



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0164815
(43) 공개일자 2024년11월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7036669
- (22) 출원일자(국제) 2023년03월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년11월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/085428
- (87) 국제공개번호 WO 2023/186081
국제공개일자 2023년10월05일
- (30) 우선권주장
202210345707.0 2022년04월02일 중국(CN)

- (71) 출원인
바이오세우스 인크.
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
- (72) 발명자
자이 티안항
중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10
비
다이 슈양
중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10
비
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 25 항

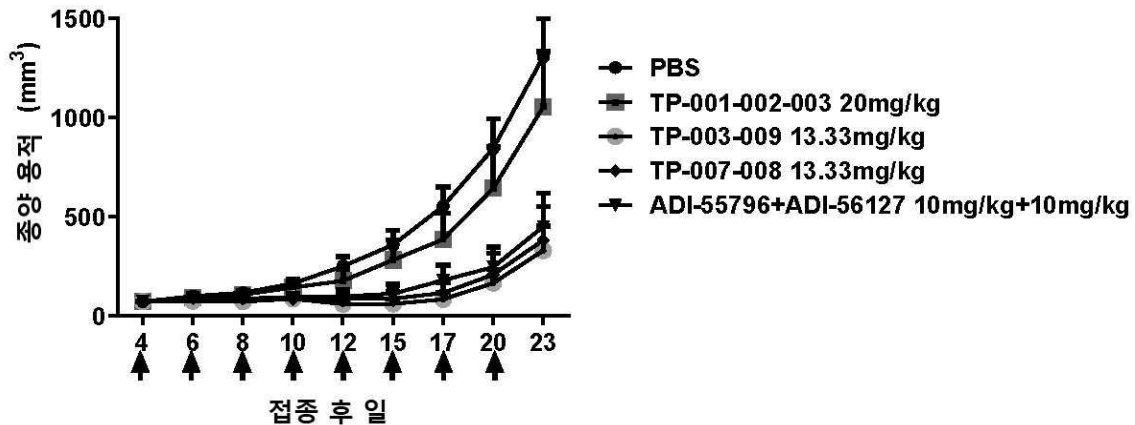
(54) 발명의 명칭 항-TIGIT/항-PVRIG 이중특이적 항체, 이의 약제학적 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 생물학적 의약품 분야에 속하며, 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 및 이의 약제학적 조성물 및 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 PVRIG를 표적으로 하는 제1 단백질 기능 영역 및 PVRIG와 상이한 표적(예: TIGIT)을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이며, 여기서 상기

(뒷면에 계속)

대표도 - 도15



제1 단백질 기능 영역은 항-PVRIG 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 항-PVRIG 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고, 상기 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체는 우수한 항종양 효과를 갖는다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

후양 웨이펑

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트, 탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

먀오 샤오니우

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트, 탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

출 언 디

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트, 탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

명세서

청구범위

청구항 1

PVRIG를 표적으로 하는(targeting) 제1 단백질 기능 영역(first protein functional region), 및 PVRIG와 상이한 표적(예: TIGIT)을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역을 포함하는 이중특이적 항체(bispecific antibody)로서,

상기 제1 단백질 기능 영역이 항-PVRIG 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고;

상기 항-PVRIG 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고;

상기 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제2 단백질 기능 영역이 항-TIGIT 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고,

상기 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는

상기 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이의 항원 결합 단편이 독립적으로 단일쇄 항체 또는 IgG 분자(IgG-HM)인, 이중특이적 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 단백질 기능 영역이 항-PVRIG 면역글로불린이고, 상기 제2 단백질 기능 영역이 항-TIGIT 단일쇄 항체이고:

상기 항-PVRIG 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;

상기 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는

상기 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 단백질 기능 영역이 항-PVRIG 단일쇄 항체이고, 상기 제2 단백질 기능 영역이 항-TIGIT 면역글로불린이고;

상기 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;

상기 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는

상기 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역이 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖고;

상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역이 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 갖고;

바람직하게는, 상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 위치 44의 글리신이 시스테인으로 대체되고, 상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 위치 100의 글리신이 시스테인으로 대체되는, 이중특이적 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역이 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖거나; 또는

상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역이 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 갖고;

바람직하게는, 상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 위치 44의 글리신이 시스테인으로 대체되고, 상기 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 위치 100의 글리신이 시스테인으로 대체되는, 이중특이적 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 단백질 기능 영역과 상기 제2 단백질 기능 영역이 직접 연결되거나 링커(linker)를 통해 연결되고;

바람직하게는, 상기 링커가 (GGGS) m 이고, m 이 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

바람직하게는, 상기 링커의 아미노산 서열이 서열번호 6에 제시되어 있는, 이중특이적 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 단백질 기능 영역 및 상기 제2 단백질 기능 영역의 개수가 독립적으로 1개, 2개 또는 2개 이상인, 이중특이적 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-TIGIT 단일쇄 항체가 각각 항-PVRIG 면역글로불린의 두 중쇄의 C-말단에 연결되거나, 또는

상기 항-PVRIG 단일쇄 항체가 각각 항-TIGIT 면역글로불린의 두 중쇄의 C-말단에 연결되는, 이중특이적 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-TIGIT 면역글로불린의 불변 영역이 인간 항체로부터 유래되고;

바람직하게는, 상기 불변 영역이 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되는, 이중특이적 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역이 인간 Ig 감마-1쇄 C 영역 또는 인간 Ig 감마-4쇄 C 영역이고, 상기 경쇄 불변 영역이 인간 Ig 카파쇄 C 영역이고;

바람직하게는, 상기 항-PVRIG 면역글로불린 및 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역이 EU 넘버링 시스템(numbering system)에 따라 L234A 돌연변이 및 L235A 돌연변이를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드쇄와 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드쇄로 형성된 이량체 또는 사량체, 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드쇄와 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드쇄로 형성된 이량체 또는 사량체인, 이중특이적 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 인코딩(encoding)하는, 단리된 핵산 분자(isolated nucleic acid molecule).

청구항 15

제14항에 따른 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector).

청구항 16

제14항에 따른 단리된 핵산 분자 또는 제15항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포(host cell).

청구항 17

이중특이적 항체와 접합된 모이어티(conjugated moiety)를 포함하는 접합체(conjugate)로서, 상기 이중특이적 항체가 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체이고, 상기 접합된 모이어티가 검출 가능한 표지이며, 바람직하게는 상기 접합된 모이어티가 방사성 동위원소, 형광 물질, 착색 물질 또는 효소인, 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체를 포함하는 키트(kit)로서,

바람직하게는, 상기 키트가 이중특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 임의로, 상기 제2 항체가 방사성 동위원소, 형광 물질, 착색 물질 또는 효소와 같은 검출 가능한 표지를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 19

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서,

바람직하게는, 상기 약제학적 조성물이 적어도 하나의 항-PD-1 항체를 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 이중특이적 항체 대 상기 항-PD-1 항체의 몰 비가 (1:5) 내지 (5:1)이고, 더욱 바람직하게는 1:1인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체가 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역이 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고, 여기서

상기 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-PD-1 항체의 경쇄 가변 영역이 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제1 생성물과 제2 생성물을 별도의 패키지(package)에 포함하는 조합 생성물(combination product)로서,

상기 제1 생성물이 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 포함하고;

상기 제2 생성물이 적어도 하나의 항-PD-1 항체를 포함하고;

바람직하게는, 상기 제1 생성물 및 상기 제2 생성물이 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 독립적으로 포함하고;

바람직하게는, 상기 조합 생성물이 패키지 삽입물(package insert)을 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 이중특이적 항체 대 상기 항-PD-1 항체의 몰 비가 (1:5) 내지 (5:1)이고, 더욱 바람직하게는 1:1인, 조합 생성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체가 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역이 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고, 여기서

상기 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 상기 항-PD-1 항체의 경쇄 가변 영역이 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역이 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 조합 생성물.

청구항 23

종양의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체의 용도로서,

바람직하게는, 상기 종양이 결장직장암(colorectal cancer), 흑색종(melanoma), 폐암(lung cancer), 신장암(kidney cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 유방암(breast cancer), 피부암(skin cancer), 난소암(ovarian cancer), 위암(stomach cancer), 두경부암(head and neck cancer), 간암(liver cancer), 뇌종양(brain tumor), 요로암(urinary tract cancer), 골종양(bone tumor), 담관암(bile duct cancer), 직장암(rectal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 다발성 골수종(multiple myeloma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), B-세포 림프종(B-cell lymphoma), 형질세포암(plasma cell cancer), 전립선암(prostate cancer) 및 고환암(testicular cancer)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상이고;

바람직하게는, 상기 폐암이 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 또는 소세포 폐암(small cell lung cancer)인, 용도.

청구항 24

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항, 또는 제17항에 있어서, 종양의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 이중특이적 항체, 또는 접합체로서,

상기 종양이 결장직장암, 흑색종, 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암, 두경부암, 간암, 뇌종양, 요로암, 골종양, 담관암, 직장암, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 형질세포암, 전립선암 및 고환암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상이고;

바람직하게는, 상기 폐암이 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암인, 이중특이적 항체, 또는 접합체.

청구항 25

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체의 유효량을 이룰 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서,

바람직하게는, 상기 종양이 결장직장암, 흑색종, 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암, 두경부암, 간암, 뇌종양, 요로암, 골종양, 담관암, 직장암, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 형질세포암, 전립선암 및 고환암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상이고;

바람직하게는, 상기 폐암이 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물의학 분야에 속하며, 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체(bispecific antibody), 이의 약제학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT, 또한 WUCAM, Vstm3, VSIG9로도 공지됨)는 활성화된 CD8⁺ T 및 CD4⁺ T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 조절 T 세포(Treg) 및 여포 헬퍼 T 세포에 의해 발현되는 새로운 면역억제 수용체이다.

[0003] 폴리오바이러스 수용체 관련 면역글로불린 도메인 함유 단백질(PVRIG, CD112R로도 공지됨)은 세포의 영역에 IgV 구조 도메인과 세포내 영역에 면역수용체 티로신 기반 억제제 모티프(ITIM)를 갖는 PVR 계열의 구성원이며, NK

세포와 T 세포에서 발견되는 새로운 면역억제 수용체이다.

- [0004] PVRIG 또는 이의 리간드 PVRL2는 폐암(lung cancer), 신장암(kidney cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 유방암(breast cancer) 및 피부암(skin cancer) 및 이들의 종양 미세환경에서 고도로 발견되며, PVRIG는 전립선암(prostate cancer) 환자의 NK 세포에서도 고도로 발견되었다(Whelan S et al. Cancer Immunol Res. 2019;7(2):257-268.). 또한, PVRIG는 CD8+ T 세포에서 고갈 마커인 TIGIT 및 PD-1과 함께 공동 발견되고, 이는 PVRIG 발현이 특정 종양 특이성을 가지며, TIL의 활성화/고갈 상태와 관련될 수 있음을 시사한다(Whelan S, et al. Cancer Immunol Res. 2019;7(2):257-268.). WO2021180205A1은 항-PVRIG 항체가 폐암, 유방암, 난소암(ovarian cancer), 신장암, 위암(gastric cancer), 자궁내막암 및 두경부암(head and neck cancer)의 치료에 사용될 수 있다고 보고했다.
- [0005] TIGIT/PVRIG는 복잡한 조절 네트워크에 관여한다: CD226(DNAM-1)은 CD155 및 CD112에 결합하여 활성화 신호를 매개하는 T/NK 세포의 활성화 수용체이고; TIGIT 및 PVRIG는 세포 활성화시 상향 조절되고, 각각 리간드 CD155 및 CD112에 결합하여 독립적으로 억제 신호를 도입하는 동시에 리간드 결합을 위해 CD226과 경쟁함으로써 이의 자극 신호를 차단하고 면역 세포 기능의 음성 조절을 달성하는 T/NK 세포의 억제 수용체이다.
- [0006] 연구자들은 TIGIT/CD155 및 PVRIG/CD112와 항체의 상호작용을 개별적으로 차단하면 종양 세포에 대한 NK 세포의 세포독성을 향상시킬 수 있으며, PVRIG와 TIGIT 차단 모노클로날 항체의 조합이 유방암 세포에 대한 NK 세포의 사멸 효과를 추가로 향상시킬 수 있음을 발견했다(Xu F, et al. Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. Cancer Immunol Immunother. 2017 Oct;66(10):1367-1375.). T 세포의 시험관내 기능 연구에서는, TIGIT 항체와 PVRIG 항체가 각각 T 세포 확장 및 IFN- γ 분비를 개별적으로 증가시킬 수 있는 반면, 둘의 조합은 부가적 또는 시너지 효과를 생성하여 T 세포 기능을 추가로 향상시킬 수 있음을 보여주었다(Whelan S, et al. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+ T-cell Function. Cancer Immunol Res. 2019 Feb;7(2):257-268.). 녹아웃 마우스 모델에서, PVRIG 항체는 TIGIT-/- 마우스에서 종양 성장을 감소시켰으며, 단일 유전자 녹아웃 마우스와 비교하여 PVRIG 및 TIGIT 이중 녹아웃 마우스에서 종양 성장 제어가 더욱 개선되었다(Kathryn Logronio et al. COM902, a Novel Therapeutic Antibody Targeting TIGIT Augments T Cell Function and the Activity of PVRIG Pathway Blockade In Vitro and In Vivo. SITC 2019.). 이러한 실험 데이터는 TIGIT/CD155 및 PVRIG/CD112가 두 개의 독립적이고 중복되지 않는 T 세포 억제 경로를 입증했다. TIGIT 및 PVRIG 둘 다를 동시에 표적으로 하면(targeting) 암 요법에서 CD226에 의해 생성된 T 세포 활성화 신호를 더 잘 방출할 수 있는 큰 잠재력을 가지고 있다.
- [0007] Hengrui Pharmaceuticals에 의해 개발된 SHR-2002는 임상 개발에 진입한 최초이자 유일한 TIGIT/PVRIG 이중 표적 항체이다. 2021년 12월 초에 임상 개발 승인을 받았으며 현재 암 치료를 위한 임상 1상 시험을 진행 중이다.
- [0008] TIGIT와 PVRIG의 동시 표적화는 생체내 실험과 시험관내 실험 모두에서 좋은 결과를 보여주었다. 이중특이적 항체는 두 개의 항원 또는 항원 에피토프에 동시에 특이적으로 결합할 수 있고, 이는 특이성(pecificity)과 이중기능성(bifunctionality)을 특징으로 하며 항체 공학 분야의 연구 핫스팟이 되었다. 그러나, 복잡한 전임상 평가 모델, 낮은 발현, 불량한 안정성, 복잡한 공정 및 높은 품질 관리의 가변성과 같은 이중특이적 항체의 개발에서 직면한 문제들은 이중특이적 항체 개발의 진행에 영향을 미쳤다.
- [0009] 따라서, 우수한 특이성과 효능을 갖고 제조하기 용이한 TIGIT 및 PVRIG를 표적으로 하는(targeting) 이중특이적 항체를 개발하는 것이 여전히 시급한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 집중적인 연구와 창의적인 작업 후에 새로운 이중특이적 항체를 수득했다. 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 이중특이적 항체가 우수한 친화도 및 생물학적 활성을 나타내며, 항종양 효과에 대한 잠재력을 가지고 있음을 발견했다. 이를 통해 다음과 같은 발명이 이루어졌다:

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 하나의 양태는

- [0012] PVRIG를 표적으로 하는 제1 단백질 기능 영역(first protein functional region), 및
- [0013] PVRIG와 상이한 표적(예: TIGIT)을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이며,
- [0014] 여기서,
- [0015] 제1 단백질 기능 영역은 항-PVRIG 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고,
- [0016] 항-PVRIG 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고;
- [0017] 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.
- [0018] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 항-PVRIG-항-TIGIT 이중특이적 항체로서 지칭되기도 하는 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체이며, 본 발명의 이중특이적 항체로 약칭된다.
- [0019] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0020] 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.
- [0021] 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원에 대한 결합을 결정하고; 각 쇠의 가변 영역은 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)이라고 불리는 3개의 추가변 영역을 포함하며, 이 중 중쇄(H)의 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄(L)의 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, HCDR1-HCDR3 및 LCDR1-LCDR3은 미국 특허 공보 US20210380669A1 또는 문헌[Lu et al (Deamidation and isomerization liability analysis of 131 clinical-stage antibodies, MABS, 2019, VOL. 11, NO. 1, 45-57, DOI: 10.1080/19420862.2018.1548233)]에 따라 정의되거나 넘버링된다.
- [0022] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 이의 항원 결합 단편은 독립적으로 단일 쇠 항체 또는 IgG 반분자(IgG-HM)이다.
- [0023] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서
- [0024] 제1 단백질 기능 영역은 항-PVRIG 면역글로불린이고, 제2 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 단일 쇠 항체이고; 여기서
- [0025] 항-PVRIG 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;
- [0026] 항-TIGIT 단일 쇠 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0027] 항-TIGIT 단일 쇠 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서

- [0029] 제1 단백질 기능 영역은 항-PVRIG 단일쇄 항체이고, 제2 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린이고; 여기서
- [0030] 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-PVRIG 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;
- [0031] 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0032] 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고; 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서
- [0034] 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖고;
- [0035] 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 가지며;
- [0036] 바람직하게는, 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 위치 44의 글리신은 시스테인으로 대체되고, 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-PVRIG 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 위치 100의 글리신은 시스테인으로 대체된다.
- [0037] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서
- [0038] 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖거나; 또는
- [0039] 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 가지며;
- [0040] 바람직하게는, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 위치 44의 글리신은 시스테인으로 대체되고, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 항-TIGIT 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 위치 100의 글리신은 시스테인으로 대체된다.
- [0041] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 제1 단백질 기능 영역과 제2 단백질 기능 영역은 직접 연결되거나 링커(linker)를 통해 연결되고;
- [0042] 바람직하게는, 링커는 (GGGS)_m이고, m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;
- [0043] 바람직하게는, 링커의 아미노산 서열은 서열번호 6에 제시되어 있다.
- [0044] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역의 개수는 독립적으로 1개, 2개 또는 2개 이상이다.
- [0045] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서
- [0046] 항-TIGIT 단일쇄 항체(두 분자)는 각각 항-PVRIG 면역글로불린의 두 중쇄의 C-말단에 연결되거나, 또는
- [0047] 항-PVRIG 단일쇄 항체(두 분자)는 각각 항-TIGIT 면역글로불린의 두 중쇄의 C-말단에 연결된다.
- [0048] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서

- [0049] 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-TIGIT 면역글로불린의 불변 영역은 인간 항체로부터 유래되고;
- [0050] 바람직하게는, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0051] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서
- [0052] 항-PVRIG 면역글로불린 또는 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 인간 Ig 감마-1 쇠 C 영역 또는 인간 Ig 감마-4 쇠 C 영역이고, 경쇄 불변 영역은 인간 Ig 카파 쇠 C 영역이고;
- [0053] 바람직하게는, 항-PVRIG 면역글로불린 및 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링 시스템에 따라 L234A 돌연변이 및 L235A 돌연변이(LALA로서 약칭됨)를 추가로 포함한다.
- [0054] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 부위 앞의 문자는 돌연변이 전 아미노산을 나타내고, 부위 뒤의 문자는 돌연변이 후 아미노산을 나타낸다.
- [0055] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체가 제공되고, 이는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드 쇠와 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드 쇠로 형성된 이량체 또는 사량체, 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드 쇠와 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드 쇠로 형성된 이량체 또는 사량체이다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 임의의 구현예에 따라 이중특이적 항체를 인코딩(encoding)하는, 단리된 핵산 분자(isolated nucleic acid molecule)에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector)에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 단리된 핵산 분자 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포(host cell)에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 양태는 이중특이적 항체와 접합된 모이어티(moiety)를 포함하는 접합체(conjugate)에 관한 것으로, 여기서 이중특이적 항체는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체이고, 접합된 모이어티는 검출 가능한 표지이며, 바람직하게는 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 착색 물질 또는 효소이다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체를 포함하는 키트(kit)에 관한 것이고;
- [0061] 바람직하게는, 키트는 이중특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 임의로, 제2 항체는 방사성 동위원소, 형광 물질, 착색 물질 또는 효소와 같은 검출 가능한 표지를 추가로 포함한다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이고;
- [0063] 바람직하게는, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 항-PD-1 항체를 추가로 포함하고;
- [0064] 바람직하게는, 이중특이적 항체 대 항-PD-1 항체의 몰 비는 (1:5) 내지 (5:1), 예를 들어, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1이며, 더욱 바람직하게는 1:1이다.
- [0065] 본 발명의 일부 구현예에서, 약제학적 조성물이 제공되며, 여기서 항-PD-1 항체는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고, 여기서
- [0066] 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며, 항-PD-1 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;
- [0067] 바람직하게는, 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0068] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 약제학적 조성물이 제공되며, 여기서 여기에 함유된 이중특이적 항체의 질량에 의해 계산된 약제학적 조성물의 단위 용량은 100mg-1000mg, 200mg-800mg, 200mg-500mg, 300mg-600mg,

400mg-500mg 또는 450mg이다.

