



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0145470  
(43) 공개일자 2024년10월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7026551
- (22) 출원일자(국제) 2023년02월14일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년08월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/075862
- (87) 국제공개번호 WO 2023/151693  
국제공개일자 2023년08월17일
- (30) 우선권주장  
202210132762.1 2022년02월14일 중국(CN)

- (71) 출원인  
아케소 바이오파마, 인크.  
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선  
농 불러바드 6
- (72) 발명자  
시아 유  
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선  
농 불러바드 6  
왕 중민  
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선  
농 불러바드 6  
리 바이용  
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선  
농 불러바드 6
- (74) 대리인  
김진희, 김태홍

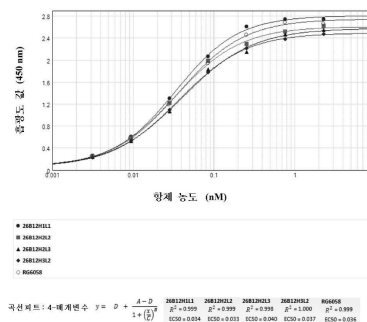
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 항-TIGIT 항체 및 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물 및 용도

(57) 요약

본 발명은 약제 분야에 관한 것이고, 항-TIGIT 항체 및 이의 약제학적 조성물 및 용도, 특히 종양을 예방 또는 치료하기 위한 항-PD-1-항-VEGFA 항체와 조합한 용도를 제공한다. 구체적으로, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다. 항체의 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 3 내지 5에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하고; 항체의 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 8 내지 10에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1 내지 LCDR3을 포함한다. 항체는 TIGIT에 효과적으로 결합할 수 있고, 종양의 예방 및 치료에 적용될 가능성을 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

**C07K 16/22** (2013.01)

**C07K 16/2818** (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물로서, 선택적으로 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 더 포함하고,

상기 항-TIGIT 항체는 서열번호 1에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3 및 서열번호 6에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고(바람직하게는, IMGT 넘버링 시스템에 따르면, 상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 3 내지 5에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 8 내지 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1 내지 LCDR3을 포함함),

상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체는

PD-1을 표적화하는 제1 단백질 기능 영역 및

VEGFA를 표적화하는 제2 단백질 기능 영역

을 포함하되;

상기 제1 단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 상기 제2 단백질 기능 영역은 단일 사슬 항체이거나; 상기 제1 단백질 기능 영역은 단일 사슬 항체이고, 상기 제2 단백질 기능 영역은 면역글로불린이며;

상기 면역글로불린은 서열번호 31에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 35 내지 37에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름) 및 서열번호 33에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 38 내지 40에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하고;

상기 단일 사슬 항체는 서열번호 41에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 45 내지 47에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름) 및 서열번호 43에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 48 내지 50에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하거나;

또는

상기 면역글로불린은 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 45 내지 47에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 48 내지 50에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

상기 단일 사슬 항체는 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 35 내지 37에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는, 각각 서열번호 38 내지 40에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

상기 면역글로불린은 인간 IgG1 하위유형의 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-TIGIT 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15 및 서열번호 17로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고; 상기 항-TIGIT 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 6, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23 및 서열번호 25로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지며;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우,

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 가지며;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 상기 항체는 무린 이외의 종, 예를 들어 인간 항체로부터 유래된 비-CDR 영역을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 상기 항체는 Ig 감마-1 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI 등록: P01857)인 중쇄 불변 영역 및 Ig 카파 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI 등록: P01834)인 경쇄 불변 영역을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, 상보성 결정 영역 단편, 단일 사슬 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 다이아바디(diabody)로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 상기 항체는 TIGIT-mFc에 4E-10 미만 또는 4E-11 미만의 K<sub>D</sub>로 결합하고; 바람직하게는, K<sub>D</sub>는 Fortebio 분자 상호작용 기기에 의해 측정되고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 상기 항체는 TIGIT에 1.5nM 미만, 1.2nM 미만 또는 1nM 미만의 EC<sub>50</sub>으로 결합하고; 바람직하게는, EC<sub>50</sub>은 유세포 분석기에 의해 측정되고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체는 단클론성 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 상기 항체는 중국 타입 컬처 컬렉션 센터(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)에 CCTCC 번호 C2020208로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT019에 의해 생성된 항체인, 약제학적 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 상기 면역글로불린의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 31 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고; 상기 면역글로불린의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 33 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고; 상기 단일 사슬 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 41 또는 이에 대

하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고; 상기 단일 사슬 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 43 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지며;

바람직하게는, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 상기 제1 단백질 기능 영역은 직접 또는 링커 단편을 통해 상기 제2 단백질 기능 영역에 연결되고/되거나; 상기 단일 사슬 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 직접 또는 링커 단편을 통해 상기 단일 사슬 항체의 상기 경쇄 가변 영역에 연결되고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 상기 링커 단편은 (GGGGGS)<sub>n</sub>이 되, n은 양의 정수이고; 바람직하게는 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 상기 제1 단백질 기능 영역의 수 및 상기 제2 단백질 기능 영역의 수는 각각 독립적으로 1, 2 또는 그 이상이고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 상기 단일 사슬 항체(바람직하게는 상기 중쇄 가변 영역)는 상기 면역글로불린의 상기 중쇄의 C-말단에 연결되;

EU 넘버링 시스템에 따르면, 상기 면역글로불린은

L234A 및 L235A; 또는

L234A 및 G237A; 또는

L235A 및 G237A; 또는

L234A, L235A 및 G237A

의 돌연변이를 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체는

PD-1을 표적화하는 제1 단백질 기능 영역 및

VEGFA를 표적화하는 제2 단백질 기능 영역

을 포함하되;

상기 제1 단백질 기능 영역의 수는 2이고, 상기 제2 단백질 기능 영역의 수는 1이며;

상기 제1 단백질 기능 영역은 단일 사슬 항체이고, 상기 단일 사슬 항체는 동일하거나 상이하고; 상기 제2 단백질 기능 영역은 면역글로불린이고;

상기 면역글로불린의 상기 중쇄는 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열을 갖고, 상기 경쇄는 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열을 갖고;

상기 단일 사슬 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열을 갖고, 상기 단일 사슬 항체의 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 서열을 갖고;

상기 단일 사슬 항체는 상기 면역글로불린의 상기 중쇄의 C-말단에 연결되고;

상기 제1 단백질 기능 영역은 제1 링커 단편을 통해 제2 단백질 기능 영역에 연결되고; 단일 사슬 항체의 상기 중쇄 가변 영역은 제2 링커 단편을 통해 상기 단일 사슬 항체의 상기 경쇄 가변 영역에 연결되고; 상기 제1 링커 단편과 상기 제2 링커 단편은 동일하거나 상이하고;

바람직하게는, 상기 제1 링커 단편과 상기 제2 링커 단편은 각각 서열번호 52 및 서열번호 53으로부터 독립적으

로 선택되는 아미노산 서열을 갖고;

바람직하게는, 상기 제1 링커 단편과 상기 제2 링커 단편은 둘 다 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열을 갖고;

바람직하게는 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 상기 중쇄는 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 경쇄는 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 상기 이중특이적 항체는 IgG-scFv의 구조를 갖되, 상기 IgG 부분은 항-VEGFA 항체이고, scFv 부분은 항-PD-1 항체인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체 기준으로 1:5 내지 5:1, 예를 들어 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1의 질량비로 존재하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

별도의 패키지에 제1 제품 및 제2 제품을 포함하는 키트로서,

상기 제1 제품은 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고;

상기 제2 제품은 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고;

바람직하게는, 상기 키트는 별도의 패키지에 하나 이상의 화학요법제를 포함하는 제3 제품을 더 포함하고,

바람직하게는, 상기 제1 제품 및 상기 제2 제품은 독립적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함하고;

바람직하게는, 상기 조합 제품은 패키지 삽입물을 더 포함하고;

바람직하게는, 상기 키트에서, 상기 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체 기준으로 1:5 내지 5:1, 예를 들어 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1의 질량비로 존재하는, 키트.

#### 청구항 6

종양을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및/또는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고;

바람직하게는, 하나 이상의 화학요법제 또는 치료 절차가 조합하여 투여되고(바람직하게는 상기 화학요법제는 화학요법제 또는 성장 저해제(예를 들어, 알킬화제, 안트라사이클린, 항-호르몬제, 아로마타제 저해제, 항-안드로겐제, 단백질 키나제 저해제, 지질 키나제 저해제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 항대사물질, 토포아이스머라제 저해제, 세포독성제 또는 항-종양 항생제, 프로테아솜 저해제, 항-미세소관제, EGFR 길항제, 레티노이드, 타이로신 키나제 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 이들의 조합), 표적 치료제(예를 들어, B-raf 저해제, MEK 저해제, K-ras 저해제, c-Met 저해제, Alk 저해제, 포스포티딜이노시톨 3-키나제 저해제, Akt 저해제, mTOR 저해제, 다이포스포티딜피노사이트 3-키나제/mTOR 저해제, 및 이들의 조합), 항체-약물 접합체(예컨대, 메이탄신, 모노메틸 오리스티틴 E, 칼리케아마이신, 에스페라미신 및 방사성 동위원소 킬레이트제), 항대사물질, 항생제, 식물성 약물 및/또는 호르몬 약물, 바람직하게는 사이클로포스파마이드, 페메트렉시드, 백금-기반 약물, 예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴, 아드리아마이신, 과클리탁셀, 빈카 알칼로이드, 타목시펜, 메게스트롤, 고세렐린, 아스파라기나제 및/또는 플루오로우라실 항신생물제임),

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 및 상기 항-종양 화학요법제는 동시에 또는 순차적으로 투여되고; 더 바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체 및 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체는 외과적 치료 전 또는 후 및/또는 방사선 요법 전 또는 후에 투여되고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 항체, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 및/또는 상기 화학요법제는 정맥내 주사 또는 정맥내 점적 주입에 적합한 형태, 바람직하게는 액체 형태이고;

바람직하게는, 상기 화학요법제 또는 상기 성장 저해제는 알킬화제, 안트라사이클린, 항-호르몬제, 아로마타제 저해제, 항-안드로젠제, 단백질 키나제 저해제, 지질 키나제 저해제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 항대사물질, 토포아이스머라제 저해제, 세포독성제 또는 항-종양 항생제, 프로테아솜 저해제, 항-미세소관제, EGFR 길항제, 레티노이드, 타이로신 키나제 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 이들의 조합으로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 표적 치료제는 B-raf 저해제, MEK 저해제, K-ras 저해제, c-Met 저해제, Alk 저해제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제 저해제, Akt 저해제, mTOR 저해제, 다이포스파티딜글라이콜 3-키나제/mTOR 저해제, 및 이들의 조합으로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 항체-약물 접합체는 메이탄신, 모노메틸 오리스티틴 E, 칼리케아마이신, 에스페라미신 및 방사성 동위원소 킬레이트제로 이루어진 군으로부터 선택되는 약물을 포함하고;

바람직하게는, 상기 종양은 자궁경부암(예를 들어, 전이성 자궁경부암), 자궁내막암, 폐암, 예컨대, 소세포폐암 및 비소세포폐암(예를 들어, 편평 비소세포폐암 또는 비-편평 비소세포폐암), 인후암, 식도암, 식도 편평암, 갑상선암, 중피종, 위암(예를 들어, 진행성 위암, 위장관암, 위 선암종 또는 위식도접합부 선암종), 간암(예를 들어, 간세포 암종), 장암, 직장암, 결장암, 결장직장암, 담관암종, 간담도암, 담도암, 담관암종, 췌장암, 췌장암, 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종), 난소암(예를 들어, 진행성 난소암), 나팔관암, 복막암, 신경교종(예를 들어, 신경교종(neuroglioma) 및 재발성 신경교종), 피부암, 흑색종, 백혈병(예를 들어, 급성 골수성 백혈병), 림프종(예를 들어, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 형질세포암, 골암, 육종, 골육종, 연골육종, 신경아세포종, 골수종(예를 들어, 다발성 골수종), 대세포 신경내분비암, 요로상피 암종(예를 들어, 상부 요로상피암종 또는 방광암), 전립선암, 고환암, 말초 T-세포 림프종, 비인두암, 고도 현미부수체 불안정성(high microsatellite instability: MSI-H) 또는 불일치 복구 결함(mismatch repair deficient: dMMR) 고형 종양, 두경부암, 뇌암(예를 들어, 공격성 뇌암, 예컨대, 교모세포종), 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선종, 유방암(예를 들어, 삼중-음성 유방암), 흉선암, 회맹부 선암종, 앰플레이트(ampullate) 선암종, 점액 또는 장액 낭선암종, 평활근육종, 횡문근육종, 용모막상피종, 악성 포상기태, 악성 세르톨리 세포-기질 세포 종양, 악성 과립 세포종, 난소고환종, 교모세포종, 진균종, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액암 중 하나 이상으로부터 선택되고,

바람직하게는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 상기 항-TIGIT 항체 및/또는 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 체중 kg당 0.1 내지 100mg, 바람직하게는 1 내지 10mg이고; 대안적으로 본 발명의 임의의 양상에 정의된 바와 같은 상기 항-TIGIT 항체 및/또는 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 각각의 대상체에서 10 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg 또는 200mg이고,

바람직하게는, 상기 용량은 1일 2회 내지 약 격일에 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주에 1회로 투여되고;

바람직하게는, 상기 투여 경로는 정맥내 점적 주입 또는 정맥내 주사인, 방법.

### 청구항 7

단위 제형으로서, 바람직하게는, 종양을 치료하는 데 사용되고, 1 내지 10000mg(바람직하게는 10 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg 또는 200mg)의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-TIGIT 항체, 1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체, 및 선택적으로 제6항에 정의된 바와 같은 화학요법제(예컨대, 백금-기반 약물 및/또는 플루오로우라실 항신생물제) 중 하나 이상을 포함하되, 상기 항-TIGIT 항체, 상기 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 및 상기 화학요법제는 별도로 포장되는, 단위 제형.

### 청구항 8

단일 용량 단위로서, 바람직하게는, 종양을 치료하는 데 사용되고, 0.1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-TIGIT 항체, 0.1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는, 단일 용량

단위.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 의학 분야에 속하고, 항-TIGIT 항체 및 이의 약제학적 조성물과 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-TIGIT 단클론성 항체에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] TIGIT(또한 WUCAM, Vstm3 또는 VSIG9로도 알려진, T 세포 Ig 및 ITIM 도메인)는 폴리오바이러스 수용체(PVR)/넥틴 패밀리의 구성원이다. TIGIT는 세포의 면역글로불린 가변 영역(IgV) 도메인, 유형 I 막관통 도메인, 및 고전적인 면역수용체 타이로신-기반 저해성 모티프(ITIM)와 면역글로불린 테일 타이로신(ITT) 모티프가 있는 세포 내 도메인으로 이루어져 있다. TIGIT는 림프구, 특히 이펙터 및 조절성 CD4+ T 세포, 여포성 헬퍼 CD4+ T 세포 및 이펙터 CD8+ T 세포뿐만 아니라, 자연 살해(NK) 세포에서 과발현된다(Yu X, Harden K, Gonzalez L C, et al., The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(1): 48).

[0003] CD155(또한 PVR, Nec15 또는 Tage4로도 알려짐), CD112(또한 PVRL2/넥틴 2로도 알려짐) 및 CD113(또한 PVRL3으로도 알려짐)은 TIGIT가 결합하는 리간드이며(Martinet L, Smyth M J., Balancing natural killer cell activation through paired receptors[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(4): 243-254), 여기서 CD155는 TIGIT에 대한 고친화성 리간드이다. NK 세포에서, 리간드 CD155 또는 CD112에 대한 TIGIT의 결합은 TIGIT-과발현 세포에 대한 NK 세포의 살해 효과를 저해할 수 있다(Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, et al., The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(42): 17858-17863). 또한 PD-1과 TIGIT가 동시에 차단되면, CD8+ T 세포의 살해 효과가 향상될 수 있음이 보고되었다(Johnston R J, Comps-Agrar L, Hackney J, et al., The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(6): 923-937). 최근 연구에서, TIGIT는 NK 세포의 면역 관문이며 중앙 진행 과정에서 저해성 수용체로서 NK 세포 고갈을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌으며; 또한 항-TIGIT 단클론성 항체가 NK 세포 고갈을 역전시키고 다양한 중앙에 대해 면역요법으로 사용될 수 있음이 입증되었다(Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al., Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. *Nature immunology*, 2018, 19(7): 723-732).

[0004] 추가적으로, TIGIT 차단제는 단독으로 또는 PD-1 차단제와 CD96 차단제와 조합하면 야생형 및 CD155-/- 마우스 모델에서 B16 흑색종의 성장을 상당히 감소시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al., CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest*, 2018, 128:2613-25). CD112R 차단제는 단독으로 또는 TIGIT 차단제 및/또는 PD-1 차단제와 조합하면 난소암, 자궁내막암 및 폐 중앙에서 TIL의 사이토카인 생성 능력을 증가시킬 수 있었다(Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al., PVRL2 and PVRL1 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8<sup>+</sup> T-cell function. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7:257-68).

[0005] 새로운 면역 환문 항체 약제인 항-TIGIT 항체 약제는 다양한 응용 분야에서 유망한 유용성을 가지며, 중앙의 면역요법에 사용될 수 있다. Roche가 개발한 티라고루맵은 현재 3상 임상 시험 중이고, 1차 요법으로서 TIGIT 단클론성 항체인 티라고루맵과 PD-L1 약제인 티센트릭(아테졸리주맵)의 조합은 2상 임상 시험에서 PD-L1-양성 전이성 비소세포폐암(NSCLC) 환자에서 질 용인되었으며 질환 진행 위험이 43% 감소하는 상당한 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Exit C. Roche to present first clinical data on novel anti-TIGIT cancer immunotherapy tiragolumab at ASCO[J]). 기존 임상 기록은 TIGIT가 비소세포폐암, 소세포폐암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 흑색종, 췌장암, 자궁경부 중앙, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종, B-림프종 및 형질세포암을 치료하기 위한 중요한 표적임을 나타낸다.

