



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0026284
(43) 공개일자 2025년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001892
(22) 출원일자(국제) 2023년04월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/087998
(87) 국제공개번호 WO 2023/246247
국제공개일자 2023년12월28일
(30) 우선권주장
202210712836.9 2022년06월22일 중국(CN)

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

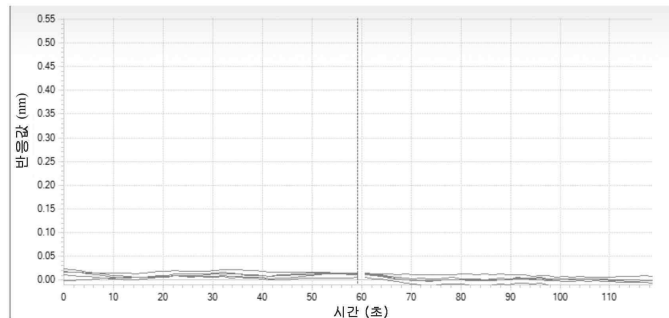
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 약학 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD73 (예를 들어, 인간 CD73) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 특히, 항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 15-17로 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1-HCDR3을 포함하고; 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 18-20로 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1-LCDR3을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/22 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-CD73 (예를 들어, 인간 CD73) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물로서, 임의로, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 더 포함하고,

항-CD73 항체는

서열번호 2로 기재된 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3; 및 서열번호 4로 기재된 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3

을 포함하고;

바람직하게는, IMGT 번호매김 체계에 따라서, 항-CD73 항체는

서열번호 15로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR1,

서열번호 16으로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR2,

서열번호 17로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR3,

서열번호 18로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR1,

서열번호 19로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR2, 및

서열번호 20으로 기재된 아미노산 서열, 또는 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR3

을 포함하고;

항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체는

PD-1을 표적화하는 제1 단백질 기능성 영역, 및

VEGFA를 표적화하는 제2 단백질 기능성 영역

을 포함하고;

제1 단백질 기능성 영역은 단일 사슬 항체이고, 제2 단백질 기능성 영역은 면역글로불린이거나; 또는 제1 단백

질 기능성 영역은 면역글로불린이고, 제2 단백질 기능성 영역은 단일 사슬 항체이고,

면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 27로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 31-33으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 29로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 34-36으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하고;

단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 37로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 41-43으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 44-46으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하거나;

또는

면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 37로 기재된 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 41-43으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 44-46으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하고;

단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 27로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 31-33에 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 29로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 34-36으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역은 하기 서열:

서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10, 또는 서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열

을 포함하거나 또는 그로 이루어지고;

항-CD73 항체의 경쇄 가변 영역은 하기 서열:

서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14, 또는 서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열

을 포함하거나 또는 그로 이루어지고,

바람직하게는

항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 1로 기재)되고, 항-CD73 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 4로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 3으로 기재)되거나;

항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 6으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 5로 기재)되고, 항-CD73 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 8로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 7로 기재)되거나;

항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 9로 기재)되고, 항-CD73 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 12로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 11로 기재)되거나; 또는

항-CD73 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 9로 기재)되고, 항-CD73 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 14로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 13으로 기재)되고;

바람직하게는, 항-CD73 항체의 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01834이고, 보다 바람직하게는, 항-CD73 항체의 중쇄 불변 영역은 EU 번호매김 체계에 따른 수탁 번호: P01857로 기재된 서열을 기반으로 하는 하기 돌연변이:

L234A 및 L235A; 또는

L234A 및 G237A; 또는

L235A 및 G237A;

또는

L234A, L235A 및 G237A

또는

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 K320A로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 가지고; 가장 바람직하게는, 항-CD73 항체의 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 21로 기재되고, 항-CD73 항체의 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 22로 기재되고;

바람직하게는, 항-CD73 항체는 단일클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)이고,

보다 바람직하게는, 항-CD73 항체는 수탁 번호 CCTCC NO: C2018137로 중국 생물 자원 보존 센터 (China Center for Type Culture Collection)(CCTCC)에 기탁된 하이브리도마 세포주 LT014에 의해 생산된 항체인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27로 기재되고, 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 29로 기재되거나; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 37로 기재되고, 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 39로 기재되거나; 또는 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 37로 기재되고, 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 39로 기재되거나; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27로 기재되고, 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 29로 기재되고;

바람직하게는, 이중특이적 항체 경우에, EU 번호매김 체계에 따라서, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 하기 돌연변이:

L234A 및 L235A; 또는

L234A 및 G237A; 또는

L235A 및 G237A;

또는

L234A, L235A, G237A를 가지고, 보다 바람직하게는, 이중특이적 항체 경우에, EU 번호매김 체계에 따라서, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은

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 K320A로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖거나 또는 더 가지고,

바람직하게는, 면역글로불린은 인간 IgG1 아형이고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체는 서열번호 23으로 기재된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 25로 기재된 경쇄 아미노산 서열을 가지고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 중쇄는 서열번호 24로 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고, 이의 경쇄는 서열번호 26으로 기재된 아미노산 서열에 의해 코딩되고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 단일 사슬 항체는 면역글로불린의 중쇄의 C 말단에 연결되고, 바람직하게는, 하나의 면역글로불린 분자는 2개의 단일 사슬 항체 분자에 연결되고, 보다 바람직하게는 2개의 단일 사슬 항체 분자는 동일하고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 2개의 단일 사슬 항체가 존재하고, 각각의 단일 사슬 항체의 1개 말단은 면역글로불린의 2개 중쇄 중 하나의 C 말단 또는 N 말단에 연결되고, 보다 바람직하게는, 단일 사슬 항체는 면역글로불린의 중쇄의 C 말단에 연결되고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능성 영역은 제2 단백질 기능성 영역에 직접적으로 또는 링커 단편을 통해서 연결되고/되거나; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 직접적으로 또는 링커 단편을 통해서 연결되고,

바람직하게는, 링커 단편은 (GGGS)_n (여기서, n은 양의 정수이고, 바람직하게는, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6임)이고,

바람직하게는, 제1 단백질 기능성 영역은 제2 단백질 기능성 영역에 제1 링커 단편을 통해서 연결되고; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 제2 링커 단편을 통해서 연결되고; 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편은 동일하거나 또는 상이하고;

바람직하게는, 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편의 아미노산 서열은 서열번호 47 및 서열번호 48로부터 독립적으로 선택되고;

바람직하게는, 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편의 아미노산 서열은 서열번호 48로 기재되고,

바람직하게는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능성 영역 및 제2 단백질 기능성 영역의 개수는 각각 독립적으로 1개, 2개 또는 그 이상이고,

바람직하게는, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체는 단일클론 항체 또는 인간화 항체인 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역 단편, 단일 사슬 항체 (예를 들어, scFv), 인간화 항체, 키메라 항체 및 이중특이적 항체로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 5

별도 포장 안에 제1 제품 및 제2 제품을 포함하는 조합 제품(예를 들어, 키트)로서,

제1 제품은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고;

제2 제품은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하고;

바람직하게는, 조합 제품은 하나 이상의 화학요법제를 포함하는 별도 포장 안에 제3 제품을 더 포함하고;

바람직하게는, 제1 제품 및 제2 제품은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 보조 물질을 독립적으로 더 포함하고;

바람직하게는, 조합 제품은 제품 설명서를 더 포함하고, 바람직하게는, 설명서는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량이 체중 kg 당 0.1-100 mg, 바람직하게는 1-10 mg이고; 대안적으로, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량이 각 대상체에서 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg인 것을 명시하고, 바람직하게는 설명서는 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체가 1일 2회 내지 격일 마다 약 1회, 또는 3일, 4일, 5일,

6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 마다 1회 투여된다는 것을 명시하고,

바람직하게는, 조합 제품에서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편 대 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 질량비는 항체의 질량을 기준으로, (1:5)-(5:1), 예를 들어, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1이고,

바람직하게는, 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및/또는 화학요법 약물은 피하 주사, 피내 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사 또는 병변내 주사에 의한 투여에 적합한 형태, 바람직하게는 정맥내 주사 또는 정맥내 점적 주입에 의한 투여에 적합한 형태, 및 바람직하게는 액상 형태인 조합 제품.

청구항 6

종양을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법으로서, 방법은 환자에게 약물 A의 치료적 유효량 및 약물 B의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 약물 A는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 약물 B는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하고, 바람직하게는 약물 A 및 약물 B는 동시에 또는 순차적으로 투여되고, 순차적 투여는 약물 A를 먼저 투여하거나 또는 약물 B를 먼저 투여하고,

바람직하게는, 방법은 하나 이상의 화학요법 약물 (바람직하게는 화학요법 약물은 화학요법제 또는 성장 억제제, 표적화 치료제 (예를 들어, 항체-약물 접합체, 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포, 혈관생성 억제제, 항신생물제, 암 백신, 보조제 및 이의 조합, 알킬화제, 항대사산물제, 항생제, 식물-기반 및/또는 호르몬 약물, 바람직하게는 사이클로포스파미드, 페메트렉세드, 백금계 약물 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 아드리아마이신, 파클리탁셀, 빈카 알칼로이드, 타목시펜, 메게스트롤, 고세렐린, 아스파라기나제 및/또는 플루오로우라실 항신생물성 약물)과 병용하여 투여하는 단계를 더 포함하고, 바람직하게는 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및 화학요법 약물은 동시에 또는 순차적으로 투여되고, 보다 바람직하게는, 항-CD73 항체 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체는 외과적 처치 이전 또는 이후, 및/또는 방사선요법 이전 또는 이후에 투여되고,

바람직하게는, 화학요법제 또는 성장 억제제는 알킬화제, 안트라사이클린, 항호르몬제 (예컨대 항-안드로겐제), 아로마타제 억제제, 단백질 키나제 억제제 (예컨대 티로신 키나제 억제제), 지질 키나제 억제제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 항-대사산물제, 토포이소머라제 억제제, 세포독성제 또는 항-종양 항생제, 프로테아솜 억제제, 항-마이크로튜불제, EGFR 길항제, VEGF 길항제, PD-1 길항제, 안지오프이어틴 2 길항제, 레티노이드, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 및 이의 조합으로부터 선택되고,

바람직하게는, 표적화 치료제는 B-raf 억제제, MEK 억제제, K-ras 억제제, c-Met 억제제, Alk 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제 억제제, Akt 억제제, mTOR 억제제, VEGF 억제제, CD73 억제제, PARP 억제제, PD-1 억제제, 디포스파티딜글리콜 3-키나제/mTOR 억제제, 및 이의 조합으로부터 선택되고,

바람직하게는, 항체-약물 접합체는 마이탄신, 모노메틸 아우리스타틴 E, 칼리케아미신, 에스퍼라미신, 및 방사성 동위원소 킬레이트화제로 이루어진 군으로부터 선택되는 약물을 포함하고,

바람직하게는, CD73 억제제는 BMS-986179, MEDI9447, NZV930, CPI-006, AB680, LY-3475070, TJ004309[3], ORIC-533, IPH5301AB680 및 LY-3475070 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않고,

바람직하게는, PARP 억제제는 에토포시드, 올라파립, 루카파립, 니라파립, 탈라조파립, 플루조파립, 벨리파립 ER, ABT-472, ABT-767, 스테노파립, AST-6828, AG-PD, ANG-2864, ANG-3038, ANG-3186, AZD-5305, AZ-0108, AZD-2461, AMXI-5001, AMXI-2001, AMXI-3001, AMXI-7001, AMXI-9001, 파미파립, ZYTP-1, CK-102, XZ-120312, YHP-743, 이오벤구안 I 131, 루카파립 캄실레이트, CVL-218, CPH-101, CPH-102, CBX-11, CBX-15, 미노사이클린, DB-207, DPS-102, E-7016, 이오벤구안 I 131, MK-2512, HCX-014, HWH-340, IDX-1197, IDX-1197, 세나파립, IMP-04100, IMP-04111, IMP-04149, IMP-04249, IMP-04307, IMP-04356, JPI-289, JPI-547, JPI-283, 플루조파립, GT-1620, 이오벤구안 I 131, DR-2313, MP-124, H-10, NT-125, BGP-15, NMSP-293, NMSP-293, NMSP-118, NMSP-648, NMSP-914, DB-207, NUV-1156, NUV-1176, JPI-289, 스테노파립, OX-401, NU-1025, NU-1085, PLX-376, R-554, RBN-2397, RBN-012759, PJ-34, INO-1001, WW-46, BSI-401, 이니파립, SOMCL-9112, SC-10914, HTMC-0435, SRX-3128, TSL-1502, PJ-34, CEP-8983, CK-102, THG-009, 탈라조파립 SR, L-2286, 미토파립 및 WB-1340 중 하나 이상으로부터 선택되는 것인 종양의 치료 및/또는 예방 방법.

청구항 7

단위 제제로서, 바람직하게는 종양을 치료하기 위해 사용되고, 1-10000 mg (바람직하게는 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg)의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및 1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체, 및 임의로 제6항에 정의된 바와 같은 하나 이상의 화학요법 약물 (예컨대 백금계 약물 및/또는 플루오로우라실 항신생물성 약물)을 포함하고; 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및 화학요법 약물은 별도로 포장되고,

바람직하게는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 체중 kg 당 0.1-100 mg, 바람직하게는 1-10 mg이고; 대안적으로, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 각 대상체에서 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg이고,

바람직하게는, 용량은 1일 2회 내지 격일 마다 약 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 마다 1회 제공되는 것인 단위 제제.

