(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023471
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7000422
(22) 출원일자(국제) 2023년06월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월07일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/098753
(87) 국제공개번호 WO 2023/236971
국제공개일자 2023년12월14일
(30) 우선권주장
202210639331.4 2022년06월08일 중국(CN)

(71) 출원인
상하이 후아오타 바이오파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국 201203 상하이 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존, 넘버 538 카이룬 로드, 2 빌딩, 1스트 플로어
후아보 바이오팜 (상하이) 컴퍼니 리미티드
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 1 1층
(72) 발명자
쉬 진전
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
지아 후이펑
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

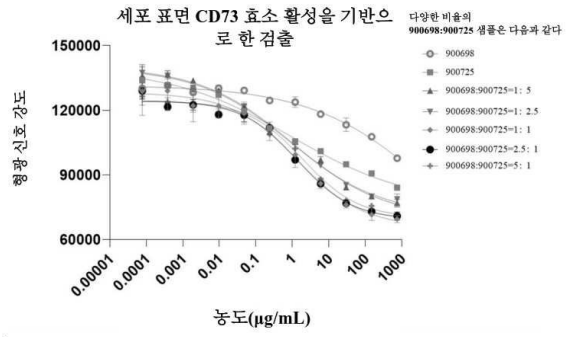
전체 청구항 수 : 총 102 항

(54) 발명의 명칭 **CD73 항체 칵테일 요법**

(57) 요 약

약학적 조합물으로서, CD73에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 단백질 및 CD73에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단백질을 포함하고, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질에는 서로 다른 CD73 항원 결합 에피토프가 있으며, 또한 상기 약학적 조합물을 포함하는 약학적 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
(72) 발명자
잔 이판
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
판 시안페이
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
위 하이지아
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
왕 샤오지에
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
시아 시민
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층
주 시앙양
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에어리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 차이룬 로드 538 빌딩 2 1층

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD73에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 단백질 및 CD73에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조합물로서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 상이한 CD73 항원 결합 에피토프를 갖는, 약학적 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질 및 상기 제2 항원 결합 단백질은 CD73 단백질에 비경쟁적 방식으로 결합하는, 약학적 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 혼합물 형태로 존재하는, 약학적 조합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함하고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함하고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함하고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 12

제9항 또는 제11항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함하고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함하고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함하고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 12(WAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함하고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함하고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함하고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함하고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함하고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함하고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함하고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함하고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 30(LAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함하고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래되는, 약학적 조합물.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함하고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조합물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:5 내지 5:1인, 약학적 조합물.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:5인, 약학적 조합물.

청구항 44

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:2.5인, 약학적 조합물.

청구항 45

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:1인, 약학적 조합물.

청구항 46

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 2.5:1인, 약학적 조합물.

청구항 47

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 5:1인, 약학적 조합물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조합물 및 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 3 내지 300mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 3 내지 150mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 5 내지 100mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 10 내지 100mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 10 내지 50mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 54

제48항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 30±5mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조합물의 농도는 30±3mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 56

제48항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충액을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 완충액은 산성 완충액을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 완충액은 중성 완충액을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산 완충액, 히스티딘-히스티딘 염산 완충액, 구연산염-구연산 완충액, 인산염 완충액, 히스티딘-아세트산 완충액, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (Tris)-염산염 완충액, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹(group)으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산, 구연산염-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산염, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액은 아세트산나트륨-아세트산, 구연산나트륨-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산이수소나트륨-인산수소이나트륨, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산 및 인산-구연산나트륨으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 62

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 100mM인, 약학적 조성물.

청구항 63

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 60mM인, 약학적 조성물.

청구항 64

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 50mM인, 약학적 조성물.

청구항 65

제56항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 약 10 내지 40mM인, 약학적 조성물.

청구항 66

제56항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 20±5mM인, 약학적 조성물.

청구항 67

제56항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액의 농도는 20±2mM인, 약학적 조성물.

청구항 68

제48항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 5 내지 7인, 약학적 조성물.

청구항 69

제48항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 6±0.5인, 약학적 조성물.

청구항 70

제48항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 6±0.3인, 약학적 조성물.

청구항 71

제48항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 6±0.1인, 약학적 조성물.

청구항 72

제48항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 6.5±0.3인, 약학적 조성물.

청구항 73

제48항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, pH 값은 약 7±0.3인, 약학적 조성물.

청구항 74

제48항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 안정제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 안정제는 염화나트륨, 아미노산, 당 알코올 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 아미노산은 프롤린(Proline), 아르기닌(Arginine), 글라이신(Glycine), 히스티딘(Histidine), 라이신(lysine), 메티오닌(Methionine) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 당 알코올은 수크로스(Sucrose), 만니톨(Mannitol), 트레할로스(Trehalose), 소르비톨(Sorbitol) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 78

제74항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제는 수크로스, 트레할로스, 소르비톨, 만니톨, 프롤린/수크로스, 메티오닌/트레할로스, 글라이신/만니톨, 염화나트륨/수크로스, 아르기닌/수크로스 및 라이신/트레할로스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 79

제74항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 20 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 80

제74항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 10 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 81

제74항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 8 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 82

제74항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 4±1 중량% 또는 8±1 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 83

제74항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 4±0.5 중량% 또는 8±0.5 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 84

제74항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 4 중량%, 5 중량%, 7 중량% 또는 8 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 85

제74항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정제의 함량은 약 8 중량%인, 약학적 조성물.

청구항 86

제48항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 계면활성제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유, 글리세롤 지방산 에스테르, 폴리소르베이트, 폴록사머 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20(PS-20, 트윈(Tween)-20), 폴리소르베이트 40(PS-40), 폴리소르베이트 60(PS-60) 및 폴리소르베이트 80(PS-80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조

성물.

청구항 89

제86항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 PS-20(트윈-20) 및 PS-80(트윈-80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 90

제86항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.001% 내지 0.5%인, 약학적 조성물.

청구항 91

제86항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.005% 내지 0.1%인, 약학적 조성물.

청구항 92

제86항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.005%, 0.01%, 0.03%, 0.05% 또는 0.1%인, 약학적 조성물.

청구항 93

제86항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.01%인, 약학적 조성물.

청구항 94

제86항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.03%인, 약학적 조성물.

청구항 95

제48항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는:

(1) 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80;

(2) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80;

(3) 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80;

(4) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80;

(5) 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80;

(6) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80;

(7) 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80;

(8) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 96

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조합물 및/또는 제48항 내지 제95항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물의, 질환 및/또는 병증을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물의 제조에서의 용도.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 질환 및/또는 병증은 CD73에 의해 매개되는 질환 및/또는 병증을 포함하는, 용도.

청구항 98

제96항 또는 제97항에 있어서, 상기 질환 및/또는 병증은 종양을 포함하는, 용도.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 종양은 고형 종양 및/또는 혈액 종양을 포함하는, 용도.

청구항 100

제96항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환 및/또는 병증은 췌장암, 유방암 및 특발성 폐 섬유증(IPF)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 용도.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 유방암은 삼중 음성 유방암을 포함하는, 용도.

청구항 102

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조합물 및/또는 제48항 내지 제95항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물의, CD73 단백질의 존재 및/또는 함량을 검출하기 위한 검출 키트의 제조에 있어서의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 생물의학 분야, 구체적으로는 CD73 항체 칵테일 요법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] NT5E라고도 칭하는 CD73은 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)을 통해 세포 표면에 고정되어 있으며, 주로 이량체 형태로 존재하는 분자량이 약 70Kd인 세포외 5-뉴클레아제(NT5E)이다. 정상적인 생리학적 조건에서 CD73은 간, 대장, 신장, 비장, 폐, 난소, 림프절 등 조직과 같은 다양한 조직 또는 기관에서 발현될 수 있다.

[0003] 다량의 전임상 연구 결과에 따르면, CD73은 신경아교종, 유방암, 흑색종, 비소세포폐암, 방광암, 난소암, 결장직장암을 포함하는 다양한 종양 세포의 표면에서 비정상적으로 고 발현되는 것으로 나타나고, 임상 데이터에 따르면, CD73의 고 발현은 종양 환자의 불량한 예후와 밀접한 관련이 있으므로, CD73은 다양한 종양의 임상 치료 및 예후를 위한 잠재적인 표적으로 사용될 수 있다.

[0004] 따라서, 비정상적인 CD73 발현으로 인한 질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 더 많은 새로운 아이디어를 제공하기 위해, CD73을 표적으로 하는 다양한 치료법을 개발하는 것이 시급하다.

발명의 내용

[0005] 본 출원은 CD73에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 단백질 및 CD73에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조합물을 제공하고, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 상이한 CD73 항원 결합 에피토프를 갖는다. 본 출원에 기재된 약학적 조합물은 (1) CD73 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 특성; (2) CD73 단백질과 높은 친화력을 가지는 특성; (3) 종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제할 수 있는 특성 중 하나 이상을 갖는다.

[0006] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질 및 상기 제2 항원 결합 단백질은 CD73 단백질에 비경쟁적 방식으로 결합한다.

[0007] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 혼합물 형태로 존재한다.

[0008] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함하고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함하고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함하고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미

노산 서열을 포함한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다.

[0015] 특정 실시양태에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다.

[0016] 특정 실시양태에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함하고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함하고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함하고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 12(WAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함하고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0024] 특정 실시양태에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래된다.

[0025] 특정 실시양태에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 특정 실시양태에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함하고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함하고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함하고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함하고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0033] 특정 실시양태에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다.

[0034] 특정 실시양태에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다.

[0035] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질의 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함하고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 28에 제

시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0037] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0038] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함하고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함하고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 30(LAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함하고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0042] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래된다.

[0044] 특정 실시양태에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0045] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함하고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:5 내지 5:1이다.

[0047] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:5이다.

[0048] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:2.5이다.

[0049] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:1이다.

[0050] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 2.5:1이다.

[0051] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 5:1이다.

[0052] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 상기 약학적 조합물 및 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 3 내지 300mg/mL이다.

[0054] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 3 내지 150mg/mL이다.

[0055] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 5 내지 100mg/mL이다.

[0056] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 10 내지 100mg/mL이다.

[0057] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 10 내지 50mg/mL이다.

[0058] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 30±5mg/mL이다.

[0059] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 30±3mg/mL이다.

[0060] 특정 실시양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충액을 포함한다.

[0061] 특정 실시양태에서, 상기 완충액은 산성 완충액을 포함한다.

[0062] 특정 실시양태에서, 상기 완충액은 중성 완충액을 포함한다.

[0063] 특정 실시양태에서, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산 완충액, 히스티딘-히스티딘 염산 완충액, 구연산염-구연산 완충액, 인산염 완충액, 히스티딘-아세트산 완충액, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (Tris)-염산염 완충액, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹(group)으로부터 선택된다.

[0064] 특정 실시양태에서, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산, 구연산염-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산염, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0065] 특정 실시양태에서, 상기 완충액은 아세트산나트륨-아세트산, 구연산나트륨-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산이수소나트륨-인산수소이나트륨, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산 및 인산-구연산나트륨으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0066] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 100mM이다.

[0067] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 60mM이다.

[0068] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 50mM이다.

[0069] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 약 10 내지 40mM이다.

[0070] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 20±5mM이다.

[0071] 특정 실시양태에서, 상기 완충액의 농도는 20±2mM이다.

[0072] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 5 내지 7이다.

[0073] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.5이다.

[0074] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.3이다.

[0075] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.1이다.

[0076] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6.5±0.3이다.

[0077] 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 7±0.3이다.

[0078] 특정 실시양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 안정제를 포함한다.

[0079] 특정 실시양태에서, 상기 안정제는 염화나트륨, 아미노산, 당 알코올 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0080] 특정 실시양태에서, 상기 아미노산은 프롤린(Proline), 아르기닌(Arginine), 글라이신(Glycine), 히스티딘(Histidine), 라이신(lysine), 메티오닌(Methionine) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0081] 특정 실시양태에서, 상기 당 알코올은 수크로스(Sucrose), 만니톨(Mannitol), 트레할로스(Trehalose), 소르비톨(Sorbitol) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0082] 특정 실시양태에서, 상기 안정제는 수크로스, 트레할로스, 소르비톨, 만니톨, 프롤린/수크로스, 메티오닌/트레할로스, 글라이신/만니톨, 염화나트륨/수크로스, 아르기닌/수크로스 및 라이신/트레할로스로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0083] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 20 중량%이다.

[0084] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 10 중량%이다.

[0085] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 8 중량%이다.

[0086] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 4±1 중량% 또는 8±1 중량%이다.

[0087] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 4±0.5 중량% 또는 8±0.5 중량%이다.

[0088] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 4 중량%, 5 중량%, 7 중량%, 또는 8 중량%이다.

[0089] 특정 실시양태에서, 상기 안정제의 함량은 약 8 중량%이다.

[0090] 특정 실시양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 계면활성제를 포함한다.

[0091] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자

유, 글리세롤 지방산 에스테르, 폴리소르베이트, 폴록사머 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0092] 특정 실시양태에서, 상기 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20(PS-20, 트윈(Tween)-20), 폴리소르베이트 40(PS-40), 폴리소르베이트 60(PS-60) 및 폴리소르베이트 80(PS-80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0093] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제는 PS-20(트윈-20) 및 PS-80(트윈-80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0094] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.001% 내지 0.5%이다.

[0095] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.005% 내지 0.1%이다.

[0096] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.005%, 0.01%, 0.03%, 0.05%, 또는 0.1%이다.