[0006] 그러나, 기존 항-인간 TIGIT 항체 약제의 친화도는 낮으며; 여전히 친화도가 높은 항-TIGIT 항체가 필요하다.

[0007] 따라서, 자가면역 질환을 치료하기 위해 TIGIT에 대한 친화도가 높고, 효능이 더 높으며, 독성 부작용이 더 적은 항체 약제의 개발이 매우 중요하다.

- [0008] 막관통 수용체 PD-1(예정세포사 단백질-1(programmed cell death protein-1))은 CD28 패밀리의 구성원이고, 활성화된 T 세포, B 세포 및 골수 세포에서 발견된다. PD-1, PDL1(예정세포사 1 리간드 1(programmed cell death 1 ligand 1) 또는 PD-L1) 및 PDL2(예정세포사 1 리간드 2 또는 PD-L2)의 리간드는 둘 다 B7 슈퍼패밀리의 구성원이고, 여기서 PDL1은 T 세포, B 세포, 내피 세포, 및 상피 세포를 포함하여 다양한 세포에서 발견되고, PDL2는 수지상 세포 및 대식세포와 같은 항원-제시 세포에서만 발견된다.
- [0009] PD-1/PDL1 신호전달 경로는 면역 관용, 미생물 감염, 및 종양 면역 탈출을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. PD-1은 주로 T 세포와 같은 면역 세포에서 발견되고, PD-1의 리간드 PDL1은 복수의 인간 종양 조직에서 고도로 발견된다. PD-1/PDL1 신호전달 경로를 차단하면 저해된 T 세포를 활성화시킬 수 있으며, 따라서 암 세포를 공격한다. PD-1/PDL1 신호전달을 차단하면 종양 항원-특이적 T 세포의 증식을 촉진시키고, 종양 세포 사멸 과정을 활성화시켜, 국소적인 종양 성장을 추가로 저해할 수 있다(Julie R et al., 2012, *N Engl J Med.*, 366:2455-2465). 추가적으로, PDL1 발현이 높은 종양은 검출하기 어려운 암과 연관되어 있다(Hamanishi et al., 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3360-5). 효과적인 방법은 항-PD-1 항체를 투여하여 PD-1의 발현을 조절하는 것이다. PD-1 항체의 광범위한 항-종양 전망과 놀라운 효능으로 인해, PD-1 경로를 표적화하는 항체가 다양한 종양, 예를 들어 비소세포폐암, 신장세포 암종, 난소암, 흑색종(Homet M. B., Parisi G., et al., 2015, *Semin Oncol.*, 42(3):466-473), 백혈병 및 빈혈(Held SA, Heine A, et al., 2013, *Curr Cancer Drug Targets.*, 13(7):768-774)의 치료에 돌파구를 가져올 것임이 업계에서 널리 받아들여지고 있다.
- [0010] 혈관 내피 성장 인자(VEGF)는 내피 세포의 분열과 증식을 촉진하고, 새로운 혈관의 형성을 촉진하고, 혈관 투과성을 개선시킬 수 있는 성장 인자이다. 이는 세포 표면의 혈관 내피 성장 인자 수용체에 결합하고 타이로신 키나제 신호 전달 경로를 활성화시킴으로써 역할을 한다. 종양 조직에서, 종양 세포, 및 종양에 침입한 대식세포와 비만 세포는 높은 수준의 VEGF를 분비하고, 주변분비 형태로 종양 혈관 내피 세포를 자극하고, 내피 세포의 증식 및 이동을 촉진하고, 혈관신생을 유도하고, 종양의 지속적인 성장을 촉진하고, 혈관 투과성을 개선시키며, 주변 조직에 피브린 침착을 유발하고, 단핵 세포, 섬유아세포 및 내피 세포의 침윤을 촉진할 수 있으며, 이는 종양 기질의 형성과 종양 세포의 새로운 혈관으로의 진입을 용이하게 하고 종양 전이를 촉진한다. 따라서, 종양 혈관신생을 저해하는 것은 현재 가장 유망한 종양 치료 방법 중 하나로 간주된다. VEGF 패밀리는 VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, 및 PIGF를 포함한다. 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)는 VEGFR1(또한 Flt1로도 알려짐), VEGFR2(또한 KDR 또는 Flk1로도 알려짐), VEGFR3(또한 Flt4로도 알려짐) 및 뉴로핀린-1(NRP-1)을 포함한다. 처음 3개 수용체는 타이로신 키나제 슈퍼패밀리의 구성원이고, 막외 영역, 막관통 세그먼트 및 막내 영역으로 구성된 유사한 구조를 가지며, 여기서 막외 영역은 면역글로불린-유사 도메인으로 구성되고, 막내 영역은 타이로신 키나제 영역이다. VEGFR1 및 VEGFR2는 혈관 내피 세포의 표면에서 주로 발견되고, VEGFR3은 림프 내피 세포의 표면에서 주로 발견된다.
- [0011] VEGF 패밀리의 분자는 이들 수용체에 대해 상이한 친화도를 갖는다. VEGFA는 주로 VEGFR1, VEGFR2 및 NRP-1과 함께 작용한다. VEGFR1은 처음으로 식별된 수용체이고, 정상적인 생리학적 조건 하에서 VEGFR2보다 VEGFA에 대해 더 높은 친화도를 갖지만 VEGFR2보다 세포내 세그먼트에서 더 낮은 타이로시나제 활성을 갖는다(Ma Li, *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24(5), 2016:146-148).
- [0012] VEGFR2는 혈관신생 및 혈관 조사의 주요 조절자이고, VEGFR1보다 훨씬 더 높은 타이로신 키나제 활성을 갖는다. VEGFR2는 리간드 VEGFA에 결합한 후, 혈관 내피 세포의 증식, 분화 및 기타 진행뿐만 아니라, 혈관의 형성 과정 및 혈관 투과성을 매개한다(Roskoski R Jr. et al., *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(3), 2007:179-213). VEGFA는 VEGFR2에 결합한 후, 하류 PLC- $\gamma$ -PKC-Raf-MEK-MAPK 신호전달 경로를 통해 관련된 세포내 단백질 유전자의 전사 및 발현을 매개하고, 따라서 혈관 내피 세포의 증식을 촉진한다(Takahashi T et al., *Oncogene*, 18(13), 1999:2221-2230).
- [0013] VEGFR3은 타이로신 키나제 패밀리의 구성원 중 하나로서, 배아 혈관 내피 세포 및 성숙한 림프 내피 세포에서 주로 발견되며, VEGFC 및 VEGFD는 VEGFR3에 결합하여 림프 내피 세포의 증식 및 이동을 자극하고 림프관의 신생을 촉진하고; NRP-1은 비-타이로신 키나제 막관통 단백질로서, 생물학적 신호를 독립적으로 전달할 수는 없지만 VEGF 타이로신 키나제 수용체와 복합체를 형성한 후에만 신호전달을 매개할 수 있다. (Ma Li, *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24(5), 2016:146-148).
- [0014] VEGFA 및 VEGFR2는 주로 혈관신생 조절에 관여하는데, 여기서 VEGFA가 VEGFR2에 결합하기 전과 후에 상류 및 하류 경로에서 수많은 중간 신호의 캐스케이드 반응이 형성되고, 최종적으로 생리학적 기능이 증식, 생존, 이동, 투과성 증가, 말초 조직으로의 침윤 및 내피 세포의 기타 패턴에 의해 변화된다(Dong Hongchao et al., Sep.

2014, *Journal of Modern Oncology*, 22(9): 2231-3).

[0015] 현재, 인간 VEGF, 특히 VEGFA를 표적화하는 여러 가지 인간화된 단클론성 항체, 예컨대, 베바시주맙이 있으며, 베바시주맙은 2004년 동안 잇달아 비소세포폐암, 신장세포 암종, 자궁경부암, 및 전이성 결장직장암과 같은 다양한 종양의 치료용으로 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)의 승인을 받았다.

[0016] 요약하면, 효능이 더 높은 치료법 또는 조합 요법을 개발하는 것은 큰 의미가 있다.

### 발명의 내용

[0017] 집중적인 연구와 창의적 노력 끝에, 본 발명자들은 포유동물 세포 발현 시스템을 사용하여 재조합 인간 TIGIT를 항원으로 발현하여 마우스를 면역시키고, 마우스 비장 세포와 골수종 세포의 융합에 의해 하이브리도마 세포를 얻었다. 본 발명자들은 다수의 샘플을 스크리닝함으로써 하이브리도마 세포주 LT019(CCTCC 번호 C2020208로 기탁됨)를 획득하였다.

[0018] 본 발명자들은 놀랍게도 하이브리도마 세포주 LT019가 인간 TIGIT에 특이적으로 결합하는 특정 단클론성 항체 (26B12로 지정함)를 분비할 수 있으며, 상기 단클론성 항체는 TIGIT에 효과적으로 결합하고, 면역 세포에서 TIGIT의 저해 효과를 감소시키며, T 세포의 활성을 촉진하고, NK 세포 고갈을 역전시키며, 종양에 대한 면역 세포의 살해 효과를 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 인간화된 항-인간 TIGIT 항체를 창의적으로 제조하였다(26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4로 지정함).

[0019] 본 발명자들은 또한 놀랍게도 본 발명의 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4가 TIGIT에 대한 결합 활성을 갖고 강한 친화도를 가지며; 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4는 TIGIT의 활성을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 발견하였다.

[0020] 또한, 본 발명자들은 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체와 조합한 항-TIGIT 항체가 종양을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0021] 본 발명의 항체는 종양(예를 들어, 비소세포폐암, 소세포폐암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 흑색종, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종 및 형질세포암)과 같은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용할 가능성을 갖는다. 본 발명은 아래에 상세히 기술되어 있다.

[0022] 본 발명의 일 양상은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이고, 여기서

[0023] 항-TIGIT 항체는 서열번호 1에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3 및 서열번호 6에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고,

[0024] 바람직하게는, IMGT 넘버링 시스템에 따르면, 항체는 각각 서열번호 3 내지 5에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 항체의 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 8 내지 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1 내지 LCDR3을 포함한다.

[0025] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15 및 서열번호 17로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고;

[0026] 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 6, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23 및 서열번호 25로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0027] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 가지며;

[0028] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

[0029] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

[0030] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;

- [0031] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0032] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0033] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0034] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0035] 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0036] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항체는 무린 이외의 종, 예컨대, 인간 항체로부터 유래된 비-CDR 영역을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항체는 Ig 감마-1 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI 등록: P01857)인 중쇄 불변 영역 및 Ig 카파 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI 등록: P01834)인 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, 상보성 결정 영역 단편, 단일 사슬 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 다이아바디(diabody)로부터 선택된다.
- [0039] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 항체는 TIGIT-mFc에 4E-10 미만 또는 4E-11 미만의 K<sub>D</sub>로 결합하고; 바람직하게는, K<sub>D</sub>는 Fortebio 분자 상호작용 기기에 의해 측정된다.
- [0040] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 항체는 TIGIT에 1.5nM 미만, 1.2nM 미만 또는 1nM 미만의 EC<sub>50</sub>으로 결합하고; 바람직하게는, EC<sub>50</sub>은 유세포 분석기에 의해 측정된다.
- [0041] 본 발명의 일부 실시형태에서, 항-TIGIT 항체는 단클론성 항체이다.
- [0042] 본 발명의 일부 실시형태에서, 항-TIGIT 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이다.
- [0043] 본 발명의 일부 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역 단편, 단일 사슬 항체(예를 들어, scFv), 인간화 항체, 키메라 항체 및 이중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0044] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 항체는 중국 타입 컬처 컬렉션 센터(China Center for Type Culture Collection, CCTCC; 중국 우한 소재, 우편번호 430072)에 CCTCC 번호 C2020208로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT019에 의해 생성된 항체이다.
- [0045] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 단리된 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양상은 중국 타입 컬처 컬렉션 센터(CCTCC)에 CCTCC 번호 C2020208로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT019에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양상은 항체 및 접합된 모이어티를 포함하는 접합체에 관한 것이고, 여기서 항체는 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 접합된 모이어티는 검출 가능한 표지이며; 바람직하게는, 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질 또는 효소이다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하거

나 본 발명의 집합체를 포함하는 키트에 관한 것이며;

- [0051] 여기서 바람직하게는, 키트는 항체를 특이적으로 인식하는 제2 항체를 더 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 검출 가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질 또는 효소를 더 포함한다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 양상은 샘플에서 TIGIT의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트를 제조하는 데 있어서 본 발명의 임의의 양상에 따른 항체 또는 본 발명의 집합체의 용도에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 본 발명의 집합체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이며; 선택적으로 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 더 포함한다.
- [0054] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 항-PD-1 항체 또는 항-VEGF 항체를 더 포함한다.
- [0055] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 약제학적 조성물의 경우, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 항-PD-1 항체 또는 항-VEGF 항체는 항체 기준으로 1:5 내지 5:1, 예를 들어 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1의 질량비로 존재한다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양상은 별도의 패키지에 제1 제품 및 제2 제품을 포함하는 조합 제품(예를 들어, 키트)에 관한 것이고, 여기서
- [0057] 제1 제품은 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 본 발명의 집합체 또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 약제학적 조성물을 포함하고;
- [0058] 제2 제품은 적어도 하나의 항-PD-1 항체 또는 하나의 항-VEGF 항체, 예를 들어 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하고;
- [0059] 바람직하게는, 조합 제품은 별도의 패키지에 하나 이상의 화학요법제를 포함하는 제3 제품을 더 포함하고,
- [0060] 바람직하게는, 제1 제품 및 제2 제품은 독립적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함하고;
- [0061] 바람직하게는, 조합 제품은 패키지 삽입물을 더 포함한다.
- [0062] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 조합 제품의 경우, 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 항-PD-1 항체 또는 항-VEGF 항체는 항체 기준으로 1:5 내지 5:1, 예를 들어 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1의 질량비로 존재한다.
- [0063] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항-VEGF 항체는 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체이다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 양상은 종양을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제를 제조하는 데 있어서 본 발명의 임의의 양상에 따른 항체, 본 발명의 집합체, 본 발명의 임의의 양상에 따른 약제학적 조성물 또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 조합의 용도에 관한 것이며; 바람직하게는, 종양은 비소세포폐암, 소세포폐암, 유방암, 난소암, 직장결장암, 흑색종, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종 및 형질세포암 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0065] 본 발명의 임의의 양상에 따른 항체, 본 발명의 집합체, 본 발명의 임의의 양상에 따른 약제학적 조성물 또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 조성물은 종양을 치료 및/또는 예방하는 데 있어서 사용하기 위한 것이며; 바람직하게는 종양은 비소세포폐암, 소세포폐암, 유방암, 난소암, 직장결장암, 흑색종, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종 및 형질세포암 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 양상은 유효량의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항체, 본 발명의 집합체, 본 발명의 임의의 양상에 따른 약제학적 조성물 또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 조합을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이며; 바람직하게는, 종양은 비소세포폐암, 소세포폐암, 유방암, 난소암, 직장결장암, 흑색종, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종 및 형질세포암 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0067] 본 발명은 치료적 유효량의 항-TIGIT 항체를 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체와 조합하여, 더 바람직하게는 추가로 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 치료제(바람직하게는 치료제는 화학요법제 또는 성장 저해제, 표적

치료제, 항체-약물 접합체, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 혈관신생 저해제, 항신생물제, 암 백신, 아주반트 및 이의 조합, 알킬화제, 항대사물질, 항생제, 식물-기반 및/또는 호르몬 약물, 바람직하게는 사이클로포스파마이드, 페메트렉시드, 백금-기반 약물, 예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 아드리아마이신, 파클리탁셀, 빈카 알칼로이드, 타목시펜, 메게스트롤, 고세렐린, 아스파라기나제 및/또는 플루오로우라실 항신생물제)와 조합하여 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 (특히 악성 종양)을 예방 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이며; 바람직하게는, 항-TIGIT 항체, 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체, 및 항-종양 화학요법제는 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0068] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 화학요법제 또는 성장 저해제는 알킬화제, 안트라사이클린, 항-호르몬제, 아로마타제 저해제, 항-안드로겐제, 단백질 키나제 저해제, 지질 키나제 저해제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 항대사물질, 토포아이스머라제 저해제, 세포독성제 또는 항-종양 항생제, 프로테아솜 저해제, 항-미세소관제, EGFR 길항제, VEGF 길항제, 안지오프이에틴 2 길항제, 레티노이드, 타이로신 키나제 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0069] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 표적 치료제는 B-raf 저해제, MEK 저해제, K-ras 저해제, c-Met 저해제, Alk 저해제, 포스포티딜이노시톨 3-키나제 저해제, Akt 저해제, mTOR 저해제, VEGF 저해제, 다이포스포티딜글라이콜 3-키나제/mTOR 저해제, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0070] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항체-약물 접합체는 메이탄신, 모노메틸 오리스티틴 E, 칼리케아마이신, 에스페라미신 및 방사성 동위원소 킬레이트제로 이루어진 군으로부터 선택되는 약물을 포함한다.

