(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0103034
(43) 공개일자 2024년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7019886
(22) 출원일자(국제) 2022년11월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월14일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/132422
(87) 국제공개번호 WO 2023/088337
국제공개일자 2023년05월25일
(30) 우선권주장
202111359665.8 2021년11월17일 중국(CN)

(71) 출원인
바이오세우스 인크.
중국 광둥성 519080 주하이 샹저우 구 탕지아완 타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
(72) 발명자
다이, 쌍
중국, 519080 광둥성, 주하이, 샹저우, 탕지아완 타운, 케지 로드 7, 넘버1, 빌딩 4, 10비
자이, 티엔항
중국, 519080 광둥성, 주하이, 샹저우, 탕지아완 타운, 케지 로드 7, 넘버1, 빌딩 4, 10비
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한라특허법인(유한)

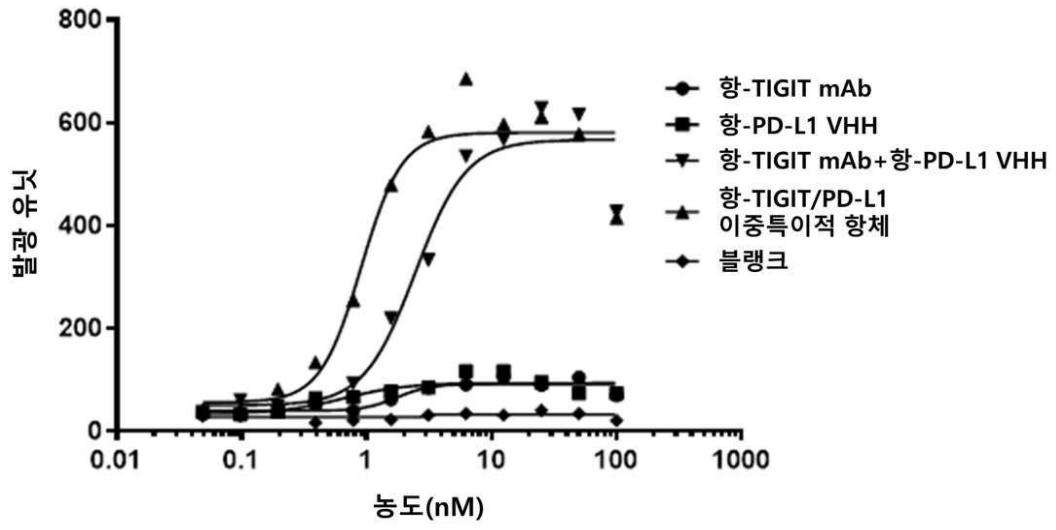
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **TIGIT 및 PD-L1에 대한 이중특이적 항체, 그의 의약 조성물, 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생물의학 분야에 속하며, TIGIT 및 PD-L1에 대한 이중특이적 항체, 이의 약학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이중특이적 항체는 TIGIT-표적화 제1 단백질 기능 영역 및 PD-L1-표적화 제2 단백질 기능 영역을 포함하고, 여기서 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 항-TIGIT 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 10에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 11에 나타낸 아미노산 서열 및 서열번호 12에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고, 그리고 항-TIGIT 항체의 경쇄 가변영역은 서열 번호 13에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열 번호 14에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 15에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체는 이중 표적, 즉 TIGIT 및 PD-L1에 대해 높은 친화도를 가지며, 좋은 응용 전망을 갖는다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
(72) 발명자
후앙, 웨이펑
중국, 519080 광둥성, 주하이, 샹저우, 탕지아완 타운, 케지 로드 7, 넘버1, 빌딩 4, 10비
펑, 샤오강
중국, 519080 광둥성, 주하이, 샹저우, 탕지아완 타운, 케지 로드 7, 넘버1, 빌딩 4, 10비
선, 쭤웨 조앤
중국, 519080 광둥성, 주하이, 샹저우, 탕지아완 타운, 케지 로드 7, 넘버1, 빌딩 4, 10비

명 세 서

청구범위

청구항 1

TIGIT를 표적으로 하는 제1 단백질 기능 영역, 및 TIGIT와 상이한 표적(예를 들어, PD-L1)을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역을 포함하는 이중특이적 항체로서,

제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편이고;

항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고; 그리고

항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3를 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역은 직접 연결되거나 링커를 통해 연결되고;

바람직하게는, 링커는 $(GGGGS)_m$이고, 여기서 m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

바람직하게는, 링커는 $(GGGGS)_nG$이고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고; 그리고

바람직하게는, 링커의 아미노산 서열은 서열번호 2에 기재되어 있는, 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역의 수는 독립적으로 1, 2 또는 2 초과인, 이중특이적 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 단백질 기능성 영역은 항-TIGIT 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고, 제2 단백질 기능성 영역은 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 단일-사슬 항체 또는 단일-도메인 항체이고;

바람직하게는, 단일-도메인 항체는 항-PD-L1 단일-도메인 항체이고; 그리고

바람직하게는, 단일-사슬 항체는 항-PD-L1 단일-사슬 항체인, 이중특이적 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 단일 사슬 항체이고, 제2 단백질 기능 영역은 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고;

바람직하게는, TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린은 항-PD-L1 면역글로불린인, 이중특이적 항체.