청구항 8

단일 용량 단위로서, 바람직하게는 종양을 치료하기 위해 사용되고, 0.1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-CD73 항체 및 0.1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는 것인 단일 용량 단위.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 종양은 하기 중 하나 이상으로부터 선택되는 것인 방법, 단위 제제 또는 단일 용량 단위:

자궁경부암 (예를 들어, 전이성 자궁경부암), 자궁내막암, 폐암 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암 (예를 들어, 편평 비-소세포 폐암 또는 비-편평 비-소세포 폐암), 인후암, 식도암, 식도 편평 암, 갑상선암, 중피종, 위장암 예컨대 위암 (미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 예를 들어, 후기 위암, 위 선암종 또는 위식도 접합부 선암종), 및 장암 (예를 들어, 직장암, 결장암, 직결장암 (미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 간암 (예를 들어, 간세포 암종, 간담도암), 담관암 (예를 들어, 담도암 및 담낭암), 췌장의 암, 췌장암, 신장암, 난소암 (예를 들어, 후기 난소암), 나팔관암, 항문 유표피 암종, 복막암, 신경교종, 신경아교종, 재발성 신경교종, 피부암, 흑색종, 혈액학적 악성종 (예컨대 백혈병 (예를 들어, 급성 골수성 백혈병)), 림프종 (예를 들어, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종), 다발성 골수종, B-림프종 (예를 들어, 형질 세포 암종), 골암, 육종 (예를 들어, 평활근육종, 횡문근육종), 골육종, 연골육종, 신경아세포종, 골수종 (예를 들어, 다발성 골수종), 거대 세포 신경내분비 암, 요로상피 암종 (예를 들어, 상부 요로상피 암종 또는 방광암), 전립선암 (전이성 거세-저항성 전립선암 (mCRPC) 포함), 고환암, 삼중-음성 유방암, 말초 T 세포 림프종, 비인두암, 미세부수체 고 불안정성 (MSI-H) 또는 불일치 복구 기능장애 (dMMR) 유형 고형 종양, 두경부암, 뇌암 (예를 들어, 공격성 뇌암), 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선종 (예를 들어, 유방암, 흉선암, 회맹부 선암종, 방적샘 선암종, 췌관 선암종, 점액성 또는 장액성 낭선암종), 용모상피종, 악성 수포형 모반, 악성 세르톨리 세포-기질 세포 종양, 악성 과립구종, 이상세포종, 교모세포종, 진균증, 메르켈 세포 암종, 간내 담관암, 메르켈 세포 암종, 편평 세포 항문직장암, 허의 편평 세포 암종, 두경부의 편평 세포 암종, 및 다른 혈액학적 악성 종양.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 면역학 분야에 관한 것으로서, 특히 항-CD73 (예를 들어, 인간 CD73) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 약물 조성물에 관한

것이다.

배경 기술

- [0002] 엑토-5'-뉴클레오티다제, 즉 CD73 단백질은 NT5E 유전자에 의해 코딩되고, 70 KD의 분자량을 가지며, 글리코실 포스파티딜 이노시톨 (GPI)에 의해 세포막에 앵커링되는, 다기능성 당단백질이다 (Zimmermann H., *Biochem J.*, 1992; 285:345-365).
- [0003] CD73은 인간 조직 세포의 표면 상에서 광범위하게 분포되고, 다양한 고형 종양에서, 특히 종양 미세 환경에서의 암 세포, 수지상 세포, 조절 T 세포 (Treg), 자연 살해 세포 (NK 세포), 골수-유래 억제자 세포 (MDSC), 종양-연관 마크로파지 (TAM) 등에서 고도로 발현된다는 것이 연구에서 확인되었다. 저산소증은 저산소-유도가능 인자-1 (HIF-1)과 같은 분자의 상향 조절을 유도하여서, 종양 미세 환경에서 CD73의 광범위 발현을 일으킨다 (Synnestvedt K, et al. *J Clin Invest.* 2002; 110:993-1002). 임상 종양 샘플의 분석은 CD73의 고발현이 잠재적인 생체마커이고, 유방암, 폐암, 난소암, 신장암, 위암, 두경부암 등을 포함한, 다양한 유형의 종양의 부정적인 예후와 밀접하게 관련된다는 것을 보여주었다.
- [0004] CD73은 히드롤라제 활성 및 비-히드롤라제 활성 둘 모두를 갖는다. CD73의 효소 및 비-효소 기능은 종양에서 관련 과정으로 동시에 작용하며, 종양의 진행을 상호 촉진하고 유지한다. 더 많은 연구들이 CD73이 시험관내에서 종양 세포 증식, 전이 및 침입, 및 생체내에서 종양 혈관 생성 및 종양 면역 회피 기전에 대한 핵심 조절 분자이고, 중요한 면역 억제 기전은 CD73-아데노신 물질대사 신호전달 경로에 의해 매개된다는 것을 밝혀주었다. CD73의 상류에서 CD39는 ATP를 촉매하여 아데노신 모노포스페이트 (AMP)를 생성시킬 수 있고, 생성된 AMP는 CD73에 의해서 아데노신으로 전환되고, 아데노신은 하류 아데노신 수용체 (A2AR)에 결합한다. A2AR은 면역활성화와 관련된 일련의 신호전달 경로, 예컨대 LCK, MAPK, 및 PKC를 억제하고, 단백질 키나제 A (PKA) 및 Csk 키나제 활성화에 의해서 T 세포의 면역 사멸 효과를 억제하여, 면역 억제 역할을 한다 (Antonioni L, et al. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13:842-857).
- [0005] 경막 수용체 PD-1 (프로그램된 세포 사멸 단백질-1)은 CD28 패밀리의 구성원이고, 활성화된 T 세포, B 세포, 및 골수 세포에서 발현된다. PD-1의 리간드인, PDL1 (프로그램된 세포 사멸 1 리간드 1, 또는 PDL-1) 및 PDL2 (프로그램 세포 사멸 1 리간드 2, 또는 PDL-2) 둘 모두는 B7 수퍼패밀리의 구성원이다. PDL1은 T 세포, B 세포, 내피 세포 및 상피 세포를 포함한, 다양한 세포에서 발현되고, PDL2는 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포 및 마크로파지에서만 발현된다.
- [0006] PD-1/PDL1 신호전달 경로는 면역 내성, 미생물 감염, 및 종양 면역 회피의 조절에서 중요한 역할을 한다. PD-1은 면역 세포 예컨대 T 세포에서 주로 발현되고, PD-1의 리간드 PDL1은 다수의 인간 종양 조직에서 고도로 발현된다. PD-1/PDL1 신호전달 경로의 차단은 억제된 T 세포를 활성화시킬 수 있으므로, 암 세포를 공격하게 된다. PD-1/PDL1 신호전달의 차단은 종양 항원-특이적 T 세포의 증식을 촉진할 수 있고, 종양 세포 사멸 과정을 활성화시킬 수 있으며, 국소 종양 성장을 더욱 억제할 수 있다 (Julie R et al., 2012, *N Engl J Med.*, 366:2455-2465). 또한, PDL1 발현이 높은 종양은 검출이 어려운 암과 연관있다 (Hamanishi et al., 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3360-5). 효과적인 방법은 PD-1의 발현을 조절하도록 항-PD-1 항체를 투여하는 것이다. PD-1 항체의 광범위한 항-종양 전망 및 놀라운 효능 덕분에, PD-1 경로를 표적화하는 항체가 다양한 종양, 예를 들어, 비-소세포 폐암, 신장 세포 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):768-74)에서 돌파구를 가져올 것으로 산업계에서 광범위하게 용인된다.
- [0007] 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 내피 세포의 분열 및 증식을 촉진할 수 있고, 새로운 혈관의 형성을 촉진할 수 있으며, 혈관 투과성을 개선할 수 있는 성장 인자이다. 세포 표면 상의 혈관 내피 성장 인자 수용체에 결합하여서, 티로신 키나제 신호 전달 경로를 활성화시켜 역할을 한다. 종양 조직에서, 종양 세포, 및 종양으로 침입한 마크로파지 및 비만 세포는 높은 수준의 VEGF를 분비할 수 있고, 주변분비 형태로 종양 혈관 내피 세포를 자극 시켜서, 내피 세포의 증식 및 이동을 촉진하고, 혈관생성을 유도하며, 종양의 지속적인 성장을 촉진하고, 혈관 투과성을 개선시키고, 주변 조직에서 피브린 침착을 초래하고, 단핵 세포, 섬유아세포 및 내피 세포의 침윤을 촉진하여, 종양 기질의 형성 및 신규 혈관으로 종양의 진입을 용이하게 하여, 종양 전이를 촉진한다. 그러므로, 종양 혈관생성의 억제는 현재 가장 유망한 종양 치료 방법 중 하나로 여겨진다. VEGF 패밀리는 VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, 및 PIGF를 포함한다. 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)는 VEGFR1 (Flt1로도 알려짐), VEGFR2 (KDR 또는 Flk1로도 알려짐), VEGFR3 (Flt4로도 알려짐), 및 뉴로핀-1 (NRP-1)을 포함하며, 처음 3개 수용체는 구조가 유사하고, 티로신 키나제 수퍼패밀리에 속하고, 외막 영역, 경막 절편 및 막내 영역으로 구성되는데,

외막 영역은 면역글로불린-유사 도메인으로 구성되고, 내막 영역은 티로신 키나제 영역이다. VEGFR1 및 VEGFR2는 혈관 내피 세포의 표면 상에서 주로 발견되고, VEGFR3는 림프계 내피 세포의 표면 상에서 주로 발견된다.

[0008] VEGF 패밀리의 분자는 이들 수용체에 대해 상이한 친화성을 갖는다. VEGFA는 주로 VEGFR1, VEGFR2 및 NRP-1과 조합하여 작용한다. VEGFR1은 최초로 인식된 수용체이고, 정상적인 생리적 조건 하에서 VEGFR2에 비해서 VEGFA에 대해 더 높은 친화성을 갖지만, VEGFR2에 비해서 세포내 절편에서 더 낮은 티로시나제 활성을 갖는다 (Ma Li, *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24(5) (2016):146-148).

[0009] VEGFR2는 혈관생성 및 혈관 조作的 주요 조절인자이고, VEGFR1에 비해서 훨씬 더 높은 티로신 키나제 활성을 갖는다. VEGFR2는 리간드 VEGFA에 결합된 후에, 혈관 내피 세포의 증식, 분화 등을 비롯하여, 혈관의 형성 과정 및 혈관의 투과성을 매개한다 (Roskoski R Jr. et al., *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(3) (2007):179-213). VEGFA는 VEGFR2에 결합 후에, 하류 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 신호전달 경로를 통해서 세포내 관련 단백질 유전자의 전사 발현을 매개하고, 따라서 혈관 내피 세포의 증식을 촉진한다 (Takahashi T et al., *Oncogene*, 18(13) (1999):2221-2230).

[0010] VEGFR3은 티로신 키나제 패밀리의 구성원이고, 배아 혈관 내피 세포 및 성인 림프계 내피 세포에서 주로 발현되고, VEGFC 및 VEGFD는 VEGFR3에 결합하여 림프계 내피 세포의 증식 및 이동을 촉진하고, 림프관의 신생합성을 촉진하며; NRP-1은 비-티로신 키나제 경막 단백질로서, 생물학적 신호를 독립적으로 전달할 수 없고, VEGF 티로신 키나제 수용체와 복합체 형성 후에만 신호전달을 매개할 수 있다 (Ma Li, *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 24(5) (2016):146-148).

[0011] VEGFA 및 VEGFR2는 혈관생성의 조절에 주로 관여하는데, VEGFR2에 VEGFA의 결합 이전 및 이후에, 상류 및 하류 경로의 수많은 중간 신호의 캐스캐이드 반응이 형성되고, 최종적으로 생리적 기능은 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).

[0012] 현재, 인간 VEGF, 특히 VEGFA를 표적화하는 몇몇 인간화 단일클론 항체가 존재하는데, 예컨대 베바시주맙은 2004년 동안 연속하여 비-소세포 폐암, 신장 세포 암종, 자궁경부암, 및 전이성 직결장암과 같은 다양한 치료를 위해서 미국 식품의약청에서 승인을 받았다.

[0013] 요약하면, 더 높은 효능의 치료 또는 병용 요법의 개발은 매우 의미가 있다.

발명의 내용

[0014] 광범위한 연구 및 창의적인 노력 후에, 발명자는 마우스를 면역화시키기 위한 항원으로서 재조합 인간 CD73을 발현시키기 위해 포유동물 세포 발현 시스템을 사용하였고, 마우스 비장 세포와 골수종 세포의 융합을 통해 하이브리도마 세포를 수득하였다. 발명자는 다수의 샘플을 스크리닝하여 하이브리도마 세포주 LT014 (수탁 번호: CCTCC NO: C2018137)를 수득하였다.

[0015] 발명자는 하이브리도마 세포주 LT014가 인간 CD73에 특이적으로 결합하는 특이적 단일클론 항체 (19F3으로 명명됨)를 분리할 수 있고, 이 단일클론 항체는 비-기질 경쟁 방식으로 CD73의 효소 활성 반응을 효과적으로 억제할 수 있고, 아데노신의 생산을 감소시킬 수 있으며, T 세포의 활성을 촉진하고, 종양 성장 억제 효과를 발휘할 수 있다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

[0016] 또한, 발명자는 인간 CD73에 대한 인간화 항체 (19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM), 19F3H2L3 및 19F3H2L3(hG1DM)으로 명명됨)를 창조적으로 제조하였고, 또한, 항-CD73 항체는 항체에 의해 매개되는 비바람직한 독성을 피하면서, ADCC 및 CDC 효과를 제거하도록 아미노산 돌연변이가 도입되었다.