[0071] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 종양은 다음 중 하나 이상으로부터 선택된다:

[0072] 자궁경부암(예를 들어, 전이성 자궁경부암), 자궁내막암, 폐암, 예컨대, 소세포폐암 및 비소세포폐암(예를 들어, 편평 비소세포폐암 또는 비-편평 비소세포폐암), 인후암, 식도암, 식도 편평암, 갑상선암, 중피종, 위암(예를 들어, 진행성 위암, 위장관암, 위 선암종 또는 위식도접합부 선암종), 간암(예를 들어, 간세포 암종), 장암, 직장암, 결장암, 결장직장암, 담관암종, 간담도암, 담도암, 담관암종, 췌장암, 췌장암, 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종), 난소암(예를 들어, 진행성 난소암), 나팔관암, 복막암, 신경교종(예를 들어, 신경교종(neuroglioma) 및 재발성 신경교종), 피부암, 흑색종, 백혈병(예를 들어, 급성 골수성 백혈병), 림프종(예를 들어, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 형질세포암, 골암, 육종, 골육종, 연골육종, 신경아세포종, 골수종(예를 들어, 다발성 골수종), 대세포 신경내분비암, 요로상피 암종(예를 들어, 상부 요로상피암종 또는 방광암), 전립선암, 고환암, 말초 T-세포 림프종, 비인두암, 고도 현미부수체 불안정성(high microsatellite instability: MSI-H) 또는 불일치 복구 결함(mismatch repair deficient: dMMR) 고형 종양, 두경부암, 뇌암(예를 들어, 공격성 뇌암, 예컨대, 교모세포종), 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선종, 유방암(예를 들어, 삼중-음성 유방암), 흉선암, 회맹부 선암종, 앰플레이트(ampullate) 선암종, 점액 또는 장액 낭선암종, 평활근육종, 횡문근육종, 용모막상피종, 악성 포상기태, 악성 세르톨리 세포-기질 세포 종양, 악성 과립세포종, 난소고환종, 교모세포종, 진균증, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액암.

[0073] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-PD-1 이중특이적 항체는

[0074] PD-1을 표적화하는 제1 단백질 기능 영역 및

[0075] VEGFA를 표적화하는 제2 단백질 기능 영역

[0076] 을 포함하고;

[0077] 여기서 제1 단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 제2 단백질 기능 영역은 단일 사슬 항체이거나; 제1 단백질 기능 영역은 단일 사슬 항체이고, 제2 단백질 기능 영역은 면역글로불린이고;

[0078] 여기서,

[0079] 면역글로불린은 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 35 내지 37에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 38 내지 40에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나;

[0080] 단일 사슬 항체는 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람

직하게는 각각 서열번호 45 내지 47에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43을 갖는 경쇄 가변 영역(바람직하게는 각각 서열번호 48 내지 50에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하거나;

- [0081] 또는
- [0082] 면역글로불린은 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 45 내지 47에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 48 내지 50에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나;
- [0083] 단일 사슬 항체는 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1 내지 HCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 35 내지 37에 제시된 HCDR1 내지 HCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1 내지 LCDR3(바람직하게는 각각 서열번호 38 내지 40에 제시된 LCDR1 내지 LCDR3, IMGT 넘버링 시스템에 따름)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나;
- [0084] 면역글로불린은 인간 IgG1 하위유형의 것이다.
- [0085] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중 특이적 항체의 경우, EU 넘버링 시스템에 따르면, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 다음 돌연변이를 갖는다:
- [0086] L234A 및 L235A; 또는
- [0087] L234A 및 G237A; 또는
- [0088] L235A 및 G237A;
- [0089] 또는
- [0090] L234A, L235A 및 G237A.
- [0091] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 위치 번호 앞의 문자는 돌연변이 전의 아미노산을 나타내고, 위치 번호 뒤의 문자는 돌연변이 후의 아미노산을 나타낸다.
- [0092] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중 특이적 항체의 경우, EU 넘버링 시스템에 따르면, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 다음으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖거나 추가로 갖는다:
- [0093] N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A 및 K320A.
- [0094] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체의 경우,
- [0095] 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열을 가지며; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0096] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체의 경우,
- [0097] 면역글로불린은 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄, 및 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0098] 본 발명의 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 단일 사슬 항체는 면역글로불린 중쇄의 C-말단에 연결된다. 면역글로불린은 2개의 중쇄를 가지므로, 2개의 단일 사슬 항체 분자는 하나의 면역글로불린 분자에 연결된다. 바람직하게는, 2개의 단일 사슬 항체 분자는 동일하다.
- [0099] 본 발명의 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 2개의 단일 사슬 항체가 존재하고, 각각의 단일 사슬 항체의 하나의 말단은 면역글로불린의 2개의 중쇄 중 하나의 C 말단 또는 N- 말단에 연결된다.
- [0100] 본 발명의 일부 실시형태에서, 이황화 결합은 단일 사슬 항체의 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub>의 사이에 있다. 항체의 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub>의 사이에

이항화 결합을 도입하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 US5,747,654호; 문헌[Rajagopal, et al., *Prot. Engin.*, 10(1997)1453-1459; Reiter et al., *Nat. Biotechnol.*, 14(1996)1239-1245; Reiter, et al., *Protein Engineering*, 8(1995)1323-1331; Webber, et al., *Molecular Immunology*, 32(1995)249-258; Reiter, et al., *Immunity*, 2(1995)281-287; Reiter, et al., *JBC*, 269(1994)18327-18331; Reiter, et al., *Inter. J. of Cancer*, 58(1994)142-149; 및 Reiter, et al., *Cancer Res.*, 54(1994)2714-2718]을 참조하고, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

- [0101] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역은 직접 또는 링커 단편을 통해 제2 단백질 기능 영역에 연결되고/되거나; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 직접 또는 링커 단편을 통해 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 연결된다.
- [0102] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 링커 단편은 (GGGS)<sub>n</sub>이고, 여기서 n은 양의 정수이고; 바람직하게는 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.
- [0103] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역의 수는 각각 독립적으로 1, 2 또는 그 이상이다.
- [0104] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체에서, 단일 사슬 항체는 면역글로불린 중쇄의 C-말단에 연결된다.
- [0105] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 제1 단백질 기능 영역은 제1 링커 단편을 통해 제2 단백질 기능 영역에 연결되고; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 제2 링커 단편을 통해 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 연결되고; 제1 링커 단편과 제2 링커 단편은 동일하거나 상이하고;
- [0106] 바람직하게는, 제1 링커 단편과 제2 링커 단편은 각각 서열번호 52 및 서열번호 53으로부터 독립적으로 선택되는 아미노산 서열을 갖고;
- [0107] 바람직하게는 제1 링커 단편과 제2 링커 단편은 둘 다 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0108] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체는 단클론성 항체이다.
- [0109] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이중특이적 항체는 인간화 항체이다.
- [0110] 본 발명의 다른 양상은, 바람직하게는 종양을 치료하는 데 사용되고, 1 내지 10000mg(바람직하게는 10 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg 또는 200mg)의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체, 1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체, 및 선택적으로 본 발명에 따른 종양을 치료하기 위한 치료제(예컨대, 화학요법제, 예를 들어 백금-기반 약물 및/또는 플루오로우라실 항신생물제) 중 하나 이상을 포함하는 단위 제형에 관한 것이며; 여기서 항-TIGIT 항체, 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 및 종양을 치료하기 위한 치료제는 별도로 포장된다.
- [0111] 본 발명은 암 또는 종양을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이고, 이는 본 발명에 따른 단위 제형의 1회 이상의 용량을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 바람직하게는 단위 제형의 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체, 항-TIGIT 항체 및 종양을 치료하기 위한 치료제는 각각 별도로 투여된다.
- [0112] 본 발명의 다른 양상은, 바람직하게는 종양을 치료하는 데 사용되고, 0.1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체, 0.1 내지 10000mg(바람직하게는 1 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg, 200mg 또는 100mg)의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는 단일 용량 단위에 관한 것이다.
- [0113] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 항-TIGIT 항체, 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 및/또는 종양을 치료하기 위한 치료제는 정맥내 주사 또는 정맥내 점적 주입에 적합한 형태, 바람직하게는 액체 형태이다.
- [0114] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 유효량의 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 및/또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 대상체에게 투여하는 것은 외과적 치료 전 또는 후 및/또는 방사선 요법 전 또는 후이다.

- [0115] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 및/또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 체중 kg당 0.1 내지 100mg, 바람직하게는 1 내지 10mg이고; 대안적으로 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-TIGIT 항체 및/또는 본 발명의 임의의 양상에 따른 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 각각의 대상체에서 10 내지 1000mg, 바람직하게는 50 내지 500mg, 100 내지 400mg, 150 내지 300mg, 150 내지 250mg 또는 200mg이고,
- [0116] 바람직하게는, 용량은 1일 2회 내지 약 격일에 1회 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주에 1회로 투여되고;
- [0117] 바람직하게는, 투여 경로는 정맥내 점적 주입 또는 정맥내 주사이다.
- [0118] 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 결정하고; 각각의 사슬의 가변 영역은 상보성 결정 영역(CDR; 중쇄(H)의 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄(L)의 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 이들은 Kabat의 다수에 의해 명명되었음, 문헌[Bethesda M.d., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242] 참조)이라고 불리는 3개의 초가변 영역을 포함한다. 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 알려진 서열을 고려하여, Kabat, IMGT, Chothia 및 AbM 넘버링 시스템을 포함하여 항체의 CDR을 결정하는 몇 가지 방법이 있다. 그러나, 항체 또는 이의 변이체에 대한 CDR의 모든 정의의 적용은 본 명세서에서 정의되고 사용되는 용어의 범주 내에 속하여야 한다. 항체의 가변 영역의 아미노산 서열이 알려져 있는 경우, 당업자는 일반적으로 서열 자체 이외의 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고, 특정 CDR을 결정할 수 있다.
- [0119] 바람직하게는 CDR은 또한 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의될 수 있으며, 문헌[Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc., IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF, and MhcSF. *Nucleic acids research*, 2009; 38(suppl\_1): D301-D307]을 참조한다.
- [0120] 단클론성 항체 서열의 CDR의 아미노산 서열은 당업자에게 잘 알려진 기술적 수단에 의해, 예를 들어 VBASE2 데이터베이스를 사용함으로써 IMGT 정의에 따라 분석된다.
- [0121] 본 발명에 관련된 항체 26B12, 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4는 동일한 CDR을 갖는다:
- [0122] 중쇄 가변 영역의 3개 CDR은 다음 아미노산 서열을 갖는다:
- [0123] HCDR1: GHSFTSDYA(서열번호 3)
- [0124] HCDR2: ISYSDST(서열번호 4)
- [0125] HCDR3: ARLDYGNYGAMDY(서열번호 5);
- [0126] 경쇄 가변 영역의 3개 CDR은 다음 아미노산 서열을 갖는다:
- [0127] LCDR1: QHVSTA(서열번호 8)
- [0128] LCDR2: SAS(서열번호 9)
- [0129] LCDR3: QQHYITPWT(서열번호 10).
- [0130] 본 발명에서, 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 추가적으로, 본 명세서에서 사용되는 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학의 실험실 작업은 해당 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 발명을 더 잘 이해하기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명이 하기 제공되어 있다.
- [0131] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, TIGIT의 아미노산 서열(NCBI GenBank ID: NP\_776160.2)을 지칭할 때, 이는 TIGIT 단백질의 전장 또는 세포의 면역글로불린 가변 영역(IgV) 도메인 또는 세포의 면역글로불린 가변 영역(IgV) 도메인을 포함하는 단편을 포함하고; 또한 TIGIT의 융합 단백질, 예컨대, 마우스 또는 인간 IgG의 Fc 단백질 단편에 융합된 단편(mFc 또는 hFc)도 포함된다. 그러나, 당업자는 TIGIT 단백질의 아미노산 서열에서 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하지만 이에 제한되지 않음)가 자연적으로 발생할 수 있거나 이의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않으면서 인위적으로 도입될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에서, 용어 "TIGIT 단백질" 또는 "TIGIT"는 제시된 서열 및 이의 천연 또는 인공 변이체를 포함하여 그러한

모든 서열을 포함하여야 한다. 더욱이, TIGIT 단백질의 서열 단편을 기재할 때, 이는 서열 단편뿐만 아니라 이의 천연 또는 인공 변이체의 해당하는 서열 단편을 포함한다.

[0132] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 EC<sub>50</sub>은 최대 효과의 50%에 대한 농도, 즉, 최대 효과의 50%를 유발할 수 있는 농도를 지칭한다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 일반적으로 2쌍의 폴리펩타이드 사슬(각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(L) 및 하나의 "중쇄"(H)를 가짐)로 이루어지는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체 경쇄는  $\kappa$  및  $\lambda$  경쇄로 분류된다. 중쇄는  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  또는  $\epsilon$ 로 분류된다. 항체의 아이소타입은 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의된다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역으로 연결되고, 중쇄는 약 3개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 더 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(V<sub>H</sub>) 및 중쇄 불변 영역(C<sub>H</sub>)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> 및 C<sub>H3</sub>)으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(V<sub>L</sub>) 및 경쇄 불변 영역(C<sub>L</sub>)으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인 C<sub>L</sub>로 이루어진다. 항체의 불변 영역은 고전적 보체 시스템의 제1 구성요소(C1q)에 대한 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포)의 결합을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 영역은 초가변 영역(상보성 결정 영역 또는 CDR로 불림) 및 CDR 사이에 분포된 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 보존 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>은 아미노 말단에서 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열되는 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다. 각각의 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역(V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>)은 각각 항원-결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, M.d. (1987 and 1991)] 또는 [Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987; 196:901-917; Chothia et al., *Nature*, 1989; 342:878-883] 또는 IMGT 넘버링 시스템의 정의에 기반하고, 문헌[Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc., "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.", *Nucleic acids research*, 2009; 38(suppl\_1): D301-D307]을 참조한다. 용어 "항체"는 항체를 생성하기 위한 임의의 특정 방법에 의해 제한되지 않는다. 예를 들어, 항체는 특이 재조합 항체, 단클론성 항체 및 다클론성 항체를 포함한다. 항체는 항체의 다양한 아이소타입, 예컨대, 항체 IgG(예를 들어, 하위유형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM일 수 있다.

[0134] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "항원-결합 부분"으로도 알려진 항체의 "항원-결합 단편"이라는 용어는 전장 항체의 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭하고, 이는 전장 항체가 결합하는 동일한 항원에 특이적으로 결합하고/하거나 항원에 대한 특이적 결합을 위해 전장 항체와 경쟁하는 능력을 유지한다. 일반적으로 문헌[Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989))]을 참조하고, 이는 모든 목적을 위해 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용된다. 항체의 항원-결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 손상되지 않은 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 일부 경우에, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb 및 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일 사슬 항체 단편(예를 들어, scFv), 키메라 항체, 다이아바디 및 특정 항원 결합 능력을 부여하기에 충분한 항체의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0135] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Fd 단편"은 V<sub>H</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 항체 단편을 지칭하고; 용어 "Fv 단편"은 항체의 단일 아암(arm)의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진 항체 단편을 지칭하고; 용어 "dAb 단편"은 V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진 항체 단편을 지칭하고(Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)); 용어 "Fab 단편"은 V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 항체 단편을 지칭하고; 용어 "F(ab')<sub>2</sub> 단편"은 힌지 영역 상의 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭한다.

[0136] 일부 경우에, 항체의 항원-결합 단편은 V<sub>L</sub>과 V<sub>H</sub> 도메인이 쌍을 이루어 단일 폴리펩타이드 사슬을 생성할 수 있게 하는 링커를 통해 1가 분자를 형성하는 단일 사슬 항체(예를 들어, scFv)이다(예를 들어, 문헌[Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988) 및 Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)] 참조). 그러한 scFv 분자는 일반 구조 NH<sub>2</sub>-V<sub>L</sub>-링커-V<sub>H</sub>-COOH 또는 NH<sub>2</sub>-V<sub>H</sub>-링커-V<sub>L</sub>-COOH를 가질 수 있다. 선행 기술의 적절한 링커는 GGGGS 아미노산 서열 반복부 또는 이의 변이체로 이루어진다. 예를 들어, 아미노산 서열 (GGGGS)<sub>4</sub>를

갖는 링커가 사용될 수 있지만, 이의 변이체도 또한 사용될 수 있다(Holliger et al., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448). 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 링커는 문헌[Alfthan et al., (1995), *Protein Eng.*, 8:725-731; Choi et al., (2001), *Eur. J. Immunol.*, 31: 94-106; Hu et al., (1996), *Cancer Res.*, 56:3055-3061; Kipriyanov et al., (1999), *J. Mol. Biol.*, 293:41-56; 및 Roovers et al., (2001), *Cancer Immunol*]에 기재되어 있다.

[0137] 일부 경우에, 항체의 항원-결합 단편은 다이아바디, 즉,  $V_H$  및  $V_L$  도메인이 단일 폴리펩티드 사슬에서 발견되는 2가 항체이다. 그러나, 사용된 링커는 너무 짧아서 하나의 사슬 상에서 2개의 도메인이 짝을 이룰 수 없으므로, 도메인은 다른 사슬 상의 상보적인 도메인과 짝을 이루게 되어 2개의 항원-결합 부위가 생성된다(예를 들어, 문헌[Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 및 Poljak R. J. et al., *Structure*, 2:1121-1123 (1994)] 참조).

[0138] 다른 경우에, 항체의 항원-결합 단편은 "이중특이적 항체"이고, 이는 링커를 통해 제1 항체(단편)과 제2 항체(단편) 또는 항체 유사체로부터 형성되는 접합체를 지칭하고; 접합 방법은 화학 반응, 유전자 융합 및 효소 촉매 작용을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체의 항원-결합 단편은, 예를 들어 삼중특이적 항체 및 이중특이적 항체를 포함하는 "다중특이적 항체"일 수 있으며, 전자는 3가지 상이한 종류의 항원-결합 특이성을 갖는 항체이고, 후자는 4가지 상이한 종류의 항원-결합 특이성을 갖는 항체이다. 예를 들어, 설계된 안키린 반복 단백질(designed ankyrin repeat protei; DARPin)은 CN104341529A호에 기재된 것과 같은 IgG 항체, scFv-Fc 항체 단편 또는 이들의 조합에 연결된다. 항-IL-17a 피노머(fynomer)는 W02015141862A1에 기재된 것과 같은 항-IL-6R 항체에 결합한다.

[0139] 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, 상기 기재된 항체 단편)은 당업자에게 알려진 종래 기법(예를 들어, 재조합 DNA 기술 또는 효소적 또는 화학적 절단)을 사용하여 주어진 항체(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 단클론성 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 또는 26B12H4L4)로부터 얻을 수 있으며, 항체의 항원-결합 단편은 손상되지 않은 항체에 대한 것과 동일한 방식으로 특이성에 대해 스크리닝된다.

