재생하였다. 항원-항체 결합 동역학을 3분 동안 추적하고 해리 동역학을 10분 동안 추적하였다. 얻은 데이터를 1:1(랭뮤어(Langmuir)) 결합 모델을 사용하여 GE의 BIAevaluation 소프트웨어에 의해 분석하였다. 검정에 의해 결정된 Ka(kon), kd(koff) 및 KD 값은 하기 표에 기재되어 있다.

| 시험 항체 | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) |
|--------|-----------|----------|----------|
| mAb005 | 1.057E+5 | 3.769E-4 | 3.566E-9 |

[0115]

[0116]

결과는 PD-1에 대한 항체 mAb005의 결합 Kd 값이 3.57nM에 도달한다는 것을 보여준다.

[0117] **실시예 6 실험실내 세포학 시험**

[0118] 항체에 의해 영향을 받는 새로운 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 증식 검정을 이용하여 항체 mAb005의 세포 활성을 검출한다.

[0119] 새로운 인간 PBMC 밀도를 2×10^6 /ml로 조정하고, 2ml/웰로 6웰 플레이트에 시딩하고, 37°C, 5% CO₂에서 6시간 동안 항온처리하였다. 현탁액 세포를 버린 후, 유착 세포의 각각의 웰을 100ng/ml의 GM-CSF(granulocyte colony stimulating biological factor: 과립구 콜로니 자극 생물학적 인자) 및 100ng/ml의 IL-4를 함유하는 2ml의 RPMI1640 배지, 및 2일 동안 항온처리 후 100ng/ml의 GM-CSF 및 100ng/ml의 IL-4를 함유하는 또 다른 1ml의 RPMI1640 배지와 혼합하고, 이후 세포를 2일 동안 연속하여 배양한 후, 각각의 웰에 100ng/ml의 TNF- α (tumor necrosis factor- α : 종양 괴사 인자- α)를 첨가하고, 또 다른 2일 동안 배양하여 성숙 수지상 세포를 얻었다. 수지상 세포 및 동종이계 T 세포를 각각 1×10^6 /ml 및 1×10^5 /ml의 농도로 원심분리하고 재현탁시키고, 100 μ l/웰로 96웰 플레이트에 피펫팅하고, PBS에 의해 상이한 농도 구배로 희석된 20 μ l/웰의 항체를 첨가하고, 세포를 37°C, 5% CO₂ 항온처리기에서 5일 동안 배양하였다. 이후, 100 μ l의 세포 배양물을 샘플링하여 셀티터-글루(CellTiter-Glo)(등록상표) 발광 세포 생존능력 검정 키트에 의해 세포 증식을 검출하였다. 결과가 도 1에 도시되어 있고, 이것은 시험 PD-1 항체 mAb005가 83ng/ml의 EC50으로 인간 말초 혈액 단핵 세포의 증식을 효과적으로 자극할 수 있다는 것을 나타낸다. 남은 샘플을 사이토카인 IFN- γ 의 분비를 위해 검출하였다. 결과가 도 2에 도시되어 있고, 이것은 시험 PD-1 항체 mAb005가 PBMC 증식을 자극할 수 있고, 13ng/ml의 EC50으로 동시에 사이토카인 IFN- γ 의 분비를 효과적으로 자극할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0120] **실시예 7: 쥐과 항체 인간화**

[0121] mAb005 항체의 경쇄 가변 영역(mAb005 LCVR, 서열 번호 10) 및 중쇄 가변 영역(mAb005 HCVR, 서열 번호 9)의 서열과 관련하여, 생식선 데이터베이스에서 비-CDR과 가장 잘 일치하는 인간화 주형을 선택하였다. 항체 중쇄 주형은, 서열 번호 13의 서열을 가지는, 인간 생식선 경쇄 IGKV1-39의 FR1, FR2, FR3, 및 JK4의 FR4를 선택하기 위한, IgHV3-7/JH6이고; 경쇄 주형은, 서열 번호 14의 서열을 가지는, 인간 생식선 경쇄 IGKV1-39의 FR1, FR2, FR3, 및 JK4의 FR4를 선택하기 위한 IGKV1-39/JK4이었다.