[0017] 발명자는 또한 본 발명의 항-PD-1/VEGFA 이중특이적 항체와 조합된 항체가 종양 성장을 효과적으로 억제하는 약리학적 효과를 가지며, 이것은 항-PD-1/VEGFA 이중특이적 항체 또는 항-CD73 항체 단독의 경우에 비해서 우수하다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

[0018] 본 발명의 다른 양태는 또한 항체에 관한 것으로서, 항-CD73 항체는

[0019] 서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3; 및 서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14로 기재된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;

[0020] 바람직하게는, IMGT 번호매김 체계에 따라서, 항-CD73 항체는

- [0021] 서열번호 15로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR1,
- [0022] 서열번호 16으로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR2,
- [0023] 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 HCDR3,
- [0024] 서열번호 18로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR1,
- [0025] 서열번호 19로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR2, 및
- [0026] 서열번호 20으로 기재된 아미노산 서열, 이 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 또는 3)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 LCDR3을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 일부 구현예에서,
- [0028] 항체의 중쇄 가변 영역은 하기 서열:
- [0029] 서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10, 서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 2, 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 항체의 경쇄 가변 영역은 하기 서열:
- [0030] 서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14, 서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 12 또는 서열번호 14로 기재된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)의 보존성 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서

열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

- [0031] 본 발명의 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 1로 기재)되고, 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 4로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 3으로 기재)되거나;
- [0032] 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 6으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 5로 기재)되고, 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 8로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 7로 기재)되거나;
- [0033] 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 9로 기재)되고, 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 12로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 11로 기재)되거나; 또는
- [0034] 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 9로 기재)되고, 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 14로 기재 (바람직하게는, 핵산 서열은 서열번호 13으로 기재)된다.
- [0035] 본 발명의 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01834이다. 보다 바람직하게는, 항-CD73 항체의 중쇄 불변 영역은 EU 번호매김 체계에 따라서 수탁 번호: P01857로 기재된 서열을 기반으로 하기 돌연변이:
- [0036] L234A 및 L235A; 또는
- [0037] L234A 및 G237A; 또는
- [0038] L235A 및 G237A;
- [0039] 또는
- [0040] L234A, L235A 및 G237A;
- [0041] 또는
- [0042] 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 K320A로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 가장 바람직하게는, 항-CD73 항체의 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 21로 기재되고, 항-CD73 항체의 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 22로 기재된다.
- [0043] 본 발명의 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 불변 영역은 위치 234 (L234A)에 도입된 류신의 알라닌으로 점 돌연변이, 및 위치 235 (L235A)에 도입된 류신의 알라닌으로 점 돌연변이를 갖고, 서열번호 21로 기재된 아미노산 서열을 갖는, Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 서열번호 22로 기재된 아미노산 서열을 갖는, Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01834이다.
- [0044] 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원의 결합을 결정하는데, 각 사슬의 가변 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 불리는 3개의 초가변 영역을 함유한다 (중쇄 (H)의 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 (L)의 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하며, 이들은 Kabat 등 (참조: Bethesda M.d., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242)에 따라 명명된다.
- [0045] 바람직하게는, CDR은 또한 IMGT 번호매김 체계에 따라서 정의될 수도 있으며, 다음의 문헌을 참조한다: 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.
- [0046] 단일클론 항체 서열의 CDR의 아미노산 서열은 당업자에게 충분히 공지된 기술 수단을 통해서, 예를 들어 VBASE2 데이터베이스를 사용하여 IMGT 정의에 따라 분석된다.
- [0047] 본 발명에 포함되는 항체 19F3, 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)는 동일한 CDR을 갖는다.

- [0048] 중쇄 가변 영역의 3개 CDR은 하기 아미노산 서열을 갖는다:
- [0049] HCDR1: GYSFTGYT (서열번호 15),
- [0050] HCDR2: INPYNAGT (서열번호 16), 및
- [0051] HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (서열번호 17).
- [0052] 경쇄 가변 영역의 3개 CDR은 하기 아미노산 서열을 갖는다:
- [0053] LCDR1: QSLNSSNQKNY (서열번호 18),
- [0054] LCDR2: FAS (서열번호 19), 및
- [0055] LCDR3: QQHYDTPYT (서열번호 20).
- [0056] 본 발명의 일부 구현예에서, 항체는 단일클론 항체이다.
- [0057] 본 발명의 일부 구현예에서, 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)이다.
- [0058] 본 발명의 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역 단편, 단일 사슬 항체 (예를 들어, scFv), 인간화 항체, 키메라 항체 및 이중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 양태는 항체 및 접합된 모이어티를 포함하는 접합체에 관한 것으로서, 항체는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 접합된 모이어티는 정제 태그 (예를 들어, His 태그), 검출가능 표지이고; 바람직하게는 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 형광성 기질, 화학발광성 기질, 착색 물질, 폴리에틸렌 글리콜 또는 효소이다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 융합 단백질 또는 다중특이적 항체 (바람직하게는, 이중특이적 항체)에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 접합체, 융합 단백질 또는 다중특이적 항체를 포함하는 키트에 관한 것으로서; 바람직하게는, 키트는 항체를 특이적으로 인식하는 2차 항체를 더 포함하고; 임의로, 2차 항체는 검출가능한 표지, 예컨대 방사성 동위원소, 형광성 기질, 화학발광성 기질, 착색 물질 또는 효소를 더 포함한다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태는 샘플 중 CD73의 존재 또는 수준을 검출하는데 사용되는 키트의 제조에서 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 접합체, 융합 단백질 또는 다중특이적 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 접합체, 융합 단백질 또는 다중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로서; 임의로, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 더 포함한다. 바람직하게는, 약학 조성물은 피하 주사, 피내 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사 또는 병변내 주사를 통한 투여에 적합한 형태이다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 양태는 종양 (예컨대 고형 종양, 바람직하게는 비-소세포 폐암, 전립선암 (전이성 거세-저항성 전립선암 (mCRPC) 포함), 삼중-음성 유방암, 난소암, 직결장암 (미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 위암 (미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 흑색종, 두경부암, 신장 세포 암종 또는 췌관 선암종)의 치료 및/또는 예방을 위한 약물의 제조에서, 또는 종양의 진단을 위한 약물의 제조에서, 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 접합체, 융합 단백질 또는 다중특이적 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태는 수탁 번호 CCTCC NO: C2018137로 중국 생물 자원 보존 센터 (China Center for Type Culture Collection)(CCTCC)에 기탁된, 하이브리도마 세포주 LT014에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 양태는 별도 포장 안에 제1 제품 및 제2 제품을 포함하는 조합 제품(예를 들어, 키트)에 관한 것으로서,
- [0067] 제1 제품은 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명에 따른 접합

체, 또는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 약학 조성물을 포함하고;

- [0068] 제2 제품은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하고;
- [0069] 바람직하게는, 조합 제품은 하나 이상의 화학요법제를 포함하는 별도 포장 안에 제3 제품을 더 포함하고,
- [0070] 바람직하게는, 제1 제품 및 제2 제품은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 보조 물질을 독립적으로 더 포함하고;
- [0071] 바람직하게는, 조합 제품은 제품 설명서를 더 포함하고, 바람직하게는, 설명서는 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량이 체중 kg 당 0.1-100 mg, 바람직하게는 1-10 mg이고; 대안적으로, 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량이 각 대상체에서 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg인 것을 명시하고, 바람직하게는 설명서는 항-CD73 항체 및/또는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체가 1일 2회 내지 격일 마다 약 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 마다 1회로 투여된다고 명시한다.
- [0072] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 키트 또는 약학 조성물에서 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편 대 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 질량비는 항체의 질량을 기준으로, (1:5)-(5:1)이고, 예를 들어, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 또는 5:1이다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 양태는 종양의 치료 및/또는 예방을 위한 방법에 관한 것으로서, 환자에게 약물 A의 치료적 유효량 및 약물 B의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 약물 A는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명에 따른 집합체, 또는 본 발명에 따른 융합 단백질 또는 다중특이적 항체를 포함하고, 약물 B는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하고, 바람직하게는 약물 A 및 약물 B는 동시에 또는 순차적으로 투여되고, 순차적 투여는 약물 A가 먼저 투여되거나 또는 약물 B가 먼저 투여되는 것이다.
- [0074] 본 발명의 일부 구현예에서, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 23으로 기재되고, 이의 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 25로 기재된다.
- [0075] 본 발명은 종양 (특히 악성 종양)의 예방 및/또는 치료를 위한 방법에 관한 것으로서, 대상체에게 항-CD73 항체의 치료적 유효량을, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체와 병용하여, 보다 바람직하게는 추가로 하나 이상 화학요법 약물 (바람직하게는 화학요법 약물은 화학요법제 또는 성장 억제제, 표적화 치료제임 (예를 들어, 항체-약물 집합체, 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포, 혈관생성 억제제, 항신생물제, 암 백신, 보강제 및 이의 조합, 항대사산물제, 항생제, 식물-기반 및/또는 호르몬 약물, 바람직하게는 사이클로포스파미드, 페메트렉세드, 백금계 약물 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 아드리아마이신, 파클리탁셀, 빈카 알칼로이드, 타목시펜, 메게스트롤, 고세렐린, 아스파라기나제 및/또는 플루오로우라실 항신생물성 약물)과 병용하여, 투여하는 단계를 포함하고, 바람직하게는, 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및 종양 화학요법 약물은 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0076] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 화학요법제 또는 성장 억제제는 알킬화제, 안트라사이클린, 항호르몬제 (예를 들어, 항-안드로겐제), 아로마타제 억제제, 단백질 키나제 억제제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), 지질 키나제 억제제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 항-대사산물제, 토포이소머라제 억제제, 세포독성제 또는 항-종양 항생제, 프로테아솜 억제제, 항-마이크로튜블제, EGFR 길항제, VEGF 길항제, PD-1 길항제, 안지오펜터틴 2 길항제, 레티노이드, 히스톤 데아세틸라제억제제, 및 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0077] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 표적화 치료제는 B-raf 억제제, MEK 억제제, K-ras 억제제, c-Met 억제제, A1k 억제제, 포스포티딜이노시톨 3-키나제 억제제, Akt 억제제, mTOR 억제제, VEGF 억제제, CD73 억제제, PARP 억제제, PD-1 억제제, 디포스포티딜글리콜 3-키나제/mTOR 억제제, 및 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0078] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 항체-약물 집합체는 마이탄신, 모노메틸 아우리스타틴 E, 칼리케아미신, 에스퍼라미신, 및 방사성 동위원소 킬레이트화제로 이루어진 군으로부터 선택되는 약물을 포함한다.
- [0079] CD73 억제제는 BMS-986179, MEDI9447, NZV930, CPI-006, AB680, LY-3475070, TJ004309[3], ORIC-533, IPH5301AB680 및 LY-3475070 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] PARP 억제제는 에토포시드, 올라파립, 루카파립, 니라파립, 탈라조파립, 플루조파립, 벨리파립 ER, ABT-472, ABT-767, 스테노파립, AST-6828, AG-PD, ANG-2864, ANG-3038, ANG-3186, AZD-5305, AZ-0108, AZD-2461, AMXI-5001, AMXI-2001, AMXI-3001, AMXI-7001, AMXI-9001, 파미파립, ZYTP-1, CK-102, XZ-120312, YHP-743, 이오벤 구안 I 131, 루카파립 캡실레이트, CVL-218, CPH-101, CPH-102, CBX-11, CBX-15, 미노사이클린, DB-207, DPS-

102, E-7016, 이오벤구안 I 131, MK-2512, HCX-014, HWH-340, IDX-1197, IDX-1197, 세나파립, IMP-04100, IMP-04111, IMP-04149, IMP-04249, IMP-04307, IMP-04356, JPI-289, JPI-547, JPI-283, 플루조파립, GT-1620, 이오벤구안 I 131, DR-2313, MP-124, H-10, NT-125, BGP-15, NMSP-293, NMSP-293, NMSP-118, NMSP-648, NMSP-914, DB-207, NUV-1156, NUV-1176, JPI-289, 스테노파립, OX-401, NU-1025, NU-1085, PLX-376, R-554, RBN-2397, RBN-012759, PJ-34, INO-1001, WW-46, BSI-401, 이니파립, SOMCL-9112, SC-10914, HTMC-0435, SRX-3128, TSL-1502, PJ-34, CEP-8983, CK-102, THG-009, 탈라조파립 SR, L-2286, 미토파립 및 WB-1340 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0081] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 종양은 하기 중 하나 이상으로부터 선택된다:

[0082] 자궁경부암 (예를 들어, 전이성 자궁경부암), 자궁내막암, 폐암 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암 (예를 들어, 편평 비-소세포 폐암 또는 비-편평 비-소세포 폐암), 인후암, 식도암, 식도 편평 암, 갑상선암, 중피종, 위장암 예컨대 위암 ((미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 예를 들어, 후기 위암, 위 선암종 또는 위식도 접합부 선암종), 및 장암 (예를 들어, 직장암, 결장암, 직결장암 (미세부수체 안정성 (MSS) 및 불일치 복구 기능장애/미세부수체 고 불안정성 (dMMR/MSI-H) 유형 포함), 간암 (예를 들어, 간세포 암종, 간담도암), 담관암 (예를 들어, 담도암 및 담낭암), 췌장의 암, 췌장암, 신장암, 난소암 (예를 들어, 후기 난소암), 나팔관암, 항문 유표피 암종, 복막암, 신경교종, 신경아교종, 재발성 신경교종, 피부암, 흑색종, 혈액학적 악성종 (예컨대 백혈병 (예를 들어, 급성 골수성 백혈병)), 림프종 (예를 들어, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종), 다발성 골수종, B-림프종 (예를 들어, 형질 세포 암종), 골암, 육종 (예를 들어, 평활근육종, 횡문근육종), 골육종, 연골육종, 신경아세포종, 골수종 (예를 들어, 다발성 골수종), 거대 세포 신경내분비 암, 요로상피 암종 (예를 들어, 상부 요로상피 암종 또는 방광암), 전립선암 (전이성 거세-저항성 전립선암 (mCRPC) 포함), 고환암, 삼중-음성 유방암, 말초 T 세포 림프종, 비인두암, 미세부수체 고 불안정성 (MSI-H) 또는 불일치 복구 기능장애 (dMMR) 유형 고형 종양, 두경부암, 뇌암 (예를 들어, 공격성 뇌암), 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선종 (예를 들어, 유방암, 흉선암, 회맹부 선암종, 방적샘 선암종, 췌관 선암종, 점액성 또는 장액성 낭선암종), 융모상피종, 악성 수포형 모반, 악성 세르톨리 세포-기질 세포 종양, 악성 과립구종, 이상세포종, 교모세포종, 진균증, 메르켈 세포 암종, 간내 담관암, 메르켈 세포 암종, 편평 세포 항문직장암, 혀의 편평 세포 암종, 두경부의 편평 세포 암종, 및 다른 혈액학적 악성 종양.