청구항 6

제5항에 있어서,

항-PD-L1 단일 도메인 항체는 하나의 중쇄 가변영역을 포함하고, 그리고 중쇄 가변영역은 서열번호 16에 기재된

아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 아미노산 서열은 서열번호 3에 기재되어 있는, 이중특이적 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변영역은 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 그리고 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변영역은 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열을 갖고;

바람직하게는, 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 그리고 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는, 이중특이적 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

항-TIGIT 면역글로불린 또는 TIGIT과 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린의 불변 영역은 인간 항체로부터 유래되고;

바람직하게는, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는, 이중특이적 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

항-TIGIT 면역글로불린 또는 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 인간 Ig 감마-1 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01857) 또는 인간 Ig 감마-4 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01861.1)이고, 그리고 경쇄 불변 영역은 인간 Ig 카파 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01834)이고;

바람직하게는, 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 EU 넘버링 체계에 따른 L234A 돌연변이 및 L235A 돌연변이를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 10

제4항, 및 제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체는 항-TIGIT 면역글로불린의 C-말단 또는 N-말단에 연결되고, 예를 들면, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체의 수는 2이고, 그리고 각 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체의 한쪽 말단은 항-TIGIT 면역글로불린의 2 중쇄의 C-말단 또는 N-말단에 각각 연결되는, 이중특이적 항체.

청구항 11

제4항, 및 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

단일 도메인 항체는 항-PD-L1 단일 도메인 항체이고, 그리고 단일 도메인 항체를 항-TIGIT 면역글로불린에 연결시킴으로써 얻어진 펩티드 사슬은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는, 이중특이적 항체.

청구항 12

제4항, 및 제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

2개의 동일한 제1 펩티드 사슬과 2개의 동일한 제2 펩티드 사슬로 형성된 사량체이고,

제1 펩티드 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 4에 기재되어 있고, 그리고 제2 펩티드 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재되어 있는 펩티드 사슬의 아미노산 서열인, 이중특이적 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 암호화하는 단리된 핵산 분자.

청구항 14

제13항에 따른, 단리된 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 15

제13항에 따른 단리된 핵산 분자, 또는 제14항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 16

제15항에 따른 숙주세포를 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 및 세포 배양물로부터 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른, 이중특이적 항체의 제조방법.

청구항 17

이중특이적 항체와 커플링 모이어티를 포함하는 접합체로서, 이중특이적 항체는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체이고, 그리고 커플링 모이어티는 검출 가능한 표지인 접합체이고; 바람직하게는, 커플링 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질, 또는 효소인, 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중항체, 또는 제17항에 따른 접합체를 포함하는 키트로서,

바람직하게는, 키트는 이중특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질, 또는 효소와 같은 검출 가능 표지를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체를 포함하고; 선택적으로, 의약 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 의약 조성물.

청구항 20

악성 종양의 치료 또는 예방용 의약의 제조에서, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체의 용도로서,

바람직하게는, 악성 종양은 흑색종, 간암, 위암, 신장세포암, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이중특이적 항체 또는 접합체의 용도.

청구항 21

악성 종양의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 접합체로서,

바람직하게는, 악성 종양은 흑색종, 간암, 위암, 신세포암종, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이중특이적 항체 또는 접합체.

청구항 22

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 또는 제17항에 따른 커플링제의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 악성 종양의 치료 또는 예방하는 방법으로서,

바람직하게는, 악성 종양은 흑색종, 간암, 위암, 신세포암종, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 악성 종양의 치료 또는 예방 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의학 분야, 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체, 그의 의약 조성물 및 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역 수용체(TIGIT, 또한 WUCAM, Vstm3, VSIG9으로도 알려져 있음)는 활성화된 $CD8^+$ T 및 $CD4^+$ T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 조절 T 세포(Treg) 및 난포 조력자 T 세포에 의해 발현되는 새로운 유형의 면역 억제 수용체이다.

[0003] TIGIT는 종양 면역에서 복잡한 조절 네트워크에 참여하며, 여기에는 다수의 면역억제 수용체(예를 들어, CD96/TACTile, CD112R/PVRIG), 경쟁 공동자극 수용체(DNAM-1/CD226), 및 다수의 리간드(예를 들어, CD155(PVR/NECL-5), CD112(Nectin-2/PVRL2)가 포함된다. DNAM-1, TIGIT 및 CD96은 T 세포와 NK 세포에 발현되어 리간드 형태로 CD155를 공유한다.