[0097] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.01%이다.

[0098] 특정 실시양태에서, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.03%이다.

[0099] 특정 실시양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 (1) 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80; (2) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80; (3) 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80; (4) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80; (5) 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80; (6) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80; (7) 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80; (8) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0100] 다른 일 측면에서, 본 출원은 상기 약학적 조합물 및/또는 상기 약학적 조성물의, 질환 및/또는 병증을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0101] 특정 실시양태에서, 상기 질환 및/또는 병증은 CD73에 의해 매개되는 질환 및/또는 병증을 포함한다.

[0102] 특정 실시양태에서, 상기 질환 및/또는 병증은 종양을 포함한다.

[0103] 특정 실시양태에서, 상기 종양은 고형 종양 및/또는 혈액 종양을 포함한다.

[0104] 특정 실시양태에서, 상기 질환 및/또는 병증은 췌장암, 유방암 및 특발성 폐 섬유증(IPF)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0105] 특정 실시양태에서, 상기 유방암은 삼중 음성 유방암을 포함한다.

[0106] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 상기 약학적 조합물 및/또는 상기 약학적 조성물의, CD73 단백질의 존재 및/또는 함량을 검출하기 위한 검출 키트의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[0107] 당업자는 이하 상세한 설명으로부터 본 출원의 다른 측면 및 이점을 쉽게 알아낼 수 있을 것이다. 이하 상세한 설명은 단지 본 출원의 예시적인 실시양태를 보여주고 서술하였을 뿐이다. 당업자가 알아낼 수 있는 바와 같이, 본 출원의 내용은 당업자로 하여금 본 출원에 관련된 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 구체적인 실시양태를 변경할 수 있도록 한다. 이와 상응하게, 본 출원의 도면 및 명세서 설명은 단지 예시적인 것일 뿐 제한적인 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0108] 본 출원에 관련된 발명의 구체적인 특징은 첨부된 청구범위에 나타내는 바와 같다. 이하 상세하게 설명될 예시적인 실시양태 및 도면을 통해 본 출원과 관련된 발명의 특징 및 우세를 보다 잘 이해할 수 있다. 도면의 간단한 설명은 다음과 같다:

도 1은 본 출원에 기재된 칵테일 항체 요법이 CD73 효소 활성을 억제하는 효과를 나타낸다.

도 2는 다양한 로딩 조건 하에 인간 CD73 단백질에 대한 900698 및 900725의 결합 친화력 곡선 및 반응 값을 나타낸다.

도 3은 췌장암 동물 모델에서 항-CD73 칵테일 항체의 항종양 효과를 나타낸다.

도 4는 삼중 음성 유방암 동물 모델에서 항-CD73 칵테일 항체의 항종양 효과를 나타낸다.

도 5는 특발성 폐 섬유증(IPF) 마우스 모델의 투약 방안 개략도를 나타낸다.

도 6은 특발성 폐 섬유증(IPF) 마우스 모델의 각 그룹 마우스의 체중 칭량 상황을 나타낸다.

도 7은 마우스 기도 과민반응 검출 결과를 나타낸다(Penh 변화율-Mch 농도 곡선 아래의 면적).

도 8은 폐포 세척액 내 염증 관련 총 세포 수와 림프구 수 계수 결과의 분류 히스토그램이다.

도 9는 특발성 폐 섬유증의 병리학적 평점 결과를 나타낸다.

도 10은 실험에서 병리학적 평점 결과로 인한 폐 조직의 병리학적 절편의 대표적인 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 이하, 특정한 구체적 실시예로 본 출원 발명의 실시양태를 설명할 것이며, 해당 기술을 숙지한 자는 본 명세서에 개시된 내용으로부터 본 출원 발명의 기타 장점 및 효과를 용이하게 이해할 수 있을 것이다.

[0110] **용어 정의**

[0111] 본 출원에서, 용어 "약학적 조합물"은 통상적으로 적어도 두 가지 활성 성분/치료제를 포함하는 조합을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 각 활성 성분/치료제는 각각 독립적인 제제(고체, 액체, 겔 등)로 제조될 수 있고, 일부 실시양태에서, 각 활성 성분/치료제는 상이한 용기에 존재할 수 있으며, 필요한 경우 적절한 담체와 동시에 또는 별도로 원하는 제제를 배합될 수 있고; 일부 실시양태에서, 각 활성 성분/치료제는 상이한 공급원으로부터 유래될 수 있으며; 일부 실시양태에서, 각 활성 성분/치료제는 혼합물의 형태로 존재할 수 있다.

[0112] 본 출원에서, 용어 "CD73"은 "NT5E", "분화 클러스터 73", "5'-뉴클레오티다제(5'-NT)" 또는 "세포외 5'-뉴클레오티다제"라고도 칭한다. 상기 용어는 "전장", 가공되지 않은 CD73 및 세포 가공으로 인해 생성하는 모든 형태의 CD73을 망라한다. 본 출원에서, 용어 "CD73"은 전장 야생형 CD73 및 이의 돌연변이체, 단편, 변이체, 아이소타입 및 상동체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 CD73은 인간 CD73을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 CD73의 서열에 대해 Uniprot 등록 번호 P21589에서 찾을 수 있다.

[0113] 본 출원에서, 용어 "항원 결합 단백질"은 통상적으로 천연 상태에서 인공적인 수단을 통해 획득된 항원 결합 능력을 갖는 단백질을 가리킨다. 해당 "항원 결합 단백질"은 항원에 결합하는 부분 및 선택적으로 항원에 결합하는 부분이 상기 항원 결합 부분에 의한 항원의 결합을 촉진하는 구조를 채택할 수 있도록 허용하는 프레임워크 또는 프레임워크 부분을 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 예를 들어, 항체 유래 단백질 프레임워크 영역(FR) 또는 이식된 CDR 또는 CDR 유도체를 갖는 대체 단백질 프레임워크 영역 또는 인공 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 이와 같은 프레임워크는 예를 들어 항원 결합 단백질의 3차원 구조를 안정화하기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체 유래 프레임워크 영역, 및 예를 들어 생체 적합성 중합체를 포함하는 완전 합성 프레임워크 영역을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, Korndorfer 등, 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 53(1):121-129 (2003); Roque 등, Biotechnol. Prog. 20:639-654(2004)를 참조한다. 항원 결합 단백질의 예시로는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체; 재조합 항체; 단쇄 항체; 이중 기능 항체; 삼중 기능 항체; 사중 기능 항체; Fab, Fab', Fv 단편, $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, scFv, di-scFv, dAb, IgD 항체; IgE 항체; IgM 항체; IgG1 항체; IgG2 항체; IgG3 항체; 또는 IgG4 항체 및 이의 단편이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0114] 본 출원에서, 용어 "가변 도메인" 및 "가변 영역"은 상호 교환적으로 사용될 수 있으며 통상적으로 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 일부를 가리킨다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 "V_H" 및 "V_L"(또는 각각 "VH" 및 "VL"이라고 칭함)이라고 칭될 수 있다. 이러한 도메인은 통상적으로 항체의 변화가 가장 큰 부분(동일한 유형의 다른 항체에 비해)이며, 항원 결합 부위를 포함한다.

[0115] 본 출원에서, 용어 "가변"은 통상적으로 항체 사이에 서열 상으로 큰 차이가 존재할 수 있는 가변 도메인의 특정 세그먼트를 가리킨다. 가변 도메인은 항원 결합을 매개하고 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 결정한다. 그러나 가변성은 전체 가변 도메인 범위 내에 고르게 분포되지 않는다. 이는 통상적으로 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 초가변영역(CDR 또는 HVR)이라고 칭하는 세 개의 세그먼트에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도

로 보존된 부분을 프레임워크 영역(FR)이라고 칭한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 네 개의 FR 영역을 포함하며 대부분은 세 개의 CDR로 연결된 β-폴딩 구조를 채택하며 이는 고리형 연결를 형성하고 일부 경우에 β-폴딩 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬의 CDR은 FR 영역을 통해 긴밀하고 근접하게 유지되고, 다른 하나의 사슬로부터 유래된 CDR은 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성을 촉진한다(Kabat 등, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991) 참조).

[0116] 본 출원에서, 용어 "항체"는 통상적으로 체외나 체내에서 생성되는지 여부에 관계없이 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩티드를 망라하는 면역글로불린 또는 이의 단편 또는 이의 유도체를 가리킨다. 해당 용어는 다클론, 단클론, 단일특이적, 다중특이적, 비특이적, 인간화, 단일 사슬, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이 및 이식된 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. "온전한 항체"에서와 같이 용어 "온전한"에 의해 달리 변형되지 않는 한, 본 발명의 목적을 위해, 용어 "항체"는 항체 단편, 예를 들어 Fab, $F(ab')_2$, Fv, scFv, Fd, dAb 및 항원 결합 기능을 유지하는(예를 들어 CLDN18.2에 특이적으로 결합하는) 다른 항체 단편도 포함한다. 통상적으로 이러한 단편에는 항원 결합 도메인이 포함되어야 한다. 기본적인 4-사슬 항체 유닛은 두 개의 동일한 경쇄(L)와 두 개의 동일한 중쇄(H)로 구성된 이종사량체 당단백질이다. IgM 항체는 5개의 기본 이종사량체 유닛과 J 사슬이라고 칭하는 다른 폴리펩티드로 구성되어 있으며 10개의 항원 결합 부위를 함유하고 있는 반면, IgA 항체는 J 사슬에 결합하고 중합하여 다가 조합을 형성할 수 있는 2 내지 5개의 기본 4-사슬 유닛을 포함한다. IgG의 경우 4-사슬 유닛은 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각 L 사슬은 하나의 공유 이황화 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 반면, 두 개의 H 사슬은 H 사슬 아이소타입에 따라 하나 이상의 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 각 H 및 L 사슬에는 또한 규칙적으로 간격을 둔 사슬 내 이황화 브릿지 결합을 갖는다. 각 H 사슬은 N 말단에 가변 도메인(VH)을 갖고, α 및 γ 사슬에 대해 각각 세 개의 불변 도메인(CH)이 이어지고, μ 및 ε 아이소타입에 대해 네 개의 CH 도메인이 이어진다. 각 L 사슬은 N 말단에 가변 도메인(VL)을 갖고, 다른 일단에는 불변 도메인을 갖는다. VL은 VH에 대응하고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)에 대응한다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 경계면을 형성하는 것으로 간주된다. VH 및 VL은 함께 쌍을 이루어 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 상이한 유형의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 제71 페이지 및 제6장을 참조한다. 임의의 척추동물 종으로부터 유래된 L 사슬은 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 하여 두 가지 유의한 상이한 유형(κ 및 λ라고 칭함) 중 하나로 구분될 수 있다. 면역글로불린은 중쇄(CH) 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 유형 또는 아이소타입으로 나눌 수 있다. 현재 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 다섯 가지 유형이 있으며 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 명명되는 중쇄를 갖는다. γ 및 α 클래스는 CH 서열과 기능의 상대적으로 작은 차이에 따라 서브클래스로 추가로 나누고, 예를 들어, 인간은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgK1 서브클래스를 발현한다.

[0117] 본 출원에서, 용어 "CDR"은 "상보성 결정 영역"이라고도 칭하며, 통상적으로 서열이 매우 가변적이고 및/또는 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 가리킨다. 예를 들어, 항체는 여섯 개의 CDR을 포함하고; VH에 세 개(HCDR1, HCDR2, HCDR3), VL에 세 개(LCDR1, LCDR2, LCDR3)가 있다. 특정 실시양태에서, 중쇄만으로 구성된 천연적으로 존재하는 낙타 항체는 경쇄가 없는 경우에도 정상적이고 안정적으로 기능할 수 있다. 예를 들어, Hamers-Casterman 등, Nature 363:446-448(1993); Sheriff 등, Nature Struct. Biol. 3:733-736(1996)을 참조한다.

[0118] 본 출원에서, 용어 "FR"은 통상적으로 프레임워크 영역이라고 칭하는 항체 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분을 가리킨다. 통상적으로, 천연 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인은 각각 네 개의 FR 영역, 즉 VH에 네 개(H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4), 및/또는 VL에 네 개(L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4)를 포함한다.

[0119] 본 출원에서, 용어 "항원 결합 단편"은 통상적으로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 하나 이상의 단편을 가리킨다. 본 출원에서, 상기 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab)_2$, Fv 단편, $F(ab')_2$, scFv, di-scFv 및/또는 dAb를 포함할 수 있다.

[0120] 본 출원에서, 용어 "Fab"는 통상적으로 항체의 항원 결합 단편을 가리킨다. 위에 기재된 바와 같이, 파파인을 사용하여 온전한 항체를 소화할 수 있다. 항체는 파파인에 의해 소화된 후 두 개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 "Fab" 단편 및 잔여 "Fc" 단편(즉, Fc 영역, 위와 같음)을 생성한다. Fab 단편은 하나의 온전한 L 사슬과 하나의 중쇄 가변 영역 및 해당 H 사슬(V_H)의 제1 불변 영역(C_H1)으로 구성될 수 있다.