[0083] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체는

[0084] PD-1을 표적화하는 제1 단백질 기능성 영역, 및

[0085] VEGFA를 표적화하는 제2 단백질 기능성 영역을 포함하고;

[0086] 제1 단백질 기능성 영역은 단일 사슬 항체이고, 제2 단백질 기능성 영역은 면역글로불린이거나; 또는 제1 단백질 기능성 영역은 면역글로불린이고, 제2 단백질 기능성 영역은 단일 사슬 항체이고,

[0087] 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 27로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 HIMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 31-33으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 29로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 34-36으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하고;

[0088] 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 37로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 41-43으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 44-46으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하거나;

[0089] 또는

[0090] 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 37로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 41-43으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 39로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 44-46으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하고;

[0091] 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 27로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 함유된 HCDR1-HCDR3 (바람직하게는 IMGIT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 31-33으로 기재된 HCDR1-HCDR3)을 포

함하고, 이의 경쇄 가변 영역은 서열번호 29로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 함유된 LCDR1-LCDR3 (바람직하게는 IMGT 번호매김 체계에 따라서, 각각 서열번호 34-36으로 기재된 LCDR1-LCDR3)을 포함하고;

- [0092] 바람직하게는, 면역글로불린은 인간 IgG1 아형의 것이다.
- [0093] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, EU 번호매김 체계에 따라서, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 하기 돌연변이를 갖는다:
- [0094] L234A 및 L235A; 또는
- [0095] L234A 및 G237A; 또는
- [0096] L235A 및 G237A;
- [0097] 또는
- [0098] L234A, L235A 및 G237A.
- [0099] 본 발명에서, 달리 명시하지 않으면, 위치 번호 앞의 글자는 돌연변이 전 아미노산에 해당되고, 위치 번호 뒤의 글자는 돌연변이 후 아미노산에 해당된다.
- [0100] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, EU 번호매김 체계에 따라서, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은
- [0101] 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 K320A로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖거나 또는 더 갖는다.
- [0102] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에,
- [0103] 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27로 기재되고, 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 29로 기재되고; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 37로 기재되고, 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 39로 기재된다.
- [0104] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체는 서열번호 23으로 기재된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 25로 기재된 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 이중특이적 항체의 중쇄는 서열번호 24로 기재된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고, 이의 경쇄는 서열번호 26으로 기재된 아미노산 서열에 의해 코딩된다.
- [0105] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, 단일 사슬 항체는 면역글로불린의 중쇄의 C 말단에 연결된다. 면역글로불린이 2개 중쇄를 가지므로, 2개 단일 사슬 항체 분자는 하나의 면역글로불린 분자에 연결된다. 바람직하게는, 2개 단일 사슬 항체 분자는 동일하다.
- [0106] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, 2개 단일 사슬 항체가 존재하고, 각 단일 사슬 항체의 1개 말단은 면역글로불린의 2개 중쇄 중 하나의 C 말단 또는 N 말단에 연결된다.
- [0107] 본 발명의 일부 구현예에서, 디설피드 결합은 단일 사슬 항체의 VH와 VL 사이에 존재한다. 항체의 VH와 VL 사이에 디설피드 결합을 도입시키기 위한 방법은 당분야에 충분히 공지되어 있고, 예를 들어, 다음의 문헌을 참조하고, 이들을 참조로 본 명세서에 편입시킨다: US 5,747,654; 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; 또는 Reiter et al., *Cancer Res.* 54(1994)2714-2718.
- [0108] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, 제1 단백질 기능성 영역은 제2 단백질 기능성 영역에 직접적으로 또는 링커 단편을 통해서 연결되고/되거나; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 직접적으로 또는 링커 단편을 통해서 연결된다.
- [0109] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, 링커 단편은 (GGGS)_n이고, 여기서 n은 양의 정수이고, 바람직하게는, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.
- [0110] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능성 영역 및 제2 단백질 기능성 영역

의 개수는 각각 독립적으로 1, 2 또는 그 이상이다.

- [0111] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체 경우에, 단일 사슬 항체는 면역글로불린의 중쇄의 C 말단에 연결된다.
- [0112] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 제1 단백질 기능성 영역은 제2 단백질 기능성 영역에 제1 링커 단편을 통해서 연결되고; 단일 사슬 항체의 중쇄 가변 영역은 단일 사슬 항체의 경쇄 가변 영역에 제2 링커 단편을 통해서 연결되고; 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편은 동일하거나 또는 상이하고;
- [0113] 바람직하게는, 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편의 아미노산 서열은 서열번호 47 및 서열번호 48로부터 독립적으로 선택되고;
- [0114] 바람직하게는, 제1 링커 단편 및 제2 링커 단편의 아미노산 서열은 서열번호 48로 기재된다.
- [0115] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체는 단일클론 항체이다.
- [0116] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체는 인간화 항체이다.
- [0117] 본 발명의 다른 양태는 단위 제제로서, 바람직하게는 종양을 치료하는데 사용되고, 1-10000 mg (바람직하게는 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg)의 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체 및 1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체, 및 임의로 본 발명에 따른 하나 이상의 화학요법 약물 (예컨대 백금계 약물 및/또는 플루오로우라실 항신생물성 약물)을 포함하는 것인 단위 제제에 관한 것으로서, 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및 화학요법 약물은 별도로 포장된다.
- [0118] 본 발명은 암 또는 종양을 예방하거나 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 하나 이상의 단위 제제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 바람직하게는 단위 제제 중 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체, 항-CD73 항체 및 화학요법 약물은 각각 별도로 투여된다.
- [0119] 본 발명의 다른 양태는 단일 용량 단위로서, 바람직하게는 종양의 치료에 사용되고, 0.1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체, 및 0.1-10000 mg (바람직하게는 1-1000 mg, preferably 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg, 200 mg 또는 100 mg)의 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는 것인 단일 용량 단위에 관한 것이다.
- [0120] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 항-CD73 항체, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 및/또는 화학요법 약물은 정맥내 주사 또는 정맥내 점적 주입에 적합한 형태이고, 바람직하게는 액체 형태이다.
- [0121] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체 및/또는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 유효량이 대상체에게 투여되는 단계는 외과적 처치 이전 또는 이후 및/또는 방사선요법 이전 또는 이후이다.
- [0122] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체 및/또는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 체중 kg 당 0.1-100 mg, 바람직하게는 1-10 mg이고; 대안적으로, 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-CD73 항체 및/또는 본 발명의 양태 중 어느 하나에 따른 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체의 단위 용량은 각 대상체에서 10-1000 mg, 바람직하게는 50-500 mg, 100-400 mg, 150-300 mg, 150-250 mg 또는 200 mg이고,
- [0123] 바람직하게는, 용량은 1일 2회 내지 격일 마다 약 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 마다 1회로 제공되고;
- [0124] 바람직하게는, 투여 경로는 정맥내 점적 주입 또는 정맥내 주사이다.
- [0125] 본 발명에서, 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학의 실험실 작업은 해당 분야에서 널리 사용되는 통상의 절차이다. 한편, 본 발명을 더욱 잘 이해하기 위해서, 관련 용어의 정의 및 설명이 하기에 제공된다.
- [0126] 본 명세서에서 사용되는 용어 EC₅₀은 최대 효과의 50%에 대한 농도, 즉 최대 효과의 50%를 초래할 수 있는 농도

를 의미한다.

[0127] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 일반적으로 폴리펩티드 사슬의 2개 쌍 (각각은 하나의 "경"(L)쇄 및 하나의 "중"(H)쇄와 쌍형성함)으로 이루어진 면역글로불린 분자를 의미한다. 항체 경쇄는 κ 및 λ 경쇄로서 분류된다. 중쇄는 μ , δ , γ , α , 또는 ϵ 으로서 분류된다. 항체의 이소타입은 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 정의된다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 약 3개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 더 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 중쇄 불변 영역 (C_H)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개 도메인 (C_{H1} , C_{H2} , 및 C_{H3})으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (V_L) 및 경쇄 불변 영역 (C_L)으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인 C_L 로 이루어진다. 항체의 불변 영역은 고전적인 보체 시스템의 제1 성분 ($C1q$)에 대한 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포)의 결합을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. V_H 및 V_L 영역은 초가변 영역 (상보성 결정 영역, 또는 CDR이라고 함) 및 CDR 사이에 분포되는 프레임워크 영역 (FR)이라고 불리는 보존된 영역으로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 다음의 순서로 아미노 말단에서부터 카르복실 말단으로 3개 CDR 및 4개 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 각각의 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역 (V_H 및 V_L)은 각각 항원-결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산의 지정은 [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 번호매김 체계의 정의를 기반으로 하며, 다음의 문헌을 참조한다: 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. 용어 "항체"는 항체를 생산하기 위한 임의의 특별한 방법에 의해 제한되지 않는다. 예를 들어, 항체는 특히 재조합 항체, 단일클론 항체 및 다클론 항체를 포함한다. 항체는 상이한 이소타입의 항체, 예컨대 IgG (예를 들어, 아형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM일 수 있다.

[0128] 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 기질 서열이 제공되면, Kabat, IMGT, Chothia, 및 AbM 번호매김 체계를 포함한, 항체의 CDR을 결정하기 위한 몇가지 방법이 존재한다. 그러나, 항체 또는 이의 변이체에 대한 CDR의 모든 정의의 적용은 본 명세서에서 사용되고 정의된 용어의 범주 내에 속해야 한다. 항체의 가변 영역의 아미노산 서열이 공지되어 있으면, 당업자는 일반적으로 서열 그 자체 이상의 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고, 특정한 CDR을 결정할 수 있다.

[0129] 본 명세서에서 사용되는 용어 "mAb" 및 "단일클론 항체"는 자발적으로 발생될 수도 있는 천연 돌연변이를 제외하고, 고도로 상동성인 항체의 군, 즉 동일한 항체 분자의 군으로부터 유래된 항체 또는 항체의 단편을 의미한다. 단일클론 항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대해서 매우 특이적이다. 단일클론 항체에 비해서, 다클론 항체는 일반적으로 항원 상의 상이한 에피토프를 인식하는 적어도 2개 또는 그 이상의 상이한 항체를 일반적으로 포함한다. 단일클론 항체는 일반적으로 Kohler 등 (Kohler G, Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975; 256(5517):495)이 최초로 보고한 하이브리도마 기술을 사용해 수득될 수 있지만, 재조합 DNA 기술 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호)을 사용하여 수득될 수도 있다.

[0130] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)의 CDR의 전부 또는 일부가 비-인간 항체 (도너 항체)의 CDR로 치환되었을 때 수득된 항체 또는 항체 단편을 의미하며, 도너 항체는 예상되는 특이성, 친화성 또는 반응성을 갖는 비-인간 (예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼) 항체일 수도 있다. 또한, 수용자 항체의 프레임워크 영역 (FR) 중 일부 아미노산 잔기는 또한 항체의 성능을 더 개선시키거나 또는 최적화시키기 위해서 상응하는 비-인간 항체의 아미노산 잔기 또는 다른 항체의 아미노산 잔기로 치환될 수도 있다. 인간화 항체에 대한 보다 상세한 설명은 예를 들어, 다음의 문헌을 참조한다: 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.

[0131] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된"은 자연 상태에서부터 인공적인 수단을 통해 수득되는 것을 의미한다. 일정한 "단리된" 물질 또는 성분이 자연에 존재하는 경우에, 이의 자연 환경에서 변화가 발생된 경우, 또는 자연 환

경으로부터 단리된 경우, 또는 둘 모두일 수도 있다. 예를 들어, 일정한 비-단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드가 일정한 살아있는 동물에서 천연적으로 발생되고, 이러한 자연 상태에서부터 높은 순도로 단리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드라고 한다. 용어 "단리된"은 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 인공적이거나 또는 합성된 물질 또는 다른 불순물의 존재를 배제하지 않는다.