[0004] 종양 면역 억제에서 TIGIT의 역할은 PD-1/PD-L1의 역할과 유사하다. 현재의 연구는 다음과 같이 이펙터 T 세포와 NK 세포의 TIGIT 매개 억제의 여러 메커니즘을 제안하였다:

[0005] (1) T/NK 세포 표면의 TIGIT와 CD155의 결합은 TIGIT 세포의 면역수용체 티로신 억제 모티프(ITIM)를 인산화시키고 억제 신호를 직접 전달한다;

[0006] (2) DC 상의 CD155에 대한 TIGIT의 결합은 면역 내성 DC의 생성을 촉진하고, 인터루킨(IL)-12의 생성 및 IL-10의 증가를 감소시키며, 간접적으로 T 세포 반응을 억제한다;

[0007] (3) 억제 효과가 있는 TIGIT는 공동자극 수용체 CD226보다 높은 친화도로 CD155에 경합적으로 결합하여, CD226 매개 활성을 제한하고; 게다가 TIGIT는 또한 세포에서 시스(cis) 방식으로 CD226에 직접 결합하고, 이는 CD155의 동형이량체(homodimer)에 결합하는 능력을 파괴한다;

[0008] (4) TIGIT를 발현하는 Tregs는 높은 억제력을 가지며, TIGIT+Tregs는 활성화 시 IL-10 및 피브리노겐 유사 단백질 2(Fgl2)를 생성하여 T세포 억제를 매개한다;

[0009] (5) 푸소박테리움 누클레아툼(Fusobacterium nucleatum)(대장암과 관련된 혐기성 그람 공생균)으로부터의 Fap2 단백질은 TIGIT에 직접 결합할 수 있지만 CD226에는 결합하지 않으므로, NK 세포와 T 세포에 의해 매개되는 종양 면역을 억제하고 선천성 면역 반응을 조절한다.

[0010] CD274로도 알려진 PD-L1(Programmed death 1 ligand 1)은 B7 계열의 구성원이며 PD-1의 리간드이다. PD-L1은 하나의 IgV 유사 영역, 하나의 IgC 유사 영역, 하나의 막횡단 소수성 영역, 및 30개의 아미노산으로 이루어진 하나의 세포내 영역을 포함하는 총 290개의 아미노산을 가진 I형 막횡단 단백질이다. 다른 B7 계열 분자와 달리, PD-L1은 면역 반응을 부정적으로 조절하는 효과가 있다. 연구에 따르면, PD-L1은 주로 활성화된 T 세포, B 세포, 대식세포 및 수지상 세포에서 발현되는 것으로 나타났다. 림프구 외에도, PD-L1은 흉선(thymus), 심장, 태반(placenta) 등과 같은 다양한 기타 조직의 내피세포에서도 발현되며, 흑색종(melanoma), 간암, 위암, 신세포암, 난소암, 대장암, 유방암, 식도암, 두경부암 등 다양한 종류의 비림프계에서도 발현된다(Akintunde Akinleye & Zoaib Rasool, Journal of Hematology & Oncology 12권, 기사 번호: 92(2019)). PD-L1은 자가반응성 T 및 B 세포와 면역 관용을 조절하는 데 광범위한 스펙트럼을 갖고 있으며, 말초 조직에서 T 및 B 세포 반응에 역할을 한다. 종양 세포에서 PD-L1의 높은 발현은 암 환자의 예후가 좋지 않은 것과 연관이 있다.

[0011] 이중특이적 항체는 항체 의약품 개발 방향이지만, 전임상(preclinical) 평가 모델, 낮은 발현 수준, 열악한 안정성, 복잡한 공정, 및 품질관리의 큰 차이 등 많은 과제에 직면해 있다. 따라서, 이중특이적 항체의 연구 개발은 항상 어려움을 겪어왔다.

[0012] 그러므로, TIGIT 및 PD-L1을 표적으로 하는 이중특이적 항체의 개발이 필요하며, 이는 특이성과 효능이 좋으며, 제조가 용이한 항체이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0013] 심도 있는 연구와 창의적인 작업 끝에, 발명자들은 항-TIGIT 항체를 얻었고, 그 항체를 기반으로 항-TIGIT/항-

PD-L1 이중특이적 항체를 구축하였다. 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 항-TIGIT 항체(항체 또는 본 발명의 항체라고도 함) 및 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체(이중특이적 항체 또는 본 발명의 이중특이적 항체라고도 함)가 PD-L1 및 TIGIT(이중특이성 항체는 하나 이상의 양태에서 양성 대조군 항체보다 훨씬 우수함)에 대해 높은 결합 친화도를 갖는다는 것과, PD-L1과 그 리간드 PD-1의 결합 및 TIGIT와 그의 리간드 CD155/CD112의 결합을 각각 차단하여, 세포로 전달되는 억제 신호를 감소 또는 제거할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 TIGIT를 표적으로 하는 제1 단백질 기능 영역, 및 TIGIT와 상이한 표적(예를 들어, PD-L1)을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역을 포함하는 이중특이적 항체를 설계한다. 여기서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편이고; 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함한다. 항-TIGIT 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 갖는 LCDR3를 포함한다.