[0121] 본 출원에서, 용어 "Fab' 단편"은 통상적으로 Fab 단편보다 약간 큰 인간 단클론 항체의 1가 항원 결합 단편을 가리킨다. 예를 들어, Fab' 단편은 모든 경쇄, 모든 중쇄 가변 영역 및 중쇄의 제1 및 제2 불변 영역의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fab' 단편은 또한 중쇄의 일부 또는 모든 220 내지 330개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0122] 본 출원에서, 용어 "F(ab')2"는 통상적으로 펩신을 통해 온전한 항체를 소화하여 생성된 항체 단편을 가리킨다. F(ab')2 단편은 이황화 결합에 의해 함께 유지된 두 개의 Fab 단편 및 일부 힌지 영역을 함유한다. F(ab')2 단편은 2가 항원 결합 활성을 가지며 항원을 가교시킬 수 있다.

[0123] 본 출원에서 용어 "Fv 단편"은 통상적으로 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 전부 또는 일부를 포함하고, 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역이 결핍된 인간 단클론 항체의 1가 항원 결합 단편을 가리킨다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에는 예를 들어 CDR이 포함된다. 예를 들어, Fv 단편은 중쇄 및 경쇄의 약 110개의 아미노산의 아미노 단 가변 영역의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0124] 본 출원에서, 용어 "scFv"는 통상적으로 경쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역 항체 단편과 중쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 가리키며, 여기서 상기 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 인접하고(예를 들어, 짧고 유연한 폴리펩티드 링커와 같은 합성 링커를 통해), 단일 사슬 폴리펩티드 형태로 발현될 수 있으며, 여기서 상기 scFv는 그것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 달리 명시하지 않는 한, 본 출원에 사용된 바와 같이, scFv는 임의의 순서로(예를 들어, 폴리펩티드의 N 말단 및 C 말단에 대해) 상기 VL 및 VH 가변 영역을 가질 수 있으며, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0125] 본 출원에서, 용어 "dAb"는 통상적으로 VH 도메인, VL 도메인을 갖거나, 또는 VH 도메인 또는 VL 도메인을 갖는 항원 결합 단편을 가리키며, 예를 들어 Ward 등 (Nature, 1989 Oct 12; 341(6242):544-6)을 참조하고, Holt 등, Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490을 참조하며; 및 예를 들어 WO 06/030220, WO 06/003388 및 DomantisLtd의 기타 공개된 특허 출원을 참조한다.

[0126] 본 출원에서, 용어 "단클론 항체"는 통상적으로 단일 분자로 구성된 항체 분자의 제조물을 가리킨다. 단클론 항체는 통상적으로 단일 항원 부위에 대해 고도로 특이성을 갖는다. 또한, 일반적으로 다클론 항체 제제(통상적으로 상이한 결정자에 대해 상이한 항체를 가짐)와는 달리, 각 단클론 항체는 항원의 단일 결정자를 대상으로 한다. 이들의 특이성 이외에도, 단클론 항체의 장점은 다른 면역글로불린에 의한 오염 없이 하이브리도마 배양에 의해 합성될 수 있다는 것이다. 수식어 "단클론"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 획득한 항체의 특징을 나타내며, 항체가 임의의 특정 방법에 의해 생산되어야 한다고 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 출원에 사용된 단클론 항체는 하이브리도마 세포에서 제조될 수 있거나 또는 재조합 DNA 방법을 통해 제조될 수 있다.

[0127] 본 출원에서, 용어 "키메라 항체"는 통상적으로 가변 영역이 한 종으로부터 유래되고 불변 영역이 다른 한 종으로부터 유래되는 항체를 가리킨다. 통상적으로, 가변 영역은 설치류 동물과 같은 실험 동물의 항체("부모 항체")로부터 유래되고, 불변 영역은 인간 항체로부터 유래되므로, 얻어진 키메라 항체는 부모(예를 들어 마우스 유래) 항체와 비교하여 인간 개체에서 불리한 면역 반응을 유발할 가능성이 감소된다.

[0128] 본 출원에서, 용어 "인간화 항체"는 통상적으로 비인간 항체(예를 들어 마우스 항체)의 CDR 영역 이외의 아미노산의 일부 또는 전부가 인간 면역글로불린으로부터 유래된 상응하는 아미노산에 의해 치환된 항체를 가리킨다. 특정 항원에 결합하는 항체의 능력을 유지하는 한, CDR 영역에서 아미노산의 작은 첨가, 결실, 삽입, 치환 또는 변형도 허용될 수 있다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. "인간화 항체"는 원래 항체와 유사한 항원 특이성을 유지한다. 비인간(예를 들어 마우스) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 키메라 항체을 최소한으로 포함할 수 있다. 특정 상황에서, 인간 면역글로불린(수용체 항체)의 CDR 영역 잔기는 원하는 특성, 친화력 및/또는 능력을 갖는 비인간 종(기증자 항체)(예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류 동물)의 CDR 영역 잔기로 대체될 수 있다. 특정 상황에서, 인간 면역글로불린의 FR 영역 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체될 수 있다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 기증자 항체에 존재하지 않는 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화력과 같은 항체의 성능을 추가로 개선하기 위한 것일 수 있다.

[0129] 용어 "완전 인간화 항체"는 통상적으로 인간 면역글로불린 단백질 서열만을 포함하는 항체를 가리킨다. 완전 인간화 항체는 마우스, 마우스 세포 또는 마우스 세포로부터 유래된 하이브리도마에서 생산된 경우 마우스 당 사슬을 함유할 수 있다. 이와 유사하게, "마우스 항체" 또는 "래트 항체"는 각각 마우스 또는 래트 면역글로불린

서열만을 포함하는 항체를 가리킨다. 파지 디스플레이 또는 기타 분자 생물학적 방법을 통해 인간 체내, 인간 면역글로불린 생식 계열 서열을 갖는 형질전환 동물 체내에서 완전 인간화 항체를 생성할 수 있다. 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 예시적인 기술은 미국 특허 6,150,584, 6,458,592, 6,420,140에 설명되어 있다. 라이브러리의 사용과 같은 다른 기술은 당업계에서 알려져 있다.

[0130] 본 출원에서, 용어 "직접 연결"은 용어 "간접 연결"과 대조되며, 용어 "직접 연결"은 통상적으로 직접적으로 연결되는 것을 가리킨다. 예를 들어, 상기 직접 연결은 스페이서 없이 물질이 직접 연결되는 경우일 수 있다. 상기 스페이서는 링커일 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는 펩티드 링커일 수 있다. 용어 "간접 연결"은 통상적으로 물질이 직접적으로 연결되지 않은 경우를 가리킨다. 예를 들어, 상기 간접 연결은 스페이서를 통해 연결되는 것일 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 분리된 항원 결합 단백질에서, 상기 L-FR1의 C 말단과 상기 LCDR1의 N 말단이 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다.

[0131] 본 출원에서, 용어 "약학적 조성물"은 통상적으로 질환 또는 병증을 예방/치료하는 데 사용되는 조성물을 가리킨다. 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 활성 성분, 및 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물은 또한 하나 이상의(약학적으로 유효한) 담체, 안정제, 부형제, 희석제, 가용화제, 계면활성제, 유화제 및/또는 방부제의 적합한 제제를 포함할 수 있다. 조성물의 허용 가능한 성분은 사용된 용량 및 농도에서 바람직하게는 피험자에게 독성이 없다. 본 발명의 약학적 조성물은 액체, 냉동 및 동결건조된 조성물을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0132] 본 출원에서, 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 통상적으로 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및/또는 안정제를 포함하고, 이들의 사용된 용량 및 농도에서 노출되는 세포 또는 포유동물에게 독성이 없다. 생리학적으로 허용 가능한 담체에는 예를 들어 완충제, 항산화제, 저분자량(잔기가 약 10개 미만) 폴리펩티드, 단백질, 친수성 중합체, 아미노산, 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 킬레이트제, 당 알코올, 나트륨과 같은 염 형성 반대 전하 이온; 및/또는 비이온성 계면활성제가 포함될 수 있다.

[0133] 본 출원에서, 용어 "피험자"는 통상적으로 고양이, 개, 말, 돼지, 소, 양, 토끼, 마우스, 래트 또는 원숭이 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 인간 또는 비인간 동물을 가리킨다.

[0134] 본 출원에서, 용어 "종양"은 통상적으로 비정상적인 세포 성장에 의해 형성된 신생물 또는 고형 병변을 가리킨다. 본 출원에서, 종양은 고형 종양 또는 비고형 종양일 수 있다.

[0135] 본 출원에서, 관련된 단백질, 폴리펩티드 및/또는 아미노산 서열은 또한 적어도 상기 단백질 또는 폴리펩티드와 동일하거나 유사한 기능을 갖는 변이체 또는 상동체 범위를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0136] 본 출원에서, 상기 변이체는 예를 들어 상기 단백질 및/또는 상기 폴리펩티드(예를 들어, CD73에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편)의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가되는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 이미 적어도 1개, 예를 들어 1 내지 30개, 1 내지 20개 또는 1 내지 10개, 또한 예를 들어 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 통해 아미노산 변화를 갖는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 기능적 변이체는 변화(예를 들어, 치환, 결실 또는 첨가) 이전의 상기 단백질 또는 상기 폴리펩티드의 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 변화 이전의 상기 단백질 또는 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성(예를 들어 항원 결합 능력)의 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%를 유지할 수 있다. 예를 들어, 상기 치환은 보존적 치환일 수 있다.

[0137] 본 출원에서, 상기 상동체는 상기 단백질 및/또는 상기 폴리펩티드(예를 들어 CD73에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편)의 아미노산 서열과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상을 가짐) 서열 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0138] 본 출원에서, 상기 상동성은 통상적으로 두 개 이상의 서열 사이의 유사성, 유사 또는 관련성을 가리킨다. "서열 상동성 백분율"은 이하 방식을 통해 계산할 수 있다: 두 개의 정렬될 서열을 비교 창에서 비교하고 두 개의 서열에서 동일한 핵산 염기(예를 들어 A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예를 들어 Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 존재하는 위치의 수를 결정하여 매칭 위치의 수를 얻고, 매칭 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수(즉, 창 크기)로 나누고 결과에 100을 곱하여 서열 상동성 백분율을 생성한다. 서열 상동성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 당업계에서 알려진 다양한 방식으로, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로

얻을 수 있는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 구현할 수 있다. 당업자는 비교 중의 전장 서열 범위 내에서 또는 표적 서열 영역 내에서 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 상기 상동성은 FASTA 및 BLAST 방법을 통해 측정될 수 있다. FASTA 알고리즘에 대한 설명은 W. R. Pearson 및 D. J. Lipman의 "생물학적 서열 비교를 위한 개선된 도구", 미국국립과학원 회보(Proc. Natl. Acad. Sci.) , 85: 2444-2448, 1988; 및 D. J. Lipman 및 W. R. Pearson의 "빠르고 민감한 단백질 유사성 검색", Science, 227: 1435-1441, 1989를 참조한다. BLAST 알고리즘에 대한 설명은 S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers 및 D. Lipman의 "기본적인 국소 비교(alignment) 검색 도구", 분자 생물학 저널, 215: 403-410, 1990을 참조한다.

[0139] 본 출원에서, 용어 "포함하다"는 통상적으로 포함, 포괄, 함유 또는 망라한다는 의미를 가리킨다. 어떤 경우에는 "이다" 또는 "...로 구성된다"는 의미를 나타내기도 한다.

[0140] 본 출원에서, 용어 "약"은 통상적으로 지정된 수치 이상 또는 이하 0.5% 내지 10%의 범위 내에서 변동되며, 예를 들어 지정 수치 이상 또는 이하 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5% 또는 10%의 범위 내에서 변동되는 것을 가리킨다.

[0141] **발명에 대한 상세한 설명**

[0142] 일 측면에서, 본 출원은 CD73에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 단백질, 및 CD73에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조합물을 제공한다.

[0143] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 하기 특성 중의 하나 이상을 갖는다:

[0144] (1) CD73 또는 이의 기능적 활성 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 특성;

[0145] (2) CD73의 효소 활성을 억제할 수 있는 특성;

[0146] (3) 세포 표면에서 CD73의 세포내이입을 유도할 수 있는 특성;

[0147] (4) 종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제할 수 있는 특성.

[0148] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 상이한 CD73 항원 결합 에피토프를 가질 수 있다.

[0149] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 비경쟁적 방식으로 CD73 단백질에 결합할 수 있다.

[0150] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 혼합물 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 동일한 용기에 존재할 수 있으며 혼합되어 배치될 수 있다.