[0132] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오타이드를 삽입할 수 있는 핵산 비히클을 의미한다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 허용하는 경우에, 이 벡터는 발현 벡터라고 한다. 벡터는 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 통해 숙주 세포로 도입될 수 있어서, 벡터에 의해 운반된 유전 물질 성분이 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 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 않는다. 벡터로서 사용될 수 있는 동물 바이러스는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 (예컨대 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 배콜로바이러스, 파필로마바이러스, 및 파포마바이러스 (예컨대 SV40)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 성분 및 리포터 유전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 발현을 제어하는 다양한 성분을 포함할 수도 있다. 또한, 벡터는 복제 개시 부위를 더 포함할 수도 있다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 원핵생물 세포, 예컨대 이. 콜라이 (*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스 (*bacillus subtilis*), 진균 세포 예컨대 효모 세포 또는 아스퍼질러스 (*aspergillus*), 곤충 세포, 예컨대 S2 드로소필라 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 의미한다.

[0134] 본 명세서에서 사용되는 용어 "특이적 결합"은 2개 분자 간 비무작위적 결합 반응, 예컨대 항체와 이것이 표적으로 하는 항원 간 반응을 의미한다. 일부 구현예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체 (또는 항원에 특이적인 항체)는 그 항체가 약 10^{-5} M 미만, 예를 들어, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 또는 그 이하 미만의 친화성 (K_D)으로 항원과 결합한다는 것을 의미한다.

[0135] 본 명세서에서 사용되는 용어 " K_D "는 항체와 항원 간 결합 친화성을 설명하기 위해 사용되는, 특이적 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형 상수를 의미한다. 보다 작은 해리 평형 상수는 더 강력한 항체-항원 결합 및 항체와 항원 간 더 높은 친화성을 의미한다. 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 또는 그 이하 미만의 해리 평형 상수 (K_D)로 항원 (예를 들어, PD-1 단백질)에 결합한다. K_D 는 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, Fortebio 분자 상호작용 장비를 사용해 결정될 수 있다.

[0136] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일클론 항체" 및 "mAb"는 동일한 의미를 갖고 상호교환적으로 사용될 수 있고, 용어 "다클론 항체" 및 "pAb"는 동일한 의미를 갖고 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 동일한 의미를 갖고 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 아미노산은 일반적으로 당분야에서 1-글자 및 3-글자 약어로 표시된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.

[0137] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적으로 및/또는 생리학적으로 상용성인 담체 및/또는 부형제를 의미한다. 이러한 담체 및/또는 부형제는 당분야에 충분히 공지되어 있고 (참조: 예를 들어, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edited by Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), pH 조절제, 계면활성제, 보조제 및 이온 강도 증강제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 포스페이트 완충제를 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween-80을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며; 이온 강도 증강제는 염화나트륨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0138] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효량"은 바람직한 효과를 수득하거나 또는 적어도 부분적으로 수득하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 질환 (예를 들어, 종양)에 대한 예방적 유효량은 질환 (예를 들어, 종양)을 예방하거나, 중지시키거나 또는 그의 개시를 지연시키는데 충분한 양을 의미하고, 치료적 유효량은 질환을 앓는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 중지시키기에 충분한 양을 의미한다.

[0139] 용어 "단일 용량 단위"는 바람직하게는 대상체의 체중 kg 당, 용법의 시점에 대상체에게 투여하고자 하는 본 발

명에 따른 항-CD73 항체 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체를 포함하는, 예를 들어, 앰플 중에 배치된, 주사와 같은, 단일 약학 제형을 의미한다. 본 발명의 특별한 구현예에서, 용법은 예를 들어 1일 2회 내지 격일 마다 약 1회, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 마다 1회의 투여 주기에 따라서 단일 용량 단위의 투여를 포함한다.

[0140] 본 발명에서, 용어 "제1" (예를 들어, 제1 단백질 기능성 영역 또는 제1 링커 단편) 및 "제2" (예를 들어, 제2 단백질 기능성 영역 또는 제2 링커 단편)는 표현의 구별 또는 명확성을 위해 사용되고, 달리 명시하지 않으면, 전형적인 순차적 의미를 갖지 않는다.

[0141] 약물 또는 치료제의 "치료적 유효량" 또는 "치료적 유효 용량"은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 사용될 때, 질환의 개시로부터 대상체를 보호하거나 또는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간의 증가, 또는 질환의 고통으로 초래되는 손상 또는 장애의 예방으로 입증되는 질환 퇴행을 촉진하는 약물의 임의량이다. 질환 퇴행을 촉진하는 치료제의 능력은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 사용하여서, 예컨대 인간 대상체에서의 임상 시험에서, 인간에서 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 어세이로 약물의 활성을 결정하여 평가될 수 있다.

[0142] 약물의 "예방적 유효량"은 암이 발생될 위험성이 있는 대상체 (예를 들어, 전악성 병태를 갖는 대상체)에게, 또는 암의 재발 위험성이 있는 대상체에게 단독으로 또는 항신생물제와 병용하여 투여했을 때 암의 발생 또는 재발을 방지하는 약물의 임의량을 의미한다. 일부 구현예에서, 예방적 유효량은 암의 발생 또는 재발을 완전하게 예방한다. 암의 발생 또는 재발의 "억제"는 암의 발생 또는 재발 확률의 감소 또는 암의 발생 또는 재발의 완전한 예방을 의미한다.

[0143] 유리한 효과:

[0144] 본 발명의 단일클론 항체는 CD73에 충분히 특이적으로 결합할 수 있고, 비-기질 경쟁 방식으로 CD73의 효소 활성 반응을 효과적으로 억제할 수 있으며, 아데노신의 생산을 감소시킬 수 있고, T 세포 활성 및 종양 억제 효과를 촉진할 수 있다. 한편, 본 발명의 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체와 병용된 항체는 종양 성장을 효과적으로 억제하는 약리학적 효과를 가지며, 이것은 항-VEGFA/PD-1 이중특이적 항체 또는 항-CD73 항체 단독에 비해서 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0145] 도 1은 C1q에 대한 19F3H2L3(hG1DM) 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 2는 C1q에 대한 MEDI9447 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 3은 C1q에 대한 야생형 IgG1 항체 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 4는 Fc γ RIIIa에 대한 19F3H2L3(hG1DM) 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 5는 Fc γ RIIIa에 대한 MEDI9447 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 6은 Fc γ RIIIa에 대한 야생형 IgG1 항체 결합의 동적 친화성 데이터의 적합화된 곡선을 도시한다.

도 7은 항-CD73 항체가 CD73 효소 활성을 효과적으로 억제하는 것을 도시한다.

도 8은 B6-hPD1/hPDL1/hCD73 마우스 MC38-hPDL1/hCD73 종양 모델에 대한 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)와 병용된 19F3H2L3(hG1DM) 항체의 효과를 도시한다.

도 9는 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)와 병용된 19F3H2L3(hG1DM) 항체에 의한 B6-hPD1/hPDL1/hCD73 마우스 MC38-hPDL1/hCD73 종양 모델의 체중 변화를 도시한다.

도 10은 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체와 병용된 항-CD73 특이적 항체가 사이토카인 IFN- γ 의 분비를 촉진한다는 것을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0146] 본 발명의 구현예는 실시예를 참조하여 하기에 상세하게 설명될 것이다. 당업자는 하기 실시예는 단지 본 발명의 설명을 위한 것이고, 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 해석되어서는 안된다는 것을 이해할 것이다. 특별한 기술 또는 조건이 명시되지 않은 실시예는 당분야의 공개물 (참조: 예를 들어, *Guide to Molecular Cloning*

Experiments, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., third edition, Science Press)에 기술된 기술 또는 조건에 따라서 또는 제품 설명서에 따라서 수행된다. 사용되는 시약 또는 장비는 이의 제조사가 명시되지 않으면, 상업적으로 입수가 가능한 통상적인 제품이다.

- [0147] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 BALB/c 마우스는 광둥 의학 실험 동물 센터 (Guangdong Medical Experimental Animal Center)에서 구매하였다.
- [0148] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 양성 대조군 항체 MEDI9447 (올렉클루맙)은 Akeso Biopharma, Inc.가 생산한 것이다, 이의 서열은 WHO 사이트에서 Melmmune Limited가 공개적으로 발표한 의약품의 국제 일반 명칭 (International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances) (INN) (World Health Organization (2016). "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). Proposed INN: List 116" (PDF). *WHO Drug Information*. 30(4), P661-662)에 기술된 항체 서열과 동일하였다.
- [0149] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)의 조합은 Akeso Biopharma, Inc.에서 생산한 것이었고, 이의 서열 및 제조는 공개 특허 CN112830972A에 기술된 항체 VP101(hG1DM)을 참조하며, 여기서 VP101(hG1DM)의 중쇄의 아미노산 전체 서열은 서열번호 23으로 기재되고, 이의 경쇄의 아미노산 전체 서열은 서열번호 25로 기재된다. VP101(hG1DM)은 IgG-scFv의 구조를 갖는데, IgG 부분은 항-VEGFA 항체이고, scFv 부분은 항-PD-1 항체이며, 항-VEGFA 항체는 서열번호 31로 기재된 HCDR1 서열, 서열번호 32로 기재된 HCDR2 서열, 서열번호 33으로 기재된 HCDR3 서열, 및 서열번호 27로 기재된 VH 서열을 갖고, 항-VEGFA 항체는 서열번호 34로 기재된 LCDR1 서열, 서열번호 35로 기재된 LCDR2 서열, 서열번호 36으로 기재된 LCDR3 서열, 및 서열번호 29로 기재된 VL 서열을 가지며; 항-PD1 항체는 서열번호 41로 기재된 HCDR1 서열, 서열번호 42로 기재된 HCDR2 서열, 서열번호 43으로 기재된 HCDR3 서열, 및 서열번호 37로 기재된 VH 서열을 갖고, 항-PD1 항체는 서열번호 44로 기재된 LCDR1 서열, 서열번호 45로 기재된 LCDR2 서열, 서열번호 46으로 기재된 LCDR3 서열, 및 서열번호 39로 기재된 VL 서열을 갖는다.
- [0150] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 양성 대조군 항체 야생 IgG1 대조군 항체의 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01834이다.
- [0151] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 C1q는 fizegerald (Cat No. A16050201)에서 구매하였고;
- [0152] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 FcγRIIIa-bio는 Sino Biological (Cat No. LC09JA0407)에서 구매하였으며;
- [0153] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 CD73 (5'-뉴클레아제) 특이적 억제제 APCP (알파, 베타-메틸렌 아데노신-5'-디포스페이트, 5'-α, β-메틸렌-아데노신 디포스페이트)는 Sigma (Cat No. M3763-10MG)로부터 비롯되었다.
- [0154] 본 발명의 하기 실시예에서, 이소타입 대조군 항체, 인간 항-암탉 계란 리소자임 IgG (즉, 항-HEL 항체, 또는 인간 IgG, hIgG로 축약, 또는 이소타입 대조군)의 서열은 "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., *J Mol Biol.*, 2007; 374(1):130-146)의 제목으로 Acierno 등이 보고한 연구의 Fab F10.6.6 서열의 가변 영역 서열로부터 유래되었다.
- [0155] **실시예 1: 항-CD73 항체 19F3의 제조**
- [0156] 1. 하이브리도마 세포주 LT014의 제조
- [0157] 항-CD73 항체를 제조하는데 사용된 항원은 인간 NT5E-His였다 (NT5E 경우, GenbankID: NP_002517.1, 위치: 1-552, Akeso Biopharma, Inc.에서 제조됨). 면역화된 마우스의 비장 세포를 채취하여 마우스의 골수종 세포와 융합시켜서 하이브리도마 세포를 제조하였다. 하이브리도마 세포는 항원으로서 인간 NT5E-바이오틴 (NT5E 경우, GenbankID: NP_002517.1, 위치: 1-552, Akeso Biopharma, Inc.에서 제조됨)을 사용한 간접 ELISA를 통해 스크리닝되었고, CD73에 특이적으로 결합하는 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포를 획득하였다. 스크리닝으로 획득된 하이브리도마 세포에 대해서 제한 희석을 수행하여 안정한 하이브리도마 세포주를 획득하였다. 하이브리도마 세포주는 하이브리도마 세포주 LT014로 명명하였고, 그로부터 분비된 단일클론 항체는 19F3으로 명명하였다.
- [0158] 하이브리도마 세포주 LT014 (CD73-19F3이라고도 함)는 수탁 번호 CCTCC NO: C2018137로서 2018년 6월 21일에 중국 생물 자원 보존 센터 (China Center for Type Culture Collection) (CCTCC)(센터 주소: 중국, 우한시, 우

한 대학, 우편 번호: 430072)에 기탁되었다.

[0159] 2. 항-CD73 항체 19F3의 제조

[0160] 상기 제조된 LT014 세포주는 화학 한정 배지 (1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유한, CD 배지)를 사용하여 37℃의 5% CO₂ 세포 인큐베이터에서 배양되었다. 7일 후에, 세포 배양 상등액을 수집하였고, 고속 원심분리 및 미세 여과막을 통한 진공 여과를 수행하였고, HiTrap 단백질 A HP 컬럼을 사용해 정제하여 항체 19F3을 수득하였다.