[0140] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "mAb" 및 "단클론성 항체"는 상동성이 높은 항체의 그룹, 즉, 자발적으로 발생할 수 있는 천연 돌연변이를 제외한 동일한 항체 분자 그룹으로부터 유래된 항체 또는 항체의 단편을 지칭한다. 단클론성 항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대해 매우 특이적이다. 단클론성 항체에 비해 다클론성 항체는 일반적으로 항원 상의 상이한 에피토프를 인식하는 적어도 2개 이상의 상이한 항체를 일반적으로 포함한다. 단클론성 항체는 일반적으로 Kohler와 다수에 의해 처음 보고된 하이브리도마 기술을 사용하여 얻을 수 있지만(Kohler G, Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975; 256(5517): 495), 또한 재조합 DNA 기술을 사용하여 얻을 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조).

[0141] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간화 항체"는 인간 면역글로불린(수용자 항체)의 CDR의 전부 또는 일부가 비-인간 항체(공여자 항체)의 CDR로 대체될 때 얻어지는 항체 또는 항체 단편을 지칭하고, 여기서 공여자 항체는 예상되는 특이성, 친화도 또는 반응성을 갖는 비-인간(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼) 항체일 수 있다. 추가적으로, 수용자 항체의 프레임워크 영역(FR)에서 일부 아미노산 잔기는 또한 해당하는 비-인간 항체의 아미노산 잔기로 또는 다른 항체의 아미노산 잔기로 대체되어 항체의 성능을 추가로 개선시키거나 최적화할 수 있다. 인간화 항체에 대한 더 상세한 내용은, 예를 들어, 문헌[Jones et al., *Nature*, 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature*, 1988; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2:593-596; 및 Clark M., Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes' [J]. *Immunol. Today*, 2000; 21(8): 397-402]을 참조한다.

[0142] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 자연 상태에서부터 인위적인 수단으로 인해 획득되는 것을 지칭한다. 특정 "단리된" 물질 또는 구성요소가 자연에 존재하는 경우, 이는 자연 환경에서 변화가 발생하거나, 자연 환경으로부터 단리되는 경우 또는 둘 다일 수 있다. 예를 들어, 특정 비-단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 특정 살아있는 동물에서 자연적으로 발생하고, 그러한 자연 상태에서부터 단리된 순도가 높은 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드로 지칭된다. 용어 "단리된"은 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 인공 또는 합성 물질 또는 다른 불순물의 존재를 배제하지 않는다.

[0143] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "백터"는 폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있는 핵산 비히클을 지칭한다

다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 단백질의 발현을 가능하게 하는 경우, 벡터는 발현 벡터로 지칭된다. 벡터는 벡터에 의해 운반되는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 형질전환, 형질도입 또는 형질감염에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 인공 염색체, 예컨대, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC) 또는 P1-유래 인공 염색체(PAC); 파지, 예컨대, 람다 파지 또는 M13 파지; 및 동물 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있다. 벡터로서 사용될 수 있는 동물 바이러스는 레트로바이러스(렌티바이러스를 포함함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스(예컨대, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바칼로바이러스, 파필로마바이러스 및 파포바이러스(예컨대, SV40)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 벡터는, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소 및 리포터 유전자를 포함하지만 이에 제한되지 않는 발현을 제어하는 다양한 요소를 포함할 수 있다. 추가적으로, 벡터는 복제 개시 부위를 더 포함할 수 있다.

[0144] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는, 원핵 세포, 예컨대, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 진균 세포, 예컨대, 효모 세포 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 곤충 세포, 예컨대, S2 초파리 세포 또는 Sf9, 또는 동물 세포, 예컨대, 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, GS 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 벡터가 도입될 수 있는 세포를 지칭한다.

[0145] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적 결합"은 2개 분자 사이의 비-무작위 결합 반응, 예컨대, 항체와 항체가 표적으로 하는 항원 사이의 반응을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체(또는 항원에 특이적인 항체)는 항체가 약  $10^{-5}$  M 미만, 예컨대, 약  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M 또는  $10^{-10}$  M 미만 또는 그 이하의 친화도( $K_D$ )로 항원에 결합하는 것을 의미한다.

[0146] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 " $K_D$ "는 특정 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형 상수를 지칭하고, 이는 항체와 항원 사이의 결합 친화도를 설명하는 데 사용된다. 해리 평형 상수가 더 작을수록 항체-항원 결합이 더 강하고 항체와 항원 사이의 친화도가 더 높다는 것을 나타낸다. 일반적으로 항체는 약  $10^{-5}$  M 미만, 예를 들어 약  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M 또는  $10^{-10}$  M 미만 또는 그 이하의 해리 평형 상수( $K_D$ )로 항원(예를 들어, TIGIT 단백질)에 결합한다.  $K_D$ 는 당업자에게 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어 Fortebio 분자 상호작용 기기를 사용하여 결정될 수 있다.

[0147] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단클론성 항체" 및 "mAb"는 동일한 의미를 갖고 호환 가능하게 사용될 수 있으며; 용어 "다클론성 항체" 및 "pAb"는 동일한 의미를 갖고 호환 가능하게 사용될 수 있으며; 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 동일한 의미를 갖고 호환 가능하게 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아미노산은 일반적으로 당업계에 알려진 1개 문자 및 3개 문자 약어로 표시된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.

[0148] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적으로 및/또는 생리학적으로 적합한 담체 및/또는 부형제를 지칭한다. pH 조절제, 계면활성제, 아췌반트 및 이온 강도 강화제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 그러한 담체 및/또는 부형제는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, edited by Gennaro AR, 19<sup>th</sup> Ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995] 참조). 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, Tween-80을 포함하지만 이에 제한되지 않고; 이온 강도 강화제는 염화나트륨을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0149] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량"은 원하는 효과를 얻거나 적어도 부분적으로 얻기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 질환(예를 들어, 종양)에 대한 예방적 유효량은 질환(예를 들어, 종양)을 방지, 중단 또는 이의 발병을 지연시키기에 충분한 양을 지칭하고; 치료적 유효량은 질환을 앓고 있는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치유 또는 적어도 부분적으로 중단시키기에 충분한 양을 지칭한다.

[0150] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"는 호환 가능하게 사용될 수 있으며, 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"를 언급할 때, 이들은 하이브리도마의 서브클론 및 자손 세포를 더 포함한다.

[0151] 용어 "단일 용량 단위"는 요법의 시점에, 바람직하게는 대상체의 체중 kg당 투여될 본 발명에 따른 항-TIGIT 항

체 및 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는, 예를 들어 앰플에 넣은, 단일 약제학적 투약 형태, 예컨대, 주사제를 의미한다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 요법은, 예를 들어, 1일 2회 내지 격일 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주에 1회의 투여 주기에 따라 단일 용량 단위를 투여하는 것을 포함한다.

[0152] 본 발명에서, 용어 "제1"(예를 들어, 제1 단백질 기능 영역 또는 제1 링커 단편) 및 "제2"(예를 들어, 제2 단백질 기능 영역 또는 제2 링커 단편)는 발현의 구별 또는 명확성을 위해 사용되며, 달리 명시되지 않는 한 전형적인 순차적 의미를 전달하지 않는다.

[0153] 약물 또는 치료제의 "치료적 유효량" 또는 "치료적 유효 용량"은, 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 사용될 때, 질환 증상 증중도의 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 기간의 증가, 또는 질환의 고통에 의해 유발되는 손상 또는 장애의 예방에 의해 입증된 바와 같이 대상체를 질환 발병으로부터 보호하거나 질환 퇴행을 촉진시키는 약물의 임의의 양이다. 질환 퇴행을 촉진시키는 치료제의 능력은 임상 시험의 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서와 같이 당업자에게 알려진 다양한 방법을 사용하여, 또는 시험관 내 분석으로 약물의 활성을 결정함으로써 평가될 수 있다.

[0154] 약물의 "예방적 유효량"은 단독으로 또는 항신생물제와 조합하여 암이 발병할 위험에 있는 대상체(예를 들어, 전악성 상태를 갖는 대상체) 또는 암 재발의 위험에 있는 대상체에게 투여될 때 암의 발생 또는 재발을 저해하는 약물의 임의의 양을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 예방적 유효량은 암의 발생 또는 재발을 완전히 방지한다. 암의 발생 또는 재발을 "저해"하는 것은 암의 발생 또는 재발의 가능성을 감소시키거나 암의 발생 또는 재발을 완전히 방지하는 것을 의미한다.

[0155] **유익한 효과**

[0156] 본 발명의 단클론성 항체는 TIGIT에 매우 잘 특이적으로 결합하고 강한 친화도를 가질 수 있다. 상기 항체는 면역 세포에서 TIGIT의 저해 효과를 감소시키며, T 세포의 활성을 촉진하고, NK 세포 고갈을 역전시키며, 종양에 대한 면역 세포의 살해 효과를 향상시킨다. 본 발명은 TIGIT를 저해하는 약제 또는 항-PD-1/항-VEGFA 항체와 조합하여 종양과 같은 질환을 치료 또는 예방하는 약제를 제조하는 데 사용될 수 있어, 우수한 적용 가능성과 시장 가치를 갖는다.

**도면의 간단한 설명**

- [0157] 도 1: TIGIT-mFc에 결합하는 항체 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3 및 26B12H3L2의 활성에 대한 분석 결과.
- 도 2: TIGIT-mFc에 결합하는 항체 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1 및 26B12H4L4의 활성에 대한 분석 결과.
- 도 3: TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 인간 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 항체 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3 및 26B12H3L2의 활성에 대한 분석 결과.
- 도 4: TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 인간 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 항체 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1 및 26B12H4L4의 활성에 대한 분석 결과.
- 도 5: TIGIT-mFc에 대한 26B12H3L3의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 6: TIGIT-mFc에 대한 26B12H1L1의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 7: TIGIT-mFc에 대한 26B12H2L2의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 8: TIGIT-mFc에 대한 26B12H2L3의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 9: TIGIT-mFc에 대한 26B12H3L2의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 10: TIGIT-mFc에 대한 26B12H4L4의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.

- 도 11: TIGIT-mFc에 대한 26B12H1L4의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 12: TIGIT-mFc에 대한 26B12H4L1의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 13: TIGIT-mFc에 대한 RG6058의 친화도 상수에 대한 분석 결과. 위에서 아래로의 곡선 쌍에 대한 항체 농도는 각각 5nM, 1.67nM, 0.557nM, 0.185nM 및 0.06nM이다.
- 도 14: 293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 결합하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석.
- 도 15: 293T-TIGIT 세포막 표면 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석.
- 도 16: 293T-TIGIT 세포막 표면 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD112와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석.
- 도 17: hTIGIT-BALB/c 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델에 대한 효과.
- 도 18: hTIGIT-BALB/c 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델의 체중 변화.
- 도 19: BALB/c-hPD1/hTIGIT 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델에 대한 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)과 조합한 26B12H2L2의 효능.
- 도 20: 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)와 조합하여 26B12H2L2를 받은 BALB/c-hPD1/hTIGIT 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델에서의 체중 변화.
- 도 21: 수용체에 대한 해당하는 표적의 결합에 의해 매개되는 신호전달 경로의 저해를 효과적으로 중화시키는 항-PD-1/항-VEGFA 이작용성 항체와 조합한 항-TIGIT 항체.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0158] 기탁된 생물학적 물질:
- [0159] 하이브리도마 세포주 LT019(TIGIT-26B12)는 중국 타입 컬처 컬렉션 센터(CCTCC)에 2020년 10월 23일에 CCTCC 번호 C2020208로 기탁되었으며, 기탁소 주소는 중국 우한 우한 대학교, 우편번호 430072이다.
- [0160] 상세한 설명
- [0161] 본 발명의 실시형태는 실시예를 참조하여 하기에 상세히 설명될 것이다. 당업자는 다음 실시예가 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이고, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해할 것이다. 구체적인 기술 또는 조건이 명시되지 않은 실시예는 해당 분야의 간행물(예를 들어, 문헌[*Guide to Molecular Cloning Experiments*, 저자 J. Sambrook et al. 및 번역 Huang Peitang et al., 제3판, Science Press] 참조)에 기재된 기술 또는 조건에 따라 또는 제품 지침에 따라 수행된다. 사용된 시약 또는 기기는 제조업체가 명시되어 있지 않은 경우 상업적으로 입수 가능한 통상적인 제품이다. 예를 들어, 293T는 ATCC에서 구입할 수 있다.
- [0162] 본 발명의 다음 실시예에서, 사용된 BALB/c 마우스는 Guangdong Medical Experimental Animal Center에서 구입할 수 있다.
- [0163] 본 발명의 다음 실시예에서, 양성 대조군 항체 RG6058은 중국 특허 공개 제CN108290946호의 서열 34 및 서열 36에서 확인할 수 있는 서열을 갖는다.
- [0164] 본 발명의 다음 실시예에서, 조합에 사용된 항-PD-1/항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)은 Akeso Biopharma, Inc.에서 생산하였고, 이의 서열은 특허 공개 제CN112830972A호에서 확인할 수 있으며, 여기서 VP101(hG1DM)의 중쇄의 전장 아미노산 서열은 서열번호 27에 제시되어 있고, 이의 경쇄의 전장 아미노산 서열은 서열번호 29에 제시되어 있다. VP101(hG1DM)은 IgG-scFv의 구조를 가지며, IgG 부분은 항-VEGFA 항체이고 scFv 부분은 항-PD-1 항체이고, 여기서
- [0165] 항-VEGFA 항체는 서열번호 35에 제시된 HCDR1 서열, 서열번호 36에 제시된 HCDR2 서열, 서열번호 37에 제시된

HCDR3 서열 및 서열번호 31에 제시된 VH 서열을 갖고, 항-VEGFA 항체는 서열번호 38에 제시된 LCDR1 서열, 서열번호 39에 제시된 LCDR2 서열, 서열번호 40에 제시된 LCDR3 서열 및 서열번호 33에 제시된 VL 서열을 갖고;

[0166] 항-PD1 항체는 서열번호 45에 제시된 HCDR1 서열, 서열번호 46에 제시된 HCDR2 서열, 서열번호 47에 제시된 HCDR3 서열 및 서열번호 41에 제시된 VH 서열을 갖고, 항-PD1 항체는 서열번호 48에 제시된 LCDR1 서열, 서열번호 49에 제시된 LCDR2 서열, 서열번호 50에 제시된 LCDR3 서열 및 서열번호 43에 제시된 VL 서열을 갖는다.

[0167] 본 발명의 실시예에서 아이소타입 대조군 항체인 인간 항-계란 라이소자임 IgG(항-HEL 또는 인간 IgG, hIgG로 약칭함)의 가변 영역 서열은 문헌[Acierno et al., "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., *J Mol Biol.*, 2007; 374(1):130-46)]에 기재되어 있다. 실시예에서 사용된 hIgG1DM은 Akeso Biopharma, Inc.에서 제조한 hG1DM 불변 영역 서열(서열번호 55)을 갖는 항-HEL이 있는 아이소타입 대조군 항체이다.

[0168] 본 발명의 다음 실시예에서, 사용된 세포주 CHO-aAPC-PDL1-PVR은 Akeso Biopharma, Inc.에서 구축하였다. 세포주 CHO-aAPC-PDL1-PVR은 3세대 렌티바이러스 시스템을 사용하여 PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포(Promega에서 구입함)의 바이러스 감염에 의해 제조하였으며(예를 들어, 문헌[A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., *J Virol.*, 1998. 72(11):8463-8471] 참조), 여기서 사용된 렌티바이러스 발현 벡터는 pCDH-PVRFL-Puro(PVRFL, Genbank ID: NP\_006496.4; 벡터 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro, Youbio에서 구입함, 카탈로그 번호 VT1480)이었다.

[0169] 본 발명의 다음 실시예에서, 사용된 세포주 Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT는 Akeso Biopharma, Inc.에서 구축하였다. 세포주 Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT는 3세대 렌티바이러스 시스템을 사용하여 PD-1 이펙터 세포(Promega에서 구입함)의 바이러스 감염에 의해 제조하였으며(예를 들어, 문헌[A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., *J Virol.*, 1998. 72(11):8463-8471] 참조), 여기서 사용된 렌티바이러스 발현 벡터는 plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD(TIGIT, Genbank ID: NP\_776160.2; 벡터 plenti6.3/V5 TOPO, Invitrogen에서 구입함, 카탈로그 번호 K531520)이었다.

[0170] **실시예 1: 항-TIGIT 항체 26B12의 제조**

[0171] 1. 하이브리도마 세포주 LT019의 제조

[0172] 항-TIGIT 항체를 제조하는 데 사용된 항원은 인간 TIGIT-mFc이었다(TIGIT는 GenbankID: NP\_776160.2이고; mFc 서열은 서열번호 51에 제시되어 있음). 면역화된 마우스의 비장 세포를 마우스의 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 제조하였다. 인간 TIGIT-mFc를 항원으로 취하여, 하이브리도마 세포를 간접 ELISA에 의해 스크리닝하여 TIGIT에 특이적으로 결합하는 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포를 얻었다. 스크리닝에 의해 얻은 하이브리도마 세포에 대해 제한 희석을 수행하여 안정적인 하이브리도마 세포주를 얻었다. 상기 하이브리도마 세포주를 하이브리도마 세포주 LT019로 지정하였고, 상기 세포주에 의해 분비된 단클론성 항체를 26B12로 지정하였다.

[0173] 하이브리도마 세포주 LT019(또는 TIGIT-26B12)가 중국 타입 컬처 컬렉션 센터(CCTCC)에 2020년 10월 23일에 CCTCC 번호 C2020208로 기탁되었으며, 기탁소 주소는 중국 우한 우한 대학교, 우편번호 430072이다.

[0174] 2. 항-TIGIT 항체 26B12의 제조

[0175] 상기 제조한 LT019 세포주를 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 화학적 정의 배지(CD 배지, 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유함)에서 배양하였다. 7일 후, 세포 배양 상청액을 수집하고, 고속 원심분리 및 미세여과막을 통한 진공 여과를 수행한 다음, HiTrap 단백질 A HP 칼럼을 사용하여 정제하여 항체 26B12를 얻었다.