[0151] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0152] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함할 수 있고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0153] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함할 수 있고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0154] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함할 수 있고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0155] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함할 수 있고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0156] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 H-FR1을 포함할 수 있고, 상기 H-FR1의 C 단은 상기 HCDR1의 N 단에 직접 또는 간접적으로 연결되고, 상기 H-FR1은 SEQ ID NO: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0157] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 H-FR2를 포함할 수 있고, 상기 H-FR2는 상기 HCDR1과 상기 HCDR2 사이에 위치하며, 상기 H-FR2는 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0158] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 H-FR3을 포함할 수 있고, 상기 H-FR3은 상기 HCDR2와 상기 HCDR3 사이에 위치하며, 상기 H-FR3은 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0159] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 H-FR4를 포함할 수 있고, 상기 H-FR4의 N 단은 상기 H-FR3의 C 단에 직접 또는 간접적으로 연결되며, 상기 H-FR4는 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0160] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 H-FR1은 SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 H-FR2는 SEQ ID NO: 5 또는 SEQ ID NO: 25에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 H-FR3은 SEQ ID NO: 6 또는 SEQ ID NO: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 H-FR4는 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0161] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0162] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0163] 본 출원에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함할 수 있고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0165] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0166] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함할 수 있고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0167] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함할 수 있고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 12(WAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0168] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함할 수 있고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0169] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함할 수 있고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 12(WAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0170] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 L-FR1을 포함할 수 있고, 상기 L-FR1의 C 단은 상기 LCDR1의 N 단에 직접 또는 간접적으로 연결되고, 상기 L-FR1은 SEQ ID NO: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0171] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 L-FR2를 포함할 수 있고, 상기 L-FR2는 상기 LCDR1과 상기 LCDR2 사이에 위치하며, 상기 L-FR2는 SEQ ID NO: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0172] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 L-FR3을 포함할 수 있고, 상기 L-FR3은 상기 LCDR2와 상기 LCDR3 사이에 위치하며, 상기 L-FR3은 SEQ ID NO: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 L-FR4를 포함할 수 있고, 상기 L-FR4의 N 단은 상기 L-FR3의 C 단에 직접 또는 간접적으로 연결되며, 상기 L-FR4는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 L-FR1은 SEQ ID NO: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 L-FR2는 SEQ ID NO: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 L-FR3은 SEQ ID NO: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 L-FR4는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0175] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0176] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0177] 본 출원에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래될 수 있다.

[0178] 본 출원에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0179] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함할 수 있고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0180] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 VH 및 VL을 포함할 수 있고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0181] 본 출원에서, 상기 제1 항원 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 상기 중쇄는 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 경쇄는 SEQ ID NO: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0182] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 가변 영역 VH 내에 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0183] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR3을 포함할 수 있고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0184] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR2를 포함할 수 있고, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0185] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR1을 포함할 수 있고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0186] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함할 수 있고, 상기 HCDR1은 SEQ ID NO: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 HCDR2는 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 HCDR3은 SEQ ID NO: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0187] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 H-FR1을 포함할 수 있고, 상기 H-FR1의 C 단은 상기 HCDR1의 N 단에 직접 또는 간접적으로 연결되고, 상기 H-FR1은 SEQ ID NO: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0188] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 H-FR2를 포함할 수 있고, 상기 H-FR2는 상기 HCDR1과 상기 HCDR2 사이에 위치하며, 상기 H-FR2는 SEQ ID NO: 25에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0189] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 H-FR3을 포함할 수 있고, 상기 H-FR3은 상기 HCDR2와 상기 HCDR3 사이에 위치하며, 상기 H-FR3은 SEQ ID NO: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0190] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 H-FR4를 포함할 수 있고, 상기 H-FR4의 N 단은 상기 H-FR3의 C 단에 직접 또는 간접적으로 연결되며, 상기 H-FR4는 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0191] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 H-FR1은 SEQ ID NO: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 H-FR2는 SEQ ID NO: 25에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 H-FR3은 SEQ ID NO: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 H-FR4는 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0192] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VH를 포함하고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0193] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0194] 본 출원에서, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역으로부터 유래된다. 예를 들어, 상기 항체 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0195] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 중쇄를 포함할 수 있고, 상기 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0196] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 가변 영역 VL 내에 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있고,

상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0197] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR3을 포함할 수 있고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0198] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR2를 포함할 수 있고, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 30(LAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0199] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR1을 포함할 수 있고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0200] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함할 수 있고, 상기 LCDR1은 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 LCDR2는 SEQ ID NO: 30(LAS)에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 LCDR3은 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0201] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 L-FR1을 포함할 수 있고, 상기 L-FR1의 C 단은 상기 LCDR1의 N 단에 직접 또는 간접적으로 연결되고, 상기 L-FR1은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0202] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 L-FR2를 포함할 수 있고, 상기 L-FR2는 상기 LCDR1과 상기 LCDR2 사이에 위치하며, 상기 L-FR2는 SEQ ID NO: 33에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0203] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 L-FR3을 포함할 수 있고, 상기 L-FR3은 상기 LCDR2와 상기 LCDR3 사이에 위치하며, 상기 L-FR3은 SEQ ID NO: 34에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0204] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 L-FR4를 포함할 수 있고, 상기 L-FR4의 N 단은 상기 L-FR3의 C 단에 직접 또는 간접적으로 연결되며, 상기 L-FR4는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0205] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 L-FR1은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 L-FR2는 SEQ ID NO: 33에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 L-FR3은 SEQ ID NO: 34에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 L-FR4는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0206] 본 출원에서 상기 제2 항원 결합 단백질은 VL을 포함하고, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0207] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0208] 본 출원에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 인간 Igκ 불변 영역으로부터 유래될 수 있다.

[0209] 본 출원에서, 상기 항체 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0210] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 항체 경쇄를 포함할 수 있고, 상기 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0211] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 VH 및 VL을 포함할 수 있고, 상기 VH는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0212] 본 출원에서, 상기 제2 항원 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, 상기 중쇄는 SEQ ID NO: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 경쇄는 SEQ ID NO: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0213] 본 출원에서, 상기 약학적 조합물에서 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질은 일정한 질량비로 혼합될 수 있다. 예를 들어, 약 1:5 내지 5:1의 질량비로 혼합될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:5이다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:2.5이다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 1:1이다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 2.5:1이다. 예를 들어, 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질의 질량비는 약 5:1이다.

[0214] 본 출원에서, 상기 약학적 조합물은 정맥 주사로 투약하기 위해 배합될 수 있다.

[0215] 약학적 조성물

[0216] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 상기 약학적 조합물 및 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담

체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0217] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물은 상기 제1 항원 결합 단백질과 상기 제2 항원 결합 단백질을 포함하는 혼합물일 수 있으며, 상기 혼합물은 또한 약학적으로 허용 가능한 제제로 배합되기 위한 불활성 성분을 포함할 수 있다.

[0218] 본 출원에서, 상기 약학적 조합물의 농도는 약 3 내지 300mg/mL, 선택적으로 약 3 내지 150mg/mL, 선택적으로 약 5 내지 100mg/mL, 선택적으로 약 10 내지 100mg/mL, 선택적으로 약 10 내지 50mg/mL이고, 예를 들어 약 30±5mg/mL, 예를 들어 약 30±3mg/mL이다.

[0219] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물은 완충액을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 완충액은 산성 완충액일 수 있다. 예를 들어, 상기 완충액은 중성 완충액일 수 있다.

[0220] 예를 들어, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산 완충액, 히스티딘-히스티딘 염산 완충액, 구연산염-구연산 완충액, 인산염 완충액, 히스티딘-아세트산 완충액, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (Tris)-염산염 완충액, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0221] 예를 들어, 상기 완충액은 아세트산염-아세트산, 구연산염-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산염, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산, 인산-구연산염 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0222] 예를 들어, 상기 완충액은 아세트산나트륨-아세트산, 구연산나트륨-구연산, 히스티딘-히스티딘 염산, 인산이수소나트륨-인산수소이나트륨, Tris-염산염, 히스티딘-아세트산 및 인산-구연산나트륨으로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 완충액은 히스티딘-아세트산 완충액일 수 있다.

[0223] 본 출원에서, 상기 완충액의 농도는 약 5 내지 100mM, 선택적으로 약 5 내지 60mM, 선택적으로 약 5 내지 50mM, 선택적으로 약 10 내지 40mM, 선택적으로 약 20±5mM, 선택적으로 약 20±2mM일 수 있다.

[0224] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 5 내지 7일 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.5이다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.3이다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6±0.1이다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 6.5±0.3이다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 pH는 약 7±0.3이다.

[0225] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물은 안정제를 포함할 수 있다. 본 출원에서, 상기 안정제는 염화나트륨, 아미노산, 당 알코올 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산은 프롤린(Proline), 아르기닌(Arginine), 글라이신(Glycine), 히스티딘(Histidine), 라이신(lysine), 메티오닌(Methionine) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 당 알코올은 수크로스(Sucrose), 만니톨(Mannitol), 트레할로스(Trehalose), 소르비톨(Sorbitol) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0226] 예를 들어, 상기 안정제는 수크로스, 트레할로스, 소르비톨, 만니톨, 프롤린/수크로스, 메티오닌/트레할로스, 글라이신/만니톨, 염화나트륨/수크로스, 아르기닌/수크로스, 및 라이신/트레할로스로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 안정제는 수크로스일 수 있다.

[0227] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물 중 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 20 중량%이고, 선택적으로 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 10 중량%이며, 선택적으로 안정제의 함량은 약 0.15 중량% 내지 8 중량%이고, 선택적으로 안정제의 함량은 약 4±1 중량% 또는 8±1 중량%이며, 선택적으로 안정제의 함량은 약 4±0.5 중량%, 8±0.5 중량%이고, 선택적으로 안정제의 함량은 약 4 중량%, 5 중량%, 7 중량% 또는 8 중량%이다. 예를 들어, 상기 안정제의 함량은 약 0.15 중량%, 약 0.2 중량%, 약 0.3 중량%, 약 0.4 중량%, 약 0.5 중량%, 약 0.6 중량%, 약 0.8 중량%, 약 1 중량%, 약 1.5 중량%, 약 2 중량%, 약 2.5 중량%, 약 3 중량%, 약 3.5 중량%, 약 4 중량%, 약 4.5 중량%, 약 5 중량%, 약 5.5 중량%, 약 6 중량%, 약 7 중량%, 약 8 중량%이다.

[0228] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물은 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0229] 본 출원에서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유, 글리세롤 지방산 에스테르, 폴리소르베이트, 폴록사머 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 본 출원에서, 상기 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20(PS-20, 트윈-20), 폴리소르베이트 40(PS-40), 폴리소르베이트 60(PS-60), 폴리소르베이트 80(PS-80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 계면활성제는 트윈-20(PS-20) 및/또는 트윈-80(PS-80)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 계면활성제의 농

도는 약 0.001% 내지 0.5%이고, 선택적으로 약 0.005% 내지 0.1%, 선택적으로 약 0.005%, 0.01%, 0.03%, 0.05% 또는 0.1%, 선택적으로 약 0.01% 또는 0.03%이다. 예를 들어, 상기 계면활성제의 농도는 약 0.005%, 약 0.01%, 0.03%, 약 0.05%, 약 0.1%이다.

[0230] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0231] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0232] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0233] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0234] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0235] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0236] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.01 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0237] 본 출원에서, 상기 약학적 조성물의 완충 시스템은 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.01 중량%의 트윈-80을 포함할 수 있다.

[0238] 용도

[0239] 다른 일 측면에서, 본 출원은 상기 약학적 조합물 및/또는 상기 약학적 조성물의, 질환 및/또는 병증을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0240] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 질환 및/또는 병증을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 출원에 기재된 약학적 조합물 및/또는 기재된 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0241] 본 출원에서, 상기 투여는 정맥 내, 종양 내, 복강 내, 피하, 근육 내, 국소 또는 진피 내 투여와 같은 다양한 방식으로 수행될 수 있다.

[0242] 다른 일 측면에서, 본 출원에 기재된 약학적 조합물 및/또는 기재된 약학적 조성물은 질환 및/또는 병증을 예방 및/또는 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0243] 본 출원에서, 상기 질환 및/또는 병증은 비정상적인 CD73의 발현에 의해 매개되는 질환 및/또는 병증일 수 있다.

[0244] 본 출원에서, 상기 질환 및/또는 병증은 종양을 포함할 수 있다.

[0245] 본 출원에서, 상기 종양은 고형 종양 및/또는 혈액 종양을 포함할 수 있다.

[0246] 본 출원에서, 상기 질환 및/또는 병증은 췌장암, 유방암 및/또는 특발성 폐 섬유증(IPF)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 유방암은 삼중 음성 유방암을 포함할 수 있다.

[0247] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 샘플 내 CD73을 검출하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 약학적 조합물 및/또는 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0248] 본 출원에서, 상기 샘플 내 CD73을 검출하는 방법은 체외 방법일 수 있다. 본 출원에서, 상기 샘플 내 CD73을 검출하는 방법은 비치료 목적일 수 있다. 본 출원에서, 상기 샘플 내 CD73을 검출하는 방법은 진단 방법이 아니다.

[0249] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 상기 약학적 조합물 및/또는 약학적 조성물을 포함하는 샘플 내 CD73을 검출하는 시약 또는 키트를 제공한다.

[0250] 다른 일 측면에서, 본 출원은 또한 상기 약학적 조합물 및/또는 상기 약학적 조성물의, 샘플 내 CD73의 존재 및/또는 함량을 검출하기 위한 키트의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

[0251] 이하 실시예는 그 어떠한 이론에 의해서도 제한되지 않고, 단지 본 출원의 약학적 조합물, 제조 방법 및 용도 등을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 출원의 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0252] **실시예**

[0253] **일반적인 측정 방법**

[0254] SEC-UPLC: 측정은 "중화인민공화국약전"(2015년 판 3부) 0514 일반 규칙 고성능 액체 크로마토그래피를 참조하여, Waters 초고성능 액체 크로마토그래피 기기(Acquity H Class)를 통해 ACQUITY UPLC ® Protein BEH SEC 분석 컬럼(4.6mm×150mm)을 사용하여 수행되었으며, 순도는 면적 정규화 방법으로 계산하였다.

[0255] CEX-HPLC: 측정은 "중화인민공화국약전"(2015년 판, 3부) 일반 규칙 고성능 액체 크로마토그래피를 참조하여, Water 고성능 액체 크로마토그래피 기기(E2695)를 통해 ProPac™ WCX-10 분석 컬럼(4mm×250mm)을 사용하여 수행되었으며, 순도는 면적 정규화 방법으로 계산하였다.