[0015] 경쇄와 중쇄의 가변 영역은 항원에 대한 결합을 결정한다. 각 사슬의 가변 영역은 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 3개의 초가변 영역을 포함하며, 그 중 중쇄(H)의 CDR은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3를 포함하며, 그리고 경쇄(L)의 CDR은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3를 포함한다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 함유된 CDR은 본 기술분야에 공지된 다양한 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 함유된 CDR은 바람직하게는 Kabat, Chothia, AbM HVR, 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 결정된다. 달리 명시하지 않는 한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 함유된 CDR은 바람직하게는 Kabat 넘버링 시스템에 의해 결정된다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)).

[0016] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역은 직접 연결되거나 링커(링커 펩티드라고도 함)를 통해 연결되고;

[0017] 바람직하게는, 링커는 $(GGGGS)_m$이고, 여기서 m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

[0018] 바람직하게는, 링커는 $(GGGGS)_nG$이고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

[0019] 바람직하게는, 링커의 아미노산 서열은 서열번호 2에 기재되어 있고; 여기서, 괄호 안의 GGGGS는 서열번호 22로 표시된다.

[0020] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역 및 제2 단백질 기능 영역의 수는 독립적으로 1, 2 또는 2 보다 많다.

[0021] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역의 수는 1이고, 제2 단백질 기능 영역의 수는 2이다.

[0022] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역의 수는 2이고, 제2 단백질 기능 영역의 수는 1이다.

[0023] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고, 제2 단백질 기능 영역은 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 단일 사슬 항체 또는 단일 도메인 항체이고;

[0024] 바람직하게는 단일 도메인 항체는 항-PD-L1 단일 도메인 항체이고;

[0025] 바람직하게는 단일 사슬 항체는 항-PD-L1 단일 사슬 항체이다.

[0026] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린 또는 그의 항원 결합 단편이고, 제2 단백질 기능 영역은 항-PD-L1 단일 도메인 항체 또는 항-PD-L1 단일 사슬 항체이다.

[0027] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 단일 사슬 항체이고, 제2 단백질 기능 영역은 TIGIT와 표적이 다른 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편이고;

[0028] 바람직하게는 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린은 항-PD-L1 면역글로불린이다.

[0029] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 단일 사슬 항체이고, 제

2 단백질 기능 영역은 항-PD-L1 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편이다.

[0030] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항-PD-L1 단일 도메인 항체는 1개의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 16에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열 번호 17에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고;

[0031] 바람직하게는 항-PD-L1 단일 도메인 항체의 아미노산 서열은 서열번호 3에 기재되어 있다.

[0032] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항-TIGIT 면역글로불린에서, 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 19에 기재되어 있고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20에 기재되어 있고;

[0033] 바람직하게는, 항-TIGIT 면역글로불린에서 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 1에 기재되어 있고, 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재되어 있다.

[0034] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb 및 상보성 결정 영역 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린의 불변(constant) 영역은 인간 항체로부터 유래되고;

[0036] 바람직하게는 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 영역으로부터 선택된다.

[0037] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항-TIGIT 면역글로불린 또는 TIGIT와 상이한 표적을 표적으로 하는 면역글로불린에서, 중쇄 불변 영역은 인간 Ig 감마-1 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01857) 또는 인간 Ig 감마-4 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01861.1)이고, 경쇄 불변 영역은 인간 Ig 카파 사슬 C 영역(예를 들어, NCBI ACCESSION: P01834)이고; 바람직하게는, 항-TIGIT 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 또한 EU 넘버링 체계에 따른 L234A 돌연변이 및 L235A 돌연변이를 포함한다.

[0038] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체는 항-TIGIT 면역글로불린의 C-말단 또는 N-말단에 연결되며, 예를 들어, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체의 수는 2이고, 각 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체의 일 단부는 각각 항-TIGIT 면역글로불린의 2개 중쇄의 C-말단 또는 N-말단에 연결된다.

[0039] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 항-PD-L1 단일 도메인 항체 또는 항-PD-L1 단일 사슬 항체는 항-TIGIT 면역글로불린의 C-말단 또는 N-말단에 연결되고, 예를 들어, 항-PD-L1 단일 도메인 항체 또는 항-PD-L1 단일 사슬 항체의 수는 2이고, 각 항-PD-L1 단일 도메인 항체 또는 항-PD-L1 단일 사슬 항체의 일 단부는 각각 항-TIGIT 면역글로불린의 2개 중쇄의 C-말단 또는 N-말단에 연결된다.