- [0069] 본 발명의 또 다른 양태는 제1 생성물과 제2 생성물을 별도의 패키지(package)에 포함하는 조합 생성물(combination product)에 관한 것이며, 여기서
- [0070] 제1 생성물은 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체를 포함하고;
- [0071] 제2 생성물은 적어도 하나의 항 PD-1 항체를 포함하고;
- [0072] 바람직하게는, 제1 생성물 및 제2 생성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 독립적으로 포함하고;
- [0073] 바람직하게는, 조합 생성물은 패키지 삽입물(package insert)을 추가로 포함한다.
- [0074] 본 발명의 일부 구현예에서, 조합 생성물이 제공되고, 여기서 이중특이적 항체 대 항-PD-1 항체의 몰 비는 (1:5) 내지 (5:1), 예를 들어, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1이고; 보다 바람직하게는 1:1이다.
- [0075] 본 발명의 일부 구현예에서, 조합 생성물이 제공되고, 여기서 항-PD-1 항체는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 HCDR1 내지 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 LCDR1 내지 LCDR3을 포함하고, 여기서
- [0076] 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 및 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하며; 항-PD-1 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고;
- [0077] 바람직하게는, 항-PD-1 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 경쇄 가변 영역은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0078] 본 발명의 또 다른 양태는 종양의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체의 용도에 관한 것이고;
- [0079] 바람직하게는, 종양은 결장직장암(colorectal cancer), 흑색종(melanoma), 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암(stomach cancer), 두경부암, 간암(liver cancer), 뇌종양(brain tumor), 요로암(urinary tract cancer), 골종양(bone tumor), 담관암(bile duct cancer), 직장암(rectal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 다발성 골수종(multiple myeloma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), B-세포 림프종(B-cell lymphoma), 형질세포암(plasma cell cancer), 전립선암(prostate cancer) 및 고환암(testicular cancer)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상이고;
- [0080] 바람직하게는, 폐암은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 또는 소세포 폐암(small cell lung cancer)이다.
- [0081] 종양의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체, 또는 본 발명의 접합체, 또는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 약제학적 조성물로서,
- [0082] 바람직하게는, 종양은 결장직장암, 흑색종, 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암, 두경부암, 간암, 뇌종양, 요로암, 골종양, 담관암, 직장암, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 형질세포암, 전립선암 및 고환암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상이고;
- [0083] 바람직하게는, 폐암은 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암이다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 임의의 구현예에 따른 약제학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료하거나 예방하기 위한 방법에 관한 것이고;
- [0085] 바람직하게는, 종양은 결장직장암, 흑색종, 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암, 두경부암, 간암, 뇌종양, 요로암, 골종양, 담관암, 직장암, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 형질세포암, 전립선암 및 고환암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상인

고;

- [0086] 바람직하게는, 폐암은 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암이다.
- [0087] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 악성 종양(malignant tumor)을 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공되며, 여기서
- [0088] 이중특이적 항체의 단일 용량은 체중 킬로그램당 0.1 내지 100mg, 바람직하게는 1 내지 10mg(예: 1mg, 2mg, 3mg, 4mg, 5mg, 6mg, 7mg, 8mg, 9mg 또는 10mg)이며; 대안적으로, 본 발명의 이중특이적 항체의 단일 용량은 대상체당 10 내지 1000mg(예: 약 100mg, 약 150mg, 약 200mg, 약 250mg, 약 300mg, 약 350mg, 약 400mg, 약 450mg, 약 500mg, 약 600mg, 약 700mg, 약 800mg, 약 900mg 또는 약 1000mg), 바람직하게는 체중 킬로그램당 50-500mg, 100-400mg, 150-300mg, 150-250mg, 또는 200mg이고;
- [0089] 바람직하게는, 투여는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주일, 2주 또는 3주마다 수행되고;
- [0090] 바람직하게는, 투여는 정맥내 점적 또는 정맥내 주사 방식으로 수행된다.
- [0091] 일부 섭생에서, 이중특이적 항체의 투여는 2주(14일) 또는 3주(21일) 주기로 이루어지며, 바람직하게는 각 주기의 첫 번째 날(D1)에 항-PVRIG 항체가 정맥내 투여된다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 2주마다 1회(q2w) 또는 3주마다 1회(q3w)의 빈도로 투여된다.
- [0092] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 본원에 사용된 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학 실험실의 절차는 상응하는 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 발명을 보다 잘 이해하기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명이 아래에 제공된다.
- [0093] 본원에 사용된 바와 같이, PVRIG의 아미노산 서열(NCBI GenBank ID: NP_076975.2)을 지칭할 때, 이는 전장 PVRIG 단백질 또는 이의 세포의 도메인을 포함하며, 이는 또한 마우스 또는 인간 IgG Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)에 융합된 단편과 같은 PVRIG의 융합 단백질을 포함한다. 그러나, 당업자는 PVRIG 단백질의 아미노산 서열에서 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)가 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 자연적으로 발생하거나 인공적으로 도입될 수 있음을 이해한다. 따라서, 본 발명에서 용어 "PVRIG 단백질" 또는 "PVRIG"는 제시된 서열과 이의 천연 또는 인공 변이체를 포함하여 이러한 모든 서열을 포함한다. 또한, PVRIG 단백질의 서열 단편을 기재할 때, 이는 서열 단편뿐만 아니라 천연 또는 인공 변이체의 상응하는 서열 단편도 포함한다.
- [0094] 본원에 사용된 바와 같이, TIGIT의 아미노산 서열(NCBI GenBank ID: NP_776160.2)을 지칭할 때, 이는 전장 TIGIT 단백질 또는 이의 기능적 단편을 포함하고; 이는 또한 마우스 또는 인간 IgG Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)에 융합된 단편과 같은 TIGIT의 융합 단백질도 포함한다. 그러나, 당업자는 TIGIT 단백질의 아미노산 서열에서 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)가 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 자연적으로 발생하거나 인공적으로 도입될 수 있음을 이해한다. 따라서, 본 발명에서, 용어 "TIGIT 단백질" 또는 "TIGIT"는 제시된 서열과 이의 천연 또는 인공 변이체를 포함하여 이러한 모든 서열을 포함한다. 또한, TIGIT 단백질의 서열 단편을 기재할 때, 이는 서열 단편뿐만 아니라 천연 또는 인공 변이체의 상응하는 서열 단편도 포함한다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "EC₅₀"은 최대 효과의 50%를 위한 농도를 지칭하며, 이는 최대 효과의 50%를 유발하는 농도를 지칭한다.
- [0096] 본원에 사용된 용어 "항체"는 일반적으로 두 쌍의 폴리펩티드 쇄로 구성된 면역글로불린 분자를 지칭하며, 각 쌍은 "경쇄"(L)와 "중쇄"(H)를 갖는다. 항체 경쇄는 κ 및 λ 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 μ , δ , γ , α 또는 ϵ 로 분류될 수 있으며, 항체의 아이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의할 수 있다. 경쇄와 중쇄 내에서 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역으로 연결되고, 중쇄는 약 3개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 추가로 함유한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인인 CL로 구성된다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예: 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 구성 요소(C1q)를 포함한 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. VH 및 VL 영역은 또한 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 매우 가변적인 영역으로 세분화될 수 있으며, 그 사이에는 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존적인 영역이

산재되어 있다. 각 VH와 VL은 아미노 말단에서 카르복실 말단까지 다음과 같은 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역(VH 및 VL)은 각각 항체 결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산 할당은 문헌[Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196: 901-917; Chothia et al, Nature, 1989; 342: 878-883; or the IMGT numbering system, see, the definition of Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF [J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1): of D301-D307]의 정의에 따른다. 용어 "항체"는, 예를 들어, 재조합 항체, 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 포함하는 임의의 특정 항체 생산 방법에 제한되지 않는다. 항체는 상이한 아이소타입, 예를 들어, IgG(예: IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, "항원 결합 부분"으로도 공지된 용어 "항원 결합 단편"은 전장 항체의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 지칭하며, 이는 전장 항체가 결합하는 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하고/하거나 항원에 대한 특이적 결합을 위해 전장 항체와 경쟁한다. 일반적으로, 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된 문헌[Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)]을 참조한다. 항체의 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 일부 경우에, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb 및 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일 쇠 항체 단편(예: scFv), 키메라 항체, 디아바디, 및 이들에게 특정 항원 결합 능력을 부여하기에 충분한 항체의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "Fd 단편"은 V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭하고; 용어 "Fv 단편"은 항체의 단일 암의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭하고; 용어 "dAb 단편"은 V_H 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭하고(Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)); 용어 "Fab 단편"은 V_L, V_H, C_L 및 CH1 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭하며; 용어 "F(ab')₂ 단편"은 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭한다.

[0099] 일부 경우에, 항체의 항원 결합 단편은 단일 쇠 항체(예: scFv)이며, 여기서 V_L 및 V_H 도메인은 쌍을 이루어 단일 폴리펩티드 쇠를 생성할 수 있게 하는 링커를 통해 1가 분자를 형성한다(참조: 예를 들어, Bird et al., Science 242:423-426 (1988) and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)). 이러한 scFv 분자는 다음 일반적인 구조를 가질 수 있다: NH₂-V_L-링커-V_H-COOH 또는 NH₂-V_H-링커-V_L-COOH. 종래 기술에서 적절한 링커는 GGGGS 아미노산 서열 반복 또는 이의 변이체로 구성된다. 예를 들어, 아미노산 서열 (GGGGS)₄를 갖는 링커가 사용될 수 있지만, 이의 변이체도 사용될 수 있다(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. USA 90: 6444-6448). 본 발명에 사용될 수 있는 다른 링커들은 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. 293:41-56; 및 Roovers et al.(2001), Cancer Immunol]에 기재되어 있다.

[0100] 일부 경우에, 항체의 항원 결합 단편은 디아바디, 즉 V_H 및 V_L 도메인이 단일 폴리펩티드 쇠에서 발현되는 2가 항체이다. 그러나, 사용된 링커는 너무 짧아서 하나의 쇠에서 두 도메인의 쌍을 허용할 수 없으므로, 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루도록 강제되고 두 개의 항원 결합 부위가 생성된다(참조: 예를 들어, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. USA 90:6444-6448 (1993) 및 Poljak R. J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

[0101] 다른 경우에, 항체의 항원 결합 단편은 1차 항체(단편)와 2차 항체(단편) 또는 항체 유사체로부터 링커를 통해 형성된 접합체를 지칭하는 "이중특이적 항체"이며; 접합 방법은 화학 반응, 유전자 융합 및 효소 촉매 작용을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어, 삼중특이적 항체 및 사중특이적 항체를 포함하는 "다중특이적 항체"일 수 있으며, 전자는 세 개의 상이한 종류의 항원 결합 특이성을 갖는 항체이고, 후자는 네 개의 상이한 종류의 항원 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예를 들어, 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 IgG 항체, scFv-Fc 항체 단편 또는 이들의 조합, 예를 들어, CN104341529A에 연결된다. 항-IL-17a 피노머는 항-IL-6R 항체, 예를 들어, W02015141862A1에 결합한다.

- [0102] 항체의 항원 결합 단편(예: 상기 기재된 항체 단편)은 당업자에게 공지된 통상적인 기술(예: 재조합 DNA 기술 또는 효소적 또는 화학적 절단)을 사용하여 주어진 항체(예: 본 발명에 제공된 모노클로날 항체 ADI-56127, ADI-55796 또는 ADI-55812)로부터 획득될 수 있고, 항체의 항원 결합 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 특이성을 위해 스크리닝된다.
- [0103] 용어 "mcAb" 및 "모노클로날 항체"는 고도로 상동성인 항체 분자 그룹, 즉 자발적으로 발생할 수 있는 천연 돌연변이를 제외한 동일한 항체 분자 그룹의 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 모노클로날 항체는 항원의 단일 에피토프에 대해 매우 특이적이다. 폴리클로날 항체는 일반적으로 적어도 두 개 이상의 상이한 항체를 포함하는 모노클로날 항체에 상대적이며, 이러한 상이한 항체는 일반적으로 항원의 상이한 에피토프를 인식한다. 모노클로날 항체는 일반적으로 문헌[Kohler et al. (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517): 495)]에 처음 보고된 하이브리도마 기술을 사용하여 획득될 수 있을 뿐만 아니라 재조합 DNA 기술(참조: 예를 들어, 미국 특허 4,816,567)을 사용하여 획득될 수 있다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는 인간 면역글로불린(수용체 항체)의 CDR의 전부 또는 일부가 비인간 항체(공여체 항체)의 CDR로 대체될 때 획득되는 항체 또는 항체 단편을 지칭하며, 여기서 공여체 항체는 예상되는 특이성, 친화도 또는 반응성을 갖는 비인간(예: 마우스, 래트 또는 토끼) 항체일 수 있다. 또한, 수용체 항체의 프레임워크 영역(FR)의 일부 아미노산 잔기는 또한 상응하는 비인간 항체의 아미노산 잔기 또는 다른 항체의 아미노산 잔기로 대체되어 항체의 성능을 더욱 개선하거나 최적화할 수도 있다. 인간화 항체에 대한 더 자세한 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; and Clark, Immunol. Today, 2000; 21:397-402]을 참조한다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "단리된" 또는 "단리되는"은 인공적인 순단에 의해 천연 상태에서부터 획득되는 것을 지칭한다. "단리된" 물질 또는 성분이 자연에서 발생하는 경우, 이는 자연 환경의 변화 때문일 수 있고, 또는 물질이 자연 환경으로부터 분리되었기 때문일 수도 있고, 둘 다일 수 있다. 예를 들어, 특정의 단리되지 않은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 살아있는 동물에 자연적으로 존재하며, 이 자연 상태에서부터 단리된 고순도의 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 "단리된"이라고 한다. 용어 "단리된" 또는 "단리되는"은 인공 또는 합성 물질의 혼합을 배제하지 않으며, 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 다른 불순한 물질의 존재를 배제하지도 않는다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "백터"는 폴리뉴클레오티드가 삽입될 수 있는 핵산 전달 비히클을 지칭한다. 백터가 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 단백질을 발현할 수 있는 경우, 백터는 발현 백터라고 한다. 백터는 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있고, 이로써 백터가 운반하는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 인공 염색체, 예를 들어, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC) 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC); 파지, 예를 들어, λ 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 백터는 당업자에게 익히 공지되어 있다. 백터로 사용될 수 있는 동물 바이러스에는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스바이러스(예: 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바칼로바이러스, 유두종바이러스, 파포바이러스(예: SV40)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 백터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소 및 리포터 유전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 발현 제어 요소를 포함할 수 있다. 또한, 백터는 복제 부위의 기원을 포함할 수도 있다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 백터를 도입하는 데 사용될 수 있는 세포를 지칭하며, 이는 원핵 세포, 예를 들어, 에셰리키아 콜리(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 진균 세포, 예를 들어, 효모 세포 또는 아스페질러스(*Aspergillus*) 등, 곤충 세포, 예를 들어, S2 초파리(*Drosophila*) 세포 또는 Sf9, 또는 동물 세포, 예를 들어, 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, GS 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합"은 두 분자 사이의 비무작위 결합 반응, 예를 들어, 항체와 항체가 표적으로 하는 항원 사이의 반응을 지칭한다. 특정 구현예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체(또는 항원에 특이적인 항체)는 약 10^{-5} M 미만, 예를 들어, 약 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 이하의 친화도(K_D)로 항원에 결합하는 항체를 지칭한다.

- [0109] 본원에 사용된 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하며, 이는 항체와 항원 사이의 결합 친화도를 기재하는 데 사용된다. 평형 해리 상수가 작을수록 항체-항원 결합은 더 단단해지고 항체와 항원 사이의 친화도는 더 높아진다. 전형적으로, 항체는 약 10^{-5} M 미만, 예를 들어, 약 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 이하인 해리 평형 상수(K_D)로 항원(예: TIGIT 단백질)에 결합한다. K_D 는 Fortebio 분자 상호작용 기기를 사용하는 것과 같은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" 및 "McAb"는 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용되고; 용어 "폴리클로날 항체" 및 "PcAb"는 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용된다. 그리고, 본 발명에서, 아미노산은 일반적으로 당업계에 익히 공지된 한 문자 및 세 문자 약어로 표현된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.
- [0111] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적으로 및/또는 생리학적으로 적합한 담체 및/또는 부형제를 지칭한다. 이는 당업계에 익히 공지되어 있으며(참조: 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 강화제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하지만, 이에 제한되지 않고; 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, Tween-80을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며; 이온 강도 강화제는 염화나트륨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0112] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 목적하는 효과를 적어도 부분적으로 수득하기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 예방적 유효량은 질환(예: 종양)의 발생을 예방, 정지 또는 지연시키기에 충분한 양이며; 치료적 유효량은 이미 질환을 앓고 있는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 예방하기에 충분한 양이다.
- [0113] 본원에 사용된 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"는 상호교환 가능하며, "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"를 언급할 때, 이는 또한 하이브리도마의 하위 클론 및 자손 세포도 포함한다.
- [0114] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "제1"(예: 제1 생성물) 및 "제2"(예: 제2 생성물)은 표현의 구별 또는 명확성을 위해 사용되며, 임의의 전형적인 우선 순위를 의미하지는 않는다.