[0176] **실시예 2: 항-TIGIT 항체 26B12의 서열 분석**

[0177] RNAprep pure Cell/Bacteria Kit(Tiangen, 카탈로그 번호 DP430)의 매뉴얼에 기재된 방법에 따라 실시예 1에서 배양한 세포주 LT019로부터 mRNA를 추출하였다.

[0178] RT-PCR을 위한 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System의 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하고 PCR로 증폭시켰다.

[0179] pEASY-T1 Cloning Kit(Transgen CT101)의 매뉴얼에 따라 PCR-증폭 생성물에 직접 TA 클로닝을 수행하였다.

[0180] TA-클로닝된 생성물을 직접 시퀀싱하였으며, 시퀀싱 결과는 다음과 같다:

[0181] 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2에 제시되어 있으며 길이는 363 bp이다.

[0182] 인코딩된 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시되어 있으며, 길이는 121개 아미노산이고,

[0183] 여기서 중쇄 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 서열은 각각 서열번호 3, 4 및 5에 제시되어 있다.

[0184] 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7에 제시되어 있으며 길이는 321 bp이다.

[0185] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 6에 제시되어 있고, 길이는 107개 아미노산이고,

[0186] 여기서 경쇄 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0187] **실시예 3: 인간화 항-인간 TIGIT 항체의 경쇄 및 중쇄의 설계 및 제조**

[0188] 1. 인간화 항-인간 TIGIT 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4의 경쇄 및 중쇄의 설계

[0189] 실시예 2에서 얻은 인간 TIGIT 단백질의 3차원 결정 구조 및 항체 26B12의 서열에 기반하여, 컴퓨터로 항체 모델을 시뮬레이션하고, 모델에 따라 돌연변이를 설계하여 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4의 가변 영역 서열을 얻었다(NCBI 데이터베이스의 항체 불변 영역 서열: 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 등록: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 등록: P01834이다).

[0190] 설계한 가변 영역 서열은 하기 표 A에 나타나 있다.

번호	명칭	중쇄 가변 영역 아미노산 서열 서열번호	중쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열 서열번호	경쇄 가변 영역 아미노산 서열 서열번호	경쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열 서열번호
1	26B12H1L1	11	12	19	20
2	26B12H4L1	17	18	19	20
3	26B12H2L2	13	14	21	22
4	26B12H2L3	13	14	23	24
5	26B12H3L2	15	16	21	22
6	26B12H3L3	15	16	23	24
7	26B12H1L4	11	12	25	26
8	26B12H4L4	17	18	25	26

[0191]

[0192] (7) 인간화 단클론성 항체 26B12H1L4의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0193] 상기 8개 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4의 경우, 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열의 길이는 363 bp이고, 인코딩된 아미노산 서열의 길이는 121 aa이며; 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열의 길이는 321 bp이고, 인코딩된 아미노산 서열의 길이는 107 aa 이었다.

[0194] 더욱이, 상기 8개 항체는 동일한 HCDR1 내지 HCDR3 및 LCDR1 내지 LCDR3을 가졌으며:

[0195] HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 서열은 각각 서열번호 3, 4 및 5에 제시되어 있고;

[0196] LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0197] 2. 인간화 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4의 제조

[0198] 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 등록: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 모든 Ig 카피 사슬 C 영역, 등록: P01834였다.

[0199] 26B12H1L1의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H4L1의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H2L2의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H3L2의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H2L3의 의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H3L3의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H1L4의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 26B12H2L4의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 및 26B12H4L4의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 pUC57simple(GenScript가 제공함) 벡터에 개별적으로 클로닝하여 각각 pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L4; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L4; 및 pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L4를 얻었다. 문헌 [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition)]에 기재된 표준 기법을 참조하여, EcoRI&HindIII 분해로 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 제한 효소 EcoRI&HindIII로 분해하여 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-26B12H1, pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4, pcDNA3.1-26B12H2, pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3, pcDNA3.1-26B12L3 및 pcDNA3.1-26B12L4를 얻고, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄/경쇄 유전자를 추가로 시퀀싱하였다. 그 다음 해당하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드(pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L4 및 pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L4)를 포함하는 설계한 유전자 조합을 293F 세포에 개별적으로 공동-형질감염시키고, 배양물을 수집한 다음 정제하였다. 서열을 검증한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 7일 후, 세포 배양물을 수집하고 단백질 A 칼럼에서 친화성 정제를 수행하여 인간화 항체를 얻었다.

[0200] **실시예 4: 항원 TIGIT-mFc에 결합하는 항체의 활성에 대한 ELISA 분석**

[0201] 절차: 염소 항-마우스 IgG Fc(Jackson에서 구입함, 로트 번호 132560)를 마이크로플레이트에 2 µg/mL로 첨가하고 4°C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 염소 항-마우스 IgG Fc로 코팅한 마이크로플레이트를 PBST로 1회 세척한 다음, 마이크로플레이트 차단 용액으로서 1% BSA를 함유하는 PBST 용액으로 2시간 동안 차단하였다. 차단 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 그 다음, 1 µg/mL 항원 인간 TIGIT-mFc를 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 3회 세척하였다. PBST 용액으로 연속적으로 희석한 항체를 마이크로플레이트의 웰에 첨가하였다. 항체 희석 구배는 표 1 및 표 2에 나타나 있다. 테스트 항체를 함유하는 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 3회 세척하였다. 세척 후, 1:5000 비율로 희석한 HRP-표지 염소 항-인간 IgG Fc(Jackson에서 구입함, 로트 번호 128332) 2차 항체 작용 용액을 첨가하고, 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBST로 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 4분 동안 발색시킨 다음, 정지 용액을 첨가하여 발색 반응을 종결시켰다. 그 다음 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각각의 웰의 OD 값을 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하였다.

[0202] 항원 TIGIT-mFc에 대한 항체의 결합 결과는 도 1 및 2에 나타나 있다. 모든 투약량에 대한 OD 값은 표 1 및 표 2에 나타나 있다. 흡광도 대 항체 농도 곡선을 피팅하고, 항원에 대한 항체 결합의 EC<sub>50</sub>을 계산하였다. 결과는 표 1과 표 2, 및 도 1과 도 2에 나타나 있다.

표 1

TIGIT-mFc에 대한 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2 및 RG6058 결합의 활성에 대한 분석 결과

코팅: 염소 항-마우스 IgG Fc(2 µg/mL)										
항체 희석 (µg/mL)	TIGIT-mFc(1µg/mL)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
0.3330	2.789	2.701	2.623	2.609	2.560	2.542	2.513	2.430	2.644	2.689
0.1110	2.722	2.771	2.460	2.572	2.413	2.528	2.368	2.394	2.516	2.863
0.0370	2.539	2.676	2.322	2.253	2.162	2.137	2.142	2.292	2.332	2.605
0.0123	2.001	2.126	2.001	1.965	1.853	1.811	1.706	1.861	1.855	2.028
0.0041	1.262	1.349	1.211	1.221	1.038	1.103	1.106	1.092	1.142	1.263
0.0014	0.593	0.613	0.542	0.627	0.506	0.544	0.546	0.527	0.569	0.602
0.0005	0.264	0.265	0.249	0.258	0.237	0.243	0.224	0.229	0.238	0.254
0.0000	0.056	0.051	0.053	0.046	0.052	0.049	0.049	0.050	0.053	0.049
2차 항체	HRP-표지 염소 항-인간 IgG Fc(1:5000)									
EC <sub>50</sub> (nM)	0.034		0.033		0.040		0.037		0.036	

[0203]

표 2

TIGIT-mFc에 대한 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1, 26B12H4L4 및 RG6058의 활성에 대한 분석 결과

코팅: 염소 항-마우스 IgG Fc(2 µg/mL)										
항체 희석 (µg/mL)	TIGIT-mFc(1µg/mL)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
0.3330	2.736	2.788	2.639	2.604	2.709	2.829	2.728	2.608	2.963	3.089
0.1110	2.707	2.774	2.469	2.422	2.625	2.587	2.626	2.788	2.915	3.119
0.0370	2.546	2.538	2.568	2.451	2.392	2.699	2.679	2.660	2.830	2.797
0.0123	1.861	1.881	2.049	1.882	2.113	2.091	1.987	2.045	2.237	2.237
0.0041	1.074	1.012	1.232	1.266	1.252	1.279	1.265	1.239	1.254	1.258
0.0014	0.483	0.477	0.593	0.580	0.582	0.592	0.589	0.593	0.569	0.593
0.0005	0.217	0.211	0.246	0.263	0.256	0.261	0.253	0.253	0.244	0.248
0.0000	0.065	0.060	0.053	0.051	0.051	0.051	0.052	0.054	0.065	0.061
2차 항체	HRP-표지 염소 항-인간 IgG Fc(1:5000)									
EC <sub>50</sub> (nM)	0.048		0.031		0.033		0.034		0.039	

[0204]

[0205] 결과는 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4가 모두 용량-의존적 방식으로 인간 TIGIT-mFc에 효과적으로 결합할 수 있고, 결합 활성이 동일한 표적에 대한 양성 약물 RG6058과 비슷함을 나타내며, 이는 항체 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4가 TIGIT에 효과적으로 결합하는 기능을 가짐을 나타낸다.

[0206] **실시예 5: TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 항체의 활성에 대한 경쟁적 ELISA 분석**

[0207] 절차: 마이크로플레이트를 2 µg/mL의 TIGIT-mFc로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 항원으로 코팅한 마이크로플레이트를 PBST로 1회 헹군 다음, 마이크로플레이트 차단 용액으로서 1% BSA를 함유하는 PBST 용액으로 2시간 동안 차단하였다. 차단 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. PBST 용액으로 연속적으로 희석한 항체를 마이크로플레이트에 첨가하였다. 항체 농도는 표 3 및 표 4에 나타나 있다. 마이크로플레이트를 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 동일한 부피의 2 µg/mL CD155-hFc-바이오틴(Akeso Biopharma, Inc.에서 생산함, 로트 번호 20170210, 여기서 CD155는 GenBank 등록 번호 NP\_006496.4이고, hFc 서열은 서열번호 54에 제시되어 있으며; 최종 농도는 1 µg/mL임)을 첨가하고, 항체와 잘 혼합하였다. 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 3회 세척하였다. 세척 후, 1:4000 비율로 희석한 SA-HRP 작용 용액을 첨가하고, 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBST로 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분 동안 발색시킨 다음, 정지 용액을 첨가하여 발색 반응을 종결시켰다. 그 다음 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각각의 웰의 OD 값을 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하였다.

[0208] TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 항체의 활성 결과는 표 3 및 표 4에 나타나 있다. 흡광도 대 항체 농도 곡선을 피팅하고, TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 항체의 EC<sub>50</sub>을 계산하였다. 결과는 하기 표 3과 표 4, 및 도 3과 도 4에 나타나 있다.

**표 3**

TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 인간 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2 및 RG6058의 활성에 대한 분석 결과

항체 희석	항원 코팅: TIGIT-mFc(2 µg/mL)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
3 µg/mL	0.091	0.097	0.101	0.110	0.106	0.117	0.107	0.113	0.119	0.120
1:3	0.088	0.085	0.082	0.092	0.098	0.100	0.101	0.102	0.104	0.112
1:9	0.104	0.099	0.091	0.097	0.107	0.110	0.121	0.120	0.114	0.121
1:27	0.533	0.491	0.410	0.538	0.510	0.537	0.492	0.549	0.528	0.532
1:81	1.026	1.035	0.996	1.025	0.961	0.990	0.948	1.059	0.951	1.011
1:243	1.210	1.251	1.222	1.221	1.142	1.195	1.089	1.217	1.168	1.209
1:729	1.287	1.360	1.274	1.242	1.201	1.287	1.120	1.236	1.209	1.251
0	1.347	1.387	1.315	1.296	1.279	1.307	1.263	1.340	1.295	1.354
CD155-hFc-바이오틴(1 µg/mL)										
SA-HRP(1:4000)										
EC <sub>50</sub> (nM)	0.255		0.254		0.266		0.283		0.254	

[0209]

표 4

TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 인간 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1, 26B12H4L4 및 RG6058의 활성에 대한 분석 결과

항체 희석	항원 코팅: TIGIT-mFc(2 µg/mL)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
3 µg/mL	0.087	0.085	0.091	0.084	0.102	0.086	0.091	0.085	0.091	0.093
1:3	0.083	0.082	0.077	0.086	0.086	0.086	0.084	0.082	0.089	0.084
1:9	0.139	0.146	0.094	0.096	0.106	0.102	0.103	0.103	0.101	0.100
1:27	0.646	0.650	0.449	0.495	0.495	0.561	0.516	0.532	0.530	0.539
1:81	1.031	1.027	0.938	0.967	0.931	1.030	0.974	0.999	0.946	1.037
1:243	1.239	1.294	1.171	1.224	1.180	1.232	1.131	1.218	1.152	1.223
1:729	1.318	1.378	1.336	1.382	1.278	1.292	1.123	1.335	1.302	1.346
0	1.410	1.393	1.341	1.361	1.357	1.360	1.258	1.364	1.380	1.427
CD155-hFc-바이오틴(1 µg/mL)										
SA-HRP(1:4000)										
EC <sub>50</sub> (nM)	0.294		0.217		0.250		0.271		0.236	

[0210]

[0211]

결과는 동일한 실험 조건에서, 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4가 항원 TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁할 수 있고, 활성이 동일한 표적에 대한 양성 약물 RG6058과 비슷함을 나타내며, 이는 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 및 26B12H4L4가 TIGIT-mFc에 대한 결합에 대해 CD155-hFc-바이오틴과 경쟁하는 효과적인 기능을 가짐을 나타낸다.

[0212]

**실시예 6: Fortebio 분자 상호작용 기기를 사용한 항원 TIGIT-mFc에 대한 인간화 항체 26B12H3L3, 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H4L1 및 RG6058의 동역학 분석**

[0213]

샘플 희석 완충액은 PBS(0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH 7.4)이었다. TIGIT-mFc를 3 µg/mL의 농도로 50초 동안 AMC 센서에 고정시키고, 센서를 완충액에서 60초 동안 평형화시켰다. 센서에 고정된 TIGIT-mFc를 120초 동안 0.06 내지 5nM(3배 희석)의 농도로 항체에 결합시키고, 단백질을 완충액에서 300초 동안 해리시켰다. 센서를 10mM 글라이신 용액(pH = 1.7)에서 재생하였다. 검출 온도는 37°C이고, 검출 주파수는 0.3 Hz이고, 샘플 플레이트 진탕 속도는 1000 rpm이었다. 데이터를 1:1 모델 피팅으로 분석하여 친화도 상수를 얻었다.

[0214]

TIGIT에 대한 인간화 항체(대조군 항체임)의 친화도 상수에 대한 분석 결과는 표 5 및 도 5 내지 13에 나타나 있다.

**표 5**

항원 TIGIT-mFc에 대한 인간화 항체의 친화도 상수에 대한 분석 결과

항체	분석물의 최대 신호 높이(nm)	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Ms)	S E(kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
26B12H3L3	0.09	9.64E-11	2.48E+06	3.22E+05	2.39E-04	8.57E-05	0.05~0.13
26B12H1L1	0.15	1.64E-11	5.44E+06	1.92E+05	8.93E-05	3.36E-05	0.06~0.17
26B12H2L2	0.14	8.40E-12	5.47E+06	2.55E+05	4.60E-05	4.40E-05	0.07~0.17
26B12H2L3	0.12	4.85E-11	3.29E+06	2.53E+05	1.59E-04	5.92E-05	0.15~0.31
26B12H3L2	0.12	5.40E-11	3.94E+06	3.60E+05	2.13E-04	7.86E-05	0.13~0.17
26B12H4L4	0.13	3.69E-11	2.81E+06	1.38E+05	1.04E-04	3.23E-05	0.14~0.20
26B12H1L4	0.12	4.63E-11	2.94E+06	1.96E+05	1.36E-04	4.88E-05	0.01~0.15
26B12H4L1	0.12	8.57E-12	2.90E+06	1.34E+05	2.48E-05	3.11E-05	0.11~0.18
RG6058	0.16	3.16E-11	4.56E+06	1.84E+05	1.44E-04	3.46E-05	0.01~0.18

[0215]

[0216]

K<sub>D</sub>는 친화도 상수이고; K<sub>D</sub> = kdis/kon이다.

[0217]

결과는 TIGIT-mFc에 대한 인간화 항체 26B12H3L3, 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H4L1 및 RG6058의 친화도 상수가 각각 9.64E-11 M, 1.64E-11 M, 8.40E-12 M, 4.85E-11 M, 5.40E-11 M, 3.69E-11 M, 4.63E-11 M, 8.57E-12 M 및 3.16E-11 M임을 나타낸다.

[0218]

결과는 TIGIT-mFc에 대한 친화도 수준에 따라 TIGIT에 대한 항체가 다음과 같은 내림 차순으로 열거될 수 있음을 나타낸다: 26B12H2L2, 26B12H4L1, 26B12H1L1, RG6058, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H2L3, 26B12H3L2, 및 26B12H3L3. 이 중, 인간화 항체 26B12H2L2, 26B12H4L1 및 26B12H1L1은 양성 약물 RG6058보다 더 강한 친화도를 갖고, 26B12H4L4는 양성 약물 RG6058과 비슷한 친화도를 갖는다.

[0219]

**실시예 7: 293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 결합하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석**

[0220]

절차:

[0221]

TIGIT 벡터 plenti6.3-TIGITFL-BSD(TIGIT는 GenbankID: NP\_776160.2이고; 인간 TIGIT 전장 cDNA 서열은 GenScript에서 합성하여 TIGITFL로 지정하였으며, pUC57simple 벡터(GenScript 공급)로 클로닝하여 pUC57simple-TIGITFL 플라스미드를 제공하였음. pUC57simple-TIGITFL 플라스미드를 BamHI 및 XhoI 이중 효소 분해로 합성하고; TIGITFL 표적 유전자 단편을 수집하여 제한 부위 BamHI 및 XhoI를 통해 plenti6.3 발현 벡터로 서브클로닝하였으며; 벡터 pLenti6.3은 Invitrogen에서 구입함)를 사용하여 293T 세포를 형질감염시키고, TIGIT를 안정적으로 발현하는 세포주 293T-TIGIT를 스크리닝에 의해 얻었다.