[0040] 본 발명의 일부 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 단일 도메인 항체는 항-PD-L1 단일 도메인 항체이고, 단일 도메인 항체를 항TIGIT 면역글로불린에 연결하여 얻어진 펩티드 사슬은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

[0041] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 동일한 제1 펩티드 사슬과 2개의 동일한 제2 펩티드 사슬로 형성된 사량체(tetramer)이며,

[0042] 여기서, 제 펩티드 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 4에 기재되어 있고; 제2 펩티드 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재되어 있다.

[0043] 본 발명의 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0044] TIGIT를 표적으로 하는 제1 단백질 기능 영역, 및

[0045] PD-L1을 표적으로 하는 제2 단백질 기능 영역;

[0046] 제1 단백질 기능 영역의 수는 1이고, 제2 단백질 기능 영역의 수는 2이며;

[0047] 여기서, 제1 단백질 기능 영역은 항-TIGIT 면역글로불린이고, 제2 단백질 기능 영역은 항-PD-L1 단일 도메인 항체이고;

[0048] 항-TIGIT 면역글로불린에서, 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 1에 기재되어 있고, 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재되어 있으며;

[0049] 항-PD-L1 단일 도메인 항체의 아미노산 서열은 서열번호 3에 기재되어 있고;

[0050] 2개의 항-PD-L1 단일 도메인 항체는 각각 동일하거나 상이한 링커를 통해 항-TIGIT 면역글로불린의 각 중쇄의 C-말단에 연결되고;

[0051] 바람직하게는 링커는 $(GGGGS)_m$이고, m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

[0052] 바람직하게는 링커는 $(GGGGS)_nG$이고, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6과 같은 양의 정수이고;

[0053] 바람직하게는 링커의 아미노산 서열은 서열번호 2에 기재되어 있고;

[0054] 여기서, 괄호 안의 GGGGS는 서열번호 22로 표시된다.

[0055] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체는 IgG-VHH의 형태이다.

[0056] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서는, 이중특이적 항체는 IgG-scFv, 즉 모리슨(Morrison) 패턴의 형태이다.

[0057] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서는, 이중특이적 항체에서, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체는 면역글로불린 중쇄의 C-말단에 연결된다. 면역글로불린은 2개의 중쇄로 구성되어 있으므로, 하나의 면역글로불린 분자는 2개의 단일 도메인 항체 분자 또는 2개의 단일 사슬 항체 분자에 연결된다. 바람직하게는, 2개의 단일 도메인 항체 분자는 동일하다. 바람직하게는, 2개의 단일 사슬 항체 분자는 동일하다. 바람직하게는, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 항체는 전술한 링커에 의해 형성된 아미드 결합을 통해 면역글로불린 중쇄의 C 말단에 연결된다.

[0058] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 이중특이적 항체의 경우, 인간 PD-L1, 시노몰구스 원숭이 PD-L1, 인간 TIGIT 및/또는 시노몰구스 원숭이 TIGIT 항원 각각에 대한 결합의 1가 친화도는 인간 PD-L1, 시노몰구스 원숭이 PD-L1, 인간 TIGIT 및/또는 시노몰구스 원숭이 TIGIT 항-항원에 결합하기 위한 단일 말단 항체 분자의 1가 친화도보다 더 우수하다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체를 암호화하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0061] 본 발명의 추가 양태는 본 발명의 단리된 핵산 분자, 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0062] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 숙주세포를 적절한 조건하에서 배양하고, 세포 배양물로부터 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체의 제조방법에 관한 것이다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태는 이중특이적 항체 및 접합 모이어티(conjugation moiety)를 포함하는 접합체에 관한 것이며, 여기서 이중특이적 항체는 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체이고, 접합 모이어티는 검출 가능한 표지(label)이고; 바람직하게는 접합 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질, 또는 효소이다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체를 포함하는 키트에 관한 것으로;

[0065] 바람직하게는, 키트는 이중특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 방사성 동위원소, 형광 물질, 발광 물질, 착색 물질 또는 효소와 같은 검출 가능한 표지를 추가로 포함한다.

[0066] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체를 포함하는 의약 조성물에 관한 것으로; 임의로는, 의약 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.

[0067] 본 발명의 또 다른 양태는 악성 종양의 예방 및/또는 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명의 항목 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체의 용도에 관한 것으로; 바람직하게는, 악성 종양은 흑색종(melanoma), 간암, 위암, 신장세포암, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0068] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항목 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 본 발명의 접합체의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 악성 종양의 치료 및/또는 예방 방법에 관한 것으로; 바람직하게는, 악성 종양은 흑색종, 간암, 위암, 신세포암종, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암 및 두경부암본 발명의 일부 구현예에서는, 악성 종양의 치료 및/또는 예방 방법에서, 본 발명의 항목 중 어느 하나의 이중특이적 항체의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계는 외과적 치료 전 또는 후에, 및/또는 방사선 요법 전 또는 후에 수행된다.