발명의 효과

- [0115] 본 발명은 항목 (1) 내지 (4)에 기재된 바와 같이 다음과 같은 기술적 효과 중 하나 이상을 달성한다:
- [0116] (1) 본 발명의 이중특이적 항체는 높은 친화도로 TIGIT 및 PVRIG에 결합할 수 있다.
- [0117] (2) 본 발명의 이중특이적 항체는 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체와 시너지 효과를 가질 가능성이 높다.
- [0118] (3) 본 발명의 항체는 종양, 예를 들어, 결장직장암, 흑색종, 폐암, 신장암, 자궁내막암, 유방암, 피부암, 난소암, 위암, 두경부암, 간암, 뇌종양, 요로상피암, 골종양, 담관암, 직장암, 췌장암, 자궁경부암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 형질세포암, 전립선암 및 고환암을 치료 및/또는 예방하는 데 효과적이다.
- [0119] (4) 본 발명의 이중특이적 항체는 독성 및 부작용 수준이 낮다.

도면의 간단한 설명

- [0120] 도 1a 내지 도 1c는 본 발명의 이중특이적 항체의 개략적인 구조를 보여준다.
- 도 2는 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.
- 도 3은 CHO 세포에서 과발현된 시노물구스 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.
- 도 4는 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.
- 도 5는 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.
- 도 6은 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 본 발명의 이중특이적 항

체의 곡선을 보여준다.

도 7은 CHO 세포에서 과발현된 인간 PVRIG에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 8은 CHO 세포에서 과발현된 시노몰구스 PVRIG에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 9는 CHO 세포에서 과발현된 마우스 PVRIG에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 10은 CHO 세포에서 과발현된 인간 CD112에 대한 인간 PVRIG의 결합을 차단하는 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.

도 11은 마우스 PVRIG 단백질에 대한 마우스 CD112의 결합을 차단하는 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.

도 12는 인간 PVRIG 및 인간 TIGIT 단백질에 공동 결합하는 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.

도 13은 PVRIG/CD112 및 TIGIT/CD155 신호전달 경로를 차단하는 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.

도 14a 내지 14b는 PVRIG/CD112, TIGIT/CD155 및 PD-1/PD-L1 신호전달 경로를 차단하는 항-PD-1/L1 항체와 조합된 본 발명의 이중특이적 항체의 곡선을 보여준다.

도 15는 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 B-NDG 마우스 모델에서 본 발명의 이중특이적 항체의 효능을 보여준다.

도 16a 내지 16b는 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 B-NDG 마우스 모델에서 항-PD-1 항체와 조합된 본 발명의 이중특이적 항체의 효능을 보여준다.

도 17은 마우스에서 본 발명의 이중특이적 항체의 생체내 반감기 곡선을 보여준다.

도 18은 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 19는 CHO 세포에서 과발현된 시노몰구스 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 20은 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 21은 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 본 발명의 항-TIGIT 항체의 곡선을 보여준다.

도 22는 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 본 발명의 항-TIGIT 항체의 곡선을 보여준다.

도 23은 활성화된 인간 1차 T 세포에서 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 24는 CHO 세포에서 과발현된 인간 PVRIG에 대한 본 발명의 항-PVRIG 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 25는 CHO 세포에서 과발현된 시노몰구스 PVRIG에 대한 본 발명의 항-PVRIG 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 26은 CHO 세포에서 과발현된 마우스 PVRIG에 대한 본 발명의 항-PVRIG 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 27은 CHO 세포에서 과발현된 인간 CD112에 대한 인간 PVRIG의 결합을 차단하는 본 발명의 항-PVRIG 항체의 곡선을 보여준다.

도 28은 마우스 PVRIG 단백질에 대한 마우스 CD112의 결합을 차단하는 본 발명의 항-PVRIG 항체의 곡선을 보여준다.

도 29는 활성화된 인간 1차 T 세포에서 PVRIG에 대한 본 발명의 항-PVRIG 항체의 결합 곡선을 보여준다.

도 30은 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 NDG 마우스 모델에서 본 발명의 항-PVRIG 항체의 약물 효능을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] 본 발명은 구체적인 실시예와 함께 아래에서 추가로 기재될 것이다. 이러한 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위해 사용된 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아님을 이해해야 한다. 다음 실시예에서 구체적인 조건을 명시하지 않은 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular

Cloning: Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 조건 또는 제조업체가 권장하는 조건에 따랐다. 달리 명시되지 않는 한, 백분율과 부는 중량 기준이다.

[0122] 항체 아테졸리주맵: 항 PD-L1 모노클로날 항체, 상표명 Tecentriq, Roche.

[0123] 항체 캄브롤리주맵: 항 PD-1 모노클로날 항체, 상표명 Keytruda, Merck.

[0124] 실시예에 사용된 다음 대조군 항체는 HEK293 세포로부터 발현되고 정제된다:

[0125] COM701은 미국 특허 US10227408B2의 서열번호 1372, 서열번호 1380에 상응하는 경쇄 가변 영역 서열 및 중쇄 가변 영역 서열을 갖는 HEK293 세포에 의해 발현되는 Compugen의 항인간 PVRIG 항체이다.

[0126] Mab46은 미국 특허 공보 US20200040081A1의 서열번호 912, 서열번호 918에 상응하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 서열을 갖는 HEK293 세포에 의해 발현되는 표면 종양학(Surface Oncology)으로부터의 항인간 PVRIG 항체이다.

[0127] 티라골루맵은 문헌[WHO Drug Information, Vol. 31, No. 2, 2017, Proposed INN. List 117, CAS No. 1918185-84-8]으로부터 유래된 경쇄 및 중쇄 서열을 갖는 HEK293 세포에 의해 발현되는 Genentech의 항인간 TIGIT 항체이다.

[0128] **실시예 1: 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 설계 및 제조**

[0129] 이 실시예에서, 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 scFv는 전체 유전자 합성에 의해 GGGGSGGG 링커(서열번호 44)(다른 링커, 예를 들어, GGGGSGGG, 서열번호 6도 또한 사용될 수 있음)를 통해 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796의 중쇄의 C-말단에 직렬로 연결되었다(도 1a). 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796의 scFv는 전체 유전자 합성에 의해 GGGGSGGG 링커(서열번호 44)(다른 링커, 예를 들어, GGGGSGGG, 서열번호 6도 또한 사용될 수 있음)를 통해 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 중쇄의 C-말단에 직렬로 연결되었다(도 1b). 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812의 중쇄(CH3 영역에서 돌연변이되어 "노브(Knob)" 구조를 형성함)와 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 중쇄(CH3 영역에서 돌연변이되어 "홀(Hole)" 구조를 형성함)를 조립하여 "노브 인투 홀(Knob into hole)" 방법으로 "1+1" 분자 구조를 형성했다(도 1c). TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003으로 명명된 항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체의 세 가지 상이한 구조가 형성되었으며, 이들의 개략적인 구조는 도 1a 내지 도 1c에 도시되어 있다. 항-TIGIT 항체와 항-PVRIG 항체의 scFv는 "VH-링커-VL" 연결로 구성되었고, VH와 VL 사이의 유연한 링커 펩티드는 GGGGSGGGSGGGGSGGGSG(서열번호 45)(다른 유연한 링커 펩티드, 예를 들어, GGGGSGGGSGGGGSGGGG, 서열번호 46도 또한 사용될 수 있음)이었다. 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796과 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 중쇄 가변 영역의 위치 44와 경쇄 가변 영역의 위치 100의 글리신은 각각 시스테인으로 돌연변이되어 scFv의 안정성을 향상시켰다. 세 가지 이중특이적 항체는 모두 인간 IgG1 아형이었다. 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 및 ADI-55812, 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127뿐만 아니라 형성된 이중특이적 항체의 서열은 아래 표 1에 제시되어 있다.

[0130]

[표 1]

항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 및 상응하는 단일 말단 항체의 서열

명칭 또는 의미	서열	서열번호
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796의 중쇄 가변 영역	QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKG LEWIGTVYYSGSTFHNPSLKSRTIPVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARVGPDPVSHPPFDYWGQGLTVTVSS	1
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796의 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYST PITFGGGTKVEIK	2
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812의 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTGYMHWVRQAPGQ GLEWMGSIIPFSGEANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSD DTAVYYCARGPGLDRLWYGGYGMVWVGQGTTVTVSS	3
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812의 경쇄 가변 영역	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPITFGGGTKVEIK (항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 경쇄 가변 영역의 서열과 동일)	4
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTESVDAISWVRQAPGQG LEWMGDIIPFFDIDYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREGGTSWTHFFDLWGRGTLTVTVSS	5
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 경쇄 가변 영역	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPITFGGGTKVEIK (항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812의 경쇄 가변 영역의 서열과 동일)	4
G ₄ S 링커	GGGGSGGGGS	6
항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 펩티드 # 1	QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKG LEWIGTVYYSGSTFHNPSLKSRTIPVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARVGPDPVSHPPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS	7

[0131]

	<p>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGG GSGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTESVDAISWVRQAP GQCLEWMGDIIPFFDTDYAQKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAREGGTSWTHFFDLWGRGTLVTVSSGGGGGGGGGGSG GGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSSPITFGCGTKVEIK</p>	
<p>항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008 의 펩티드 # 2(항-TIGIT 항체 ADI-55796 의 카파 경쇄)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYST PITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>8</p>
<p>항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009 의 펩티드 # 1</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTESVDAISWVRQAPGQG LEWMGDIIPFFDTDYAQKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREGGTSWTHFFDLWGRGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT</p>	<p>9</p>

[0132]

	EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPG	
항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003 의 펩티드 # 3 (항-PVRIG 항체 ADI-55812 의 카파 경쇄)	항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009 의 펩티드 # 2 의 서열과 동일	10
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 중쇄 가변 영역의 HCDR1	GSISSYDHYWT	13
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 중쇄 가변 영역의 HCDR2	TVYYSGSTFHNP SLKS	14
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 중쇄 가변 영역의 HCDR3	ARVGPDPVSHPPFDY	15
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 경쇄 가변 영역의 LCDR1	RASQSISSYLN	16
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 경쇄 가변 영역의 LCDR2	AASSLQS	17
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 경쇄 가변 영역의 LCDR3	QQSYSTPIT	18

[0134]

항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 중쇄 가변 영역의 HCDR1	YAFTGYMH	19
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 중쇄 가변 영역의 HCDR2	SIIPFSGEANYAQKFQG	20
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 중쇄 가변 영역의 HCDR3	ARGPGSLDRLWYYYYGMDV	21
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 경쇄 가변 영역의 LCDR1	RASQSVSSSYLA	22
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 경쇄 가변 영역의 LCDR2	GASSRAT	23
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812 의 경쇄 가변 영역의 LCDR3	QQYGSSPIT	24
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 중쇄 가변 영역의 HCDR1	GTESVDAIS	25
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 중쇄 가변 영역의 HCDR2	DIIPFFDTDYAQKFQG	26
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 중쇄 가변	AREGGTSWTHFFDL	27

[0135]

영역의 HCDR3		
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 경쇄 가변 영역의 LCDR1	RASQSVSSSYLA	22
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 경쇄 가변 영역의 LCDR2	GASSRAT	23
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 경쇄 가변 영역의 LCDR3	QQYGSSPIT	24
인간 PVRIG 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	MRTEAQVPALQPPEPGLEGAMGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEV WVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGPNAGAGTTLA VLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCK FASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRAD	28
시노물구스 PVRIG 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	MRTEAQLALQSPEPGLEGAMGRRTLALPWVLLTLCVTAGTPEVW VQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGPGDAGGKLA LHPELGRQWAPARQARWETQSSISLALEDGSGASSPFANTTFCKF ASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSAPPTPVILRAD	29
마우스 PVRIG 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	SPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCGFVDAGR TKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHWETPNSVSVTLTMGQSKARSSL ANTTFCEVFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQAD	30
인간 TIGIT 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQDQLL AICNADLGWHISPSFKDRVAPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHT YPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP	31
시노물구스 TIGIT 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWEQHDHS LLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTY	32

[0136]

	HTYPDGTYRGRIFLEVLLESSVAEHSARFQIP	
마우스 TIGIT 의 세포외 도메인의 아미노산 서열	TIDTKRNISAEEGSVILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSV DLGWHVASVFSRVRVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGG IYKGRIFLKVQESSDDRRNGLAQFTAPLG	33
링커	GGGGSGGGGSG	44
유연한 링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG	45
유연한 링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG	46
위치 44 에서 돌연변이된 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 중쇄 가변 영역의 서열	QLQLQESGPGLVKPAETLSLCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKC LEWIGTVVYSGSTFHNPSLKSRTIPVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARVGPDPVSHPPFDYWGQGLTVTVSS	47
위치 100 에서 돌연변이된 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796 의 경쇄 가변 영역의 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYST PITFGCGTKVEIK	48
위치 44 에서 돌연변이된 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 중쇄 가변 영역의 서열	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTESVDAISWVRQAPGQC LEWMGDIIPFFDTDYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREGGTSWTHFFDLWGRGTLTVTVSS	49
위치 100 에서 돌연변이된 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127 의 경쇄 가변 영역의 서열	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPITFGCGTKVEIK	50

[0137]

[0138]

항체의 펩티드를 인코딩하는 핵산은 분자 클로닝에 의해 pcDNA3.1의 발현 프레임으로 별도로 작제되었다. TP-007-008 이중특이적 항체는 HEK293 세포를 항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 펩티드 쇠 #1과 펩티드 쇠 #2를 함유하는 pcDNA3.1 벡터로 형질감염시킴으로써 생산되었고, TP-003-009 이중특이적 항체는 HEK293 세포를 항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009의 펩티드 쇠 #1과 펩티드 쇠 #2를 함유하는 pcDNA3.1 벡터로 형질감염시킴으로써 생산되었고, TP-001-002-003 이중특이적 항체는 HEK293 세포를 항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003의 펩티드 쇠 #1, 펩티드 쇠 #2 및 펩티드 쇠 #3을 함유하는 pcDNA3.1 벡터로 형질감염시킴으로써 제조되었다. 상청액은 세포 배양 5일 후 수집하고, 표적 단백질을 단백질 A 자기 비드(Genscript에서 구입)를 사용하여 단리 및 정제했다. 자기 비드를 적절한 용적의 결합 완충액(PBS+0.1% Tween 20, pH 7.4)으로 재현탁시킨 다음(자기 비드 용적의 1 내지 4배), 정제할 샘플에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 배양했다. 샘플을 자기 락(Beaver에서 구입)에 놓고, 상청액을 폐기시키고 자기 비드를 결합 완충액으로 3회 세척했다. 용출 완충액(0.1M 나트륨 시트레이트, pH 3.2)을 자기 비드의 3 내지 5배 용적으로 첨가하고, 실온에서 5 내지 10분 동안 진탕시키고 자기 락으로 반환시키고, 수집하고 중화 완충액(1M Tris, pH 8.54)을 함유하는 수집 튜브로 옮겨 혼합했다. 3개의 이중특이적 항체 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003을 정제하고, PBS로 대체된 완충액으로 한외여과하고, LC-MS로 분자량을 확인한 다음, 후속적 시험관내 및 생체내 검출에 사용했다.

[0139]

실시예 2: 항체 친화도 검출

[0140]

바이오필름 층 광학 간섭 기술(ForteBio)을 인간, 시노물구스 원숭이 TIGIT 및 PVRIG에 대한 실시예 1에서 수득된 세 개의 이중특이적 항체와 이들의 상응하는 단일 말단 항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796, ADI-55812 및

항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127의 결합 및 해리 속도 상수(K_D) 값을 결정하는데 사용했다. Fortebio 친화도 측정은 공지된 방법에 따라 수행되었다(Este, P et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs*, 2013.5(2): p270-8). 인간, 시노물구스 원숭이 TIGIT 및 PVRIG의 세포외 영역의 아미노산 서열은 표 1에 제시되어 있다.

[0141] 자세한 내용은 다음과 같다:

[0142] 인간, 시노물구스 원숭이 TIGIT-his 및 인간 PVRIG-his 단백질에 대한 항체의 1가 친화도 측정: 센서를 분석 완충액에서 20분 동안 오프라인으로 평형화한 다음, 120초 동안 온라인 검출하여 기준선을 확립하고, 온전한 항체를 AHQ 센서에 로딩하여 친화도 검출을 위해 1nm의 두께에 도달하도록 했다. 항체 로딩된 센서를 100nM 표적 항원에서 정체기까지 배양한 다음, 센서를 분석 완충액으로 옮겨 해리 속도 측정을 위해 적어도 2분 동안 배양했다. 동역학 분석은 1:1 결합 모델을 사용하여 수행했다.

[0143] 시노물구스 원숭이 PVRIG-Fc 단백질에 대한 항체의 2가 친화도 측정: 센서를 분석 완충액에서 20분 동안 오프라인으로 평형화한 다음, 120초 동안 온라인 검출하여 기준선을 확립하고, 온전한 항체를 AHQ 센서에 로딩하여 친화도 검출을 위해 1nm의 두께에 도달하도록 했다. 항체 로딩된 센서에 10분 동안 고농도의 비관련 온전한 항체를 계속 로딩하여 AHQ 센서의 Fc 결합 부위를 포화시켰다. 포화된 센서를 100nM 표적 항원에서 정체기까지 배양한 다음, 센서를 분석 완충액으로 옮기고, 해리 속도 측정을 위해 적어도 2분 동안 배양했다. 동역학 분석은 1:1 결합 모델을 사용하여 수행했다.

[0144] 인간과 시노물구스 원숭이 TIGIT 및 PVRIG에 결합된 이중특이적 항체와 이들의 단일 말단 항체의 KD 값은 아래 표 2에 제시되어 있다.

[0145] [표 2]

항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 및 상응하는 단일-말단 항체의 KD 값

항체	인간 TIGIT-his (K_D)	시노물구스 TIGIT-his (K_D)	인간 PVRIG-his (K_D)	시노물구스 PVRIG-hFc (K_D)
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008	1.55E-09	6.23E-09	1.23E-10	2.37E-10
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009	2.08E-10	2.90E-08	1.02E-10	2.36E-10
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003	1.10E-09	W.B	7.47E-11	3.10E-10
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796	3.22E-10	3.12E-09	N.D	N.D
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812	1.90E-09	3.40E-08	N.D	N.D
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127	N.D	N.D	1.44E-10	2.67E-10

참고: "N.D": 검출되지 않음; "W.B": 약한 결합.

[0146]

[0147] 결과는, 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008 및 TP-003-009는 단일 말단 항체인 ADI-55796과 유사한 1가 친화도로 인간 TIGIT 및 시노물구스 원숭이 TIGIT 항원에 결합하고; 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003은 단일 말단 항체인 ADI-55812와 유사한 1가 친화도로 인간 TIGIT 항원에 결합하고; 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003은 단일 말단 항체인 ADI-56127과 유사한 1가 친화도로 인간 PVRIG 항원에 결합하고; 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003은 단일 말단 항체인 ADI-56127과 유사한 2가 친화도로 시노물구스 PVRIG 항원에 결합한다는 것을 보여주었다.

[0148] 실시예 3: 인간/시노물구스/마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 및 차단 활성

[0149] 3.1 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간/시노물구스/마우스 TIGIT에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 활성의 검출

[0150] 구체적으로, 인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huTIGIT 세포), 시노물구스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-cynoTIGIT 세포) 및 마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-muTIGIT 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 각각 다중 클로닝 부위(MCS)로 클로닝된 인간 TIGIT, 시노물구스 TIGIT 및 마우스 TIGIT를 인코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 후 압력 스크리닝에 의해 생성했다. 과발현 세포를 확장하고 적절한 세포 밀도로 조정된 후, 96웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 세포에 테스트될 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 적절한 농도로 상응하게 희석된 형광 2차 항체를 첨가한 다음, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래픽 분석을 위해 사용하여 EC₅₀ 값을 수득했다. 결과는 표 3, 도 2 내지 도 4에 제시되었다.