[0161] **실시예 2: 항-CD73 항체 19F3의 서열 분석**

[0162] mRNA는 RNeasy spin column 키트 (Qiagen, Cat. No. DP430)의 매뉴얼에 기술된 방법에 따라서 실시예 1에서 배양된 세포주 LT014로부터 추출되었다.

[0163] cDNA는 RT-PCR을 위해 Invitrogen SuperScript[®] III 제1 가닥 합성 시스템의 매뉴얼에 따라서 합성되었고 PCR을 통해서 증폭되었다.

[0164] PCR-증폭 산물은 pEASY-T1 클로닝 키트 (Transgen CT101)의 매뉴얼에 따라서 TA 클로닝이 직접 수행되었다.

[0165] TA-클로닝된 산물을 직접적으로 시퀀싱하였고, 항-CD73 항체 19F3의 시퀀싱 결과는 다음과 같았다:

[0166] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 1로 기재되고, 길이는 363 bp이다.

[0167] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재되고 길이는 121 aa이고;

[0168] 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 15, 16 및 17로 기재된다.

[0169] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 3으로 기재되고 길이는 339 bp이다.

[0170] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 4로 기재되고 길이는 113 aa이고;

[0171] 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 18, 19 및 20으로 기재된다.

[0172] **실시예 3. 인간화 항-인간 CD73 항체의 경쇄 및 중쇄의 설계 및 제조**

[0173] 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)의 가변 영역 서열은 실시예 2에서 수득된 항체 19F3의 서열을 기반으로 하고, 인간 CD73 단백질의 3차원 결정 구조를 기반으로 하는 모델 설계 돌연변이에 따라 항체 모델을 컴퓨터 모델링하여서 수득되었고 (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain. *Eur J Biochem.* 1998; 258(2):831-6); 인간화 항체의 설계된 가변 영역 서열은 다음과 같았다:

[0174] (1) 인간화 단일클론 항체 19F3H1L1(hG1DM)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0175] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 5로 기재되고 길이는 363 bp이다.

[0176] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 6으로 기재되고, 길이는 121 aa인 한편, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 15, 16 및 17로 기재된다.

[0177] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 7로 기재되고, 길이는 339 bp이다.

[0178] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 8로 기재되고, 길이는 113 aa인 한편, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 18, 19 및 20으로 기재된다.

[0179] (2) 인간화 단일클론 항체 19F3H2L2(hG1DM)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0180] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 9로 기재되고, 길이는 363 bp이다.

[0181] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재되고, 길이는 121 aa인 한편, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 15, 16 및 17로 기재된다.

[0182] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 11로 기재되고, 길이는 339 bp이다.

[0183] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 12로 기재되고, 길이는 113 aa인 한편, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 18, 19 및 20으로 기재된다.

[0184] (3) 인간화 단일클론 항체 19F3H2L3(hG1DM)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

- [0185] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 9로 기재되고, 길이는 363 bp이다.
- [0186] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재되고, 길이는 121 aa인 한편, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 15, 16 및 17로 기재된다.
- [0187] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 서열번호 13으로 기재되고, 길이는 339 bp이다.
- [0188] 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 14로 기재되고, 길이는 113 aa인 한편, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 18, 19 및 20으로 기재된다.
- [0189] 3. 인간화 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3 (hG1DM)의 제조
- [0190] 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)의 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01834이다.
- [0191] Ig 감마-1 사슬 C 영역, 수탁 번호: P01857을 기반으로, 인간화 항체는 중쇄 불변 영역 (서열번호 21)의 위치 234 (L234A)에서 류신의 알라닌으로 점 돌연변이 및 위치 235 (L235A)에서 류신의 알라닌으로 점 돌연변이를 도입시켜서 획득되었고, 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)으로 명명되었다.
- [0192] 19F3H1L1(hG1DM)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 19F3H2L2(hG1DM)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 및 19F3H2L3(hG1DM)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 개별적으로 pUC57simple (Genscript이 제공함) 벡터에 클로닝하여서 pUC57simple-19F3H1(hG1DM) 및 pUC57simple-19F3L1; pUC57simple-19F3H2(hG1DM), pUC57simple-19F3L2 및 pUC57simple-19F3L3을 획득하였다. [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition)]에 기술된 표준 기술을 참조하여서, EcoRI&HindIII 분해로 합성된 중쇄 및 경쇄 전체 길이 유전자를 제한 효소 (EcoRI&HindIII)에 의한 분해를 통해서 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM), pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM), pcDNA3.1-19F3L2 및 pcDNA3.1-19F3L3을 획득하였고, 제조합 발현 플라스미드의 중쇄/경쇄 유전자에 대해서 추가로 시퀀싱 분석을 수행하였다. 다음으로, 상응하는 경쇄 및 중쇄 제조합 플라스미드를 포함하는 설계된 유전자 조합 (pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L2, 및 pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L3)은 개별적으로 293F 세포에 동시-형질감염되었고, 배양 용액을 수집하여 정제하였다. 서열을 검증한 후에, 내독소-무함유 발현 플라스미드를 제조하였고, 항체 발현을 위해서 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염되었다. 배양 용액을 7 일 후에 수집하였고, 단백질을 A 컬럼 상에서 친화성 정제를 수행하여 인간화 항체를 획득하였다.
- [0193] **실시예 4: 항-CD73 항체와 C1q 및 FcγRIIIa의 동적 친화성 어세이**
- [0194] (1) 항-CD73 항체와 C1q의 동적 친화성 어세이
- [0195] 샘플 희석 완충액은 PBS (0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH7.4)였다. 50 μg/mL의 항체를 약 2.0 nm의 고정 높이에서 FAB2G 센서 상에 고정화시켰다. 센서는 차단을 위해서 60초 동안 완충액 중에서 평형화하였고, 0.63-10 nM (연속 2배 희석)의 농도에서 항원 C1q에 대한 센서 상에 고정화된 항체의 결합을 60초 동안 어세이하였다. 항원-항체는 60초 동안 완충액 중에서 해리시켰다. 센서는 각각 5초 동안 10 mM 글리신 pH 1.7 중에서 4회 재보충해주었다. 샘플 플레이트의 진탕 속도는 1000 rpm이었고, 온도는 30℃였고, 주파수는 0.6 Hz였다. 데이터는 1:1 모델 적합화를 통해 분석하여 친화성 상수를 획득하였다. 데이터 획득 소프트웨어는 Fortebio Data Acquisition 7.0이었고, 데이터 분석 소프트웨어는 Fortebio Data Analysis 7.0이었다.
- [0196] 표 1 및 도 1-3에 표시된 결과에 따라서, 19F3H2L3(hG1DM)이나 MEDI9447은 C1q에 대한 결합 활성을 갖지 않았다.

샘플 ID	KD (M)	kon (1/Ms)	표준 오차 (kon)	kdis(1/s)	표준 오차 (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
야생형 IgG1 항체	1.37E-09	5.53E+06	4.27E+05	7.58E-03	4.84E-04

KD = kdis/kon

[0197]

[0198]

(2) 항-CD73 항체와 Fc γ RIIIa의 동적 친화성 어세이

[0199]

샘플 희석 완충액은 PBS (0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH 7.4)였다. 0.5 μ g/mL Fc γ RIIIa (from Sino Biological)를 SA 센서 상에 120초 동안 고정화하였다. 센서는 60초 동안 완충액 중에서 평형화시켰고, 31.3-500 nM (연속 2배 희석)의 농도에서 항체에 대한 센서 상의 고정화된 CD16a의 결합을 60초 동안 어세이하였다. 항체-항원은 60초 동안 완충액 중에서 해리시켰다. 센서는 10 mM NaOH로 재보충하였다. 온도는 30℃였고, 주파수는 0.6 Hz였다. 데이터는 1:1 모델 적합화를 통해 분석하여 친화성 상수를 획득하였다.

[0200]

표 2 및 도 4-6에 표시된 결과에 따라서, 19F3H2L3(hG1DM)은 Fc γ RIIIa에 결합하지 않았지만, MEDI9447은 Fc γ RIIIa에 대한 결합 활성을 가졌다.

샘플 ID	KD (M)	kon (1/Ms)	표준 오차 (kon)	kdis(1/s)	표준 오차 (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	1.41E-07	2.43E+05	4.36E+04	3.42E-02	2.08E-03
야생형 IgG1 항체	1.25E-07	1.76E+05	2.22E+04	2.20E-02	1.11E-03

KD = kdis/kon

[0201]

[0202]

실시예 5. 세포에서 내생적으로 발현되는 CD73의 효소 활성에 대한 항-CD73 항체의 억제 검출

[0203]

실험 절차는 다음과 같았다. 양호한 조건의 대수기 MDA-MB-231 세포 (ATCC, HTB-26)를 채취하였고, 혈청 무함유 RPMI-1640 배양 용액에 재현탁한 다음에, 계수하였다. MDA-MB-231 세포를 96-웰 플레이트에 3×10^4 세포/100 μ L/웰로 파종하였다. 항체를 혈청 무함유 RPMI-1640 배양 용액에 200 μ g/mL의 초기 농도 (연속 2.5-배 희석)로 희석하였다. 항체를 96-웰 플레이트에 50 μ L/웰로 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1시간 후에, 50 μ L의 RPMI-1640-희석된 600 μ M AMP를 각 웰에 첨가하였다. 3시간 후에, 25 μ L의 세포 배양 상등액을 채취하였고 새로운 96-웰 플레이트로 옮겼으며, 25 μ L의 100 μ M ATP를 각 웰에 첨가하였다. 50 μ L의 CTG (CellTiter-Glo[®] One Solution Assay, promega, Cat. No. G8461) 발색 용액을 발색을 위해 각 웰에 첨가하였고, 데이터는 다중-표지 마이크로플레이트 시험기 (PerkinElmer, Cat No. 2140-0020)로 판독하였다. 이소타입 대조군 항체 및 CD73-특이적 억제제 APCP는 각각 음성 및 양성 대조군으로서 선택되었다.

[0204]

실험 결과는 다음과 같았다: 도 7에 도시된 바와 같이, 19F3, 19F3H2L3(hG1DM), 19F3H2L3(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)은 모두가 MDA-MB-231에서 AMP를 아데노신 A로 촉매하는 내생적으로 발현된 CD73 효소의 활성을 용량-의존적으로 억제하여서, 생성된 평균 형광 강도 RLU를 용량 의존적으로 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0205]

상기 실험 결과는 첨가된 AMP가 MDA-MB-231에 의해 세포 표면 상에 내생적으로 발현된 CD73 효소에 의해 촉매될 수 있어서, CD73 항체 처리없는 조건 하에서 아데노신으로 전환될 수 있으므로, 루시페라제 활성의 억제가 경감되었다는 것을 보여준다. 그러나, 항체의 첨가 이후에, CD73은 항체가 결합되었으므로, 이의 효소 활성이 감소되어서, AMP는 아데노신으로 전환될 수 없었다. 이것은 항-CD73 항체가 비-기질 경쟁 방식으로 CD73의 효소 활성 반응을 효과적으로 억제하고, 아데노신의 생산을 감소시킨다는 것을 시사하였다.

[0206]

실시예 6: 마우스 종양 세포 피하 이종이식 모델에서 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체와 병용된 항-CD73 특이

적 항체의 약력학적 평가

[0207] 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)와 병용하여 항-CD73 특이적 항체 19F3H2L3(hG1DM)의 생체내 항-종양 활성을 결정하기 위해서, MC38-hPDL1/hCD73 세포 (GemPharmatech Co., Ltd.에서 구매함)를 먼저 6.7주령-7.7주령의 암컷 B6-hPD1/hPDL1/hCD73 마우스 (GemPharmatech Co., Ltd.에서 구매함)에 피하로 접종하였고, 평균 종양 부피가 80-120 mm³에 도달했을 때, 마우스를 종양 부피를 기반으로 그룹당 6마리 마우스의 4개 그룹으로 무작위 분류하였다. 그룹화 당일 D0로 정의하였고, 투여는 그룹화 당일 D0에 시작하였다. 조합된 투여 그룹의 투여 방식은 다음과 같았다: 약물을 별개로 제제화하였고, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)를 먼저 투여하였고, 2시간 후에 항-CD73 특이적 항체 19F3H2L3(hG1DM)을 투여하였다. 모델링 및 특정한 용법은 표 3에 표시된다. 투여 후에, 각 그룹에서 종양의 길이 및 너비를 측정하였고, 종양 부피를 계산하였다.

[0208] 표 3: MC38-hPDL1/hCD73 이식된 종양 B6-hPD1/hPDL1/hCD73 마우스 모델의 처치를 위한 19F3H2L3(hG1DM) 항체 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 VP101(hG1DM)의 병용 용법

그룹화	마릿수	이식	투여
이소타입 대조군 30 mg/kg	6	MC38-hPDL1/hCD73이 B6-hPD1/hPDL1/hCD73 마우스에게 2 × 10 ⁶ 세포로 피하 주사되었다.	이소타입 대조군 항체 (Akeso Biopharma, Inc.에서 생산됨, 배치 번호 20200704)는 30 mg/kg으로 3주 동안 주당 2회 복강내로 주사되었다.
19F3H2L3 (hG1DM) 30mg/kg	6		19F3H2L3(hG1DM) (Akeso Biopharma, Inc.에서 생산됨, 배치 번호 A119C20200701)은 30 mg/kg으로 3주 동안 주당 2회 복강내로 주사되었다.
VP101 (hG1DM) 0.5mg/kg	6		VP101(hG1DM) (Akeso Biopharma, Inc.에서 생산됨, 배치 번호 B112C20200502)은 0.5 mg/kg으로 3주 동안 주당 2회 복강내로 주사되었다.
19F3H2L3 (hG1DM) 30mg/kg, VP101 (hG1DM) 0.5mg/kg	6		19F3H2L3(hG1DM)은 30 mg/kg으로 3주 동안 주당 2회 복강내로 주사되었고; VP101(hG1DM)은 0.5 mg/kg으로 3주 동안 주당 2회 복강내 주사되었다.