[0222]

293T-TIGIT 세포를 수집하고(DMEM + 10% FBS) 5분 동안 원심분리한 다음, 상청액을 폐기하였다. 세포를 재현탁시키고 계수한 다음, 세포 생존율을 결정하였다(P7, 95.79%). 세포를 희석시키고, 30만개의 세포를 투명한 V-바닥 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가한 다음, 200 μL의 1% PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 실험 설계에 따라, 100 μL의 항체를 각각의 웰에 첨가하고(최종 농도: 300nM, 100nM, 33.3nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.23nM, 0.41nM, 0.041nM 및 0.0041nM), 블랭크 대조군 및 아이소타입 대조군을 설계하였다. 플레이트를 얼음 상에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 200 μL의 1% PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 플레이트를 2회 세척하였다. FITC 염소 항-인간 IgG 항체(Jackson에서 구입함, 카탈로그 번호 109-095-098, PBSA로 500배 희석함)를 각각의 샘플

에 첨가하고, 혼합물을 암실의 얼음 상에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 200  $\mu$ L의 PBSA를 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 현탁액을 유세포 분석 튜브로 옮겨 유세포 분석기로 각각의 농도에서 세포의 평균 형광 강도를 측정하였다.

**표 6**

293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 결합하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석

항체/ 농도(nM)	평균 형광 강도									EC <sub>50</sub> (nM)
	300	100	33.3	11.11	3.7	1.23	0.41	0.041	0.0041	
RG6058	505.61	554.87	493.98	537.75	431.36	266.73	109.14	24.47	14.61	1.257
26B12H2L2	514.58	467.29	412.32	645.99	466.99	320.40	122.58	28.76	12.66	0.917

[0223]

[0224]

실험 결과는 표 6 및 도 14에 나타나 있다. 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 양성 대조군 항체 RG6058의 결합에 대한 EC<sub>50</sub>은 1.257nM이고, 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 인간화 항체 26B12H2L2의 결합에 대한 EC<sub>50</sub>은 0.917nM 이었다.

[0225]

실험 결과는 인간화 항체 26B12H2L2가 양성 대조군 항체 RG6058보다 세포막 표면 항원 TIGIT에 대해 더 강한 결합 능력을 가짐을 나타낸다.

[0226]

**실시예 8: 293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155 또는 CD112와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석**

[0227]

절차: 293T-TIGIT 세포를 수집하고 5분 동안 원심분리한 다음, 상청액을 폐기하였다. 세포를 재현탁시키고 계수한 다음, 세포 생존율을 결정하였다(94.95%). 세포를 희석시키고, 30만개의 세포를 투명한 V-바다 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가한 다음, 200  $\mu$ L의 1% PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 실험 설계에 따라, 100  $\mu$ L의 항체를 각각의 웰에 첨가하고(최종 농도: 300nM, 100nM, 33.3nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.23nM, 0.123nM 및 0.0123nM), 블랭크 대조군 및 아이소타입 대조군을 설계하였다. 플레이트를 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. CD155(최종 농도: 10nM; Akeso Biopharma, Inc.에서 생산함, 로트 번호 20190726, 여기서 CD155는 GenBank 등록 번호 NP\_006496.4임) 또는 CD112(최종 농도: 30nM; Akeso Biopharma, Inc.에서 생산함, 로트 번호 20190726, 여기서 CD112는 GenBank 등록 번호 NP\_001036189.1임)를 각각의 샘플에 첨가하고, 혼합물을 암실의 얼음 상에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 200  $\mu$ L의 1% PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 플레이트를 2회 세척하였다. APC 염소 항-마우스 IgG 항체(Biollegend에서 구입함, 로트 번호 405308, 최소 x-반응성; PBSA로 300배 희석함)를 각각의 샘플에 첨가하고, 혼합물을 암실의 얼음 상에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 PBSA를 각각의 튜브에 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 200  $\mu$ L의 PBSA를 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 현탁액을 유세포 분석 튜브로 옮겨 유세포 분석기로 각각의 농도에서 세포의 평균 형광 강도를 측정하였다.

[0228]

실험 결과는 표 7 및 도 15뿐만 아니라, 표 8 및 도 16에 나타나 있다.

**표 7**

293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석.

항체/ 농도(nM)	평균 형광 강도								EC <sub>50</sub> (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	8.85	7.44	7.6	7.71	52.1	239	530	436	1.212
26B12H2L2	8.3	7.64	7.83	8.2	36.1	200	541	449	1.049

[0229]

**표 8**

293T-TIGIT 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD112와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2 및 RG6058의 활성에 대한 FACS 분석.

항체/ 농도(nM)	평균 형광 강도								EC <sub>50</sub> (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	20.1	17.8	18	19.2	37.1	72	129	126	1.224
26B12H2L2	21.4	19.2	20.3	19.8	37.1	73.1	131	134	1.140

[0230]

[0231]

결과는 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155와 경쟁하는 양성 대조군 항체 RG6058의 EC<sub>50</sub>이 1.212nM이고, TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2의 EC<sub>50</sub>이 1.049nM이며; TIGIT에 대한 CD112와 경쟁하는 양성 대조군 항체 RG6058의 EC<sub>50</sub>은 1.224nM이고, TIGIT에 대한 결합에 대해 CD112와 경쟁하는 인간화 항체 26B12H2L2의 EC<sub>50</sub>은 1.140nM임을 나타낸다.

[0232]

실험 결과는 인간화 항체 26B12H2L2가 양성 대조군 항체 RG6058보다 세포막 표면 항원 TIGIT에 대한 결합에 대해 CD155 또는 CD112와 경쟁하는 더 강한 능력을 가짐을 나타낸다.

[0233]

**실시예 9: hTigit-BALB/c 유전자이식 마우스에서 CT26 마우스 이식 종양에 대한 26B12H2L2의 치료 효과**

[0234]

hTigit-BALB/c 유전자이식 마우스(Gempharmatech Co., Ltd에서 구입함, 여기서 정상적인 마우스 TIGIT 유전자를 인간 TIGIT 유전자로 대체함)에 각각 50만개 CT26 세포(마우스 결장암 세포주, ATCC에서 구입함)를 등에 접종하였다. 구체적으로, 200 μL의 2,500만/mL CT26 세포를 각각의 마우스에 접종함으로써 마우스 종양 모델을 확립하였다. 아이소타입 대조군(20 mg/kg, i.p., 주 2회) 및 처리군(20 mg/kg, i.p., 주 2회)을 포함하여 마우스를 8마리의 마우스 그룹으로 나누었다. 구체적인 요법은 표 9에 나타나 있다.

표 9

마우스 CT26 종양 모델의 확립 및 항체의 투여 요법

그룹	세포 수	동물 수	모델링	요법
아이소타입 대조군	50만개 세포/마우스	8	CT26 세포: 2,500만개 세포/mL	hlgG1(Akeso Biopharma, Inc., 로트 번호 20190410) 20 mg/kg 복강내 주사(i.p.), 주 2회
26B12H2L2	50만개 세포/마우스	8	접종 부피: 200 $\mu$ L/마우스	26B12H2L2 20 mg/kg, 복강내 주사(i.p.), 주 2회

[0235]

[0236]

결과는 도 17에 나타나 있다.

[0237]

결과는 26B12H2L2가 hTIGIT-BALB/c 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델에서 종양 부피의 유의한 감소를 유발하였음을 나타낸다.

[0238]

결과는 26B12H2L2가 hTIGIT-BALB/c 유전자이식 마우스 CT26 종양 모델에 대해 강력한 효능을 가지며, 따라서 종양, 특히 결장암을 치료 및/또는 예방하는 가능성을 가짐을 나타낸다.

[0239]

한편, 도 18에 나타낸 바와 같이, 26B12H2L2는 CT26 종양 모델인 hTIGIT-BALB/c 유전자이식 마우스의 체중에 영향을 미치지 않았으며, 항체 26B12H2L2가 마우스에 대해 부작용을 유발하지 않았음을 나타낸다.

[0240]

**실시예 10: 항-PD-1/항-VEGFA 이작용성 항체와 조합한 항-TIGIT 항체를 이용한 효과적인 항-종양 치료**

[0241]

항-PD-1/항-VEGFA 이작용성 항체 VP101(hG1DM)과 조합한 항-TIGIT 항체의 생체 내 항-종양 활성을 결정하기 위해, CT26 세포(인간 결장암 세포, GemPharmatech Co., Ltd.에서 구입함)를 먼저 5 내지 7주령의 암컷 BALB/c-hPD1/hTIGIT 마우스(GemPharmatech Co., Ltd.에서 구입함)에 피하로 접종하고, 평균 종양 부피가 80 내지 120 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 마우스를 종양 부피에 기반하여 그룹당 6마리인 4개 그룹으로 나누었다. 그룹화한 날을 D0으로 정의하고, 그룹화한 D0일에 투약을 시작하였다. 조합 요법 그룹의 요법은 다음과 같다: 약물을 별도로 제형화하고 순차적으로 투여하였다(특정 순서 또는 시간 간격은 필요하지 않으며, 한 가지 치료는 다른 치료의 투여가 완료된 후에 제공하여야 한다). 모델링 및 구체적인 요법은 표 10에 나타나 있다. 투여 후, 각각의 그룹에서 종양의 길이와 폭을 측정하고, 종양 부피를 계산하였다.

표 10

BALB/c-hPD1/hTIGIT 마우스 모델에서 CT26 이식 종양을 치료하기 위한 항-PD-1/항-VEGFA 이작용성 항체와 조합한 항-TIGIT 항체의 투약 요법

그룹화	n	종양 이종이식	투여 조건
아이소타입 대조군 5 mg/kg	6	CT26, $5 \times 10^5$ 개 세포, BALB/c-hPD1/hTIGIT 마우스, SC	아이소타입 대조군 항체 hIgG1(Akeso Biopharma, Inc., 로트 번호 20200707), 5 mg/kg; 4주 동안 주 2회 복강내 투여
VP101(hG1DM) 1 mg/kg	6		VP101(hG1DM), 1 mg/kg; 4주 동안 주 2회 복강내 투여
26B12H2L2 4 mg/kg	6		26B12H2L2, 4 mg/kg; 4주 동안 주 2회 복강내 투여
26B12H2L2 4 mg/kg, VP101(hG1DM) 1 mg/kg	6		26B12H2L2, 4 mg/kg; VP101(hG1DM), 1 mg/kg; 4주 동안 주 2회 복강내 투여

[0242]

[0243]

결과는 도 19에 나타나 있다. 결과는 아이소타입 대조군 항체 hIgG와 비교하여, VP101(hG1DM) 및 26B12H2L2 둘 다 마우스 종양의 성장을 효과적으로 저해할 수 있음을 나타낸다. VP101(hG1DM) + 26B12H2L2 그룹은 모델에서 상승적인 항-종양 효과를 나타내었으며, 조합 요법은 단일요법보다 우수한 항-종양 저해를 나타내었다.

[0244]

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.0001, 2원 ANOVA(Bnoferroni 사후 검정)

[0245]

추가적으로, 도 20에 나타난 바와 같이, VP101(hG1DM) 및 26B12H2L2 둘 다 단독으로 또는 조합하여 종양-보유 마우스에 의해 잘 용인되었으며, 종양-보유 마우스의 체중에 대한 효과는 그룹에서 발견되지 않았다.

[0246]

**실시예 11: 수용체에 대한 해당하는 표적의 결합에 의해 매개되는 신호전달 경로의 저해를 효과적으로 중화시키는 항-PD-1/항-VEGFA 이작용성 항체와 조합한 항-TIGIT 항체**

[0247]

CHO-aAPC-PDL1-PVR 세포(Akeso Biopharma, Inc.에서 구축함)를 수집하고 170×g에서 5분 동안 원심분리한 후 상청액을 폐기하였다. 세포를 완전 배지(Ham's F-12 + 10% FBS)에 재현탁시키고 계수한 다음, 생존율을 계산하였다. CHO-aAPC-PDL1-PVR 세포를  $4 \times 10^4$ /웰(100 μL/웰)로 96-웰 블랙 플레이트에 첨가하고, 150 μL의 1× PBS를 가장자리 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C의 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT 세포(Akeso Biopharma, Inc.에서 구축함)를 수집하고 110×g에서 5분 동안 원심분리한 후 상청액을 폐기하였다. 세포를 분석 배양 배지(RPMI 1640 + 10% FBS)에 재현탁시키고 계수한 다음, 생존율을 계산하였다. 96-웰 블랙 플레이트의 액체를 폐기하고, Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT 세포를 30 μL/웰( $5 \times 10^4$ /웰)로 첨가한 다음; A549 폐암 세포(중국 과학 아카데미, 상하이 생물 과학 연구소의 세포 센터(Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Cell Center)에서 구입함, 카탈로그 번호 SCSP-503)를 수집하고 170×g에서 5분 동안 원심분리한 후 상청액을 폐기하였다. 세포를 분석 배양 배지에 재현탁시키고 계수한 다음, 생존율을 계산하였다. A549 세포를 30 μL/웰( $1 \times 10^4$ /웰)로 첨가하였다. 항체를 설계에 따라 희석하고(단일요법 그룹에서 VP101(hG1DM)과 26B12H2L2의 최종 농도는 3nM, 30nM, 300nM 및 1000nM이고, VP101(hG1DM) + 26B12H2L2 조합 그룹에서 VP101(hG1DM) 및 26B12H2L2의 최종 농도는 3nM, 30nM, 150nM, 300nM 및 1000nM임), 20 μL/웰로 첨가하였다. 아이소타입 대조군 및 음성 대조군은 최종 부피 80 μL/웰로 설정하였다. 세포를 37°C의 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 6시간 후, Firefly Glo Luciferase Reporter Gene Assay Kit(Yeasen에서 구입함, 카탈로그 번호 11404ES80)의 반응 용액 80 μL를 첨가하고, 5 내지 6분 인큐베이션 후, 상대광 단위(RLU)를 검출하기 위해 플레이트를 장치에 로딩하였다.



- [0271] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYISYSDSTNYPNPSLKS RVTI SRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCCARLDYG  
NYGGAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 13)
- [0272] 26B12H2의 뉴클레오타이드 서열
- [0273] GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCC  
TGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGTG  
ACCATCTCTAGAGATAACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC  
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (서열번호 14)
- [0274] 26B12H3의 아미노산 서열
- [0275] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYISYSDSTNYPNPSLKS RVTI SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCCARLDYG  
NYGGAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 15)
- [0276] 26B12H3의 뉴클레오타이드 서열
- [0277] GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCC  
TGGTCTTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGTG  
ACCATCTCTGTGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC  
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (서열번호 16)
- [0278] 26B12H4의 아미노산 서열
- [0279] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIRQFPKGLEWIMGYISYSDSTNYPNPSLKS RITI SRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCCARLDYG  
NYGGAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 17)
- [0280] 26B12H4의 뉴클레오타이드 서열
- [0281] GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCAGACCCCTGTCTGTACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCC  
TGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCTCTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATC  
ACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC  
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGTCTAGC (서열번호 18)
- [0282] 26B12L1의 아미노산 서열
- [0283] DIQMTQSPKSLSTSVGDRVTITCRSSQHVSTAVAWYQKPGKSPKLLIYSASRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWFFGGGT  
KLEIK (서열번호 19)
- [0284] 26B12L1의 뉴클레오타이드 서열
- [0285] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCGATCGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCAGCAGGTGTCTACCGCAGTGGCA  
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCTTACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGC  
ACCGATTTACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACA  
AAGCTGGAGATCAAG (서열번호 20)
- [0286] 26B12L2의 아미노산 서열
- [0287] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQHVSTALAWYQKPGKSPKLLIYSASSRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWFFGGGT  
KLEIK (서열번호 21)
- [0288] 26B12L2의 뉴클레오타이드 서열
- [0289] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCAGCAGGTGTCTACAGCCCTGGCA  
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCTTACAGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTCCGGCTCTGGCAGCGGC  
ACCGATTTACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATATACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACC  
AAGCTGGAGATCAAG (서열번호 22)
- [0290] 26B12L3의 아미노산 서열
- [0291] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQHVSTALAWYQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYITPWFFGGGT  
KLEIK (서열번호 23)