[0151] [표 3]

TIGIT/CD155 에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 및 차단 활성

항체	인간 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	마우스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	인간 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 CD155 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)	마우스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 마우스 CD155 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008	1.681	1.206	3.124	0.482	0.981
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009	3.219	3.499	8.062	0.675	3.479
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003	4.253	60.47	N.B	1.396	N.B
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55796	1.429	1.005	2.520	0.425	0.889
항-TIGIT 모노클로날 항체 ADI-55812	0.964	1.502	N.B	0.296	N.B

[0152] 참고: "N.B": 결합 없음.

[0153] 결과는, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008과 이의 TIGIT 말단 모노클로날 항체 ADI-55796은 인간/시노물구스/마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대해 유사한 결합 활성을 갖는다는 것을 보여

주었다.

- [0154] 3.2 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155 및 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합에서 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 차단 활성의 검출
- [0155] 구체적으로, CHO-huTIGIT 세포를 확장하고, 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96웰 유동 플레이트에 100 μ L/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 항체는 총 12개의 농도 구배를 위해 400nM에서 시작하여 PBS로 3배 희석했다. 희석된 샘플을 세포 운반 96-웰 유동 플레이트에 60 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 인간 CD155 단백질을 60 μ L/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μ g/mL에 도달하도록 하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC 접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μ L/웰로 PBS로 재현탁시키고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다.
- [0156] CHO-muTIGIT 세포를 확장하여 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유동 플레이트에 100 μ L/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 항체는 총 12개의 농도 구배를 위해 400nM에서 시작하여 PBS로 3배 희석했다. 희석된 샘플을 세포 운반 96-웰 유동 플레이트에 60 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 마우스 CD155 단백질을 60 μ L/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μ g/mL에 도달하도록 하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC 접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μ L/웰로 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래프 분석을 위해 사용하여 IC₅₀ 값을 측정했다.
- [0157] 결과는 표 3 및 도 5 내지 도 6에 제시되었다. 결과는, CHO 세포의 표면에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 데 및 CHO 세포의 표면에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 데 있어서 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 활성이 TIGIT 말단 모노클로날 항체인 ADI-55796과 유사했음을 보여주었다.
- [0158] **실시예 4: 인간/시노물구스/마우스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 및 차단 활성**
- [0159] 4.1 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간/시노물구스/마우스 PVRIG에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 활성의 검출
- [0160] 구체적으로, 인간 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huPVRIG 세포), 시노물구스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-cynoPVRIG 세포) 및 마우스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-muPVRIG 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 각각 다중 클로닝 부위(MCS)로 클로닝된 인간 PVRIG, 시노물구스 PVRIG 및 마우스 PVRIG를 인코딩하는 cDNA로 형질감염 후 압력 스크리닝으로 생성했다. 과발현 세포를 확장하고 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 세포에 테스트될 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고 4°C에서 30분 동안 배양했다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 적절한 농도로 상응하게 희석된 형광 2차 항체를 첨가한 다음, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래픽 분석을 위해 사용하여 EC₅₀ 값을 측정했다. 결과는 표 4, 도 7 내지 도 9에 제시되었다.

[0161] [표 4]

PVRIG/CD112 에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 결합 및 차단 활성

항체	인간 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	마우스 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	인간 CD112 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 PVRIG 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)	마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008	2.542	1.541	17.30	1.117	0.906
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009	2.028	0.758	3.631	0.9878	0.323
항-TIGIT/PVRIG 이중특이적 항체 TP-001-002-003	3.113	1.717	171.9	2.004	4.487
항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127	2.542	0.844	3.346	1.061	0.261

[0162]

[0163]

결과는, CHO 세포에서 과발현된 인간/시노물구스/마우스 PVRIG에 대한 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009의 결합 활성은 이의 PVRIG 말단 단일항체 ADI-56127과 유사하고; CHO 세포에서 과발현된 인간 PVRIG에 대한 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 결합 활성은 이의 PVRIG 말단 단일항체 ADI-56127과 유사하다는 것을 보여주었다.

[0164]

4.2 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간 CD112에 대한 인간 PVRIG의 결합에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 차단 활성의 검출

[0165]

구체적으로, 인간 CD112를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huCD112 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 다중 클로닝 부위(MCS)로 클로닝된 인간 CD112를 인코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 후 압력 스크리닝을 통해 생성했다. 정제된 항체를 PBS로 희석하고, 희석된 샘플을 96-웰 유동 플레이트에 60 μL/웰로 첨가했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 인간 PVRIG 단백질 1 μg/mL를 60 μL/웰로 첨가하여 혼합하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. CHO-huCD112 세포를 확장하여 2×10⁶ 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유동 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 원심분리 후 상청액을 폐기했다. 상기 공배양된 항체-항원 혼합물을 CHO-huCD112 세포를 함유하는 96-웰 유동 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC-접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μL/웰로 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래픽 분석을 위해 사용하여 IC₅₀ 값을 획득했다.

[0166]

결과가 표 4 및 도 10에 제시된 바와 같이, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체인 TP-007-008 및 TP-003-009는 CHO 세포에서 과발현된 인간 CD112에 대한 인간 PVRIG의 결합에 있어 이들의 PVRIG 말단 단일항체인 ADI-56127과 유사한 차단 활성을 나타낸다.

[0167]

4.3 ELISA 방법을 기반으로 마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG 단백질의 결합에서 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 차단 활성의 검출

[0168]

구체적으로, 1×ELISA 코팅 완충액으로 최종 농도 1 μg/mL로 희석된 마우스 CD112-his 단백질을 96-웰 ELISA 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 필름으로 덮고 4°C에서 밤새 코팅했다. ELISA 플레이트의 코팅 용액을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3번 세척하고, 실온에서 2시간 동안 200 μL/웰로 5% BSA/PBS로 차단했다. 차

단 기간 동안, 테스트할 정제된 항체를 1% BSA/PBS로 최종 용적 60 μ L/웰로 구배 희석했다. 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 비오틴 표지 마우스 PVRIG 단백질을 60 μ L/웰로 첨가하여 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 배양했다. ELISA 플레이트의 차단 용액을 폐기하고, 상기 항체-항원 혼합물을 100 μ L/웰로 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 배양했다. 상기 항체-항원 혼합물을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3회 세척하고, 1% BSA/PBS로 희석된 SA-HRP를 100 μ L/웰로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양했다. SA-HRP 희석액을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3회 세척하고, ELISA 크로모젠 용액을 100 μ L/웰로 첨가하고 실온에서 1-3분 동안 배양하고, ELISA 정지 용액을 50 μ L/웰로 첨가하고 450nm에서 흡광도 값을 판독했다. Graphpad 소프트웨어를 사용하여 농도-흡광도 결합 곡선과 IC₅₀ 값을 수득했다.

[0169] 결과가 표 4 및 도 11에 제시된 바와 같이, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-003-009는 마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG의 결합에서 이의 PVRIG 말단 모노클로날 항체인 ADI-56127과 유사한 차단 활성을 나타낸다.

[0170] **실시예 5: 인간 TIGIT 및 인간 PVRIG에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 공동 결합 활성**

[0171] 인간 TIGIT 및 인간 PVRIG 단백질에 대한 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 공동 결합 활성은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에 기초하여 검출되었다.

[0172] 구체적으로, 인간 PVRIG 단백질을 지침에 따라 용해시키고, 1× ELISA 코팅 용액으로 1 μ g/mL로 희석하고, 96-웰 ELISA 플레이트에서 100 μ L/웰로 코팅하고 필름으로 덮고 4°C에서 밤새 정치시켰다. 코팅 용액을 폐기하고, 1×PBST로 3회 세척하고, 5% BSA/PBS를 200 μ L/웰로 첨가하고 실온에서 2시간 동안 차단했다. 차단 용액을 폐기하고, 1% BSA/PBS로 점진적으로 희석된 테스트할 항체를 100 μ L/웰로 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양했다. 항체 희석액을 폐기하고, 1×PBST로 3회 세척하고 1% BSA/PBS로 희석된 비오틴 표지 TIGIT 단백질을 100 μ L/웰로 최종 농도 1 μ g/mL로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양했다. 항원 희석액을 폐기하고, 1×PBST로 3회 세척하고 1% BSA/PBS로 희석된 SA-HRP를 100 μ L/웰로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양했다. SA-HRP 희석액을 폐기하고 1×PBST로 3회 세척하고, ELISA 크로모젠 용액을 100 μ L/웰로 첨가하고 실온에서 1 내지 3분 동안 반응시킨 다음, ELISA 정지 용액을 50 μ L/웰로 첨가하고 450nm에서 흡광도 값을 판독했다. Graphpad 소프트웨어를 사용하여 농도-흡광도 값 결합 곡선을 플롯팅했다.

[0173] 결과는 도 12에 제시되어 있고, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체인 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003은 모두 인간 TIGIT 및 인간 PVRIG 단백질에 동시에 결합할 수 있다.

[0174] **실시예 6: 루시퍼라제 리포터 유전자 시스템에서 TIGIT/CD155 및 PVRIG/CD112 신호전달 경로에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 차단 활성**

[0175] 세포 수준에서 TIGIT/CD155 및 PVRIG/CD112 신호전달 경로에 대한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 공동 차단 활성을 추가로 검출하기 위해, 다음과 같은 루시퍼라제 리포터 시스템을 이 실시예에서 작제했다. 간단히, 인간 CD155, 인간 CD112 및 항-CD3 scFv를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1-CD155-CD112-aAPC)와 인간 TIGIT, 인간 PVRIG 및 회사 NF-AT 루시퍼라제 리포터 유전자를 과발현하는 Jurkat 세포주(Jurkat-TIGIT-PVRIG-NF-AT-luc)는 세포를 렌티바이러스로 형질감염하여 작제했다. 이어서, 이 리포터 시스템을 사용하여 관련 실험을 수행했다.

[0176] 구체적으로, CHO-K1-CD155-CD112-aAPC 기능성 세포를 분해에 의해 수득하고, 목적하는 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 백색 바닥 플레이트에 100 μ L/웰로 첨가하고, 부착을 위해 밤새 배양했다. 다음 날, Jurkat-TIGIT-PVRIG-NF-AT-luc 이펙터 세포 현탁액을 제조하고, 테스트할 샘플을 반응 배지로 점진적으로 희석했다. 백색 바닥 플레이트를 꺼내고, 배양 상청액을 피펫팅하여 폐기하고, 상기 희석된 샘플을 백색 바닥 플레이트에 40 μ L/웰로 첨가하고, Jurkat-TIGIT-PVRIG-NF-AT-luc 이펙터 세포 현탁액을 40 μ L/웰로 동시에 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 동안 배양을 수행했다. 이 기간 동안 Bio-Glo™ 시약을 실온으로 반환시켰다. 배양 후, 세포를 실온에서 5분 동안 평형화시키고, Bio-Glo™ 시약을 80 μ L/웰로 첨가하고, 다기능성 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 발광 신호 값을 판독했다.

[0177] 결과는 도 13에 제시되었다. 결과는, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체인 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003은 모두 CD155에 의해 매개된 TIGIT 억제 신호와 CD112에 의해 매개된 PVRIG 억제 신호를 방출할 수 있었고, 루시퍼라제 리포터 유전자의 발현을 향상시켰으며, TP-007-008의 차단 활성은 두 모노클

로날 항체의 조합과 유사했음을 보여주었다.

- [0178] **실시예 7: 루시퍼라제 리포터 시스템에서 항-PD-1/L1 항체를 사용한 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 시너지 차단 효과**
- [0179] 세포 수준에서 항-PD-1/L1 항체와 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 시너지 차단 활성을 검출하기 위해, 다음과 같은 루시퍼라제 리포터 유전자 시스템을 이 실시예에서 작제했다. 간단히, 실시예 6에 기초하여, 렌티바이러스를 사용하여 CHO-K1-CD155-CD112-aAPC를 감염시켜 PD-L1을 과발현시켜 CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1-aAPC 기능성 세포를 획득하고, 렌티바이러스를 사용하여 Jurkat-TIGIT-PVRIG-NF-AT-luc을 감염시켜 PD-1을 과발현시켜 Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-NF-AT-luc 이펙터 세포를 획득하고, 이 리포터 유전자 시스템을 후속 실험에 사용했다.
- [0180] 구체적으로, CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1-aAPC 기능성 세포를 분해로 획득하고, 목적하는 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 백색 바닥 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 부착을 위해 밤새 배양했다. 다음 날, Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-NF-AT-luc 이펙터 세포 현탁액을 제조하고, 테스트할 샘플을 반응 배지로 점진적으로 희석했다. 백색 바닥 플레이트를 꺼내고, 배양 상청액을 피펫팅하여 폐기하고, 상기 희석된 샘플을 백색 바닥 플레이트에 40 μL/웰로 첨가하고, Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-NF-AT-luc 이펙터 세포 현탁액을 동시에 40 μL/웰로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 동안 배양을 수행했다. 배양 후, 세포에 Bio-Glo™ 시약을 80 μL/웰로 첨가하고, 다기능성 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 발광 신호 값을 판독했다.
- [0181] 결과는 도 14a 내지 14b에 제시되었다. 결과는, 항-PD-1 항체 펨브롤리주맵(Pembro) 또는 항-D-L1 항체 아테졸리주맵(ATE)과 1:1의 물 비로 조합된 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008, TP-003-009 및 TP-001-002-003이 PVRIG/CD112, TIGIT/CD155 및 PD-1/PD-L1에 의해 매개된 다운스트림 억제 신호를 상승적으로 차단하고 루시퍼라제 신호를 더욱 향상시킬 수 있음을 보여주었다.
- [0182] **실시예 8: 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 B-NDG 마우스에서 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 생체내 약력학 연구**
- [0183] 이 실험에서는, A375 huPBMC 모델을 혼합된 A375(Addexbio에서 구입, Cat. 번호: C0020004, 악성 인간 흑색종 세포)와 인간 PBMC 세포(Milestone Biotechnologies, A10S033014/PB100C)로 접종된 B-NDG 마우스에서 확립하여 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 항종양 효과를 결정했다. 이와 관련하여, 부분적으로 재조합 인간 면역계를 가진 인간화 종양 마우스 모델은 면역결핍 마우스에 인간 면역 세포(PBMC)를 접종하여 생성했다.
- [0184] 구체적으로, A375 세포를 먼저 인간 PBMC와 1:1로 혼합하여 0.1mL 세포 현탁액을 형성하고, A375 huPBMC 모델을 피하 주사에 의해 마우스의 오른쪽 사타구니에 확립했다. 평균 종양 용적이 약 75mm³에 도달하면, 마우스를 그룹으로 나누고, PBS 또는 항체 치료제를 용량은 상이하지만 동일한 투여 용적으로 복강내 주사했다. 각 그룹은 6마리의 마우스로 구성되었다. 각 그룹의 마우스의 종양 용적 및 체중 변화를 2 내지 3주 동안 2 내지 3일 마다의 모니터링 빈도로 모니터링했다. 투여 량 및 투여 방법은 표 5에 제시되어 있다.

[0185] [표 5]

A375 huPBMC 모델에서 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 투여 섭생

그룹	투여 용량	투여 빈도
PBS	N/A	Q2-3d×8
TP-001-002-003	20 mg/kg	Q2-3d×8
TP-003-009	13.33 mg/kg	Q2-3d×8
TP-007-008	13.33 mg/kg	Q2-3d×8
ADI-55796+ADI-56127	10 mg/kg+10 mg/kg	Q2-3d×8

참고: TP-001-002-003, TP-003-009, TP-007-008, ADI-55796 및 ADI-56127의 분자량은 각각 약 150 KD, 200 KD, 200 KD, 150 KD, 및 150 KD 이고, 각 그룹의 투여된 용량은 등물 용량이었다.

[0186]

결과를 도 15에 제시되어 있다. 결과는, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008 및 TP-003-009는 유의한 항종양 효과를 나타냈으며, 종양 억제 효과는 두 개의 단일 말단 항체의 조합과 유사했음을 보여주었다.

[0187]

[0188]

실시예 9: 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 B-NDG 마우스에서 항-PD-1 모노클로날 항체와 조합된 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 생체내 약력학 연구

[0189]

이 실험에서는, A375 huPBMC 마우스 모델을 피하 혼합 접종(모델링 절차는 실시예 8과 동일함)에 의해 확립했다. 평균 종양 용적이 약 200mm³에 도달하면, 마우스를 그룹으로 나누고, 용량은 상이하지만 동일한 투여 용적으로 PBS 또는 항체 치료제를 복강내 주사했다. 각 그룹은 6마리의 마우스로 구성되었다. 각 그룹의 마우스의 종양 용적과 체중 변화를 2 내지 3주 동안 2 내지 3일 마다의 모니터링 빈도로 모니터링했다. 투여량과 투여 방법은 표 6에 제시되어 있다.

[0190] [표 6]

항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 종양 억제 활성화에 대한 실험 프로토콜

그룹	투여 용량	투여 빈도
PBS	N/A	Q2-3d×5
항-PD-1	5 mg/kg	Q2-3d×5
TP-003-009	13.33 mg/kg	Q2-3d×5
TP-007-008	13.33 mg/kg	Q2-3d×5
ADI-55796+ADI-56127	10 mg/kg+10 mg/kg	Q2-3d×5
항-PD-1+ADI-55796	5 mg/kg+10 mg/kg	Q2-3d×5
항-PD-1+ADI-56127	5 mg/kg+10 mg/kg	Q2-3d×5
항-PD-1+ADI-55796+ADI-56127	5 mg/kg+10 mg/kg+10 mg/kg	Q2-3d×5
항-PD-1+TP-003-009	5 mg/kg+13.33 mg/kg	Q2-3d×5
항-PD-1+TP-007-008	5 mg/kg+13.33 mg/kg	Q2-3d×5

[0191]

[0192] 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008과 항-PD-1 모노클로날 항체의 조합의 용량 의존적 효능을 추가로 조사하기 위해, 다음과 같은 실험 프로토콜을 설계했다: A375 huPBMC 모델을 피하 혼합 접종으로 확립하고 (모델링 절차는 실시예 8과 동일함), 평균 종양 용적이 약 300mm³에 도달하면 마우스를 그룹으로 나누었다. 고정 용량의 항-PD-1 항체와 조합된 TP-007-008의 상이한 용량을 각 그룹의 6마리의 마우스에게 복강내 주사로 투여했다. 각 그룹의 마우스의 종양 용적과 체중 변화를 2 내지 3주 동안 2 내지 3일 마다의 모니터링 빈도로 모니터링했다. 투여량과 투여 방법은 표 7에 제시되어 있다.