[0069] 본 발명의 일부 구현예에서는, 악성 종양을 치료 및/또는 예방하는 방법에서,

[0070] 본 발명의 이중특이적 항체의 단회 투여량은 체중 1 kg당 0.1 내지 100 mg, 바람직하게는 4.8 내지 24 mg, 또는 1 내지 10 mg이고; 대안적으로, 본 발명의 이중특이적 항체의 단회 투여량은 체중 1 kg당 10 내지 1,000 mg, 바람직하게는 50 내지 500 mg, 100 내지 400 mg, 150 내지 300 mg, 150 내지 250 mg 또는 200 mg이고;

[0071] 바람직하게는, 투여는 3일, 4일, 5일, 6일, 10일, 1주, 2주 또는 3주마다 수행하며;

[0072] 바람직하게는, 투여는 정맥내 점적(drip) 또는 정맥내 주사 방식으로 수행한다.

[0073] 본 발명의 항목 중 어느 하나에 따른 이중항체 또는 본 발명의 접합체는 악성종양의 치료 및/또는 예방에 사용되고; 바람직하게는, 악성 종양은 흑색종, 간암, 위암, 신세포암종, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0074] 본 발명에서, 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 과학 및 기술 용어는 본 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 및 면역학 실험실 절차는 해당 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 발명의 이해를 돕기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명을 이하에 제시한다.

[0075] "EC_{50}"이라는 용어는 최대 효과가 50%인 농도, 즉 최대 효과의 50%를 발생하는 농도를 지칭한다.

[0076] 용어 "항체"는 일반적으로 두 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성된 면역글로불린 분자를 지칭하며, 각 쌍은 "경"(L) 사슬과 "중"(H) 사슬을 갖는다. 항체 경쇄(light chani)는 κ 및 λ 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 μ, δ, γ, α 또는 ε로 분류될 수 있으며, 항체의 이소형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄와 중쇄 내에서 가변 영역과 불변 영역은 대략 12 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 대략 3 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 CL이라는 하나의 도메인으로 구성된다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. VH 및 VL 영역은 또한 상보성 결정 영역(CDR)이라고 불리는 매우 가변적인 영역으로 세분될 수 있으며, 프레임워크 영역(FR)이라고 불리는 보다 보존적인 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 아미노 말단으로부터 카르복실 말단까지 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역(VH 및 VL)은 각각 항체 결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산의 할당은 Bethesda M.d., Kabat Sequences of Immunological Interest(National Institute of Health, (1987 및 1991)) 또는 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196: 901-917; Chothia et al, Nature, 1989; 342: 878-883; 또는 IMGT 넘버링 시스템의 정의를 따른다. Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign의 정의: 면역그로불린 또는 항체에 대한 데이터베이스 및 툴, T 세표 수용체, MHC, IgSF 및 MhcSF [J]. 핵산 연구, 2009; 38(suppl_1): D301-D307 참조.

[0077] 용어 "항체"는 항체를 생산하는 어느 특정한 방법으로 한정되지 않으며, 이는, 예를 들어, 재조합 항체, 단일클론 항체, 및 다클론 항체를 포함한다. 항체는 다양한 이소형일 수 있고, 예를 들어, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위 유형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.

[0078] "mcAb" 및 "단일 클론 항체"라는 용어는 상동성(homologous)이 높은 항체 분자 그룹, 즉 자발적으로 발생할 수 있는 자연 돌연변이를 제외하고 동일한 항체 분자 그룹으로부터의 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 단일클론 항체는 항원의 단일 에피토프에 대해 매우 특이적이다. 다클론 항체는 일반적으로 적어도 두 개의 서로 다른 항체를 포함하는 단일 클론 항체와 관련이 있으며, 이러한 서로 다른 항체는 일반적으로 항원의 서로 다른 에피토프를 인식한다. 단일 클론 항체는 일반적으로 Kohler 등이 처음 보고한 하이브리도마 기술을 이용하여 얻을 수

있고(Kohler G, Milstein C. Continuous Cultures of fused Cell Secreting Antibody of Predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517): 495), 또한 재조합 DNA 기술을 이용하여 얻을 수도 있다(예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조).