- [0292] 26B12L3의 뉴클레오타이드 서열
- [0293] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGGGATAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTAGCCTGCAGTCCGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACCTGACAATCTCTCTCTGTCAGCCAGAGGATTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACC AAGCTGGAGATCAAG (서열번호 24)
- [0294] 26B12L4의 아미노산 서열
- [0295] DIQMTQSPKSMSTSVGDRVITICRSSQHVVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASYRYSVVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWFGGGT KLEIK (서열번호 25)
- [0296] 26B12L4의 뉴클레오타이드 서열
- [0297] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGGGACAGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCAGCACGTGCTACCGCAGTGGCA TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATCCGCCTCTACAGGATTCCGAGTGCCAGACCGGTTAGCGGCTCCGGCTCTGGC ACCGATTTACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACA AAGCTGGAGATCAAG (서열번호 26)
- [0298] VP101(hG1DM) 중쇄의 아미노산 서열
- [0299] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTNYGMNWRVQAPGKLEWVWVINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWYFDVWVGQTLTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSYDMSWV RQAPGKGLDWWATISGGGRYTYYPDSVKGRTI SRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGSD IQMTQSPSSMASVDRVITFCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTK LELKR (서열번호 27)
- [0300] VP101(hG1DM) 중쇄의 뉴클레오타이드 서열
- [0301] GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTCAGGGTACACCTTACAAAATATGGAATG AATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGACTGGAGTGGGTGCGCTGGATCAACACTTACACCGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTT ACCTTCAGCTGGATAACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCACTAC TATGGGAGCAGCCATTGGTATTTGACGTGTGGGGGAGGGGACTCTGGTGACAGTGCAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCAGCGTGTTCCTCTCGCCCC TCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGCTGTTGTAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTTGACA AGCGGAGTCCATATCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAATCCTGCGACAAGACACACACTGTCCCCCTGTCTGCTCCC GAAGTGTGTTGAGGCCCTAGCGTCTTCTCTTTCTCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACTGTGTCGTCGTTGATGTC AGCCATGAGGACCCGAGGTGAAATCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC AGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAG ACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTG GTCAAGGGCTTTTATCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCTCTGTCTCGACTCCGACGGC TCCTTCTCTGTACAGCAAAGTCCGCTGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTCTCTTGTTCGGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCAATTAT ACCAGAAGTCTCTGAGCTGTCCCCGGCAAGGGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGGCTCTGAGGTGCAG CTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCAGCAAGCGGATTCCGCTTTAGCTCTACGACATGAGCTGGGTG CGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGAGATACATACTATCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCC CGGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCGGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCAACCGCTACGGCAGGCTGGTTT GCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCAGTGTCTAGCGGGCGGGCGGCGGAGCGGCGGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGGCGGGCAGCGAT ATCCAGATGACCCAGTCCCCTCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGGGACCGGGTGACCTTACATGTAGAGCCTCCAGGATATCAACACTACCTGTCTTGG TTTCAGCAGAAGCCCGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCAATAGACTGGTGCAGGAGTGCCTTCCCGTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAG GACTATACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAG CTGGAGCTGAAAAGA (서열번호 28)
- [0302] VP101(hG1DM) 경쇄의 아미노산 서열

- [0303] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (서열번호 29)
- [0304] VP101(hG1DM) 경쇄의 뉴클레오타이드 서열
- [0305] GATATTCAGATGACTCAGAGCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAAT TGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGA ACCGACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACT AAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCAGTGTCTCATTTTTCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGTCTG AACAACCTTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGAAGGTGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGAT TCTACTTATAGTCTGCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCA GTCACCAAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (서열번호 30)
- [0306] 베바시주맙 중쇄 가변 영역(베바시주맙-Hv)의 아미노산 서열: (123 aa)
- [0307] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWRVQAPGKLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWFYFDVWQGTLVTVSS (서열번호 31)
- [0308] 베바시주맙 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열: (369 bp)
- [0309] GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATG AATTGGGTGCCAGGCACCAGGAAAAGGACTGGAGTGGGTGCGCTGGATCAACACTTACACCGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTT ACCTTCAGCCTGGATAACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCACTAC TATGGGAGCAGCCATTGGTATTTGACGTGTGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAAGCAGC (서열번호 32)
- [0310] 베바시주맙 경쇄 가변 영역(베바시주맙-Lv)의 아미노산 서열: (107 aa)
- [0311] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGT KVEIK (서열번호 33)
- [0312] 베바시주맙 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열: (321 bp)
- [0313] GATATTCAGATGACTCAGAGCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAAT TGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGA ACCGACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACT AAAGTCGAGATCAAG (서열번호 34)
- [0314] 베바시주맙 중쇄 가변 영역 HCDR1: GYTFTNYG (서열번호 35)
- [0315] 베바시주맙 중쇄 가변 영역 HCDR2: INTYTGE (서열번호 36)
- [0316] 베바시주맙 중쇄 가변 영역 HCDR3: AKYPHYGSSHWFYDV (서열번호 37)
- [0317] 베바시주맙 경쇄 가변 영역 LCDR1: QDISNY (서열번호 38)
- [0318] 베바시주맙 경쇄 가변 영역 LCDR2: FTS (서열번호 39)
- [0319] 베바시주맙 경쇄 가변 영역 LCDR3: QYSTVPWT (서열번호 40)
- [0320] 인간화 단클론성 항체 14C12H1L1 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (118 aa)
- [0321] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSYDMSWVRVQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGFRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGE AWFAYWQGTLVTVSS (서열번호 41)
- [0322] 인간화 단클론성 항체 14C12H1L1 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열: (354 bp)
- [0323] GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATG TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAAGGACTGGATTTGGGTGCTACTACTCTCAGGAGCGGGAGATACACTACTATCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTC ACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCAGTACTATTGTGCCAACCCGCTACGGGGA GCATGGTTTGCTATTGGGGGACAGGAAACCTGGTGACAGTCTCTAGT (서열번호 42)
- [0324] 14C12H1L1(M) 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (108 aa, 14C12H1L1에 기반한 아미노산 돌연변이 부위는 밑줄쳐

져 있음)

- [0325] DIQMTQSPSSMSASVGDRTVFTCRASQDINTYLSWFQQKPKGSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYCYLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (서열번호 43)
- [0326] 14C12H1L1(M) 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열:
- [0327] GATATCCAGATGACCCAGTCCCTCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA (서열번호 44)
- [0328] 14C12H1L1(M) 중쇄 가변 영역 HCDR1: GFAFSSYD (서열번호 45)
- [0329] 14C12H1L1(M) 중쇄 가변 영역 HCDR2: ISGGGRYT (서열번호 46)
- [0330] 14C12H1L1(M) 중쇄 가변 영역 HCDR3: ANRYGEAWFAY (서열번호 47)
- [0331] 14C12H1L1(M) 경쇄 가변 영역 LCDR1: QDINTY (서열번호 48)
- [0332] 14C12H1L1(M) 경쇄 가변 영역 LCDR2: RAN (서열번호 49)
- [0333] 14C12H1L1(M) 경쇄 가변 영역 LCDR3: LQYDEFPLT (서열번호 50)
- [0334] mFc의 아미노산 서열
- [0335] PRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHDDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLSDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열번호 51)
- [0336] 제1 링커 단편의 아미노산 서열
- [0337] GGGGSGGGSGGGGS (서열번호 52)
- [0338] 제2 링커 단편의 아미노산 서열
- [0339] GGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열번호 53)
- [0340] hFc의 아미노산 서열
- [0341] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 54)
- [0342] hIgG1DM 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열
- [0343] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 55)

**수탁번호**

[0344]

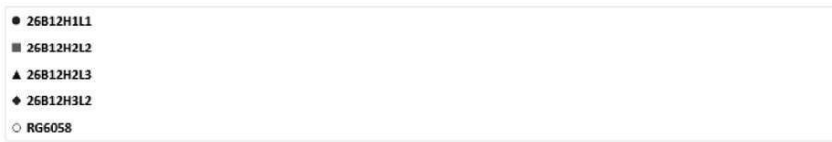
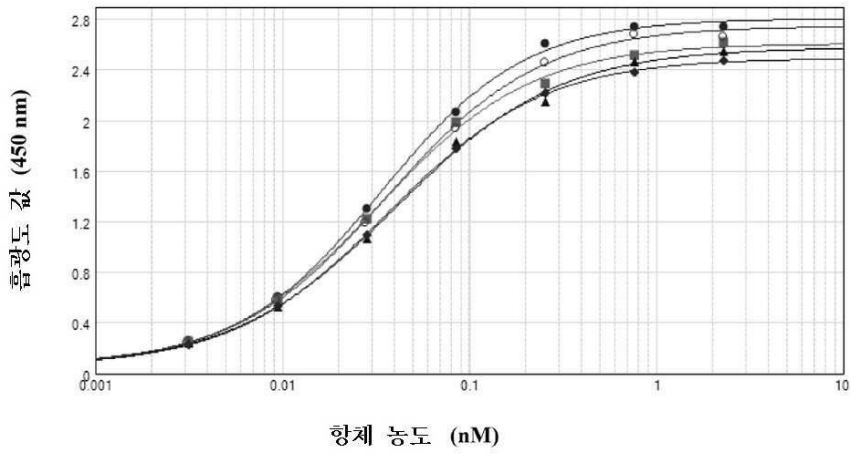
기탁기관명 : CCTCC

수탁번호 : CCTCCC2020208

수탁일자 : 20201023

도면

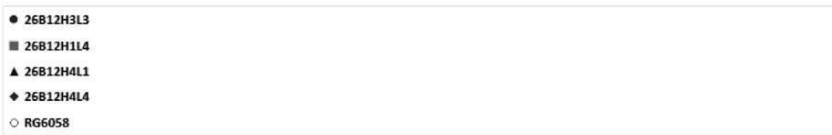
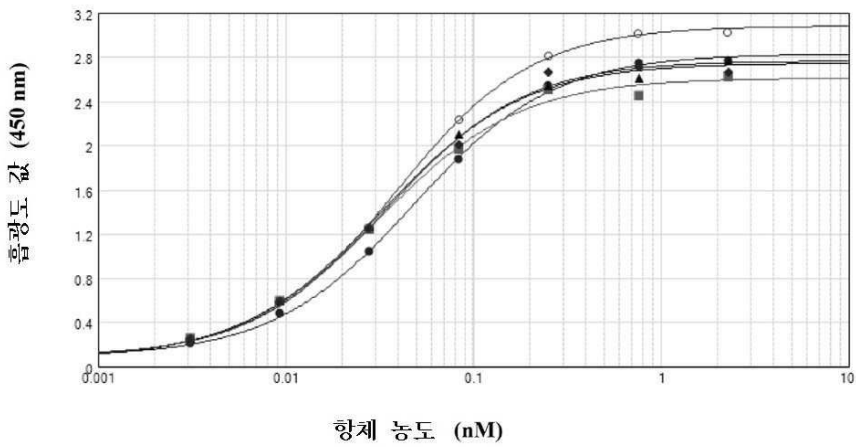
도면1



곡선 피트: 4-매개변수  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{EC50})^n}$

26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058
$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 0.999$
EC50 = 0.034	EC50 = 0.033	EC50 = 0.040	EC50 = 0.037	EC50 = 0.036

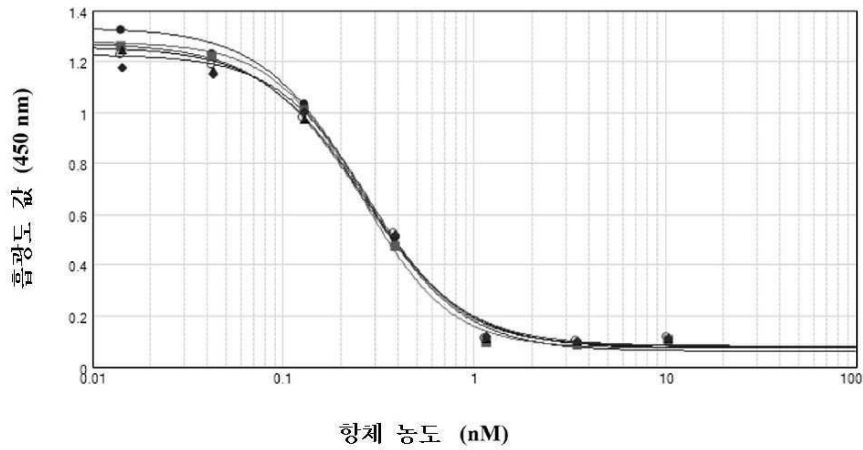
도면2



곡선 피트: 4-매개변수  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{EC50})^n}$

26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058
$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.997$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.997$	$R^2 = 1.000$
EC50 = 0.048	EC50 = 0.031	EC50 = 0.033	EC50 = 0.034	EC50 = 0.039

도면3

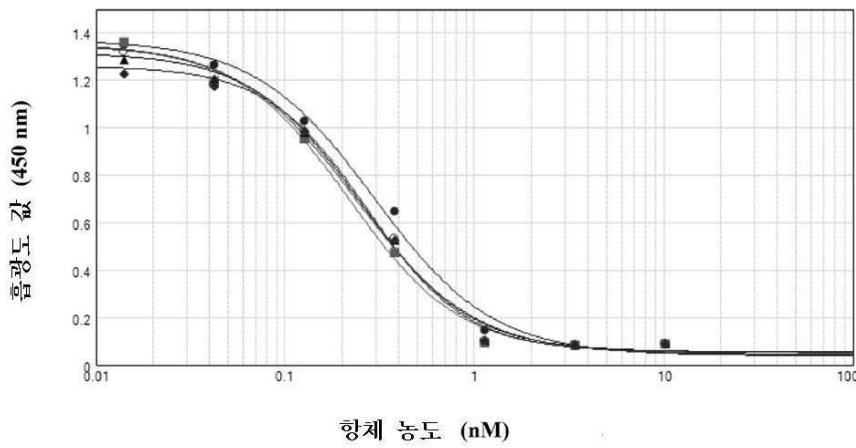


● 26B12H1L1	■ 26B12H2L2	▲ 26B12H2L3	◆ 26B12H3L2	○ RG6058
-------------	-------------	-------------	-------------	----------

곡선 피트: 4-매개변수  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058
$R^2 = 0.997$	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.994$	$R^2 = 0.995$
EC50 = 0.255	EC50 = 0.254	EC50 = 0.266	EC50 = 0.283	EC50 = 0.254

도면4

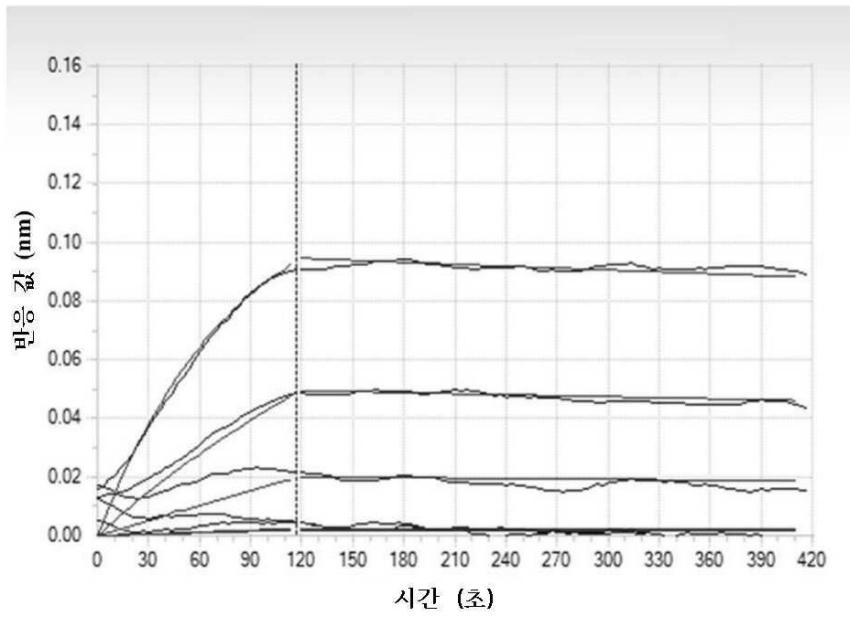


● 26B12H3L3	■ 26B12H1L4	▲ 26B12H4L1	◆ 26B12H4L4	○ RG6058
-------------	-------------	-------------	-------------	----------

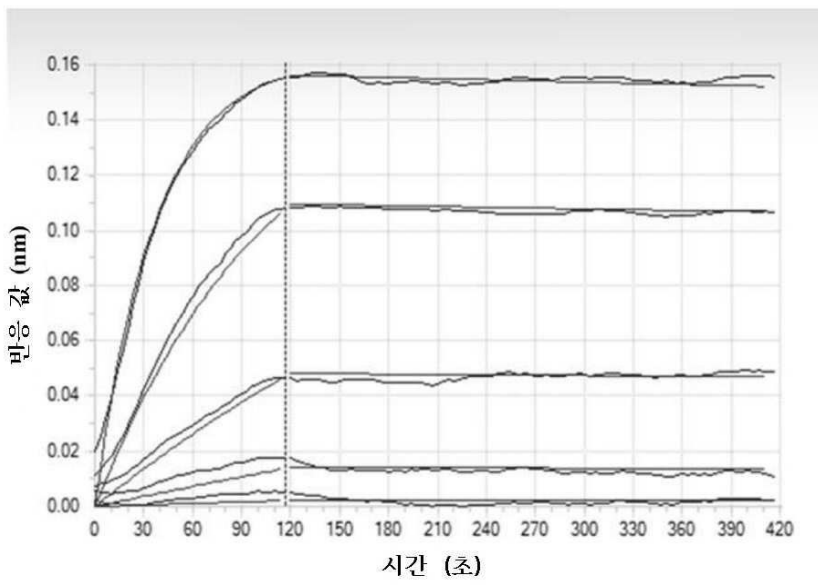
곡선 피트: 4-매개변수  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058
$R^2 = 0.995$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.993$
EC50 = 0.294	EC50 = 0.217	EC50 = 0.250	EC50 = 0.271	EC50 = 0.236