[0193] [표 7]

항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 종양 억제 활성화에 대한 실험 프로토콜

그룹	투여 용량	투여 빈도
PBS	N/A	Q2-3d×4
항-PD-1+TP-007-008	3 mg/kg + 3 mg/kg	Q2-3d×4
항-PD-1+TP-007-008	3 mg/kg + 12 mg/kg	Q2-3d×4
항-PD-1+TP-007-008	3 mg/kg + 48 mg/kg	Q2-3d×4

[0194]

[0195] 도 16a에 도시된 바와 같이, 초기 투여된 종양 용적이 200mm³ 이상에 도달한 경우, 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008, 항-PD-1 모노클로날 항체, 및 항-TIGIT와 항-PVRIG 모노클로날 항체의 조합의 그룹에서는 유의한 종양 억제 효능이 관찰되지 않은 반면, TP-007-008과 항-PD-1 모노클로날 항체의 조합

은 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있고, 항-PD-1, 항-TIGIT 및 항-PVRIG 모노클로날 항체의 조합과 유사한 효능을 나타냈다. 도 16b에 도시된 바와 같이, 고정 용량의 PD-1 모노클로날 항체(3mg/kg)와 조합된 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008은 용량 의존적이었고 유의한 종양 억제 활성을 나타냈다.

[0196] 이 실시예에서 사용된 항-PD-1 모노클로날 항체의 서열은 아래에 제시된다:

[0197] 항 PD-1 항체의 VH의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGGT
NFNEKFKPRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTVRDFRFDKGFKYWGQGLV
TVSS (서열번호 34)

[0198]

[0199] 항-PD-1 항체의 VL의 아미노산 서열

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGLNYPHWYQRKPGQAPRLLIYLGSYLDS
GVPARFSGSGGTDFLTITISSLEPEDFAVYYCQQSWELPLTFGGGTKVEIK (서열번호 35)

[0200]

[0201] 상기 항-PD-1 항체에 대한 CDR은 아래에 나열된다:

HCDR1: YTFTEYYIY (서열번호 36)

HCDR2: GINPSNGGTNFNEKFKP (서열번호 37)

HCDR3: TVRDFRFDKGFKY (서열번호 38)

LCDR1: RASKSVSTSGLNYPVH (서열번호 39)

LCDR2: LGSYLDS (서열번호 40)

LCDR3: QQSWELPLI (서열번호 41)

[0202]

[0203] 이 실시예에서 사용된 항-PD-1 모노클로날 항체의 중쇄 불변 영역은 L234A, L235A에 의해 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역이었다:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSK
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호 42)

[0204]

[0205] 이 실시예에서 사용된 항 PD-1 모노클로날 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 카파 경쇄 불변 영역이었다:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열번호 43)

[0206]

[0207] 실시예 10: 마우스에서 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체의 생체내 반감기 연구

[0208] 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 생체내 반감기는 꼬리 정맥 단일 주사법에 의해 마우스에서 검출되었다.

[0209] 구체적으로, 받은 수컷이고 받은 암컷인 Balb/c 마우스를 이 실험에 사용하였고, 24°C ± 2°C의 온도와 40%-70%의 습도에서 12/12시간 명/암 조절 환경에서 물과 먹이에 자유롭게 접근할 수 있도록 사육했다. 실험 당일, Balb/c 마우스는 10mg/kg 용량으로 항체의 단일 꼬리 정맥 주사를 받았다. 채혈 시점: 혈액을 투여 후 5분, 0.5시간, 2시간, 6시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간, 336시간 및 504시간에 마우스의 안와에서 채취했다.

전체 혈액 샘플을 2°C 내지 8°C에서 30분 동안 위치시키고, 12,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 혈청을 수집했다. 수집된 혈청을 2°C 내지 8°C, 12,000rpm에서 5분 동안 원심분리하고, -80°C에서 저장했다. 혈청 내 이종특이적 항체 분자의 양은 ELISA로 검출했다(ELISA 검정은 실시예 5와 동일함).

[0210] 결과는 도 17에 제시되어 있다. 결과는, 마우스에 단일 주사 후 본 발명의 항-TIGIT-항-PVRIG 이중특이적 항체 TP-007-008의 생체내 반감기가 103시간이었음을 보여주었다.

[0211] **제조 실시예 1: 항-TIGIT 모노클로날 항체의 제조**

[0212] 항-TIGIT 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산(아미노산 서열은 서열번호 1-2에 제시됨)을 각각 L234A, L235A로 변형된 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역과 야생형 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역에 작제했다. 또한, 경쇄의 가변 영역을 인코딩하는 핵산(아미노산 서열은 서열번호 3-4에 제시됨)을 인간 면역글로불린 카파 경쇄 불변 영역에 작제했다. 항-TIGIT 모노클로날 항체는 각각 55796-G1, 55796-G1LALA, 55812-G1 및 55812-G1LALA로 지정되었으며, HEK293 발현 시스템을 사용하여 일시적으로 발현시키고 정제했다. 구체적인 절차는 다음과 같았다: 항체의 중쇄와 경쇄를 함유하는 pcDNA3.1 벡터를 화학적 형질감염 방법에 의해 HEK293 세포로 옮기고, 37°C, 8% CO₂에서 7일 동안 배양했다. 세포액을 수집하고, 13,000rpm에서 20분 동안 원심분리했다. 상청액을 수집하고 단백질을 A로 정제하고, 항체 순도를 SEC로 검출하는 동시에 내독소 함량을 제어했다. 마지막으로, 항-TIGIT 모노클로날 항체 55796-G1, 55796-G1LALA, 55812-G1 및 55812-G1LALA를 수득했다.

[0213] **시험예 1: 항-TIGIT 모노클로날 항체의 친화도 검출**

[0214] 바이오필름 층 광학 간섭 기술(ForteBio)을 사용하여 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 TIGIT에 대한 실시예 1에서 수득된 항-TIGIT 모노클로날 항체의 결합 및 해리 속도 상수(K_D) 값을 결정했다. ForteBio 친화도 측정법은 기존 방법(Este, P et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs*, 2013.5(2): p270-8)에 따라 수행했다. 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 TIGIT의 세포외 영역의 아미노산 서열은 상기 표 1에 제시되어 있다.

[0215] 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 TIGIT-his 단백질에 대한 온전한 항체(아디파에 의해 수득된 전장 IgG)의 1가 친화도의 측정: 센서를 분석 완충액에서 20분 동안 오프라인으로 평형화한 다음, 120초 동안 온라인 검출하여 기준선을 확립하고, 온전한 TIGIT 항체를 AHQ 센서에 로딩하여 친화도 검출을 위해 1nm의 두께에 도달하도록 했다. 항체 로딩 센서를 100nM TIGIT 항원에서 정제기까지 배양한 다음, 센서를 분석 완충액으로 옮기고 해리 속도 측정을 위해 적어도 2분 동안 배양했다. 동역학 분석은 1:1 결합 모델을 사용하여 수행했다.

[0216] 상기 결정 방법에서, 항체의 K_D 값은 표 8에 제시되어 있다:

[0217] [표 8]

항-TIGIT 모노클로날 항체의 K_D 값

항체	인간 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도	시노물구스 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도	마우스 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도
55796-G1	1.99E-10	4.72E-09	9.60E-08
55796-G1LALA	2.10E-10	4.90E-09	6.10E-08
55812-G1	3.50E-09	2.41E-08	N.B.
55812-G1LALA	3.40E-09	2.21E-08	N.B.
티라골루맵	8.70E-10	3.50E-09	NA

참고: "N.B.": 결합 없음; "NA": 이용 가능하지 않음.

[0218] 표 8의 결과로부터 다음을 알 수 있다: (1) 인간 TIGIT-his의 단백질에 대한 항-TIGIT 모노클로날 항체의 1가 친화도는 대조군 분자 티라골루맵의 친화도보다 더 높았고; (2) 시노물구스 원숭이 TIGIT-his 단백질에 대한 항

-TIGIT 모노클로날 항체의 1가 친화도는 대조군 분자 티라골루맵과 유사했으며; (3) 항-TIGIT 모노클로날 항체 55796-G1 및 55796-G1LALA는 마우스 TIGIT와 교차 결합 활성을 나타냈다.

[0220] **시험예 2: 인간/시노물구스/마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 및 차단 활성**

[0221] 2.1 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간/시노물구스/마우스 TIGIT에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 활성의 검출.

[0222] 구체적으로, 인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huTIGIT 세포), 시노물구스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-cynoTIGIT 세포) 및 마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포(CHO-muTIGIT 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 각각 다중 클로닝 부위(MCS)로 클로닝된 인간 TIGIT, 시노물구스 TIGIT 및 마우스 TIGIT를 인코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 후 압력 스크리닝에 의해 생성했다. 과발현 세포를 확장하고 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 세포에 테스트할 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고 4°C에서 30분 동안 배양했다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 적절한 농도로 상응하게 희석된 형광 2차 항체를 첨가한 다음, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래픽 분석을 위해 사용하여 EC₅₀ 값을 수득했다. 결과는 표 9, 도 18 내지 도 20에 제시되어 있다.

[0223] 2.2 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합 및 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합에서 항-TIGIT 항체의 차단 활성의 검출

[0224] 구체적으로, CHO-huTIGIT 세포를 확장하여 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유동 플레이트에 100 μ L/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 모노클로날 항체는 총 12개의 농도 구배를 위해 400nM에서 시작하여 PBS로 3배 희석했다. 희석된 샘플을 세포 운반 96-웰 유동 플레이트에 60 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 인간 CD155 단백질을 60 μ L/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μ g/mL에 도달하도록 하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC 접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μ L/웰로 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다.

[0225] CHO-muTIGIT 세포를 확장하여 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유동 플레이트에 100 μ L/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 항체는 총 12개의 농도 구배를 위해 400nM에서 시작하여 PBS로 3배 희석했다. 희석된 샘플을 세포 운반 96-웰 유동 플레이트에 60 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 마우스 CD155 단백질을 60 μ L/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μ g/mL에 도달하도록 하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC 접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μ L/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μ L/웰로 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래프 분석을 위해 사용하여 IC₅₀ 값을 수득했다. 결과는 표 9 및 도 21 내지 도 22에 제시되어 있다.

[0226] [표 9]

과발현 세포에 대한 항-TIGIT 항체의 결합 활성 및 차단 활성의 요약 표

항체	인간 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	마우스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC ₅₀ (nM)	인간 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 CD155 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)	마우스 TIGIT 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 마우스 CD155 의 결합을 차단하는 IC ₅₀ (nM)
55796-G1	0.96	1.32	2.96	0.24	1.50
55796-G1LALA	0.84	1.34	3.36	0.37	1.56
55812-G1	0.66	1.13	N.B.	0.36	NA
55812-G1LALA	0.70	1.28	N.B.	0.32	NA
티라글루맷	1.35	4.18	N.B.	0.63	NA

[0227] 참고: "N.B.": 결합 없음; and "NA": 이용 가능하지 않음.

[0228] 표 9, 도 18 내지 도 20의 결과로부터 다음을 알 수 있다: (1) CHO 세포의 표면에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 활성은 대조군 분자 티라글루맷의 결합 활성보다 더 우수했고; (2) CHO 세포의 표면에서 과발현된 시노물구스 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 활성은 대조군 분자 티라글루맷보다 더 우수하였으며; (3) 본 발명의 항-TIGIT 항체 55796-G1 및 55796-G1LALA는 CHO 세포의 표면에서 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 대한 유의한 결합을 나타냈다.

[0229] 표 9, 도 21 내지 도 22의 결과로부터 다음을 알 수 있다: (1) CHO 세포의 표면에서 과발현된 인간 TIGIT 단백질에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 데 있어 본 발명의 항-TIGIT 항체의 활성은 대조군 분자 티라글루맷의 활성보다 더 우수했고; (2) CHO 세포의 표면에서 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 대한 결합을 나타낸 항-TIGIT 항체 55796-G1 및 55796-G1LALA는 또한 CHO 세포의 표면에서 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 대한 마우스 CD155의 결합을 유의하게 차단할 수 있었다.

[0230] **시험예 3: 1차 T 세포의 표면에서 TIGIT에 대한 항-TIGIT 항체의 결합**

[0231] 활성화된 T 세포의 표면에서 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 활성을 유세포 분석 검출 방법에 기초하여 검출하였다.

[0232] 구체적으로, 인간 PBMC는 인간 총 T 세포를 획득하기 위해, STEMCELL Company(stemcell, Cat. No.: #17951C)에서 제공한 실험 프로토콜에 따라 분류했다. T 세포는 1µL의 IL-2 스톡 용액(1,000,000 IU)이 보충된 X-VIVO15 배지(lonza에서 구입, Cat. No.: 04-418Q)를 사용하여 1.0×10⁶ 세포/mL의 농도로 조정하고, 동시에 CD3/CD28 Dynabeads(gibco에서 구입, Cat. No.: 11132D)를 1:1 비율(비드 대 세포)로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양했다. 활성화된 T 세포를 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 테스트할 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. PBS로 두 번 세척하고, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고 4°C에서 30분 동안 배양하고, PBS로 두 번 세척했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다.

[0233] 결과는 도 23에 제시되어 있다. 결과는, 본 발명의 항-TIGIT 항체 55796-G1, 55796-G1LALA, 55812-G1 및 55812-G1LALA는 활성화된 T 세포의 표면에서 TIGIT 분자에 결합할 수 있으며, 결합 활성은 대조군 분자 티라글루맷의 활성보다 더 우수했음을 보여주었다.

[0234] **제조예 2: 항-PVRIG 모노클로날 항체의 제조**

[0235] 항-PVRIG 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산(아미노산 서열은 서열번호 5에 제시됨)을 각각

L234A, L235A로 변형된 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역과 야생형 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역으로 작제했다. 또한, 경쇄의 가변 영역을 인코딩하는 핵산(아미노산 서열은 서열번호 4에 제시됨)을 인간 면역글로불린 카과 경쇄 불변 영역에 작제했다. 항-PVRIG 모노클로날 항체는 각각 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA로 지정되었으며, HEK293 발현 시스템을 사용하여 일시적으로 발현시키고 정제했다. 구체적인 절차는 다음과 같았다: 항체의 중쇄와 경쇄를 함유하는 pcDNA3.1 벡터를 화학적 형질감염 방법에 의해 HEK293 세포로 옮기고, 37°C, 8% CO₂ 에서 7일 동안 배양했다. 세포액을 수집하고, 13,000rpm에서 20분 동안 원심분리했다. 상청액을 수집하고 단백질 A로 정제하고 항체 순도를 SEC로 검출하는 동시에, 내독소 함량을 제어했다.

[0236] 마지막으로, 항-PVRIG 모노클로날 항체 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA를 수득했다.

[0237] **시험예 4: 인간/시노물구스/마우스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-PVRIG 항체의 결합 활성 및 차단 활성**

[0238] 4.1 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간/시노물구스/마우스 PVRIG에 대한 항-PVRIG 항체의 결합 활성의 검출

[0239] 구체적으로, 인간 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huPVRIG 세포), 시노물구스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-cynoPVRIG 세포) 및 마우스 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포(CHO-muPVRIG 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 각각 다중 클로닝 부위(MCS)에 클로닝된 인간 PVRIG, 시노물구스 PVRIG 및 마우스 PVRIG를 인코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 후 압력 스크리닝에 의해 생성했다. 과발현 세포를 확장하고 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 세포에 테스트할 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양했다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고 적절한 농도로 상응하게 희석된 형광 2차 항체를 첨가한 다음, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. Graphpad 소프트웨어를 그래픽 분석을 위해 사용하여 EC₅₀ 값을 수득했다. 결과는 표 10, 도 24 내지 도 26에 제시되어 있다.

[0240] 4.2 유세포 분석법을 기반으로 CHO 세포에서 과발현된 인간 CD112에 대한 인간 PVRIG의 결합에서 항-PVRIG 항체의 차단 활성의 검출

[0241] 구체적으로, 인간 CD112를 과발현하는 CHO 세포(CHO-huCD112 세포)는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 각각 다중 클로닝 부위(MCS)에 클로닝된 인간 CD112를 인코딩하는 cDNA로 형질감염한 후, 압력 스크리닝에 의해 생성했다. CHO-huCD112 세포를 확장하여 2×10⁶ 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유동 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 모노클로날 항체를 PBS로 구배 희석하고, 희석된 샘플을 블랭크 96-웰 유동 플레이트에 60 μL/웰로 첨가했다. 그런 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그가 있는 인간 PVRIG 단백질 1 μg/mL를 60 μL/웰로 첨가하고, 혼합물을 혼합하고 4°C에서 30분 동안 배양했다. 상기 배양된 샘플을 CHO-huCD112 세포를 함유하는 96-웰 유동 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 APC-접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. 세포를 100 μL/웰로 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다. 결과는 표 10 및 도 27에 제시되어 있다.

[0242] 4.3 ELISA 방법을 기반으로 마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG 단백질의 결합에서 항-PVRIG 항체의 차단 활성의 검출

[0243] 구체적으로, 1배 코팅 완충액으로 최종 농도 1 μg/mL로 희석된 마우스 CD112-his 단백질을 100 μL/웰로 ELISA 플레이트에 첨가하고, 필름으로 덮고 4°C에서 밤새 코팅했다. ELISA 플레이트의 코팅 용액을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3번 세척하고, 실온에서 2시간 동안 200 μL/웰로 5% BSA/PBS로 차단했다. 차단 기간 동안, 테스트할 샘플을 1% BSA/PBS로 60 μL/웰의 최종 용적까지 구배 희석했다. 1% BSA/PBS로 2 μg/mL로 희석된 비오틴 표지 마우스 PVRIG huFc 단백질을 상기 샘플 웰에 60 μL/웰로 첨가하고, 혼합하고 실온에서 1시간 동안 배양했다. ELISA 플레이트의 차단 용액을 폐기하고, 상기 샘플 혼합물을 100 μL/웰로 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양했다. 상기 공동 배양된 샘플을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3회 세척하고, 1% BSA/PBS로 희석된 SA-HRP를 100 μL/웰로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양했다. SA-HRP 희석액을 폐기하고, ELISA 플레이트를 1×PBST로 3회 세척하고, ELISA 크로모젠 용액을 100 μL/웰로 첨가하고 실온에서 1 내지 3분 동안 배양하고, ELISA 정지 용액을 50 μL/웰로 첨가하고, 450nm에서 흡광도 값을 판독했다. Graphpad 소프트웨어를 사용하여 농도-흡광도 결합 곡선을 수득했으며, 결과는 표 10 및 도 28에 제시되어 있다.

[0244] [표 10]

과발현 세포에 대한 항-PVRIG 항체의 결합 활성 및 차단 활성의 요약 표

항체	인간 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC50 (nM)	시노물구스 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC50 (nM)	마우스 PVRIG 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 EC50 (nM)	인간 CD112 를 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 PVRIG 의 결합을 차단하는 IC50 (nM)	마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG 의 결합을 차단하는 IC50 (nM)
ADI-56127-G1	2.514	1.955	6.469	1.229	1.568
ADI-56127-G1LALA	2.443	1.978	5.375	1.359	1.776
Mab46-G1	2.999	8.18	3.877	1.153	2.834
Mab46-G1LALA	3.804	22.04	6.266	1.032	2.863
COM701-G4	6.417	3.582	N.B.	1.097	NA

참고: "N.B.": 결합 없음; "NA": 이용 가능하지 않음.