[0256] Tm 값 측정(IF, 전체 스펙트럼 형광): 상이한 처방의 용해 온도 Tm은 Uncle(Unchained Labs)을 사용하여 25℃ 내지 95℃ 범위 내에서 0.3℃/분으로 가열하고, 전체 스펙트럼 형광 모듈로 계산하였다.

[0257] Tagg 값 측정(SLS, 정적 광산란): 상이한 처방의 항체 분자의 시작 응집 온도 Tagg는 Uncle 기기를 사용하여 25℃ 내지 95℃에서 0.3℃/분으로 가열하고, 정적 광산란 모듈로 계산하였다.

[0258] **실시예 1. 항-CD73 칵테일 항체에서 성분 900698 및 900725의 CD73 효소 활성 억제 실험**

[0259] 900698(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 10에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같음)과 900725(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 28에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 36에 제시된 바와 같음)를 PBS로 30μg/mL로 희석한 후 1:5, 1:2.5, 1:1, 2.5:1, 5:1로 혼합한 후, 8개 구배로 5배 희석하였다. 대수 성장기에 처한 인간 CD73(CHOK1-huCD73-3F4, Huabo Bio)을 발현하는 세포 현탁액을 취하여, 배지를 사용하여 4×105/mL 세포 현탁액으로 제조하고, 96웰 U형 플레이트에 웰당 100μL(약 40000개 세포)를 첨가하고, 1500rpm×5분으로 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 그 다음, 세포를 연속적으로 희석한 항체로 재현탁시키고, 웰당 100μL를 첨가하고 고르게 혼합하고 37℃에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 끝난 후, 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 200μL/웰 PBS로 1회 세척한 다음, 100μL/웰 180uM AMP로 재현탁하여 37℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 끝난 후, 1500rpm×5분으로 원심분리하고, 50μL/웰 상청액을 취하여 96웰 블랙 플레이트에 옮긴 후, 배합된 ATP를 50μL/웰로 첨가하고 고르게 혼합하고, 37℃에서 15분 동안 반응시켰다. 마지막으로 CellTiter-Glo® Substrate을 CellTiter-Glo® buffer에 첨가하고, 고르게 혼합하여 실온으로 평형시킨 다음, 시험할 웰에 100μL/웰로 첨가하고 실온에서 10분 동안 반응시켜, 전체 파장 검출을 수행하였다. 효소 활성의 백분율은 다음과 같이 평가를 수행하였다: 잔여 CD73 활성: (CHOK1-huCD73-3F4 세포+Ab+ATP+AMP)-(ATP+AMP)/(CHOK1-huCD73-3F4 세포+ATP+AMP)-(ATP+AMP)*100.

[0260] 900698, 900725 및 다양한 비율의 900698과 900725의 혼합물이 세포막에서 발현되는 CD73(CHOK1-huCD73-3F4, Huabo Bio)의 효소 활성 억제에 대한 효과는 도 1을 참조한다. 결과로부터, 항체 농도가 0.1 내지 1μg/mL일 경우, 동일한 농도 조건에서 900698과 900725의 혼합물이 효소 활성 억제에 대한 효과가 단독적인 900698과 900725보다 더 강한 것을 알 수 있고(검은색 점선 화살표로 표시된 바와 같이, 효소 활성 억제 곡선의 고원 값이 낮을수록 효소 활성에 대한 항체의 최대 억제 효과가 더 강해짐), 이는 900698과 900725가 혼합된 후 시너지 억제 효과를 가지며, 900698과 900725의 비율이 1:1인 경우, 최적의 효과를 나타내는 것을 설명한다.

[0261] **실시예 2. 항-CD73 칵테일 항체의 SPR 경쟁 결합 실험**

[0262] 900698과 900725 항체가 CD73에 결합할 때 경쟁 기능이 있는지 탐구하기 위해 SPR 경쟁 결합 실험을 수행하였다. 먼저, BIAcore 8k를 사용하여 인간 CD73 항원 단백질(제조업체: ACRO Biosystems, 카탈로그 번호: CD3-H52H7)을 포획하여 리간드로 사용한 다음, 항체를 분석물로 사용하였다. 항체를 첨가하는 순서는 900698+900725(먼저 900698을 첨가한 다음 900725를 첨가) 또는 900725+900698(먼저 900725를 첨가한 다음 900698을 첨가)에 따라 순차적으로 샘플을 주입하고, 동시에 900698+완충액, 900725+완충액의 방식을 사용하여 대조를 수행하였다.

[0263] 아래 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 먼저 900698 또는 900725가 첨가되는지 여부는 CD73 항원에 대한 다른

항체의 결합에 영향을 미치지 않으며, 이는 항-CD73 칵테일 항체의 두 성분인 900698 및 900725는 CD73 항원에서 상이한 결합 에피토프가 있고, CD73 항원에 동시에 결합할 수 있다는 것을 설명한다.

[0264] 표 1. 다양한 로딩 조건 하에 인간 CD73 단백질에 대한 900698과 900725의 결합 친화력 검출

리간드	분석물 1	분석물 2	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
인간화 CD73 이량체 단백질	Buffer	900698	1.56E+05	1.14E-03	7.30E-09
	900725	900698	1.35E+05	1.70E-03	1.26E-08
	Buffer	900725	1.50E+06	4.52E-03	3.01E-09
	900698	900725	1.42E+06	5.91E-03	4.16E-09

[0265]

[0266] **실시예 3. 췌장암 동물 모델에서 항-CD73 칵테일 항체의 항종양 효과 검출**

[0267] 본 실험에서는 NPG 마우스를 이용하여 BxPC-3 췌장암 동물 모델을 확립하고 피험 항체의 약효를 시험하였다. 본 실시예에 사용되는 인간 췌장암 세포 BxPC-3은 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지로, 5% CO_2가 함유된 37℃ 인큐베이터에서 배양되었다. 세포를 10대까지 연속적으로 배양하기 전에, 약 1×10^7개의 BxPC-3 세포를 함유하는 PBS 100μL와 동일한 부피의 Matrigel을 고르게 혼합한 후, 피하 주사를 통해 NPG 마우스 36마리의 등 부분 오른쪽 겨드랑이 아래 근처에 약 200μL의 접종 부피로 접종하였다. 접종하기 전에 2 내지 5% 이소플루란으로 마우스를 마취하였다. 접종 당일, 꼬리 정맥을 통해 1.0×10^7 PBMC(100μL)를 주사하고, 종양이 평균 약 50 내지 80mm^3 정도로 성장했을 때, 36마리의 종양 보유 마우스를 종양의 부피와 체중에 따라 그룹당 6마리씩, 6개 그룹으로 무작위로 나누었다. 그룹으로 나눈 당일 투약하였으며, 구체적인 투약 방안은 아래 표를 참조한다. 여기서, 900201은 CD73 항원에 결합하지 않는 음성 대조 항체이다. 900201의 중쇄(HC) 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같고, 900201의 경쇄(LC) 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 38에 제시된 바와 같다. Oleclumab은 AstraZeneca에서 개발한 항-CD73 단클론 항체로서 현재 임상 3상 진행 중이다. Uliledlimab은 I-Mab에서 개발한 항-CD73 단클론 항체로서 현재 임상 1상 진행 중이다.

[0268] 결과는 아래 표 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 음성 대조 그룹 900201에 비해, 양성 약물 oleclumab, uliledlimab 및 시험 약물 900698, 900725, 항-CD73 칵테일 항체는 모두 BxPC-3 췌장암의 성장을 유의하게 억제할 수 있으며, 동일한 용량의 항-CD73 칵테일 항체는 양성 대조 그룹 oleclumab, uliledlimab 및 900698과 900725보다 더 우수한 종양 억제 효과를 나타내고, 이는 900698과 900725를 등비로 혼합하여 형성된 항-CD73 항체 칵테일 항체가 항췌장암 종양에 대해 우수한 시너지 효과를 갖는다는 것을 입증한다.

[0269] 표 2. 췌장암 모델의 투약 방안

그룹별	시험품	동물 수(마리)	투약 용량(mg/kg)	투약 경로	투약 빈도[a]	투약 횟수
G1	900201	6	5	i.p.	BIW	6
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	6
G3	uliledlimab	6	5	i.p.	BIW	6
G4	900698	6	5	i.p.	BIW	6
G5	900725	6	5	i.p.	BIW	6
G6	항-CD73 칵테일 항체	6	5	i.p.	BIW	8

[0270]

[0271] **실시예 4. 삼중 음성 유방암 동물 모델에서 항-CD73 칵테일 항체의 항종양 효과 검출**

[0272] 본 실험에서는 NPG 마우스를 이용하여 MDA-MB-231 삼중 음성 유방암 동물 모델을 확립하고 피험 항체의 약효를 시험하였다. 본 실험에 사용되는 인간 유방암 세포 MDA-MB-231은 10% FBS가 첨가된 L-15 배지로, CO_2가 함유되지 않은 37℃ 인큐베이터에서 배양되었다. 세포를 10대까자 연속적으로 배양하기 전에, 약 5.0×10^6개의 MDA-MB-231 세포를 100μL의 PBS에 재현탁시키고, 동일한 부피의 Matrigel와 고르게 혼합한 후, 피하 주사를 통해 NPG 인간화 마우스 등 부분 오른쪽 겨드랑이 아래 근처에 200μL 정도의 접종 부피로 접종하였다. 접종하기 전에 2 내지 5% 이소플루란으로 마우스를 마취하였다. 접종 당일, 꼬리 정맥을 통해 1.0×10^7 PBMC(100μL)를 주사하고, 종양이 평균 약 50 내지 80mm^3 정도까지 성장했을 때, 30마리의 종양 보유 마우스를 종양의 부피와 체중에 따라 그룹당 6마리씩, 5개 그룹으로 무작위로 나누었다. 그룹으로 나눈 당일 투약하였으며, 구체적인 투약 방안은 아래 표를 참조한다. 여기서, 900201은 CD73 항원에 결합하지 않는 음성 대조 항체이다. Oleclumab은

AstraZeneca에서 개발한 항-CD73 단클론 항체로서 현재 임상 3상 진행 중이다.

[0273] 결과는 아래 표 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 와 음성 대조 그룹 900201에 비해, 양성 약물 oleclumab 및 시험 약물 900698, 900725, 항-CD73 칵테일 항체는 모두 MDA-MB-231 삼중 음성 유방암의 성장을 유의하게 억제할 수 있으며, 동일한 용량의 항-CD73 칵테일 항체는 양성 대조 그룹 oleclumab과 900698 및 900725보다 더 우수한 종양 억제 효과를 나타내고, 이는 900698과 900725를 등비로 혼합하여 형성된 항-CD73 항체 칵테일 항체가 삼중 음성 유방암 종양에 대해 우수한 시너지 효과를 갖는다는 것을 입증한다.

[0274] 표 3. 삼중 음성 유방암 모델의 투약 방안

[0275]

그룹별	시험품	동물 수(마리)	투약 용량(mg/kg)	투약 경로	투약 빈도[a]	투약 횟수
G1	900201	6	5	i.p.	BIW	8
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	8
G3	900698	6	5	i.p.	BIW	8
G4	900725	6	5	i.p.	BIW	8
G5	항-CD73 칵테일 항체	6	5	i.p.	BIW	8

[0276] **실시예 5. 특발성 폐 섬유증(IPF) 동물 모델에서 항-CD73 칵테일 항체의 치료 효과**

[0277] 특발성 폐 섬유증(IPF)은 진행성 및 비가역성 폐 섬유증을 특징으로 하는 치명적인 질환으로 현재 효과적인 치료 방법이 없다. 대부분의 환자는 증상이 발생한 후 3 내지 8년 이내에 진행성 호흡 부전으로 사망한다. IPF의 발병 기전이 잘 알려져 있지 않지만, 특징적인 병리학적 특징으로는 폐의 염증 변화, 과도한 섬유모세포 증식 및 세포외 기질(ECM)의 비정상적인 침착 등이 포함된다. 블레오마이신(BLM)에 의해 유도되는 섬유증은 특발성 폐 섬유증의 발병 기전을 연구하는 데 널리 사용되고 있다.

[0278] CD73 인간화 형질전환 마우스에서 블레오마이신에 의해 유도되는 특발성 폐 섬유증 모델 실험의 구체적인 조작은 다음과 같다: CD73 인간화 마우스는 아래 표 4에 따라 그룹을 나누었으며, 즉, G1 정상 그룹에 직접 나열된 무작위로 선택된 3마리의 동물을 제외하고, 다른 모든 그룹의 동물은 모델을 유도하기 위해 모두 기관에 블레오마이신을 드롭방식으로 주입하였다. 구체적인 유도 방법은 다음과 같다: 1일째, 동물을 2 내지 5% 이소플루란을 흡입시켜 마취하고, 체중을 기준으로, 기관 내 투약 경로를 통해 동물에게 블레오마이신을 투여하였다(2U/kg, 구체적인 투약 부피는 동물의 체중을 기준으로 계산하여 기록함). 블레오마이신을 드롭방식으로 주입한 3일 후, 동물 체중과 동물 상태에 따라 체중이 과도하게 감소한 동물과 체중 변화가 미약한 동물은 제거하고, 각 그룹의 평균 체중을 근사화하고 그룹간 편차를 줄이기 위해, 48마리의 동물은 BioBook의 무작위 할당 기능을 통해 나머지 6개 그룹별로 나누었다. 모든 동물은 4일째부터 실험이 끝날 때까지 투약하였고, 구체적인 투약 방안은 도 5와 표 4에 나타낸 것을 참조한다. 전체 실험 주기 동안, 동물의 체중은 주 3회 측정하고 기록하였다. 마우스 체중 결과는 도 6에 도시된 바와 같이, 전체 실험 주기 동안, 정상 그룹을 제외한 동물은 모델링 후 체중이 점차 감소하고, 실험이 진행됨에 따라 자가 회복되면서 체중이 점차 지속적으로 증가하며, 각 그룹 사이에 유의한 차이가 없다.