[0122] 인간 생식선 중쇄 주형(서열 번호 13):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGTIV
TVSS;

[0123]

[0124] 인간 생식선 경쇄 주형(서열 번호 14):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFGGGKVEIK .

[0125]

[0126] 쥐과 항체의 CDR을 선택된 인간화 주형에 그래프팅하여, 인간 주형의 CDR을 대체하고, 이후 IgG4 불변 영역과 조합하여 인간화 항체 H005-1을 얻었다. 이후, 쥐과 항체의 3차원 구조에 기초하여, 문힌 잔기, CDR과 직접적으로 상호작용한 잔기, 및 VL 및 VH의 입체구성에 상당히 영향을 미치는 잔기를 역돌연변이시켜 인간화 항체 H005-2, H005-3 및 H005-4를 얻고, 서열은 하기와 같다.

[0127] 항체 발현

H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLGLGK

서열 번호 11

H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
DGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 번호 12

[0128]

[0129] 그래프팅된 컷과 CDR을 가지는 인간화 항체 H005-1의 HC 서열은 (서열 번호 11)이고, 인간화 항체의 LC 서열은 (서열 번호 12)이다. 항체 활성화에 영향을 미칠 수 있는 부위를 점 돌연변이로 처리하고, 서열은 하기와 같다:

| | HC | LC |
|--------|----------------|----------------|
| H005-1 | 서열 번호 11 | 서열 번호 12 |
| H005-2 | 서열 번호 11, G44R | 서열 번호 12 |
| H005-3 | 서열 번호 11 | 서열 번호 12, A43S |
| H005-4 | 서열 번호 11, G44R | 서열 번호 12, A43S |

[0130]

[0131] cDNA를 각각의 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열(서열 번호 11, 서열 번호 12 및 이의 변이체)에 따라 합성하였다. cDNA를 XhoI 및 BamHI에 의해 분해한 후, 얻어진 cDNA 단편을 BamHI/XhoI 제한 부위에서 pcDNA3.1 발현 벡터(라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 카탈로그 V790-20호)로 삽입하였다. 발현 벡터 및 형질감염 시약 PEI(폴리사이언시스, 인코포레이티드.(Polysciences, Inc.) 카탈로그 23966호)를 사용하여 HEK293 세포(라이프 테크놀로지스 카탈로그 11625019호)를 1:2로 형질감염시키고, 형질감염된 세포를 CO₂ 항온 처리기에서 4-5일 동안 항온처리하였다. 발현된 항체를 원심분리에 의해 회수하고, 종래의 방법에 따라 정제하여 본 발명의 인간화 항체를 얻었다.

[0132] **실시예 8: 인간화 항체 활성화 데이터**

[0133] 인간화 항체를 실험실내 ELISA 결합 검정(방법은 실시예 2의 방법과 동일함), 리간드 결합 차단 검정(방법은 실시예 2의 방법과 동일함), 및 친화도 동역학 실험(방법은 실시예 5의 방법과 동일함)으로 처리하였다. 결과가 하기 표에 기재되어 있다:

| 시험 항체 | ELISA, EC50, nM | LBB 검정, IC50, nM | KD(M) |
|--------|-----------------|------------------|----------|
| H005-1 | 0.11 | 1.27 | 2.79E-09 |
| H005-2 | 0.14 | 1.27 | 2.98E-09 |
| H005-3 | 0.15 | 1.33 | 2.45E-09 |
| H005-4 | 0.14 | 1.36 | 3.89E-09 |

[0134]

[0135] 결과는 인간화 항체 H005-1, H005-2, H005-3 및 H005-4가 각각 2.79, 2.98, 2.45 및 3.89nM의 친화도 동역학 KD로 PD-1 결합 활성을 유지시킨다는 것을 보여준다. 동시에, 모든 인간화 항체는 PD-L1/PD-1 경로에 대해 차단

활성을 효과적으로 나타냈다.