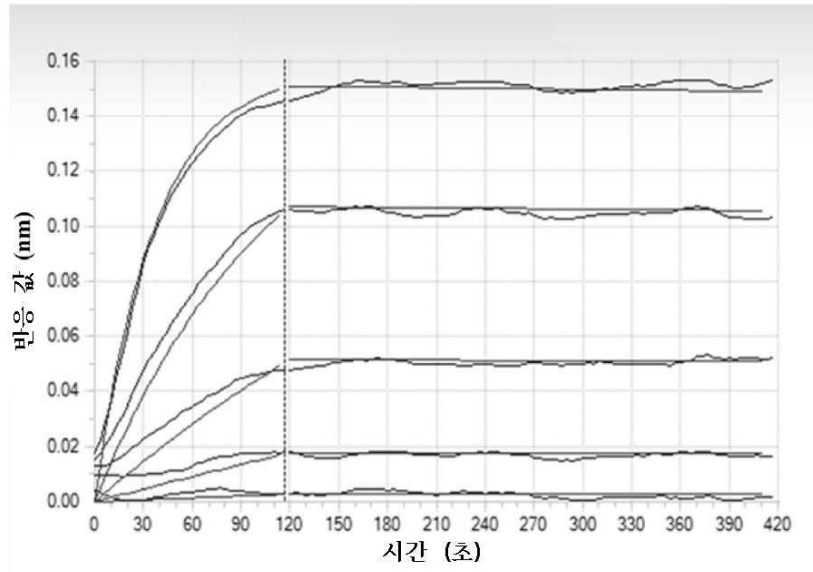
도면5



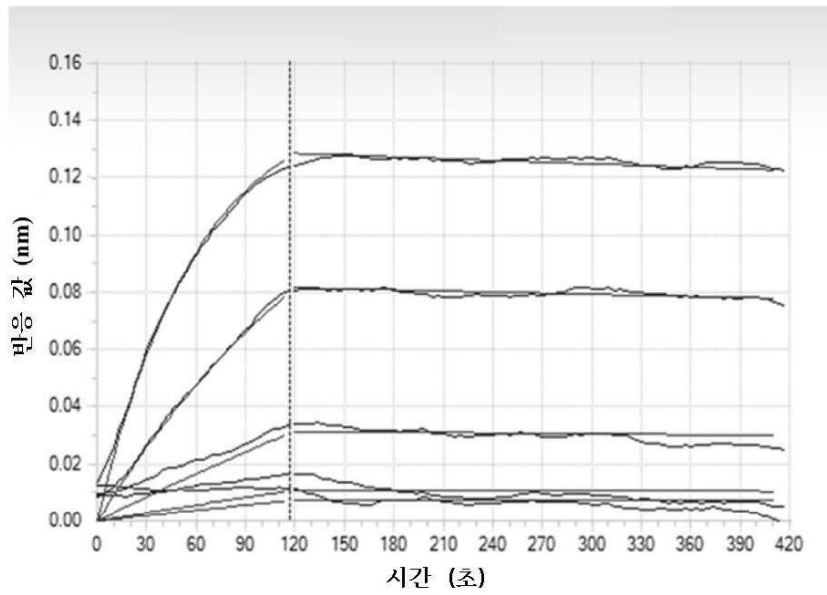
도면6



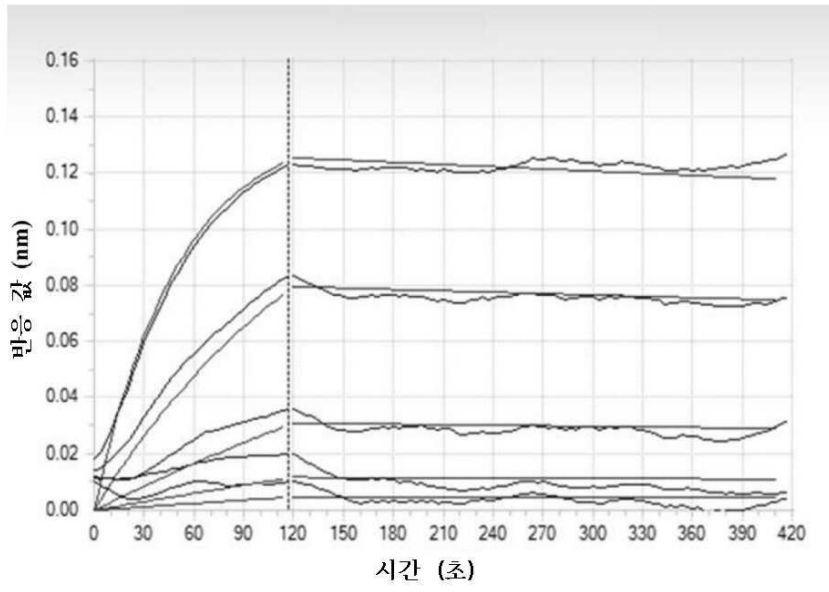
도면7



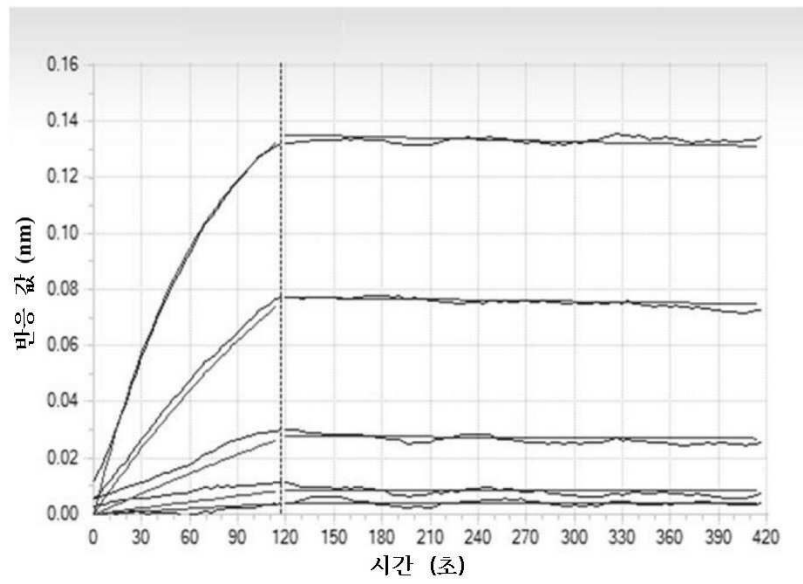
도면8



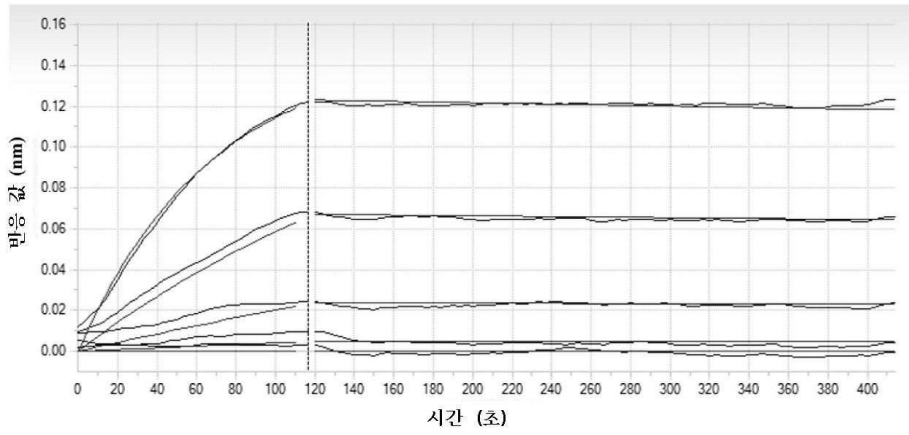
도면9



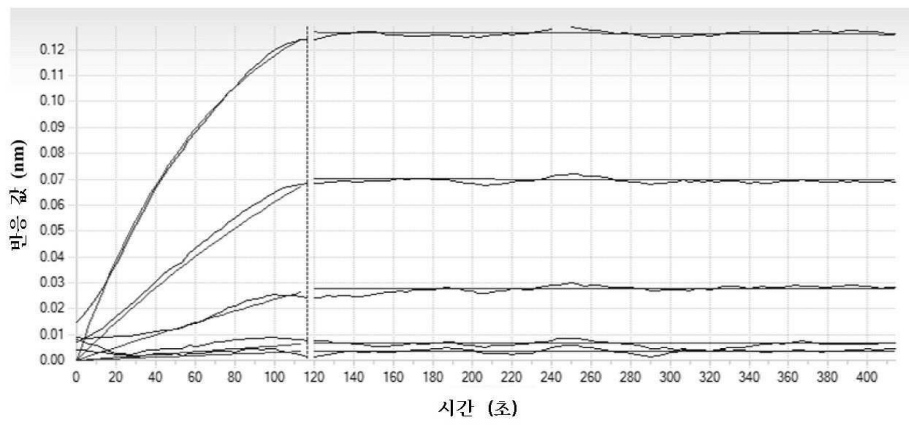
도면10



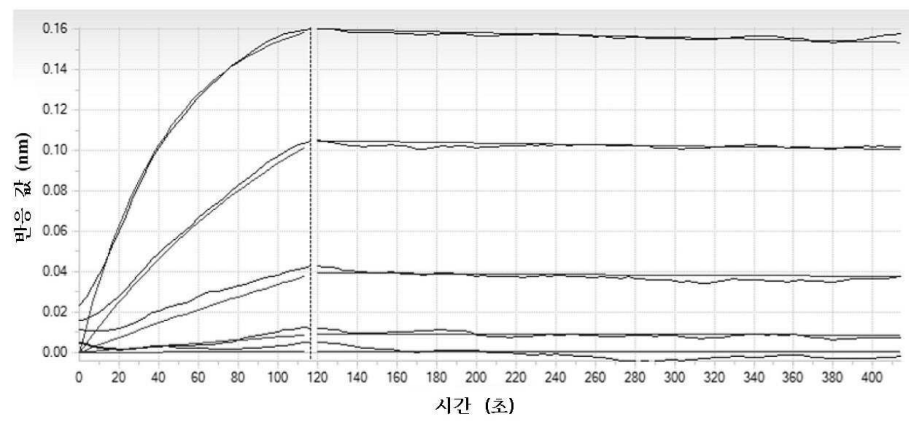
도면11



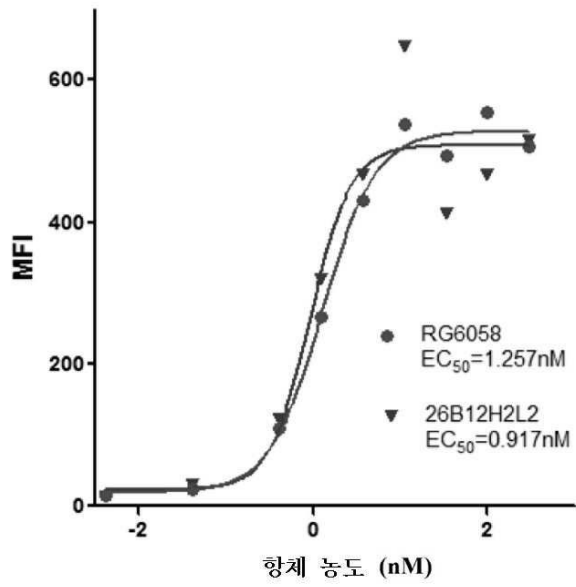
도면12



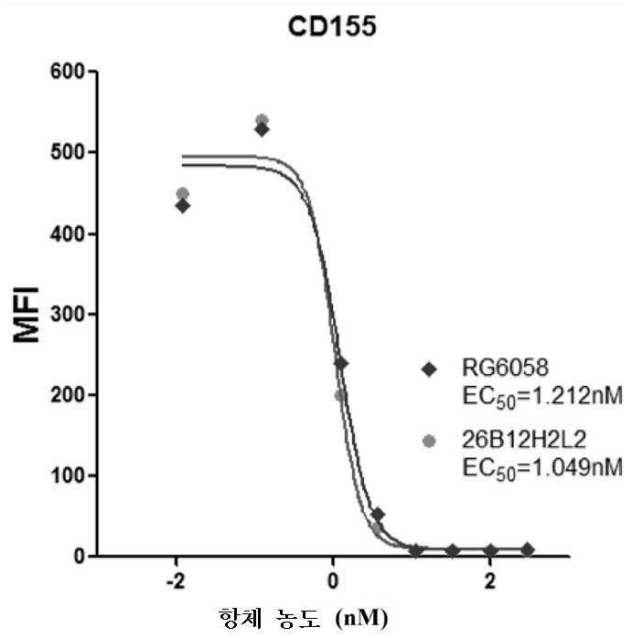
도면13



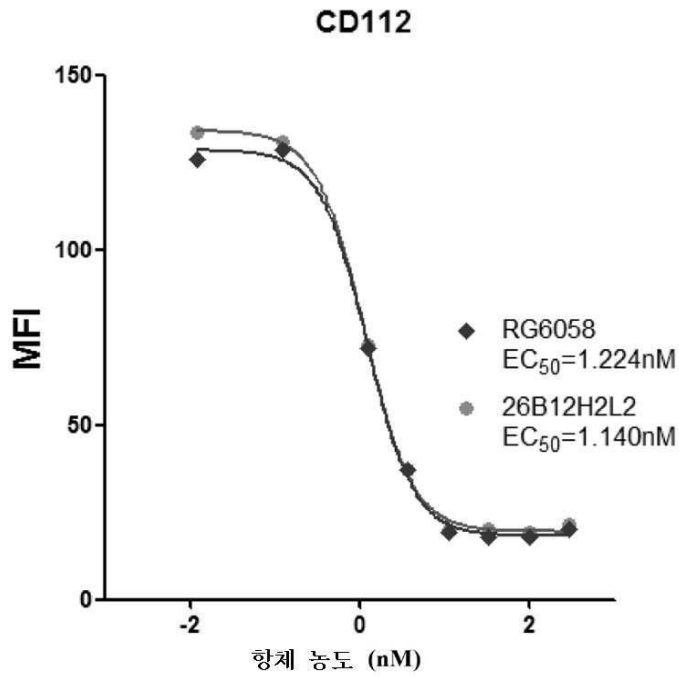
도면14



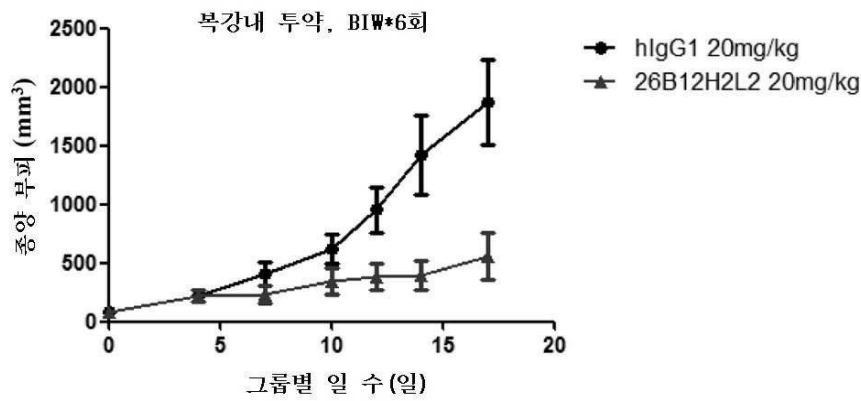
도면15



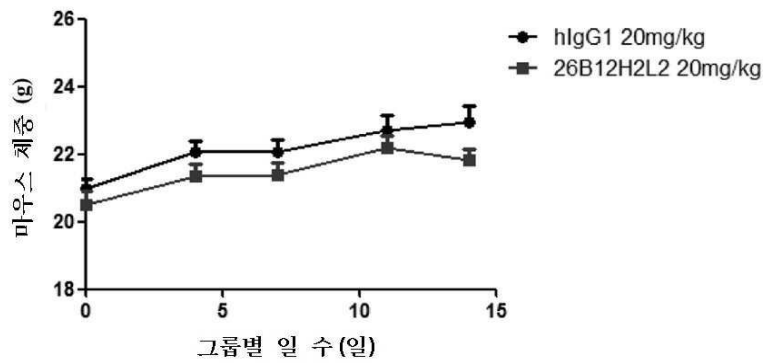
도면16



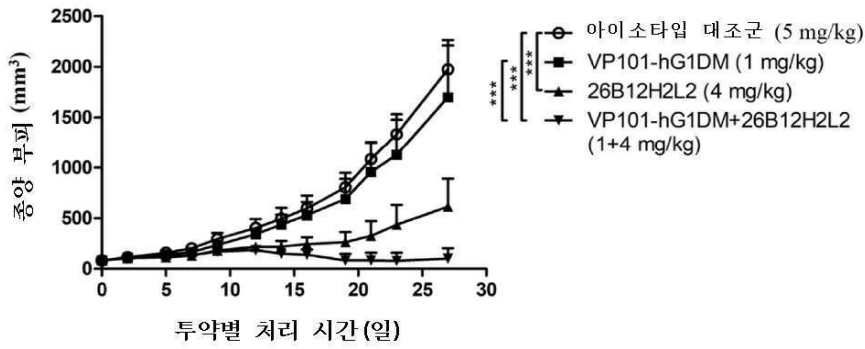
도면17



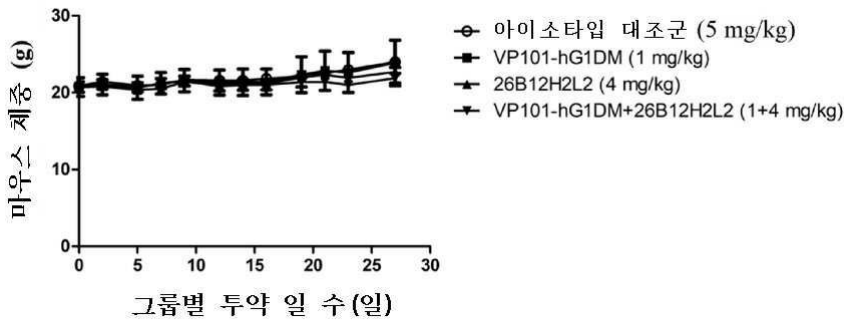
도면18



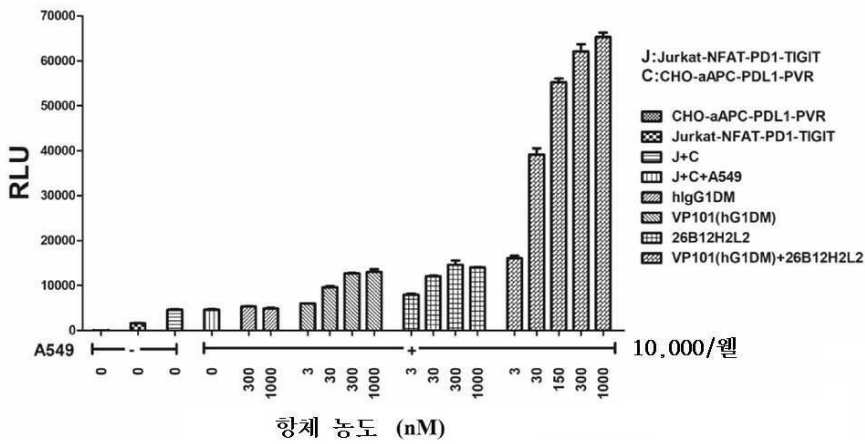
도면19



도면20



도면21



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.