[0209] 결과는 도 8에 도시된다. 결과는 이소타입 대조군 항체와 비교하여, 19F3H2L3(hG1DM) 항체 및 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM) 둘 모두가 마우스 종양의 성장을 효과적으로 억제할 수 있었다는 것을 보여주었고, 19F3H2L3(hG1DM) 및 VP101(hG1DM)의 병용 그룹은 모델에서 조합된 항-종양 효능을 보였고, 병용 그룹은 종양의 억제에서 시험된 약물의 단일 사용 그룹에 비해 우수하였다.

[0211] 또한, 도 9에 도시된 바와 같이, 종양 보유 마우스는 시험 약물 19F3H2L3(hG1DM) 및 VP101(hG1DM)의 단일 사용 및 병용 사용에 대해 충분히 내성이 있었으며, 각 그룹은 종양-보유 마우스의 체중에 대해서는 효과가 없었다.

[0212] 실시예 7: 혼합 림프구 반응을 사용한 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체와 병용된 항-CD73 특이적 항체에 의한 사이토카인 분비 촉진의 검출

[0213] 본 발명에서, PDL1의 GenBank 수탁 번호는 NP_054862.1이고, PDL1FL은 PDL1 유전자의 전체 길이에 해당된다.

[0214] 바이러스 포장 후 인간 PD-L1 과발현 렌티바이러스 벡터 plenti6.3/V5-PDL1FL-BSD (plenti6.3/V5-BSD는 Invitrogen에서 구매함, 제품 번호: K5315-20) 감염된 Raji 세포, 및 Raji-PDL1 세포주는 BSD (블라스티시딘,

Gibco 제품 번호: R210-01) 약물 스크리닝 이후에 수득되었다.

[0215] 정상 인간 PBMC는 Ficoll-Paque™ Plus의 작업 설명서에 따른 분리에 의해 수득되었다. 실험 2일전에, PBMC를 해동하였고, 완전 배지 (1640 + 10% FBS) 중에 37°C에서 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 배양하였다. 2시간 후에, PBMC 상태가 회복되었을 때, SEB (0.5 µg/mL의 최종 농도, Toxin technology, Cat No. BT202)를 첨가하여 2일 동안 세포를 자극하였다. 실험 당일에, Raji-PDL1 세포 (Akeso Biopharma, Inc.에서 구축됨)를 수집하였고, 원심분리하고, 재현탁 (분석 배지 1640 + 10% FBS)하였으며, 계수하여서, 2×10^6 세포/mL의 밀도로 조정하였다. MMC (미토마이신 C, 2 µg/mL의 최종 농도, Stressmarq, Cat No. SIH-246-10MG)를 첨가하였고, 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 처리하였다. A549 폐암 세포 (Chinese academy of sciences에서 구매)를 통상적으로 수집하고, 원심분리, 재현탁 및 계수하였다. SEB 자극 2일 후 PBMC 및 MMC 처리 후 Raji-PDL1 세포를 수집하였고, 96-웰 U-형상 플레이트 (Corning, Cat No. 3799)에 각각 PBMC 경우 1×10^5 세포/웰, Raji-PDL1 경우 1×10^5 세포/웰, 및 A549 경우 1×10^4 세포/웰로 파종을 수행하였고; AMP (아데노신-5'-모노포스페이트, TCI, Cat No. A0158) 및 항체를 실험 설계에 따라 첨가하였고, 음성 대조군 (PBMC + Raji-PDL1 + A549 + AMP) 및 이소타입 대조군 (hIgG1 및 hIgGDM)을 설정하였다. 세포는 총 3일 동안 인큐베이션하였다 (시스템의 최종 부피는 200 µL였음). 3일 후에, 세포를 250 X g로 5분 동안 원심분리 (Beckman centrifuge)하였고, 세포 상등액을 수집하였다. IFN-γ 함량을 Dakewe 키트를 사용해 검출하였다.

[0216] 결과는 도 10에 도시된다. 결과는 이소타입 대조군 항체와 비교하여, 항-PD-1-항-VEGFA 이중특이적 항체 VP101(hG1DM)가 혼합 림프구 시스템에서 사이토카인 IFN-γ의 분비를 효과적으로 촉진할 수 있고, 19F3H2L3(hG1DM) + VP101(hG1DM)의 병용 그룹이 조합된 항-종양 효능을 보인다는 것을 보여준다. 병용 그룹은 사이토카인 IFN-γ의 분비 촉진에서 단일요법 그룹에 비해 우수하고, 150 nM 19F3H2L3(hG1DM) + VP101(hG1DM)의 조합된 활성은 300 nM 19F3H2L3(hG1DM) 또는 VP101(hG1DM) 단일요법의 것에 비해 우수하다.

[0217] 서열목록

19F3의 중쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 1)

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCG
CCTCCATGCGGATGCTTGTGAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGGCT
ATACAATGAAGTGGGTGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGTGG
ATCGGCCTGATCAACCCCTACAATGCCGGCACCAGCTATAACCAGAAG
TTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGAGCTCCTCTACCGC
CTACATGGAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCCGTGTACTA
TTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTG
GGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGAGCTCC

19F3의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 2)

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLE
WIGLINPYNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYY
CARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSS

[0218]

19F3의 경쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 3)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGG
ACAGAAGGTGACAATGTCTTGTAAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAACT
CCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC
CAGTCTCCCAAGCTGCTGGTGTACTTTGCCAGCACCAAGGGAGTCCGG
AGTGCCTGACAGATTCATCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTCACCC
TGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCTGC
CAGCAGCACTACGACACCCCTTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCT
GGAGATCAAG

19F3의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 4)

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQ
SPKLLVYFASTRESGVDPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHY
DTPYTFGGGTKLEIK

[0219]

19F3H1L1(hG1DM)의 중쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 5)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAG
CCTCTATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCT
ATACAATGAACTGGGTGAAGCAGGCCACGGCCAGAATCTGGAGTGG
ATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAG
TTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGC
CTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACT
ATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATT
GGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC

19F3H1L1(hG1DM)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 6)

QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLE
WIGLINPYNAGTSYNQKFQ GKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYY
CARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSS

[0220]

19F3H1L1(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 7)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGG
AGAGAGGGTGACAATGTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACT
CCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC
CAGGCCCCTAAGCTGCTGGTGTACTTTGCCTCTACCAGGGAGAGCGG
AGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCC
TGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCTGC
CAGCAGCACTACGATACCCCTTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

19F3H1L1(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 8)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQ
APKLLVYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHY
DTPYTFGGGTKLEIK

[0221]

19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)의 중쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAG
CCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGC
TATACAATGAAGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTG
GATCGGCCTGATCAACCCCTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAA
GTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAG
CCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTAC
TATTGCGCCCCGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATT
GGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC

19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 10)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLE
WIGLINPYNAGTSYNQKFQGVLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY
CARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSS

[0222]

19F3H2L2(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 11)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGG
AGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGTGAACT
CCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC
CAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGG
AGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCC
TGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATTGC
CAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

19F3H2L2(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 12)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQA
PKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYD
TPYTFGGGTKLEIK

[0223]

19F3H2L3(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 핵산 서열: (서열번호 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGG
AGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGTGAACT
CCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC
CAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGG
AGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCC
TGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGC
CAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

19F3H2L3(hG1DM)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열: (서열번호 14)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQA
PKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYD
TPYTFGGGTKLEIK

[0224]

19F3 및 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM), 및 19F3H2L3(hG1DM)의 CDR

HCDR1: GYSFTGYT (서열번호 15)

HCDR2: INPYNAGT (서열번호 16)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (서열번호 17)

LCDR1: QSLLNSSNQKNY (서열번호 18)

LCDR2: FAS (서열번호 19)

LCDR3: QQHYDTPYT (서열번호 20)

[0225]

19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3 (hG1DM)의 중쇄 불변 영역의 서열 (330 aa, 돌연변이 부위 밑줄표시됨):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)

[0226]

19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) 및 19F3H2L3(hG1DM)의 경쇄 불변 영역의 서열 (107 aa):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC (서열번호 22)

[0227]

VP101(hG1DM)의 중쇄의 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW
VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYP
DSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRV
TFTCRASQDINTYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQ
DYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (서열번호 23)

[0228]

VP101(hG1DM)의 중쇄의 핵산 서열:

GAGGTGCAGCTGGTCCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCG
GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAAC
TATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTGCGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCAC
TGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCT
ACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
TGACGTGTGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGC
ACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCAC
CAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCC
CTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGA
GTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTG
TCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGT
CCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCTCTTTCTCC
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTG
TGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACT
GGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAG
GGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAG
TCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGG
CCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCC
AGGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCA
AGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGA
CAGCCCAGAAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCTCGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTG
GCAGCAGGGCAACGTGTTCTTGTTCGTGATGCATGAAGCACTGC
ACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGCAAGGGC
GGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGA

[0229]

GGCGGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGG
TGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTC
GCCTTTAGCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAA
GGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACAT
ACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGATAACT
CTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC
ACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTGC
CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCG
GCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGG
CAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGT
GGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCCAGGATATCAACA
CCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACA
CTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTT
TCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTT
CCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA

[0230]

(서열번호 24)

VP101(hG1DM)의 경쇄의 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 25)

[0231]

VP101(hG1DM)의 경쇄의 핵산 서열:

GATATTGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGC
GACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACTAC
CTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGAT
CTACTTACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCG
GATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGC
CTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATG
GACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCC
GCTCCAGTGTCTTCATTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCC
GGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTAGAGA
GGCAAAAGTGCAAGTGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAAT
TCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAG
TCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATA
AAGTGTATGCAITGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTC
ACCAAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (서열번호 26)

[0232]

베바시주맵 중쇄 가변 영역 (베바시주맵-Hv)의 아미노산 서열: (123 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW
VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS (서열번호 27)

[0233]

베바시주맵 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열: (369 bp)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCG
GGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAAC
TATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCAC
TGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCT
ACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
TGACGTGTGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC

[0234]

(서열번호 28)

베바시주맵 경쇄 가변 영역 (베바시주맵-Lv)의 아미노산 서열: (107 aa)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQG
TKVEIK (서열번호 29)

[0235]

베바시주맵 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열: (321 bp)

GATATTGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGC
GACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCTCAACTAC
CTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGAT
CTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCG
GATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTCTAGTCTGCAGC
CTGAGGATTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATG
GACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG (서열번호 30)

[0236]

베바시주맵의 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같다:

HCDR1: GYTFTNYG (서열번호 31)

HCDR2: INTYTGEF (서열번호 32)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (서열번호 33)

[0237]

베바시주맵의 경쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같다:

LCDR1: QDISNY (서열번호 34)

LCDR2: FTS (서열번호 35)

LCDR3: QQYSTVPWT (서열번호 36)

[0238]

14C12HIL1(M)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 37로 기재된다.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDW
VATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC
ANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 37)

[0239]

14C12HIL1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열: (354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCG
GGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCCTTTAGCTCCT
ACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTG
GGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACCTACTATCCTGACAG
CGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATC
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTAC
TATTGTGCCAACCGCTACGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAG
GGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (서열번호 38)

[0240]

14C12HIL1(M)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIY
RANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFG
AGTKLELKR (서열번호 39)

[0241]

14C12HIL1(M)의 경쇄 가변 영역 14C12L1(M)의 핵산 서열:

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGC
GACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCCAGGATATCAACACCTAC
CTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACACTGAT
CTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCG
GCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAG
CCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCC
CTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA (서열번호

[0242]

40)

14C12H1L1(M)의 중쇄 가변 영역의 CDR:

HCDR1: GFAFSSYD (서열번호 41)

HCDR2: ISGGGGRYT (서열번호 42)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (서열번호 43)

14C12H1L1(M)의 경쇄 가변 영역의 CDR:

LCDR1: QDINTY (서열번호 44)

LCDR2: RAN (서열번호 45)

LCDR3: LQYDEFPLT (서열번호 46)

[0243]

제1 링커 단편의 아미노산 서열:

GGGGSGGGSGGGGS (서열번호 47)

제2 링커 단편의 아미노산 서열:

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열번호 48)

[0244]

수탁번호

[0245]