[0136] **실시예 9: PD-1 항체에 의한 종양 세포 성장 저해**

[0137] **1. 실험 재료:**

[0138] U87MG 세포(신경교종 세포): 차이니즈 아카데미 오브 사이언시스 셀 뱅크(Chinese Academy of Sciences Cell Bank)로부터 구입, 카탈로그 TCHu138;

[0139] PBMC(말초 혈액 단핵 세포): 상하이 혈액 협회(Shanghai Blood Center)로부터 구입;

[0140] CD3: 밀테위 바이오텍(Miltenyi Biotec)으로부터 구입, 카탈로그 130-093-387호;

[0141] CD28: 밀테위 바이오텍으로부터 구입, 카탈로그 130-093-375호;

[0142] 셀 카운팅 키트-8: 도진도 래버러토리즈(DOJINDO LABORATORIES)로부터 구입, 카탈로그 CK04호;

[0143] mIgG(음성 대조군): 산타 크루즈(SANTA CRUZ)로부터 구입, 카탈로그 sc-2025; 1660ng/ml의 용량을 사용.

[0144] **2. 실험 방법:**

[0145] 1) U87MG 세포를 10%의 FBS 및 1%의 P/S를 함유하는 EMEM 배지 중에 배양하고, 96웰 플레이트에서 웰당 1×10^4 개의 세포로 항온처리한다.

[0146] 2) H005-1 항체를 PBS에 의해 상이한 농도 구배로 희석하고(도 3의 가로좌표에 도시됨), 96웰 플레이트에 $10 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 항온처리기에서 4시간 동안 항온처리한다.

[0147] 3) 세포 유착 후, $80 \mu\text{l}$ 의 PBMC 세포 현탁액을 각각의 웰에 2×10^4 개의 세포/웰의 세포 밀도로 첨가하고, $10 \mu\text{l}$ 의 CD3 항체 및 CD28 항체를 각각의 웰에 첨가하고, CD3 및 CD28 항체의 최종 농도는 둘 다 500ng/ml이다.

[0148] 4) 37°C, 5% CO₂ 항온처리기에서 항온처리 72시간 후, $10 \mu\text{l}$ 의 CCK8을 전개를 위해 각각의 웰에 첨가한다. 2시간 후, OD450을 결정한다.

[0149] **3. 결과:**

[0150] 결과는 mIgG(음성 대조군)와 비교되어 도 3에 도시되어 있고, 상이한 농도의 PD-1 항체(H005-1)는 U87MG 세포 성장에 상당한 저해 효과를 가지고, 최고 농도에서의 저해 속도는 약 30%였다.

[0151] **실시예 10: 투베르쿨린 자극된 PBMC 증식에 대한 H005-1의 활성**

[0152] 실험실내 투베르쿨린 자극된 PBMC 증식에 대한 인간화 항체 H005-1의 활성을 검출하였다.

[0153] 15ml의 새로운 PBMC에, 약 3×10^7 의 세포를 $20 \mu\text{l}$ 의 투베르쿨린(Shanghai BiYou Biotechnology, 카탈로그 97-8800호)에 첨가하고, 혼합물을 37°C, 5% CO₂ 항온처리기에서 5일 동안 항온처리하였다. 6일에, 배양된 세포를 원심분리하고, 5×10^5 개의 세포/ml로 조정된 밀도로 새로운 배지에 재현탁시켰다. $190 \mu\text{l}$ 의 재현탁된 세포를 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 플레이팅하였다. 인간화 항체 H005-1을 $10 \mu\text{l}$ /웰로 96웰 플레이트의 상응하는 웰에 첨가하였다. 대조군 및 블랭크 군에 $10 \mu\text{l}$ 의 PBS를 첨가하였다. 세포 배양 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 항온처리기에서 항온처리하고, 72시간 후, PBMC 증식(프로메가(Promega), 카탈로그 G7571호) 및 IFN- γ 분비(네오 바이오 사이언스(Neo Bioscience), 카탈로그 EHC102g호)를 결정하였다. 결과는 하기와 같다:

[0154] **투베르쿨린 자극된 PBMC 증식 및 IFN- γ 분비에 대한 시험 샘플의 활성화 효과**

| 샘플 | T 세포 증식 EC50(ng/ml) | IFN- λ EC50(ng/ml) |
|--------|---------------------|----------------------------|
| H005-1 | 15.95 ± 17.15 | 56.87 ± 48.53 |

주의: n=4

[0155]

[0156] 실험 결과는 인간화 항체 H005-1이 외인성 투베르쿨린 자극된 PBMC 증식 및 IFN- γ 분비를 훌륭히 활성화한다는 것을 보여준다.

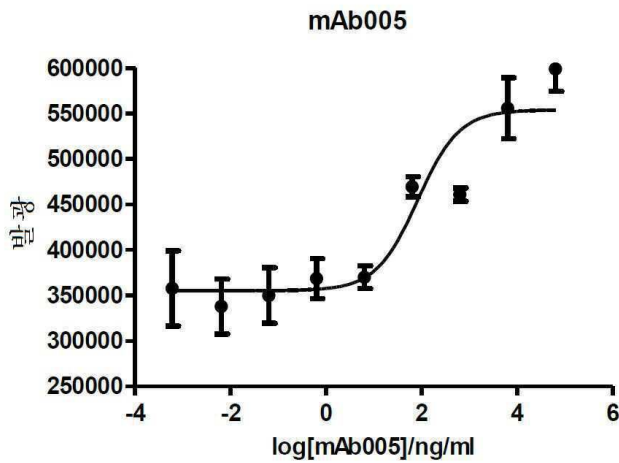
[0157] 실시예 11: H005-1에 의한 피하로 접종된 U-87MG 종양의 저해

[0158] 100 μ l의 U87 세포(5×10^6 개의 세포)를 SCID-베이지 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하였다. 종양이 7일 내지 10일 후 80-100mm³로 성장할 때, SCID-베이지 마우스를, 너무 크거나 너무 작은 체중 또는 종양을 가지는 것을 없애고, 종양 용적에 따라 H005-1 10mg/kg의 군 및 인간 IgG 10mg/kg의 군으로 무작위로 분할하고, 각각의 군은 7마리의 마우스(DO)였다. 3일 동안 CD3 항체에 의해 자극된 2 종류의 PBMC를 1:1의 비율로 혼합하고, 5×10^5 개의 세포/60 μ l로 종양 조직에 주입하고, 한편, 시험 항체를 전체 3 용량 동안 7일마다 1회 피하로 주입하였다. 마우스를 종양 용적에 대해 측정하고 1주 2회 칭량하였다. 데이터를 기록한다. 종양 용적(V)을 $V=1/2 \times a \times b^2$ 로 계산하고, 여기서 a 및 b는 각각 길이 및 폭을 나타낸다.

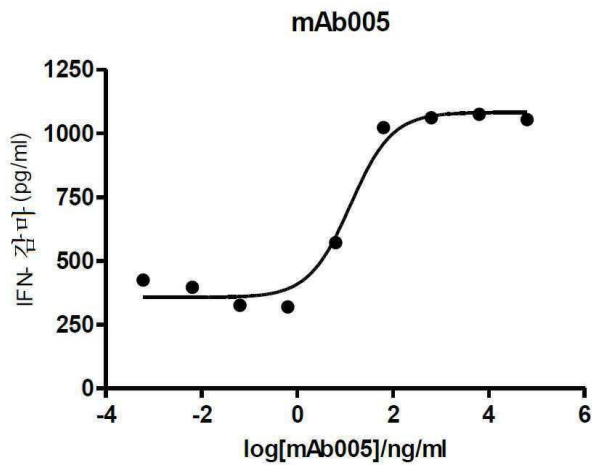
[0159] 결과는 도 4(치료 후 종양 용적 변화) 및 도 5(치료 후 마우스 중량 변화)에 도시되어 있고, 이것은 항체 H005-1이 U87MG 종양 성장을 훌륭히 저해하고, 마우스의 체중에 영향을 가지지 않는다는 나타낸다.