[0245]

표 10, 도 24 내지 도 26에서 다음과 같은 결론이 도출될 수 있었다:

[0246]

(1) CHO 세포의 표면에서 과발현된 인간 PVRIG 단백질에 대한 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA의 결합 활성은 대조군 분자인 Mab46-G1, Mab46-G1LALA 및 COM701-G4의 활성보다 더 우수했고;

[0247]

[0248]

(2) CHO 세포의 표면에서 과발현된 시노물구스 PVRIG 단백질에 대한 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA의 결합 활성은 대조군 분자인 Mab46-G1, Mab46-G1LALA 및 COM701-G4의 활성보다 더 우수했으며;

[0249]

(3) ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA는 CHO 세포의 표면에서 과발현된 마우스 PVRIG 단백질에 대한 유의미한 결합을 보였으며, 결합 활성은 대조군 분자 Mab46-G1 및 Mab46-G1LALA의 활성과 유사하다.

[0250]

표 10, 도 27 내지 도 28에서 다음과 같은 결론이 도출될 수 있었다:

[0251]

(1) CHO 세포의 표면에서 과발현된 인간 CD112 단백질에 대한 인간 PVRIG의 결합을 차단하는 데 있어서 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA의 활성은 대조군 분자인 Mab46-G1, Mab46-G1LALA 및 COM701-G4의 활성과 유사했고;

[0252]

(2) ADI-56127-G1과 ADI-56127-G1LALA는 마우스 CD112 단백질에 대한 마우스 PVRIG의 결합을 유의미하게 차단할 수 있었고, 차단 활성은 대조군 분자인 Mab46-G1 및 Mab46-G1LALA의 활성보다 더 우수했다.

[0253]

시험예 5: 1차 T 세포의 표면에서 PVRIG에 대한 항-PVRIG 항체의 결합

[0254]

활성화된 T 세포의 표면에서 PVRIG에 대한 본 발명의 항-PVRIG 항체의 결합 활성은 유세포 분석 검출 방법에 기초하여 검출했다.

[0255]

구체적으로, 인간 PBMC는 인간 총 T 세포를 획득하기 위해, STEMCELL Company(stemcell, Cat. No.: #17951C)에서 제공한 실험 프로토콜에 따라 분류했다. T 세포는 1 μ L의 IL-2 스톱 용액(1,000,000 IU)이 보충된 X-VIVO15 배지(lonza에서 구입, Cat. No.: 04-418Q)를 사용하여 1.0 \times 10⁶ 세포/mL의 농도로 조정하고, 동시에 CD3/CD28 Dynabeads(gibco에서 구입, Cat. No.: 11132D)를 1:1 비율(비드 대 세포)로 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양했다. 활성화된 T 세포를 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가했다. 원심분리 후, 테스트할 점진적으로 희석된 샘플을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양했다. PBS로 두 번 세척하고, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하고, PBS로 두 번 세척

했다. 세포를 PBS로 재현탁시키고 CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고, 상응하는 MFI를 계산했다.

[0256] 결과는 도 29에 제시되어 있다. 결과는, 본 발명의 항-PVRIG 항체 ADI-56127-G1 및 ADI-56127-G1LALA가 활성화된 T 세포의 표면에서 PVRIG 분자에 결합할 수 있으며, 결합 활성은 대조군 분자 Mab46-G1, Mab46-G1LALA 및 COM701-G4의 활성보다 더 우수했음을 보여주었다.

[0257] **시험예 6: 혼합된 A375와 인간 PBMC로 접종된 NDG 마우스에서 항-PVRIG 항체의 생체내 약력학 연구**

[0258] 이 실험에서는, A375 huPBMC 모델을 혼합된 A375(Addexbio에서 구입, Cat. No.: C0020004, 악성 인간 흑색종 세포)와 인간 PBMC 세포(Milestone Biotechnologies, A10S033014/PB100C)로 접종된 B-NDG 마우스에서 확립하여 본 발명의 항-PVRIG 항체의 항종양 효과를 결정했다. 이와 관련하여, 부분적으로 재조합 인간 면역계를 가진 인간화 종양 마우스 모델은 면역결핍 마우스에 인간 면역 세포(PBMC)를 접종하여 생성했다.

[0259] 구체적으로, A375 세포를 먼저 인간 PBMC와 1:1로 혼합하여 0.1mL 세포 현탁액을 형성하고, A375 huPBMC 모델을 피하 주사에 의해 마우스의 오른쪽 사타구니에 확립했다. 평균 종양 용적이 약 30 내지 50mm³에 도달하면, 마우스를 그룹으로 나누고, 용량은 상이하지만 동일한 투여 용적으로 PBS 또는 항체 치료제를 복강내 주사했다. 각 그룹은 6마리의 마우스로 구성되었다. 각 그룹의 마우스의 종양 용적과 체중 변화를 2 내지 3주 동안 2 내지 3일 마다의 모니터링 빈도로 모니터링했다. 투여량과 투여 방법은 표 11에 제시되어 있다.

[0260] [표 11]

A375 종양-PBMC 모델에서 항-PVRIG 항체의 투여 섭생

그룹	투여 용량	투여 빈도
PBS	N/A	Q2-3d×8
ADI-56127-G1	10 mg/kg	Q2-3d×8
Mab46-G1	10 mg/kg	Q2-3d×8
COM701-G4	10 mg/kg	Q2-3d×8

[0261]

[0262] 결과는 도 30에 제시되어 있다. 결과는, 본 발명의 항-PVRIG 항체 ADI-56127-G1은 마우스에서 A375 종양의 성장을 유의하게 억제할 수 있으며, 항종양 활성은 대조군 분자 Mab46-G1 및 COM701-G4의 활성보다 더 우수하다는 것을 보여주었다.

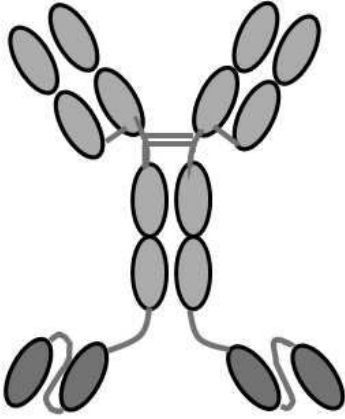
[0263] 본 발명의 특정 구현예가 상세히 기재되었지만, 당업자는 공개된 모든 교시에 기초하여 세부 사항에 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있으며, 이러한 변화가 본 발명의 보호 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 첨부된 청구범위 및 이의 임의의 등가물에 의해 제공된다.

도면

도면1a

TP-007-008

ADI-55796

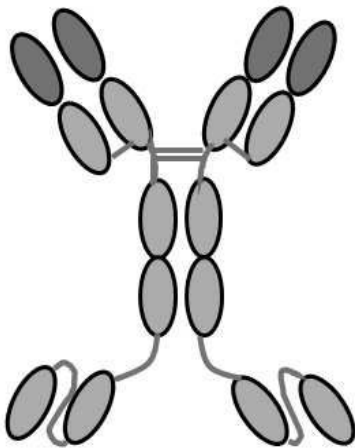


ADI-56127

도면1b

TP-003-009

ADI-56127

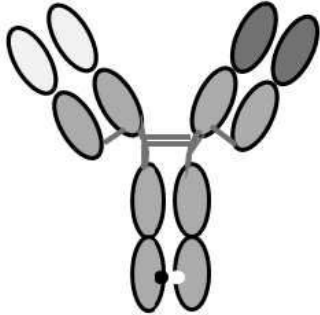


ADI-55796

도면1c

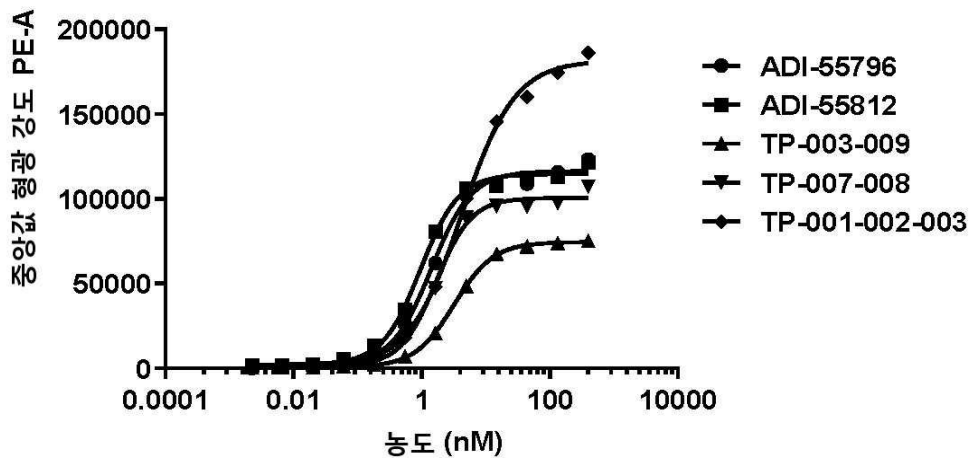
TP-001-002-003

ADI-55812 ADI-56127



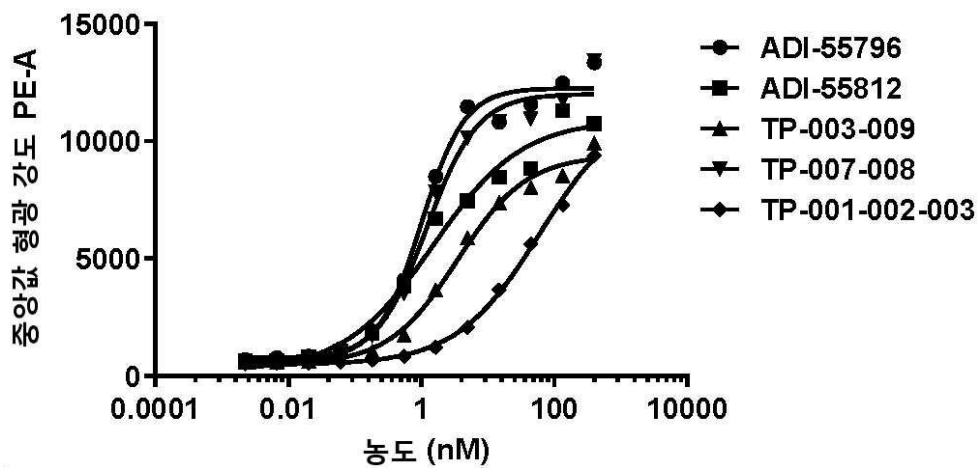
도면2

인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합

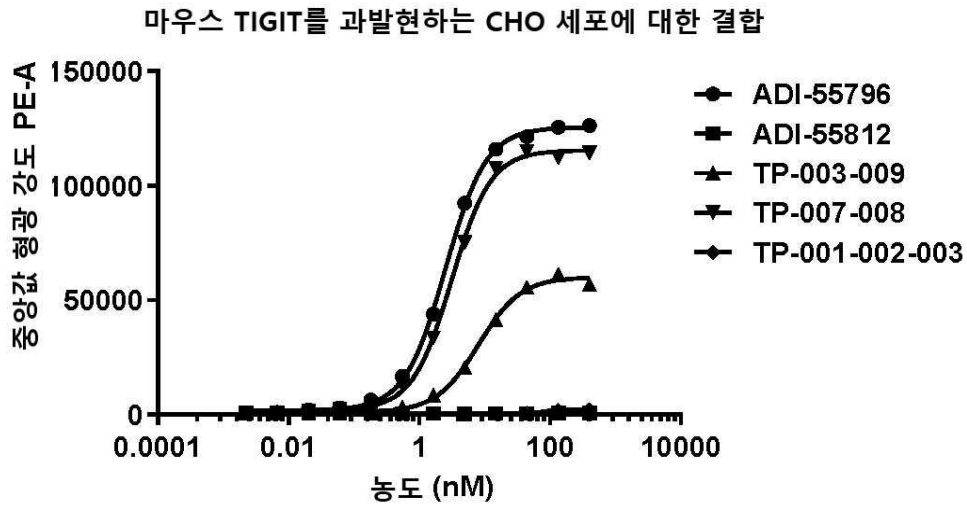


도면3

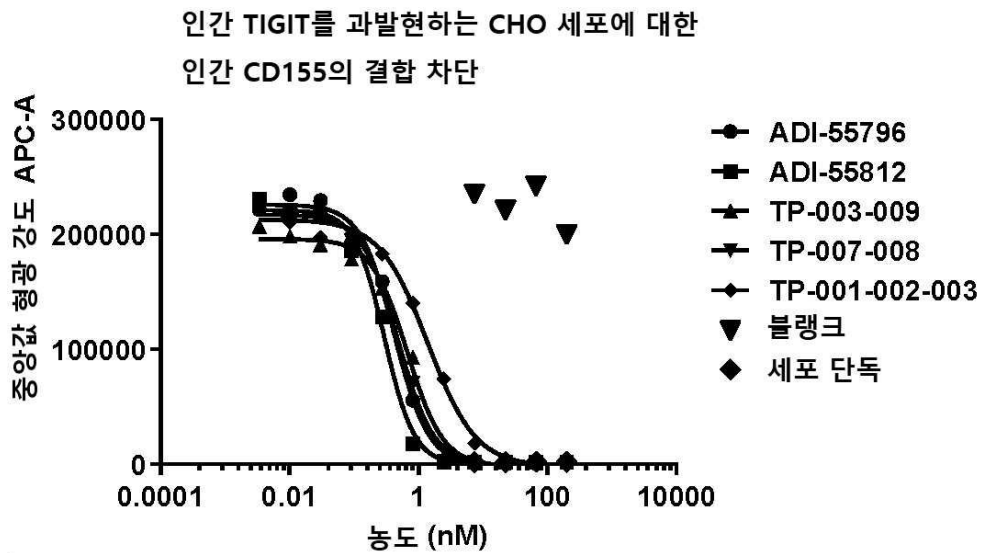
시노물구스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



도면4

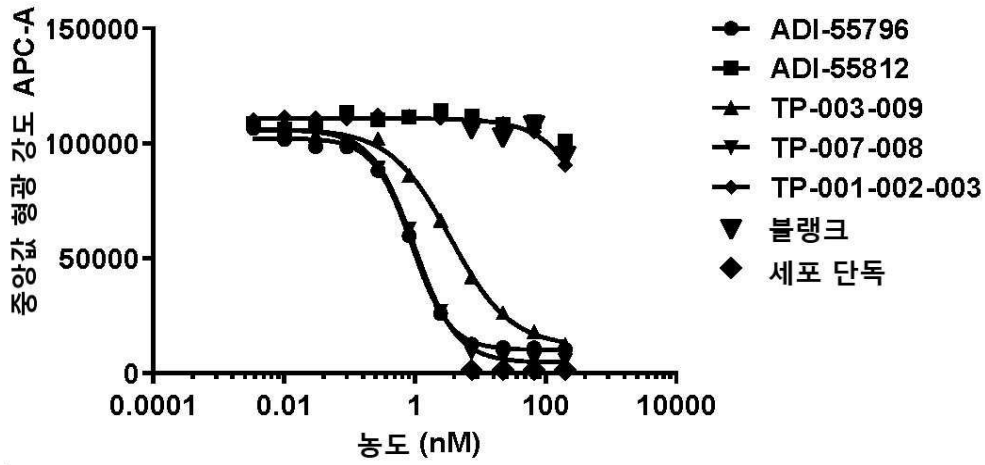


도면5



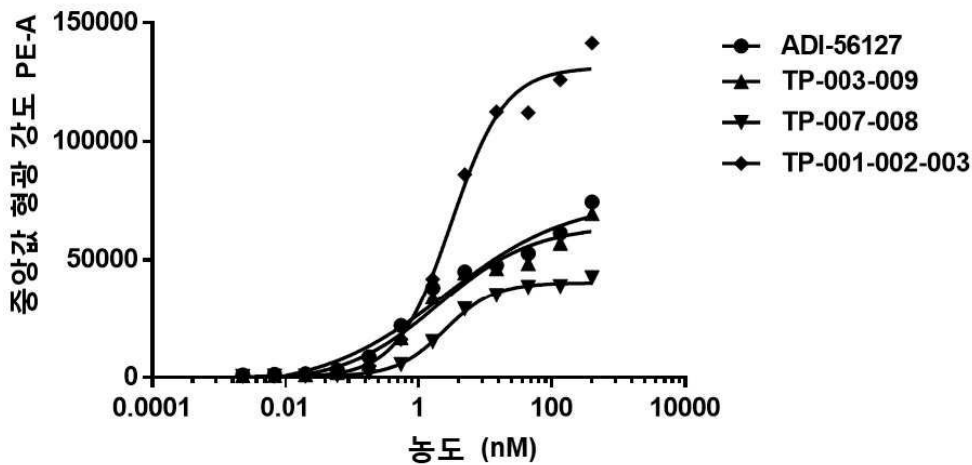
도면6

마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한
마우스 CD155의 결합 차단

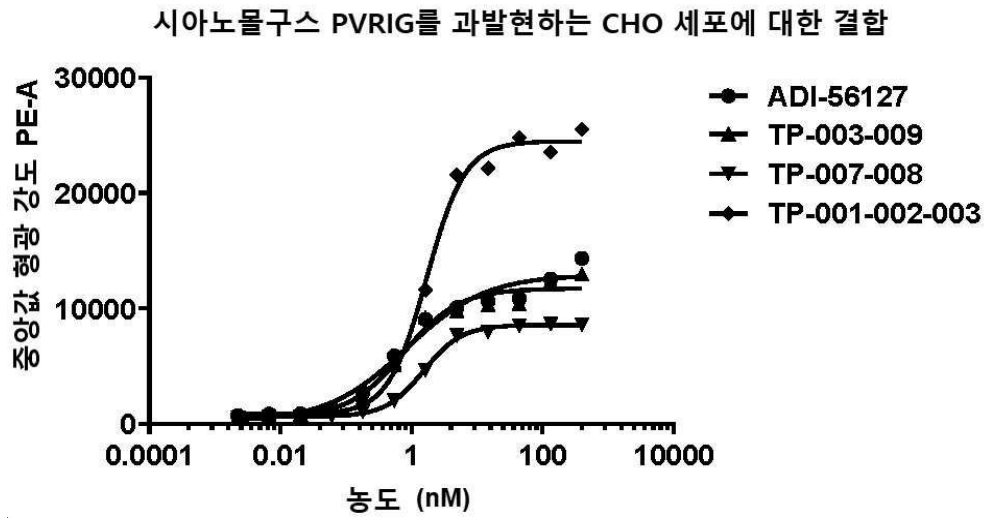


도면7

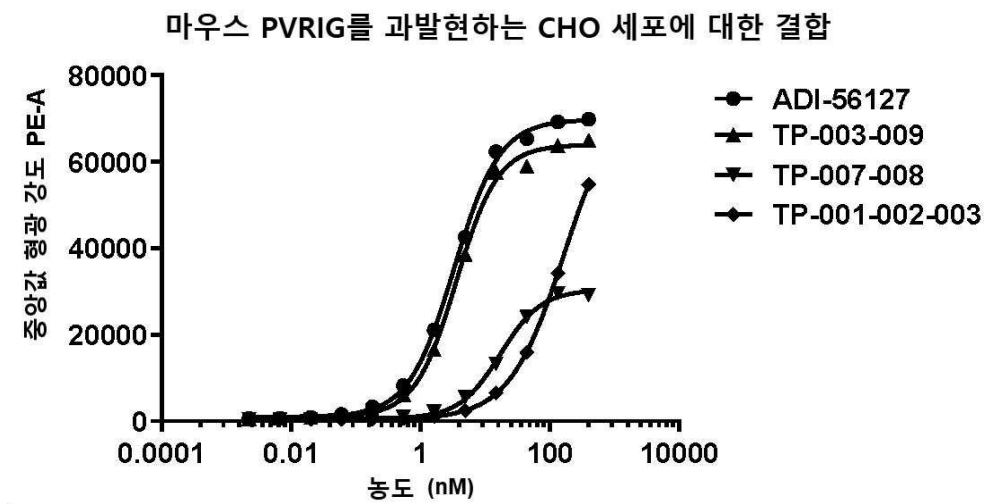
인간 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