[0079] 용어 "단일 사슬 항체(single chain fragment variable, ScFv)"는 링커에 의해 연결된 항체 중쇄 가변영역(V_H) 및 항체 경쇄 가변영역(V_L)을 포함하는 분자를 지칭하며, 여기서 V_L과 V_H 도메인은 쌍을 이루어 단일 폴리펩티드 사슬을 생성할 수 있게 하는 링커를 통해 1가 분자를 형성한다(예를 들어, Bird et al, Science 1988; 242: 423 426 및 Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 5879 5883 참조). 이러한 scFv 분자는 NH_2-VL-링커-VH-COOH 또는 NH_2-V_H-링커-V_L-COOH의 일반 구조를 가질 수 있다. 적합한 선행 기술 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열$(GGGGS)_4$(서열번호 23)을 갖는 링커를 사용할 수 있으나, 이의 변이체도 사용할 수 있다(Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 6444-6448). 본 발명에 유용한 다른 링커는 Alfthan et al, Protein Eng. 1995년; 8: 725-731, Choiet al, Eur. J. Immunol. 2001; 31: 94-106, Hu et al, Cancer Res. 1996년; 56: 3055-3061, Kipriyanov et al, J. Mol. Biol. 1999년; 293: 41-56, 및 Roovers et al, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1): 51-59. Description 에 설명되어 있다.

[0080] 본 명세서에서 사용된 용어, "단리된(isolated)" 또는 "단리되는"이란 인위적인 수단으로 자연 상태로부터 얻는 것을 지칭한다. "단리된" 물질 또는 성분이 자연에서 발생하는 경우, 이는 자연 환경의 변화에 의한 것이거나, 또는 물질이 자연 환경으로부터 분리된 것이거나, 둘 모두일 수 있다. 예를 들어, 살아있는 동물에는 어떤 단리되지 않은 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드가 자연적으로 존재하는데, 이 자연 상태로부터 고순도의 동일한 단리된 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드를 '단리된'이라고 한다. 용어 "단리된" 또는 "단리되는"이 인공 또는 합성 물질의 혼합물을 배제하는 것은 아니며, 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 기타 불순한 물질의 존재를 배제하는 것도 아니다.

[0081] 본 명세서에서 사용된 용어, "벡터"는 폴리뉴클레오티드가 삽입될 수 있는 핵산 전달체를 지칭한다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 단백질을 발현할 수 있는 경우, 그 벡터를 발현 벡터라고 한다. 벡터는 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있고, 이로써 벡터가 운반하는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 벡터는 본 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고, 다음을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다: 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC) 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC)와 같은 인공 염색체; λ 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스 등과 같은 파지. 벡터로 사용될 수 있는 동물 바이러스는 다음을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다: 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바큘로바이러스, 유두종바이러스, 파포바바이러스(예를 들어, SV40). 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소, 및 리포터 유전자를 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 발현-제어 요소를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 복제 원점 부위를 포함할 수도 있다.

[0082] 본 명세서에서 사용된 용어, "숙주 세포"는 벡터를 도입하는데 사용될 수 있는 세포를 지칭하고, 대장균(*Escherichaia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵 세포, 효모 세포 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*)와 같은 진균 세포, S2 초파리(*Drosophila*) 세포 또는 Sf9와 같은 곤충 세포, 또는 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포와 같은 동물 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 용어, "특이적 결합"은 항체와 그것이 표적으로 하는 항원 사이의 반응과 같이 두 분자 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특정 구현예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체(또는 항원에 특이적인 항체)는 약 10^{-5} M 미만, 예를 들어 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만의 친화도(K_D)으로 항원에 결합하는 항체를 지칭한다.

[0084] 본 명세서에서 사용된 용어, "K_D"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리평형상수를 지칭하며, 이는 항체와 항원 사이의 결합 친화도를 설명하는 데 사용된다. 평형 해리 상수가 작을수록, 항체-항원 결합은 더 단단해지고, 항체와 항원 사이의 친화도는 더 높아진다. 전형적으로, 항체는 10^{-5} M 미만, 예를 들어 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만의 해리 평형 상수(K_D)로 항원(예를 들어, TIGIT 단백질 또는 PD-L1 단백질)에

결합한다. K_D는 Fortebio 분자 상호작용 기기를 사용하는 것과 같이, 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0085] 본 명세서에 사용된 용어, "단일 클론 항체" 및 "McAb"는 동일한 의미를 가지며, 상호교환적으로 사용된다. "다클론 항체"와 "PcAb"라는 용어는 동일한 의미를 가지며 상호 교환적으로 사용된다. 그리고 본 발명에서, 아미노산은 일반적으로 본 기술분야의 숙련자에게 잘 알려진 1글자 및 3글자 약어로 표현된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표현될 수 있다.