[0279] 표 4. 특발성 폐 섬유증(IPF) 마우스 모델의 그룹화 및 투약 방안

그룹별	시험 물질	동물	투약 경로	농도 mg/mL	투약 농도		투약 방안
					mg/kg	mL/kg	
1	정상 그룹(블레오마이신 유도를 받지 않음)	3	i.p.	/	/	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회
2	모델 그룹(900201 음성 대조 항체 투여)	8	i.p.	5	50	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회
3	양성 약물 닌테다닙 그룹	8	p.o.	5	50	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 일 1회
4	900698 단일 약물 항체 그룹	8	i.p.	5	50	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회
5	항-CD73 칵테일 항체 (900698+900725)-저용량	8	i.p.	0.5+0.5	5+5	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회
6	항-CD73 칵테일 항체 (900698+900725)-중간 용량	8	i.p.	1.5+1.5	15+15	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회
7	항-CD73 칵테일 항체 (900698+900725)-고용량	8	i.p.	2.5+2.5	25+25	10	그룹 나눈 후 당일부터 시작하여, 주 2회

[0280]

[0281] **5.1 기도 반응성 측정:**

[0282] 21일째, 폐 기능을 검출하기 위해 모든 동물에 대해 기도 반응성 측정을 수행하였다. WBP 시스템을 사용하여 실험 마우스에 대해 기도 과민반응 측정을 수행하였다. 먼저, 마우스에게 PBS 용액을 에어로졸 흡입시킨 후 메타콜린(Mch)을 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50mg/mL 농도로 연속적으로 에어로졸 흡입시키고, 각 농도에서 90초 동안 자극하고 상응하는 농도에서 향상된 호흡 간격 값(Penh)을 측정하고, 기준선에 대한 Penh의 변화율-Mch 농도 곡선을 플롯팅하고, 곡선 아래 면적을 계산하였다.

[0283] 결과는 도 7에 도시된 바와 같이, 정상 동물에 비해 모델 그룹 동물의 Penh 곡선 아래 면적(AUC)이 유의하게 증가하다. 모델 동물 그룹에 비해, 시험 물질의 중간 및 고용량 그룹에서는 개선되는 경향을 보이며, 고용량 그룹에는 유의한 차이가 있다(P=0.024 Kruskal-Wallis Test). 그러나, 양성 대조 그룹에서는 닌테다닙의 개선이 관찰되지 않았으며, 이는 특발성 폐 섬유증의 폐 기능 개선에 있어서 항-CD73 칵테일 항체가 양성 대조 그룹의 닌테다닙보다 우수함을 입증한다.

[0284] **5.2 폐포 세척액 내 염증 세포 수의 측정**

[0285] 폐 기능 검출이 완료된 후, 동물을 졸레틸(Zoletil)(복강 주사, 25 내지 50mg/kg 졸레틸, 5 내지 10mg/kg 자일라진)로 마취시킨 후 기관에 튜브를 삽입하여, 0.4mL의 PBS(1% FBS 포함)로 폐를 1차 세척하였다. 추가로 0.4mL의 PBS(1% FBS 포함)를 취하여 폐를 2차 및 3차 세척하였다. 100uL를 혼합 현탁하고 폐포 세척액 내 총 세포 수를 계수하였다. 폐포 세척액을 300g으로 4℃에서 5분 동안 원심분리하고, 원심분리한 후 얻은 세포 펠렛을 도말 준비를 위해 재현탁하고, Wright-Giemsa 염색 용액으로 염색하여 호산구, 호중구, 대식세포 및 림프구를 구별하였다. 광학 현미경으로 수를 계수하였다. 실험 데이터는 평균값±표준 오차(mean±S.E.M)로 표시하였다. 데이터는 SPSS 또는 Graphpad Prism을 사용하여 분석하였다. 사용된 구체적인 분석 방법은 도면 범례와 표 아래 비고 사항에 설명되어 있다. P<0.05는 통계학적으로 차이를 갖는 것으로 간주된다.

[0286] 폐 세척액의 세포 수 계수 결과에 따라, 모델 그룹 동물의 폐포 세척액에서 염증 관련 총 세포 수, 림프구 수 백분율이 정상 그룹에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타나고; 양성 약물과 다양한 농도의 항-CD73 칵테일 항체 시험 물질을 투여한 후, 염증 관련 총 세포 수와 림프구 수 수준이 유의하게 감소하고, 이는 항-CD73 칵테일 항체가 특발성 폐 섬유증 질환의 염증 정도를 유의하게 개선할 수 있는 것을 설명한다.

[0287] **5.3 병리학적 섬유증 정도 평점:**

[0288] 세척한 후, 경추 탈구로 동물을 안락사시켰다. 왼쪽 폐를 수집하여 중성 포르말린으로 고정하고 왁스 블록에 내장한 후, 횡단 절단하여 상부, 중부 및 하부에서 각각 총 3장/폐엽의 절편을 채취하여 하나의 왁스 블록에 내장하고 Masson 염색시켜 병리학적 섬유증의 정도를 평점하는 데 사용하였다. 평점 기준은 아래 표 5를 참조한다.

[0289] 평점 결과는 도 9와 도 10과 같다. 정상 그룹의 동물에 비해, 모델 그룹의 동물은 블레오마이신에 의해 유도된

후 유의한 폐 섬유화 변화를 나타냈으며(P<0.001), 이는 블레오마이신 폐 섬유증 모델이 모델링에 성공하였음을 설명한다. 양성 약물인 닌테다닙 그룹 및 항-CD73 칵테일 항체 투약 그룹은 모두 병리학적 평점이 개선되었다. Kruskal-Wallis test 방법을 사용하여 검사한 결과에 따라, 중간 용량의 항-CD73 칵테일 항체 투약 그룹은 모델 그룹에 비해 유의한 차이가 있었다. 이는 항-CD73 칵테일 항체가 특발성 폐 섬유증의 병리학적 평점을 효과적으로 개선할 수 있음을 설명한다.

[0290] 표 5. 병리학적 섬유증 평점 기준

점수	병리학적 섬유증 평점 기준
1	정상
3	최소한의 섬유증 비후
5	중간 정도의 섬유증 비후
7	폐 조직 손상을 동반한 섬유증(두꺼운 묶음)
8	섬유 면적이 크고 "벌집 모양"으로 나타남

[0291]

[0292] **실시예 6. 다양한 완충 시스템의 비교**

[0293] WaterSep 중공 섬유(Discover 12)를 사용하여 항체를 10mM의 각 스크리닝 완충액으로 치환하고(아래 표 6에 나타난 바와 같음), 각 완충액을 사용하여 항체 농도를 약 5mg/mL로 조정하고, 멸균하고 여과하여 나중에 사용하기 위해 보관하였다.

[0294] 새로 제조된 샘플은 Tm과 Tagg를 통해 각 완충액의 안정성을 평가하였으며 결과는 표 6 및 표 7에 나타난 바와 같다. 동시에, 새로 제조된 샘플은 고온 시험(40℃±2℃, 3주 동안 방치함), 동결-해동을 반복하는(5개의 순환, ≤-70℃/5℃±3℃) 단계를 포함하는 다양한 가압 조건 하에 놓았다. 안정성은 각각 외관, 순도 등 검출 항목을 통해 평가되었으며, 결과는 표 8 및 표 9에 나타난 바와 같다.

[0295] 표 6. 900698 항체에 대한 다양한 완충액의 Tm 및 Tagg 결과 요약

완충액		Tm	Tagg
종류	pH	(℃)	(℃)
아세트산나트륨-아세트산	6	71.9	80.4
구연산나트륨-구연산	6	70.3	75.7
히스티딘-히스티딘 염산	6.5	70.6	76.4
인산이수소나트륨-인산수소이나트륨	6	72.2	80.1
Tris-염산염	7	72.9	79.5
히스티딘-아세트산	6	69.9	77.0
인산-구연산나트륨	6	71.3	77.4

[0296]

[0297] 표 7. 900725 항체에 대한 다양한 완충액의 Tm 및 Tagg 결과 요약

완충액		Tm	Tagg
종류	pH	(℃)	(℃)
아세트산나트륨-아세트산	6	71.8	80.4
구연산나트륨-구연산	6	70.6	77.1
히스티딘-히스티딘 염산	6.5	71.3	77.0
인산이수소나트륨-인산수소이나트륨	6	67.9	76.2
Tris-염산염	7	71.7	78.2
히스티딘-아세트산	6	70.8	76.7
인산-구연산나트륨	6	70.7	77.5

[0298]

[0299] 표 8. 900698 항체에 대한 각 압력 조건 하에 다양한 완충 시스템의 외관 및 순도 결과 요약

완충액		동결-해동		고온	
종류	pH	외관	SEC 순도	외관	SEC 순도
아세트산나트륨-아세트산	6	맑음	98.8%	맑음	96.6%
구연산나트륨-구연산	6	맑음	99.0%	맑음	96.2%
히스티딘-히스티딘 염산	6.5	맑음	98.9%	맑음	97.0%
인산이수소나트륨-인산수소이나트륨	6	맑음	99.0%	맑음	96.0%
Tris-염산염	7	맑음	98.8%	맑음	96.6%
히스티딘-아세트산	6	맑음	99.0%	맑음	97.0%
인산-구연산나트륨	6	맑음	99.0%	맑음	96.2%

[0300]

[0301] 표 9. 900725 항체에 대한 각 압력 조건 하에 다양한 완충 시스템의 외관 및 순도 결과 요약

완충액		동결-해동		고온	
종류	pH	외관	SEC 순도	외관	SEC 순도
아세트산나트륨-아세트산	6	맑음	98.5%	맑음	96.1%
구연산나트륨-구연산	6	맑음	98.5%	맑음	96.0%
히스티딘-히스티딘 염산	6.5	맑음	98.4%	맑음	96.5%
인산이수소나트륨-인산수소이나트륨	6	맑음	98.6%	맑음	95.9%
Tris-염산염	7	맑음	98.4%	맑음	96.2%
히스티딘-아세트산	6	맑음	98.5%	맑음	96.5%
인산염-구연산나트륨	6	맑음	98.5%	맑음	95.9%

[0302]

[0303] 표 6 및 표 7로부터 볼 수 있듯이, 각 완충 시스템의 Tm과 Tagg에는 큰 차이가 없었다. 표 8 및 표 9로부터 볼 수 있듯이, 동결-해동 압력 조건 하에 각 그룹 간의 순도 방면에 유의한 차이가 없으며; 고온 압력 조건 하에 각 완충 시스템 그룹 간의 외관 및 순도 방면에 모두 유의한 차이가 없었다.

[0304] 후속에는 히스티딘-아세트산(pH 6)을 완충액으로 사용하여 다른 부형제 스크리닝을 수행하였다.

[0305] **실시예 7. 다양한 안정제의 안정성 비교**

[0306] WaterSep 중공 섬유(Discover 12)를 사용하여 항체를 히스티딘-아세트산(pH 6) 완충 시스템으로 치환하고, 각 안정제의 고농도 모액을 각각 첨가하고, 각 안정제 스크리닝 그룹을 배합하여(표 10에 나타난 바와 같음) 항체 농도를 약 30mg/mL로 조절하고, 멸균하고 여과하여 나중에 사용하기 위해 보관하였다.

[0307] 새로 제조된 샘플은 고온 시험(40℃±2℃, 3주 동안 방치함), 동결-해동을 반복하는(5개의 순환, ≤-70℃/5℃±3℃) 단계를 포함하는 다양한 가압 조건 하에 놓았다. 안정성은 각각 외관 및 순도 등 검출 항목을 통해 평가되었으며, 일부 검출 결과는 아래 표 10 및 표 11을 참조한다.