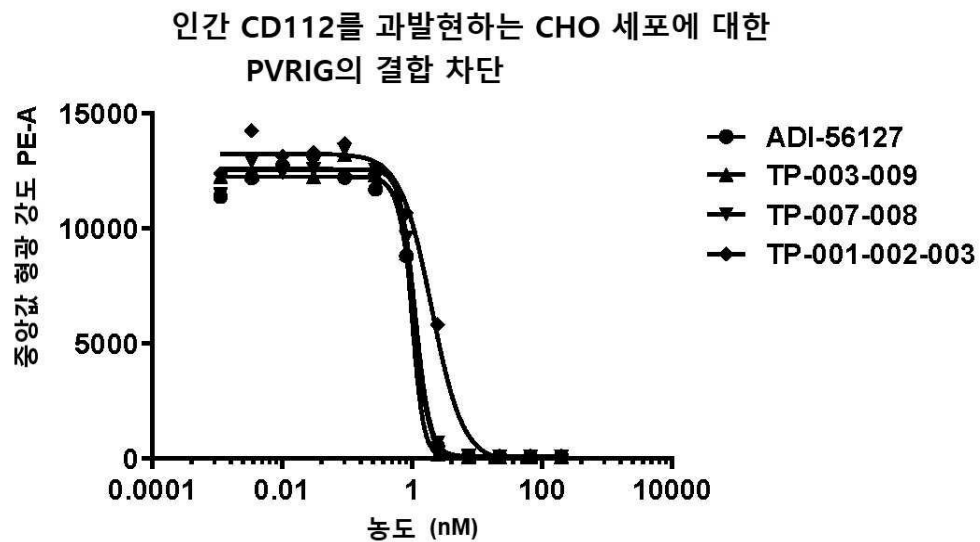
도면8



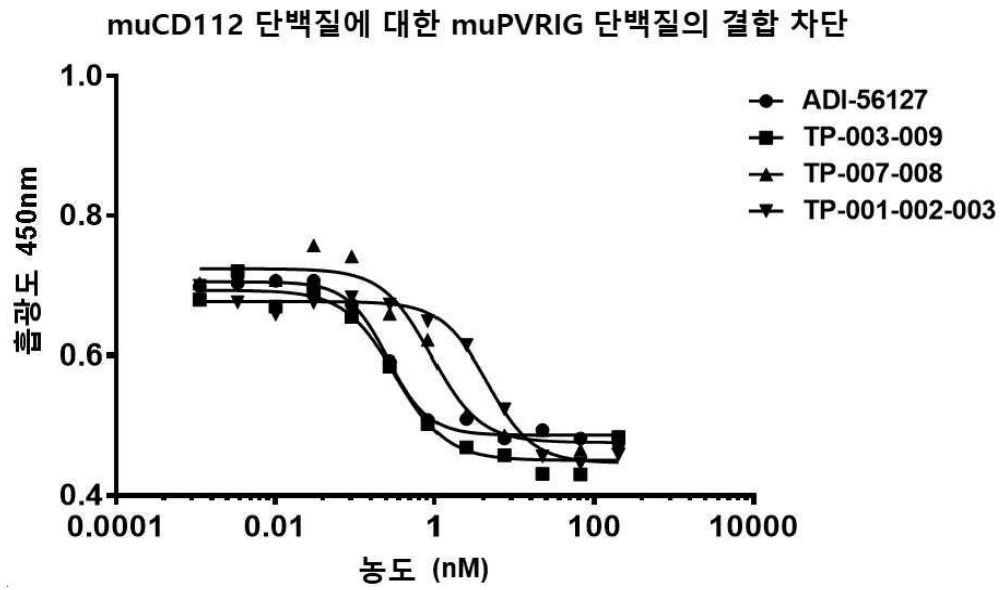
도면9



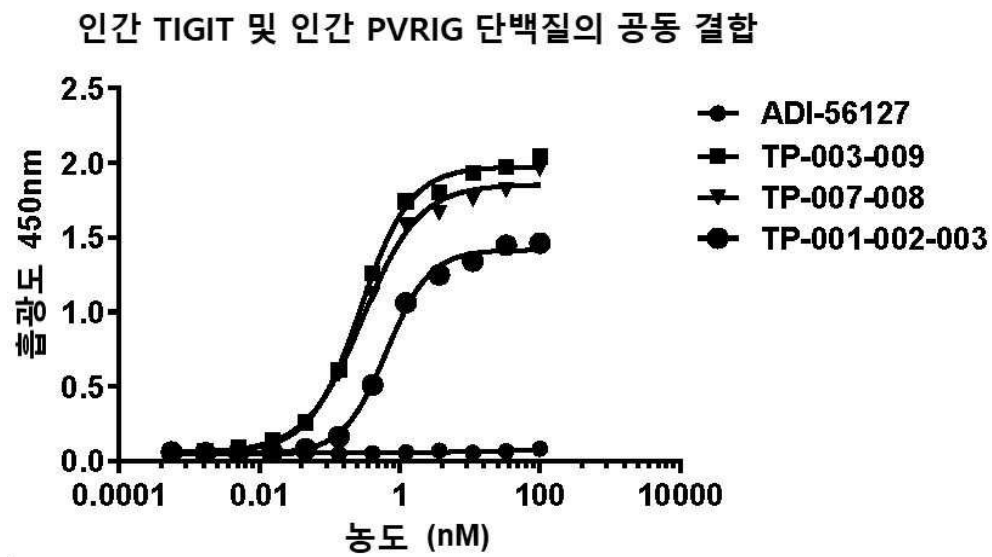
도면10



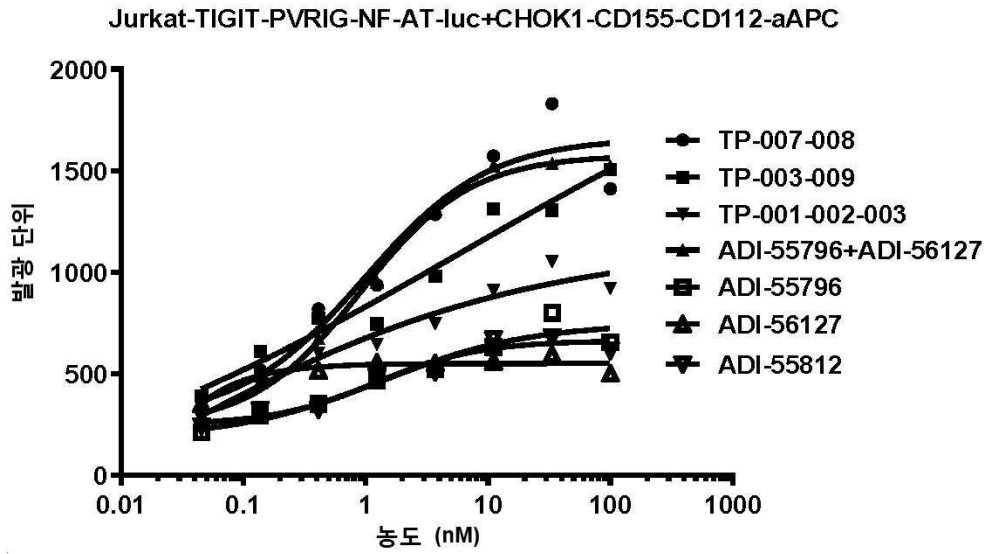
도면11



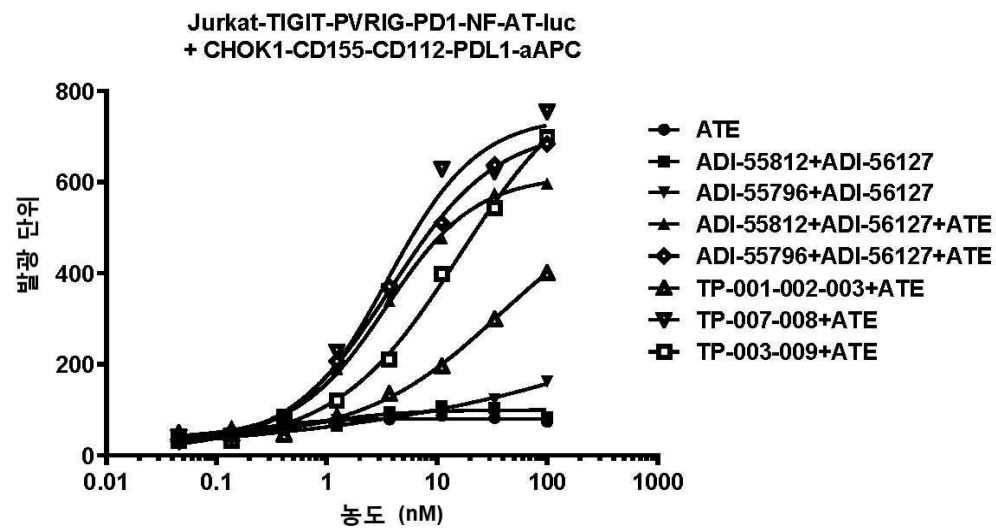
도면12



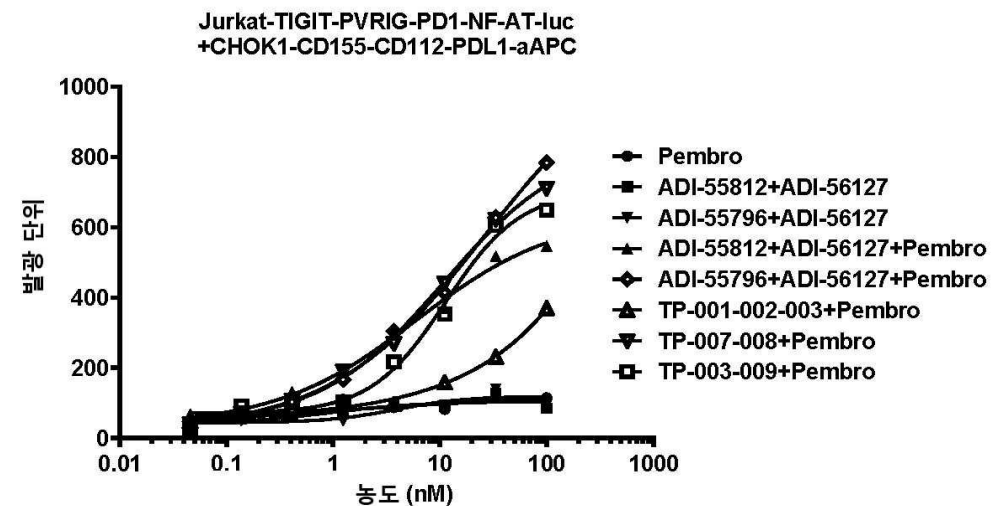
도면13



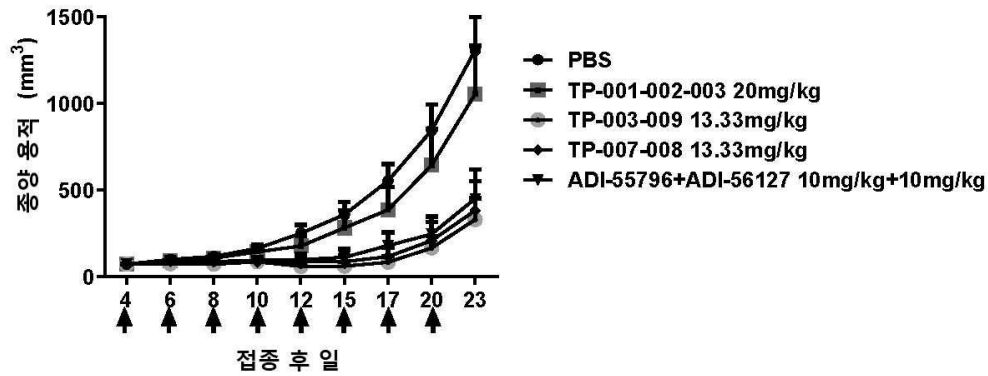
도면14a



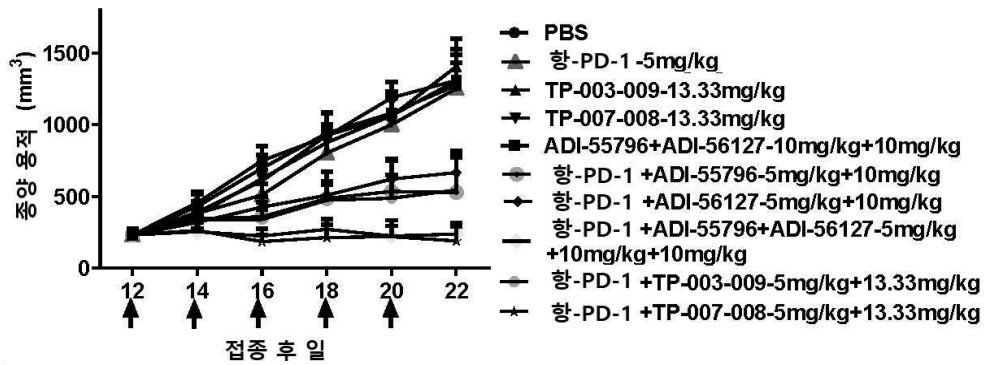
도면14b



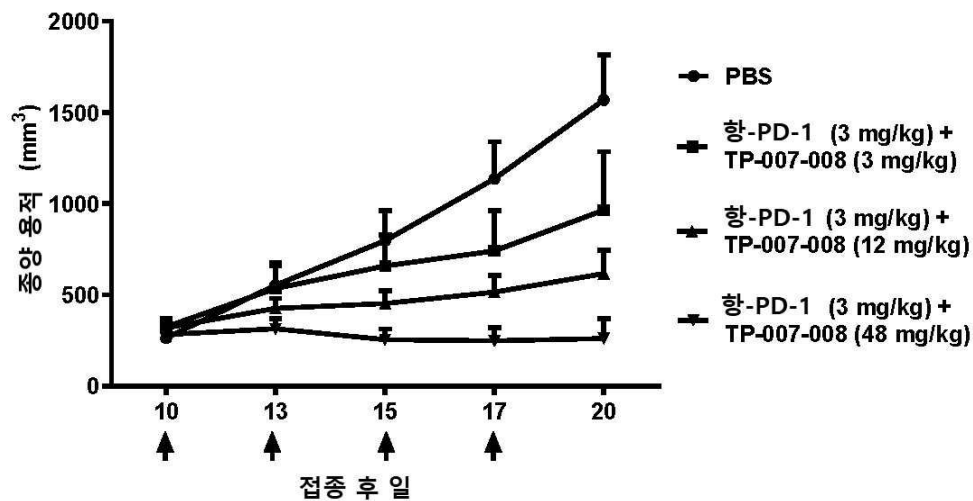
도면15



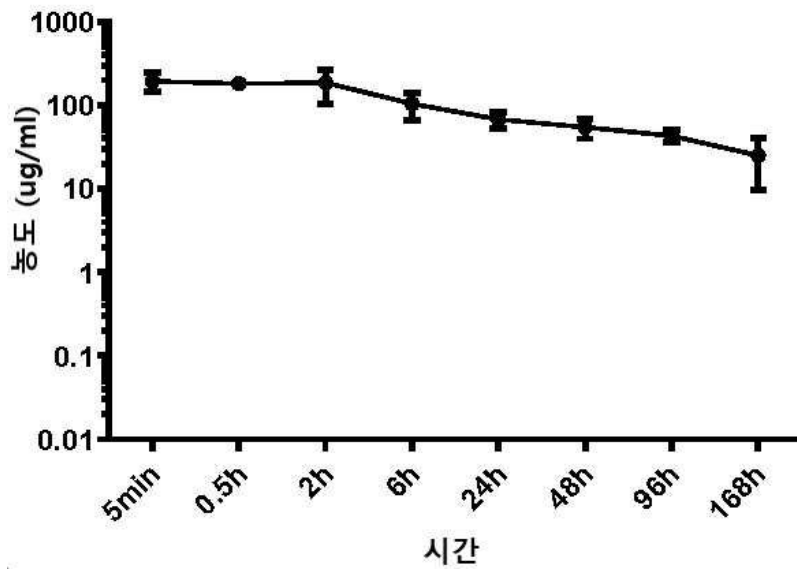
도면16a



도면16b

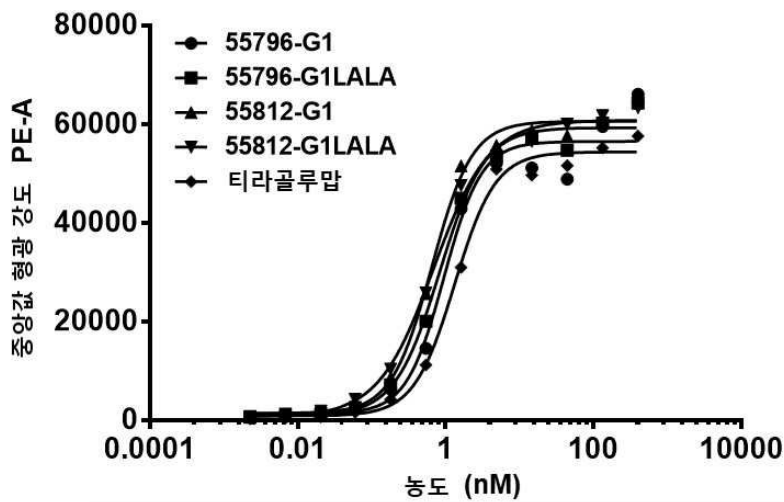


도면17



도면18

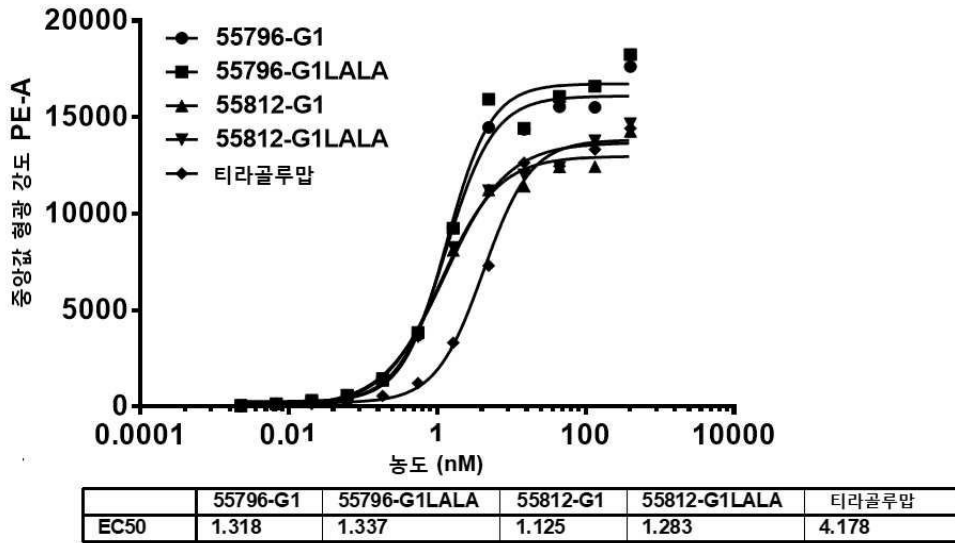
인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