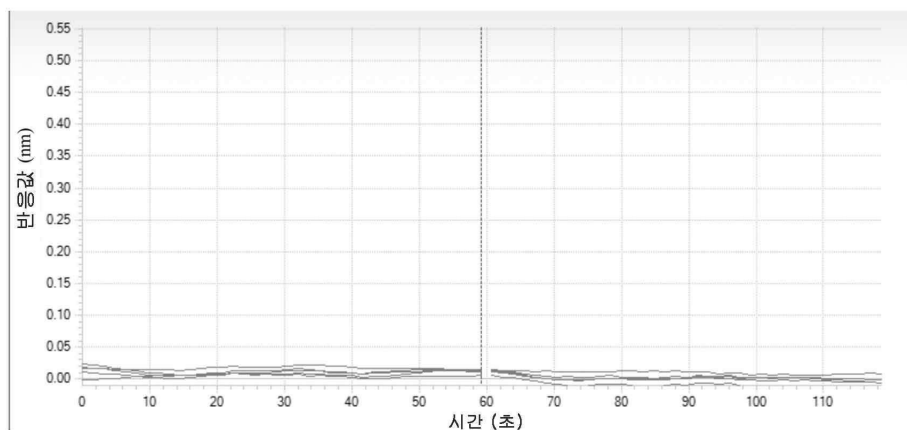
기탁기관명 : 중국 생물 자원 보존 센터

수탁번호 : CCTCCC2018137

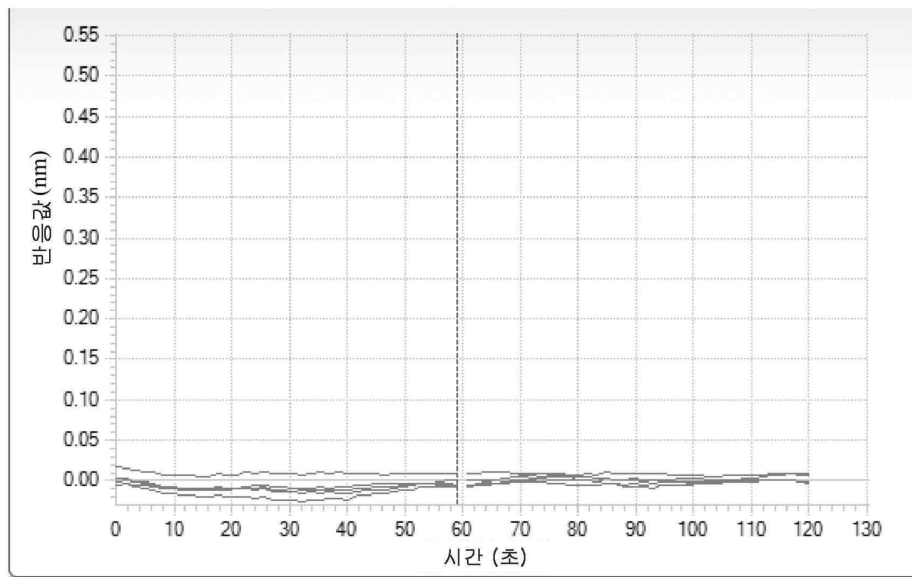
수탁일자 : 20180621

도면

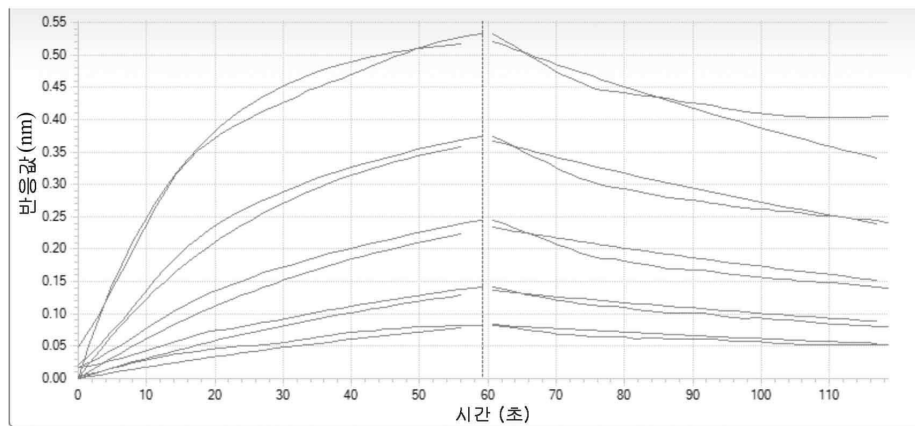
도면1



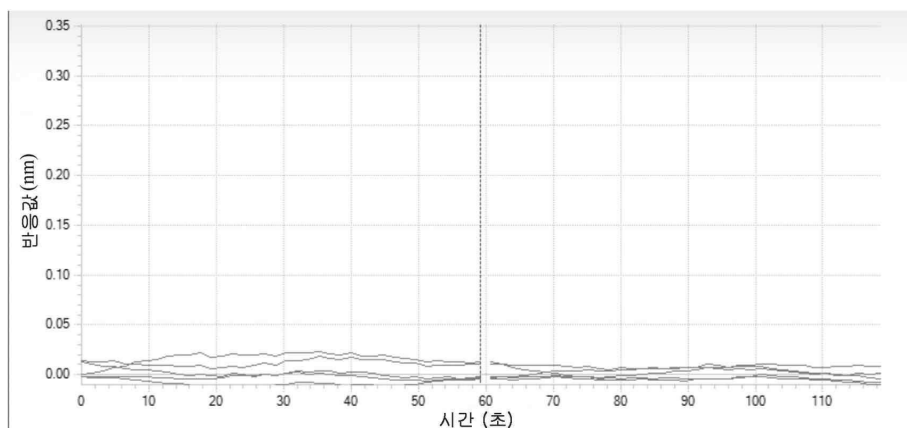
도면2



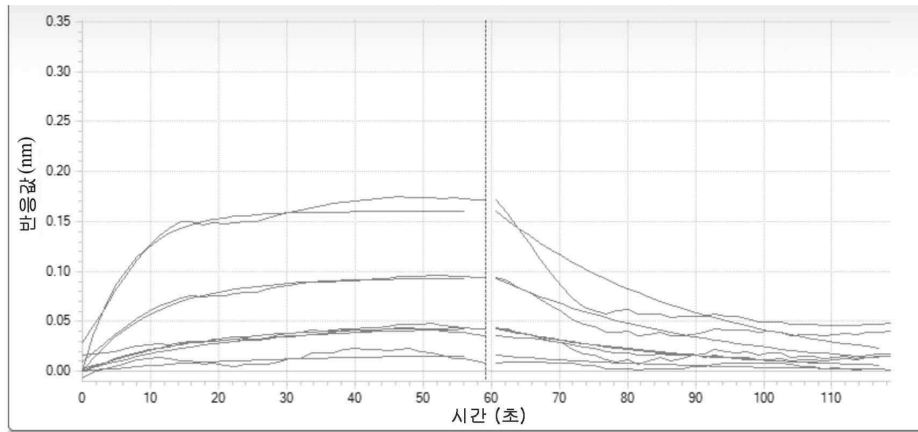
도면3



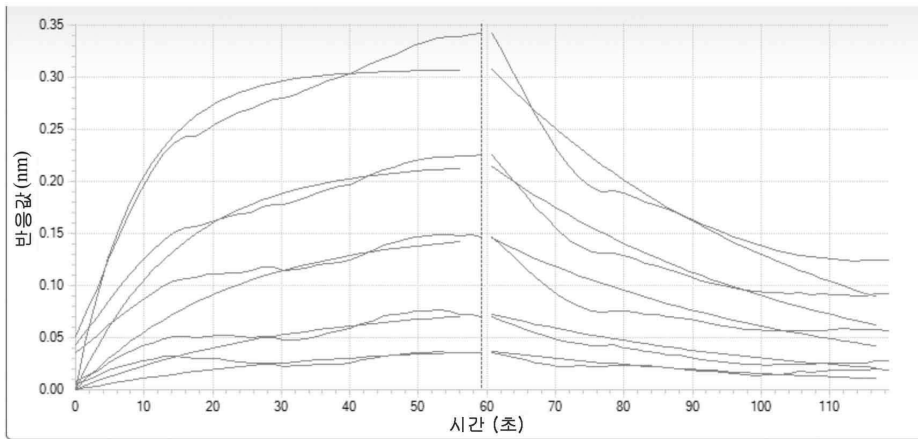
도면4



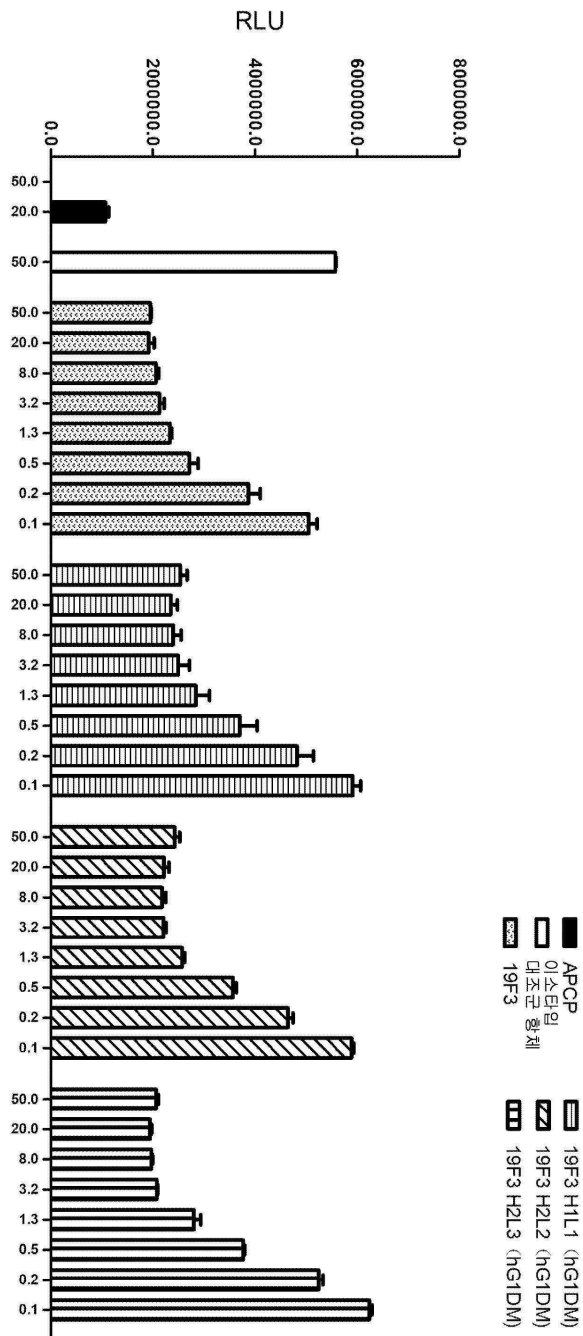
도면5



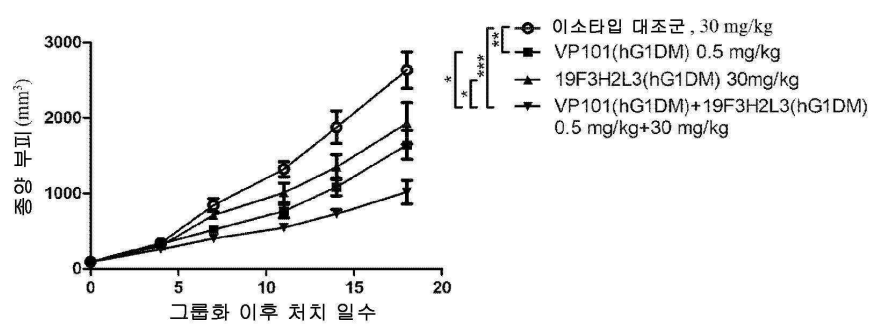
도면6



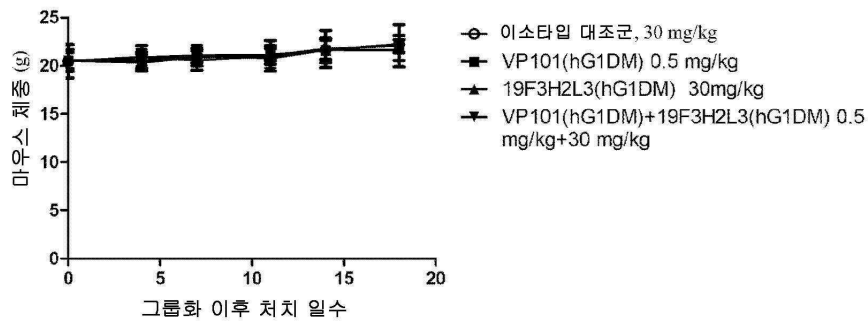
도면7



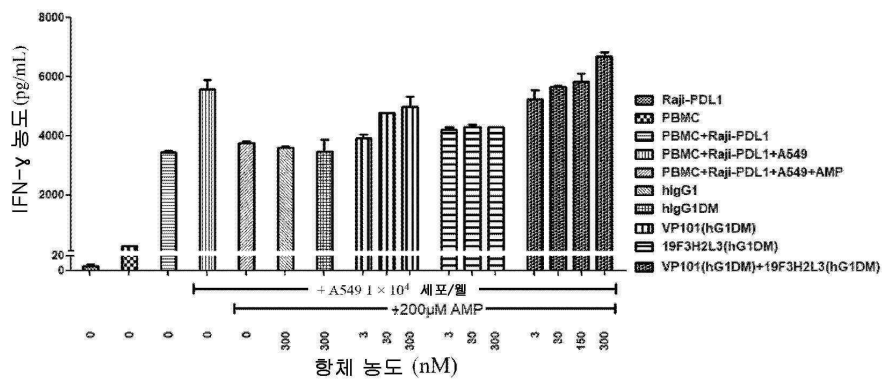
도면8



도면9



도면10



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.