[0308] 표 10. 900698 항체에 대한 각 압력 조건 하에 다양한 안정제 시스템에서 외관 및 순도 결과 요약

샘플		동결-해동		고온		
종류	함량	외관	SEC 순도	외관	SEC 순도	CEX 메인 피크
수크로스	8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.2%	55.9%
트레할로스	8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.4%	55.1%
소르비톨	4 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.4%	55.5%
만니톨	4 중량%	맑음	97.1%	맑음	97.2%	56.5%
프롤린/수크로스	1.5 중량%/5 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.4%	55.9%
메티오닌/트레할로스	0.15 중량%/8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.3%	56.7%
글라이신/만니톨	1 중량%/4 중량%	맑음	98.5%	맑음	97.3%	55.4%
염화나트륨/수크로스	0.6 중량%/5 중량%	맑음	98.4%	맑음	96.6%	56.7%
아르기닌/수크로스	1.5 중량%/5 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.2%	56.3%
라이신/트레할로스	0.5 중량%/7 중량%	맑음	98.3%	맑음	96.7%	52.8%

[0309]

[0310] 표 11. 900725 항체에 대한 각 압력 조건 하에 다양한 안정제 시스템에서 외관 및 순도 결과 요약

[0311]

샘플		동결-해동		고온		
종류	함량	외관	SEC 순도	외관	SEC 순도	CEX 메인 피크
수크로스	8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.2%	57.6%
트레할로스	8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.0%	57.5%
소르비톨	4 중량%	맑음	98.6%	맑음	97.0%	57.5%
만니톨	4 중량%	맑음	96.8%	맑음	97.0%	57.7%
프롤린/수크로스	1.5 중량%/5 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.1%	57.6%
메티오닌/트레할로스	0.15 중량%/8 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.3%	58.1%
글라이신/만니톨	1 중량%/4 중량%	맑음	98.4%	맑음	97.0%	56.4%
염화나트륨/수크로스	0.6 중량%/5 중량%	맑음	98.2%	맑음	96.6%	57.7%
아르기닌/수크로스	1.5 중량%/5 중량%	맑음	98.3%	맑음	97.2%	58.1%
라이신/트레할로스	0.5 중량%/7 중량%	맑음	98.3%	맑음	96.6%	56.9%

[0312] 표 10 및 표 11로부터 볼 수 있듯이, 동결-해동 압력 하에, 만니톨 그룹의 SEC 순도가 다른 그룹에 비해 약간 낮은 것을 제외하고는 다른 각 그룹이 모두 유의한 차이가 없으며; 고온 압력 하에, 염화나트륨-수크로스 그룹과 라이신-트레할로스 그룹의 SEC 순도가 다른 그룹에 비해 약간 낮은 것을 제외하고는 다른 각 그룹 사이에 유의한 차이가 없었다.후속에는 수크로스를 안정제로 사용하여 계면활성제 스크리닝 실험을 수행하였다.

[0313] **실시예 8. 계면활성제 스크리닝**

[0314] WaterSep 중공 섬유(Discover 12)를 사용하여 항-CD73 칵테일 항체를 히스티딘-아세트산(pH 6) 8 중량%의 수크로스 완충 시스템으로 치환하고, 각 계면활성제의 고농도 모액을 각각 첨가하고, 각 계면활성제 스크리닝 그룹을 배합하여(표 12에 나타난 바와 같음) 항체 농도를 약 30mg/mL로 조절하고, 멸균하고 여과하여 나중에 사용하기 위해 보관하였다.

[0315] 새로 제조된 샘플을 각 진탕 가압 조건 하에 놓고 실온에서 3일(200rpm) 동안 진탕시켜, 계면활성제 트윈-20(PS-20) 및 트윈-80(PS-80)의 보호 효과를 외관 및 불용성 마이크로입자의 수를 통해 평가하였으며, 일부 검출 결과는 아래 표 12를 참조한다.

[0316] 표 12. 진탕 압력 조건 하에 다양한 계면활성제의 마이크로입자 수 요약

[0317]

처방 정보			진탕		
기본 처방	계면활성제		외관	≥10μm (개/mL)	≥25μm (개/mL)
	종류	농도			
히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 함유, 항체 30mg/mL	없음	/	유백색+++	230	40
	PS-20	0.005%	맑음	60	10
		0.01%	맑음	20	0
		0.03%	유백색++	0	0
		0.05%	유백색++	380	0
		0.1%	유백색++	110	0
	PS-80	0.005%	맑음	50	0
		0.01%	맑음	0	0
		0.03%	유백색++	260	40
		0.05%	유백색++	280	10
		0.1%	유백색+	80	0

[0318] 표 12로부터 볼 수 있듯이, 진탕 압력 하에, 계면활성제를 첨가하지 않은 그룹에 비해 PS-20과 PS-80을 첨가하는 것이 모두 진탕에 의한 불용성 마이크로입자 수의 증가를 현저히 억제할 수 있다. 외관 "+"는 유백색 현상 등급을 나타내며, "+++"는 심각함을 의미하고 "++"는 비교적 심각함을 의미하며 "+"는 약간 심각함을 의미하고, 외관 측면에서 PS-20 및 PS-80을 첨가하는 것은 모두 샘플의 유백색 현상의 심각 정도를 개선할 수 있지만, PS-20과 PS-80의 농도가 0.05%를 초과하면 개선 효과가 약화된다.

[0319] **실시예 9. 다양한 완충 시스템 항-CD73 칵테일 항체 제제의 제조**

[0320] 표 6 내지 표 12에서, 각 성분 실험 결과가 개별적으로 약간 좋지 않은 것을 제외하고는 다른 그룹 간에 유의한 차이가 없음을 볼 수 있다.

[0321] 요약하면, 후속에는 다음과 같은 완충 시스템을 선택하여 가압, 가속 및 장기적인 안정성 조사를 수행할

것이다:

[0322] 1) 20mM 히스티딘-아세트산, 8 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80, PH 6±0.5

[0323] 2) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80, PH 6±0.5

[0324] 3) 20mM 히스티딘-아세트산, 1.5 중량%의 프롤린, 5 중량%의 수크로스 및 0.03 중량%의 트윈-80, PH 6±0.5

[0325] 4) 20mM 아세트산나트륨-아세트산, 0.15 중량%의 메티오닌, 8 중량%의 트레할로스 및 0.03 중량%의 트윈-80, PH 6±0.5

[0326] 먼저, Merk 회사의 30KD 한외여과막 팩(PLCTK)을 사용하여 항-CD73 칵테일 항체를 각 완충 시스템으로 치환하고, 항체 농도를 약 30±3mg/mL로 조절하고 멸균하고 여과한 후 각 시점에서 각 시스템 제제에 대해 하나의 튜브에 1mL씩으로 1.5mL EP 튜브에 무균적으로 나누어 담았다.

[0327] **실시예 10. 항-CD73 칵테일 항체 제제의 안정성**

[0328] 실시예 10에서는 실시예 9에서 제조된 여러 그룹의 완충 시스템 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제의 안정성을 조사하였으며, 안정성 조사는 가압, 가속 및 장기적인 안정성 조사이었고, 구체적으로 다음과 같다:

[0329] **10.1 가압 조건에서의 안정성 시험**

[0330] 가압 조건에는 3주 동안 고온(40℃±2℃), 3일 동안 실온에서 진탕(60rmp), 동결-해동 반복(5개의 순환, ≤-70℃/5℃±3℃ 동결-해동)하는 단계 등이 포함된다.

[0331] 실시예 9에 따라 제조된 여러 그룹의 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제 샘플을 각 압력 조건 하에 놓고 보관하고(표 13에 나타난 바와 같음), 설정된 시점 또는 처리 횟수 후에 샘플을 채취하여 검출하며, 외관, 불용성 마이크로입자 수 및 순도 등으로 이의 안정성을 평가하였고, 일부 검출 결과는 아래 표 13을 참조한다.

[0332] 표 13. 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제가 각 가압 조건에서의 안정성 데이터 요약

샘플	가압 조건	외관	불용성 마이크로입자		순도		
			≥10μm (개/mL)	≥25μm (개/mL)	SEC 순도	CEX 메인 피크 38	CEX 메인 피크 39
완충 시스템 1	T0 대조	맑음	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	실온에서 3일 동안 진탕	맑음	260	40	97.7%	26.1%	40.6%
	3주 동안 고온	맑음	110	65	96.4%	21.0%	30.5%
	동결-해동 5회 순환	맑음	/	/	97.8%	24.0%	37.4%
완충 시스템 2	T0 대조	맑음	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	실온에서 3일 동안 진탕	맑음	60	0	97.6%	28.2%	37.3%
	3주 동안 고온	맑음	30	20	95.6%	20.7%	26.2%
	동결-해동 5회 순환	맑음	/	/	97.5%	26.9%	36.7%
완충 시스템 3	T0 대조	맑음	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	실온에서 3일 동안 진탕	맑음	111	0	97.5%	25.6%	41.5%
	3주 동안 고온	맑음	25	5	96.0%	19.0%	28.4%
	동결-해동 5회 순환	맑음	/	/	97.7%	25.2%	40.5%
완충 시스템 4	T0 대조	맑음	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	실온에서 3일 동안 진탕	맑음	30	0	97.1%	28.3%	35.5%
	3주 동안 고온	맑음	45	10	95.8%	21.3%	25.4%
	동결-해동 5회 순환	맑음	/	/	97.5%	26.4%	33.7%

[0333]

[0334] 비고: T0 대조는 제제 제조가 완료되었을 때의 대조임.표 13으로부터 볼 수 있듯이, 각 압력 조건에 따라 제품 품질에 영향을 미치는 항목과 정도가 상이하게 나타났다. 진탕 및 고온 압력은 주로 불용성 마이크로입자의 큰 입자의 수를 증가시키는 것이고, 순도를 약간 감소시켰지만 품질 기준보다 훨씬 높았다. 결론적으로, 이러한 여러 그룹의 완충 시스템의 약학적 조성물은 안정성이 매우 높아 약물 주성분 항-CD73 칵테일 항체를 효과적으로 보호할 수 있으므로, 각 가압 조건의 파괴 작용을 효과적으로 저항할 수 있다.

[0335] **10.2 가속 안정성 시험**

[0336] 실시예 9에 따라 제조된 여러 그룹의 완충 시스템 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제 샘플을 가속 조건 하에 놓고 보관하고(25℃±2℃), 설정된 시점에 샘플을 채취하여 검출하고, 불용성 마이크로입자 및 순도 등으로 이의 안정성을 평가하였으며, 일부 검출 결과는 아래 표 14를 참조한다.

[0337] 표 14. 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제가 가속 조건에서의 안정성 데이터 요약

샘플 명칭	조건	불용성 마이크로입자		순도		
		≥10μm (개/mL)	≥25μm (개/mL)	SEC 순도	CEX 메인 피크(38)	CEX 메인 피크(39)
완충 시스템 1	T0 대조	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	3주	20	10	97.6%	25.3%	39.0%
	2개월	160	10	97.3%	22.8%	33.9%
	3개월	0	0	96.8%	22.1%	32.2%
완충 시스템 2	T0 대조	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	3주	25	15	97.2%	25.5%	34.4%
	2개월	60	0	96.7%	24.3%	31.5%
	3개월	0	0	95.8%	23.4%	29.8%
완충 시스템 3	T0 대조	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	3주	111	0	97.4%	23.3%	37.2%
	2개월	25	5	97.1%	22.2%	33.7%
	3개월	0	0	96.2%	21.1%	31.3%
완충 시스템 4	T0 대조	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	3주	40	15	97.2%	27.5%	34.6%
	2개월	220	0	96.9%	25.0%	30.8%
	3개월	0	0	95.9%	24.1%	29.2%

[0338]

[0339] 비고: T0 대조는 제제 제조가 완료되었을 때의 대조임.표 14로부터 볼 수 있듯이, 가속 조건으로 인해 약학적 제제의 품질이 일정한 정도로 저하되었다. 여러 그룹의 완충 시스템에서 20HA6Arg1.5Suc5ps0.03은 약간 좋지 않은 것을 나타내었으며, T0 샘플에 비해 3개월 가속한 샘플은, SEC 분자체 순도가 약 1.4% 감소되었고, CEX 메인 피크(38)의 함량이 약 4.4% 감소되었으며, CEX 메인 피크(39) 함량이 약 9.6% 감소되었지만, 여전히 품질 기준을 충족하였다. 결론적으로, 이러한 여러 그룹의 완충 시스템의 약학적 조성물은 안정성이 매우 높아, 25℃의 가속 조건 하에 적어도 3개월 이상 안정적으로 보관할 수 있다.

[0340] **10.3 장기적인 안정성 시험**

[0341] 실시예 9에 따라 제조된 여러 그룹의 완충 시스템의 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제 샘플을 장기적인 냉장 조건 하에 놓아 보관하고(5℃±3℃), 설정된 시점에 샘플을 채취하여 검출하며, 불용성 마이크로입자, 순도 등으로 이의 안정성을 평가하였고, 일부 검출 결과는 아래 표 15를 참조한다.