	55796-G1	55796-G1LALA	55812-G1	55812-G1LALA	티라골루말
EC50	0.9619	0.8445	0.6585	0.6983	1.345

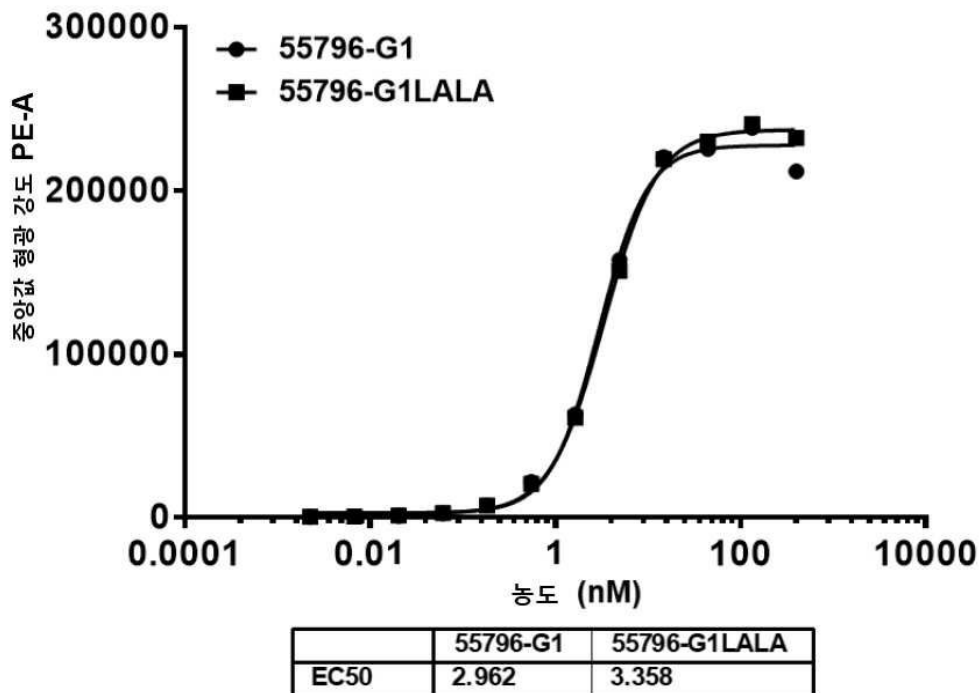
도면19

시노몰구스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



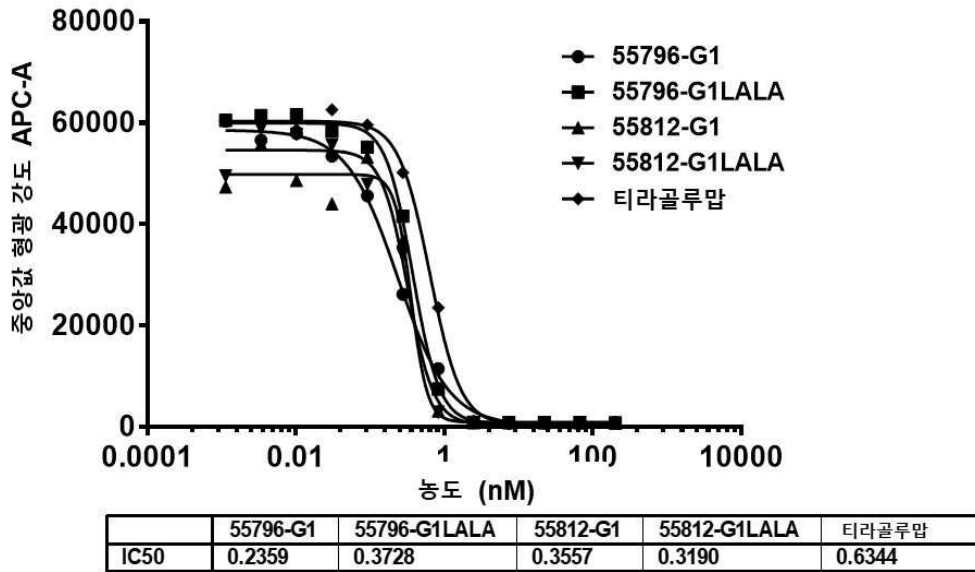
도면20

마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



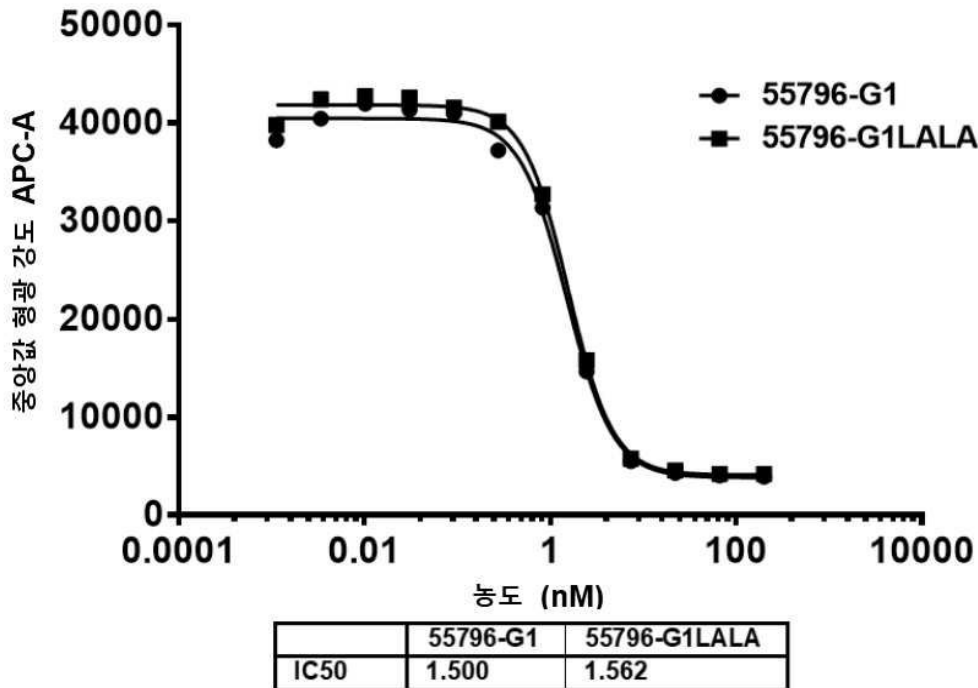
도면21

인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한
CD155의 결합 차단



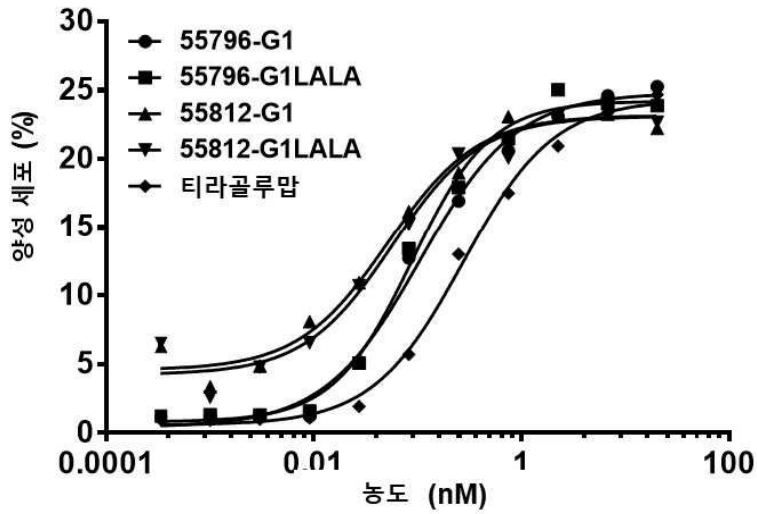
도면22

마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한
마우스 CD155의 결합 차단



도면23

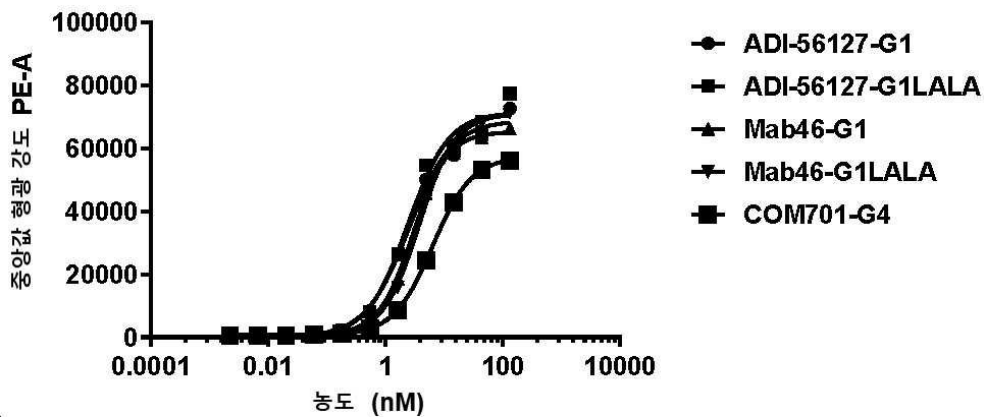
활성화 T 세포에 대한 결합



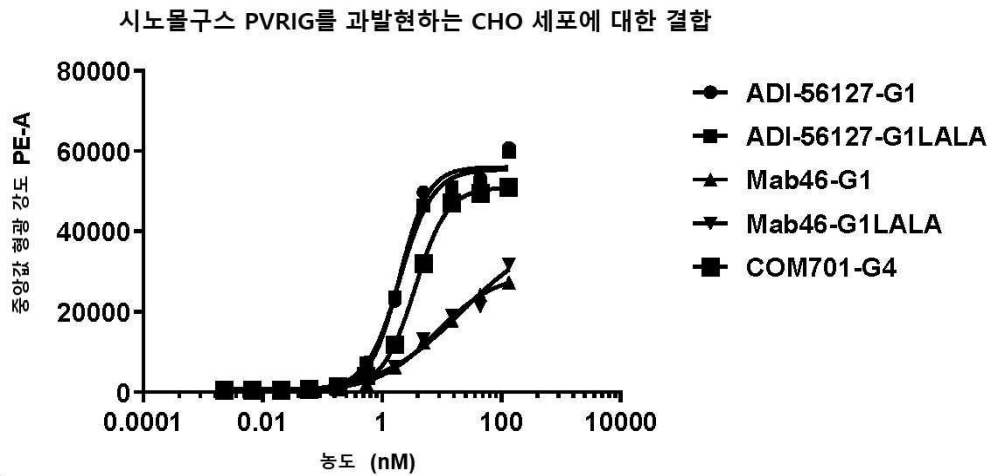
	55796-G1	55796-G1LALA	55812-G1	55812-G1LALA	티라골루맙
EC50	0.1059	0.08779	0.05175	0.05701	0.2736

도면24

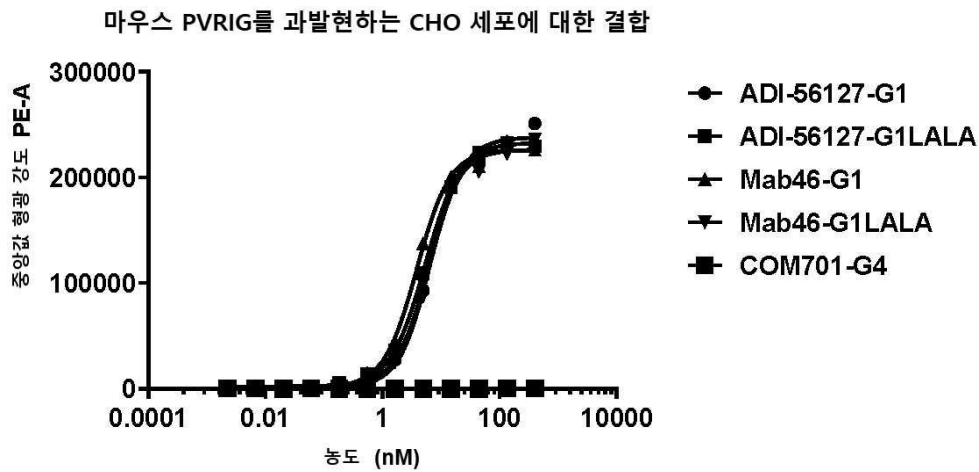
인간 PVRIG를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합



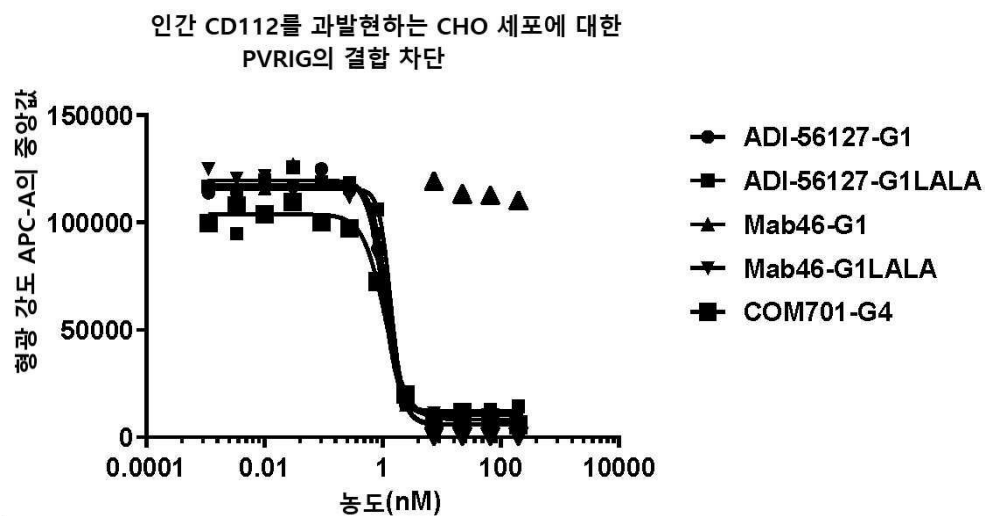
도면25



도면26

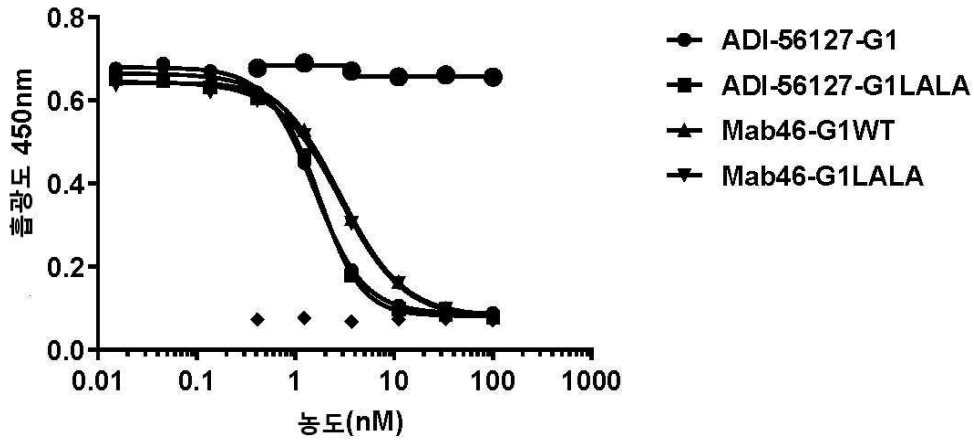


도면27



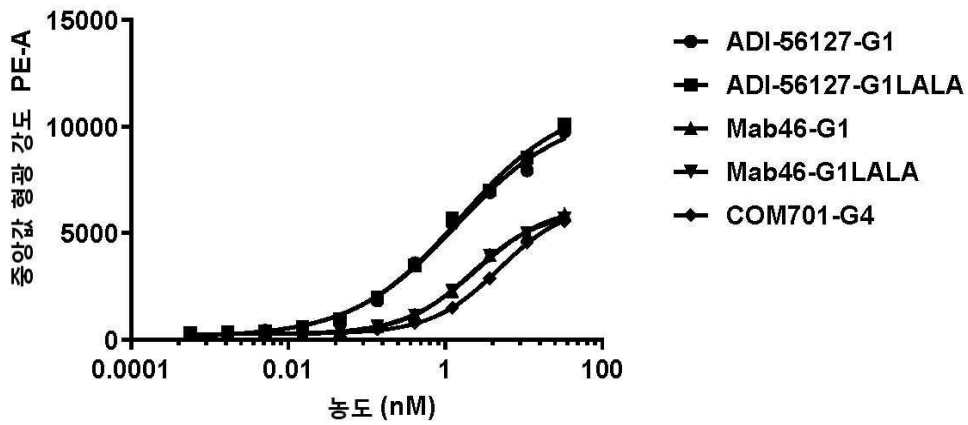
도면28

muCD112 단백질에 대한 muPVRIG 단백질의 결합 차단

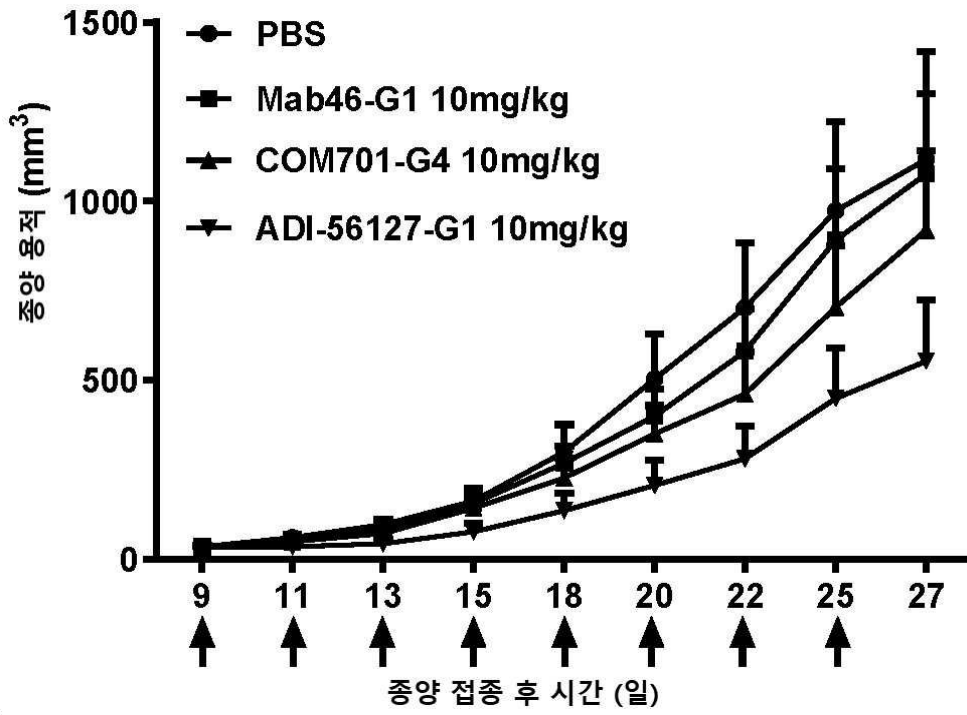


도면29

활성화 T 세포에 대한 결합



도면30



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.