도면

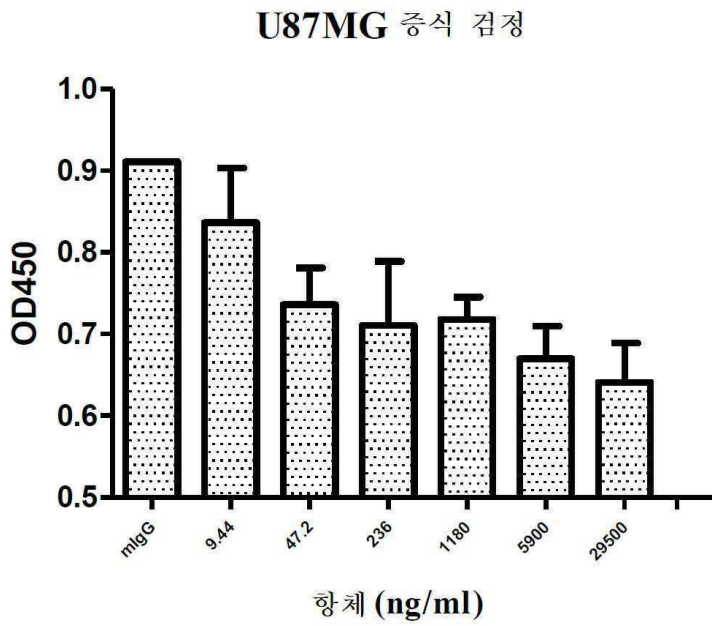
도면1



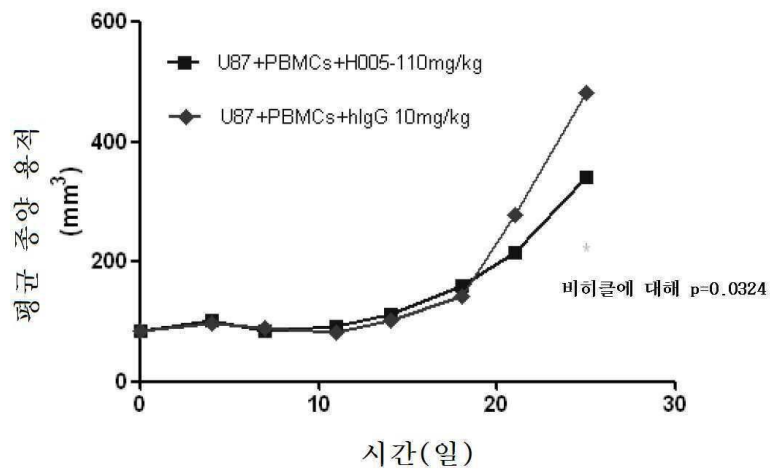
도면2



도면3



도면4



Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 290 295 300
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 325 330 335
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 340 345 350
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 355 360 365
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 370 375 380
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390 395
 <210> 2
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus HCDR2

<400> 4

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus HCDR3

<400> 5

Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR1

<400> 6

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR2

<400> 7

Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR3

<400> 8

Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus vVH

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus VL

<400> 10

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

1 5 10 15

Glu Gly Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> heavy chain sequence of humanized antibody H005-1

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Met Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> light chain framework region sequence of humanized antibody

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

 85 90 95

Ile Lys