[0342] 표 15. 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제가 장기적인 냉장 조건에서의 안정성 데이터 요약

샘플 명칭	조건	불용성 마이크로입자		순도		
		≥10μm (개/mL)	≥25μm (개/mL)	SEC 순도	CEX 메인 피크(38)	CEX 메인 피크(39)
완충 시스템 1	T0 대조	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	3개월	0	0	97.3%	24.4%	37.3%
완충 시스템 2	T0 대조	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	3개월	10	0	96.9%	25.9%	34.5%
완충 시스템 3	T0 대조	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	3개월	10	0	97.2%	23.9%	37.8%
완충 시스템 4	T0 대조	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	3개월	40	10	97.0%	26.8%	33.6%

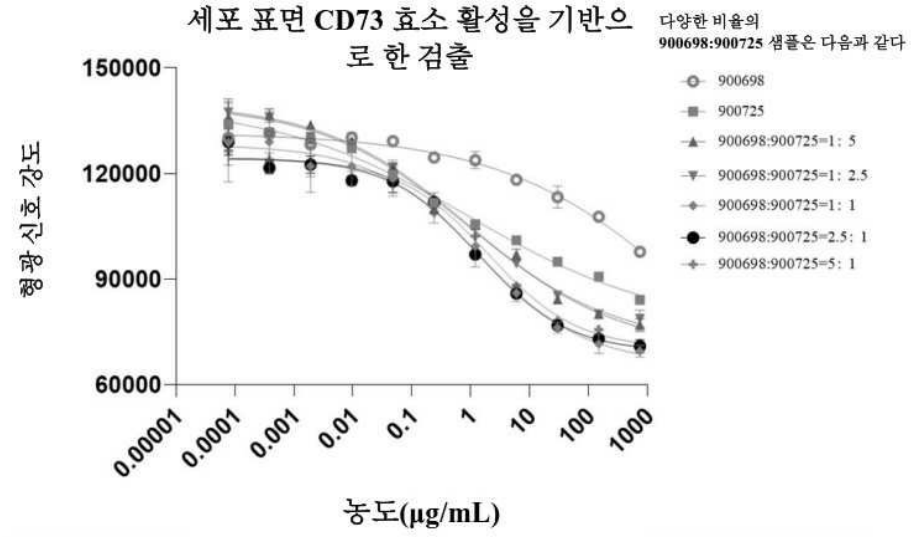
[0343]

[0344] 비고: T0 대조는 제제 제조가 완료되었을 때의 대조임.표 15로부터 볼 수 있듯이, 장기적인 냉장 조건 하에(5℃±3℃), 이러한 여러 그룹의 완충 시스템의 약학적 제제는 안정성이 매우 우수하여, 샘플은 3개월 동안 불용성 마이크로입자에 유의한 변화가 없었으며, 순도가 약간 감소되었지만 품질 기준보다 훨씬 높았다. 결론적으로, 이러한 그룹의 완충 시스템의 약학적 조성물은 안정성이 매우 높아 장기적인 냉장 조건 하에 안정적으로 보관할 수 있다.

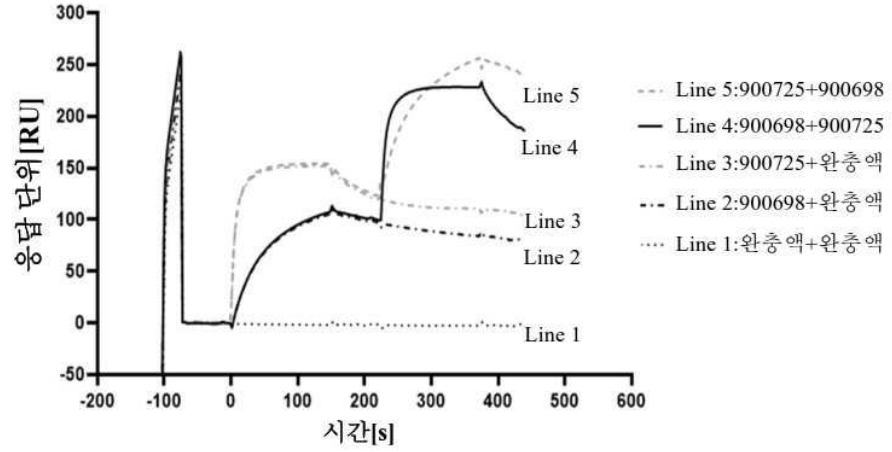
[0345] 요약하면, 실시예 9에서 제조된 여러 그룹의 완충 시스템의 항-CD73 칵테일 항체 약학적 제제는 매우 우수한 안정성을 가지며, 항-CD73 칵테일 항체는 각 압력 조건(고온, 동결-해동 반복과 진탕) 하에 비교적 우수한 안정성을 유지하며, 가속 조건(25℃±2℃) 하에 적어도 3개월 이상 안정적으로 보관할 수 있는 동시에, 장기적인 냉장 조건 하에 매우 높은 안정성을 나타내어 안정적으로 보관할 수 있다.

도면

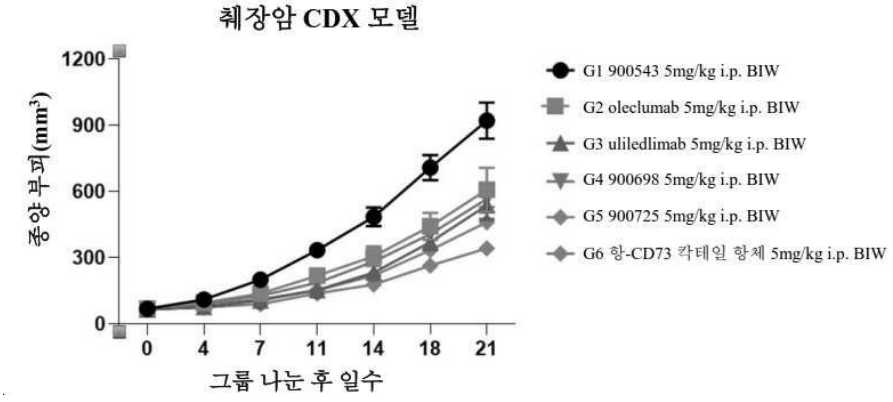
도면1



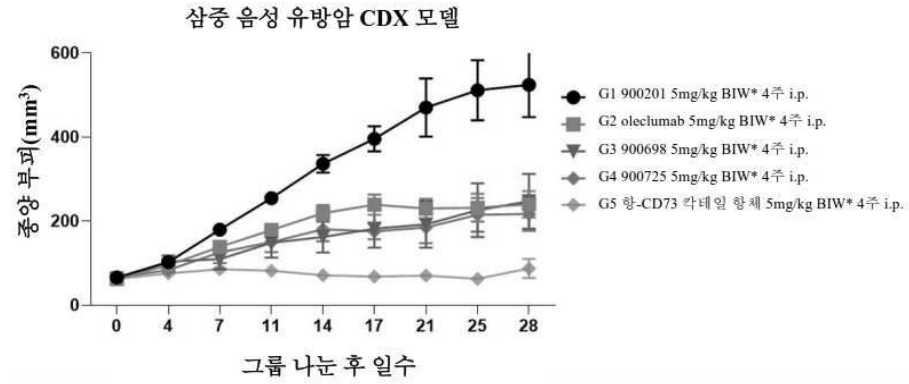
도면2



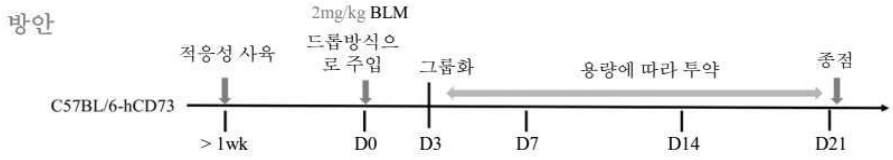
도면3



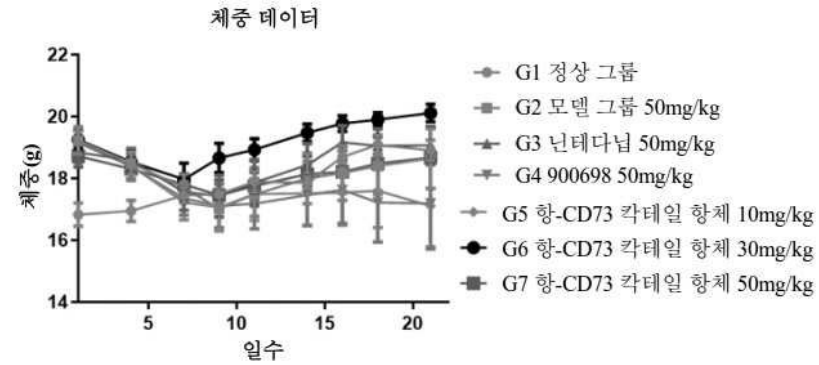
도면4



도면5

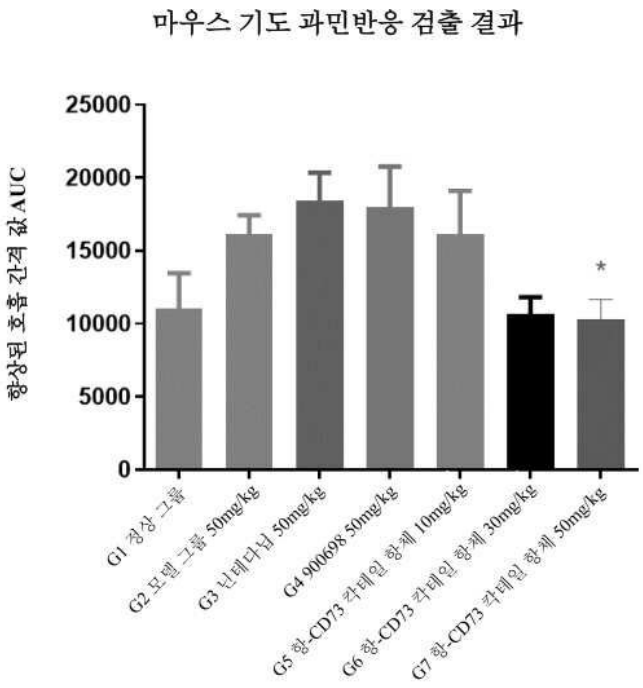


도면6



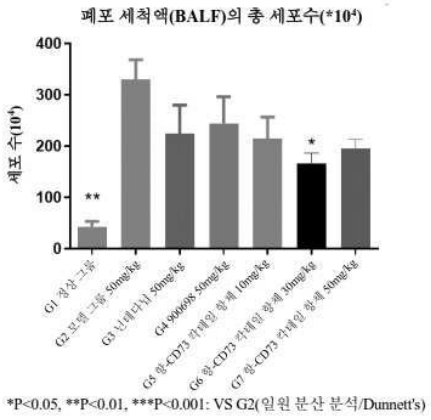
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2(반복 측정/Bonferroni's)

도면7

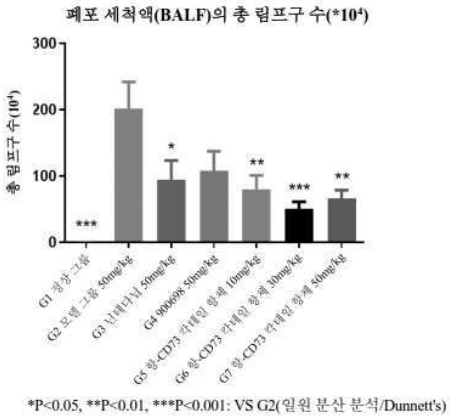


*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs G2(일원 분산 분석/Dunnett)

도면8

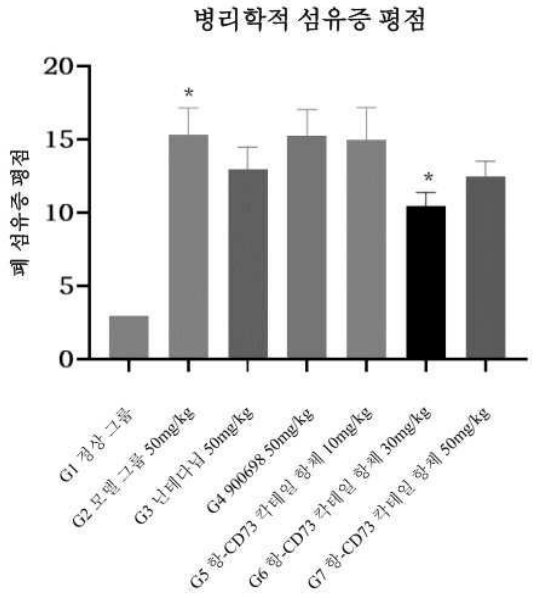


*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2(일원 분산 분석/Dunnett's)



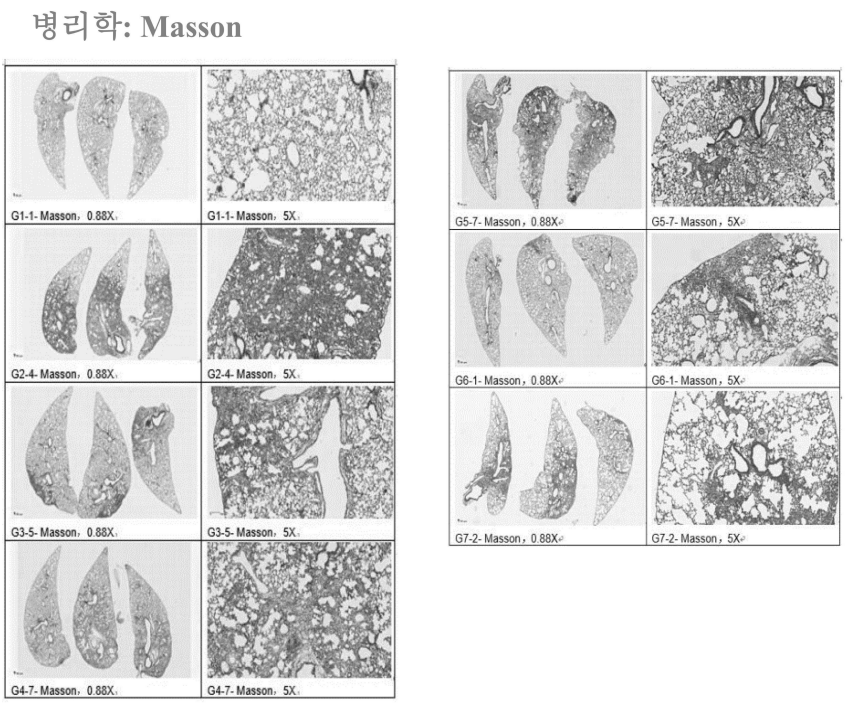
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2(일원 분산 분석/Dunnett's)

도면9



*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs G2(Mann-Whitney 시험)

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.