[0086] 본 명세서에서 사용된 용어, "약제학적으로 허용 가능한 부형제"는 대상체 및 유효 성분과 약리학적으로 및/또는 생리학적으로 양립 가능한 담체 및/또는 부형제를 지칭한다. 이는 본 기술분야에 잘 알려져 있으며(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995 참조), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 인핸서를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충제를 포함하나 이에 제한되지 않고; 계면활성제는 Tween-80과 같은 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제를 포함하나 이에 제한되지 않고; 이온 강도 인핸서는 염화나트륨을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0087] 본 명세서에서 사용된 용어, "유효량"은 적어도 부분적으로 원하는 효과를 얻기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 예방적 유효량은 질병(예를 들어, 종양)의 발생을 예방, 저지, 또는 지연시키기에 충분한 양이고, 치료적 유효량은 이미 질병을 가지고 있는 환자의 질병 및 그 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 예방하기에 충분한 양이다. 그러한 유효량을 결정하는 것은 본 기술 분야의 숙련자들의 능력 범위 내에 있다. 예를 들면, 치료용으로 효과적인 양은 치료할 질병의 중증도, 환자 자신의 면역체계의 전반적인 상태, 나이, 체중, 및 성별과 같은 환자의 일반적인 상태, 약물의 투여 방식, 및 기타 동시에 투여되는 치료법 등에 따라 달라진다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, PD-L1 단백질(프로그램된 데스(death)-리간드 1, NCBI GenBank ID: NP_054862.1)의 아미노산 서열을 언급할 때, 이는 인간 PD-L1 단백질의 전체 길이 또는 인간 PD-L1 세포외 단편 PD-L1 ECD(예를 들어, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열) 또는 PD-L1 ECD를 갖는 단편을 포함하고; 그리고 이는 또한 마우스 또는 인간 IgG Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)에 융합된 단편과 같은 PD-L1 ECD의 융합 단백질을 포함한다. 그러나 본 기술분야의 숙련자는 PD-L1 단백질의 아미노산 서열에서, 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 부가를 포함하나 이에 제한되지 않음)가 이의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 자연적으로 또는 인위적으로 도입될 수 있음을 이해한다. 따라서, 본 발명에서 용어 "PD-L1 단백질"은 도시된 서열 및 이의 자연적 또는 인공적 변이체를 포함하는 모든 서열을 포함하는 의미이다. 더욱이, PD-L1 단백질의 서열 단편을 기술할 때, 서열 단편뿐만 아니라, 그의 자연적 또는 인공적 변이체에 해당 서열 단편을 포함한다.

[0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, TIGIT 단백질(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체, NCBI GenBank ID: NP_776160.2)의 아미노산 서열을 언급할 때, 이는 인간 TIGIT 단백질의 전체 길이, 또는 인간 TIGIT의 세포외 단편 TIGIT ECD(예를 들어, 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열) 또는 TIGIT ECD를 갖는 단편을 포함하고; 이는 또한 마우스 또는 인간 IgG의 Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)에 융합된 단편과 같은 TIGIT 단백질의 전체 길이 융합 단백질 또는 TIGIT ECD의 융합 단백질을 포함한다. 그러나 본 기술분야의 숙련자는, TIGIT 단백질의 아미노산 서열에서, 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 부가를 포함하나 이에 제한되지 않음)가 이의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 자연적으로 또는 인위적으로 도입될 수 있음을 이해한다. 따라서, 본 발명에서 용어, "TIGIT 단백질"은 천연 또는 인공 변이체를 포함하는 모든 이러한 서열을 포함하는 것이다. 또한, TIGIT 단백질의 서열 단편을 기술할 때, 이는 천연 또는 인공 변이체의 상응하는 서열 단편도 포함한다.

[0090] 본 명세서에 사용된 바와 같이, PD-1 단백질(NCBI GenBank: NP_005009.2)의 아미노산 서열을 언급할 때, 이는 인간 PD-1 단백질의 전체 길이, 또는 인간 PD-1의 세포외 단편 PD-1ECD, 또는 PD-1 ECD를 갖는 단편을 포함하고; 이는 또한 마우스 또는 인간 IgG의 Fc 단백질 단편(mFc 또는 hFc)에 융합된 단편과 같은 PD-1 단백질의 융합 단백질 또는 PD-1 ECD의 융합 단백질의 전체 길이를 포함한다. 그러나 본 기술분야의 숙련자는 PD-1 단백질의 아미노산 서열에서 돌연변이 또는 변이(치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하되 이에 제한되지 않음)가 생물학적 기능에 영향을 주지 않고 자연적으로 발생하거나 인위적으로 도입될 수 있다는 것을 이해한다. 따라서, 본 발명에서 용어, "PD-1 단백질"은 이들 서열의 천연 또는 인공 변이체를 갖는 모든 서열을 포함한다. 더욱이, PD-1 단백질의 서열 단편을 기술할 때, 이는 천연 또는 인공 변이체의 상응하는 서열 단편도 포함한다.

[0091] 본 발명에서, 용어 "단일 도메인 항체", "VHH" 및 "나노바디"는 동일한 의미로서, 항체의 중쇄 가변영역을 복제하고, 하나의 중쇄 가변영역으로만 구성된 나노바디(VHH)를 구축하는 것을 지칭하며, 이는 완전한 기능을 갖는 항원 결합 단편 중 가장 작은 것이다. 통상적으로, 자연적으로 경쇄와 중쇄 불변영역 1(CH1)이 결여된 항체를

얻은 후, 항체 중쇄의 가변영역을 복제하여 하나의 중쇄 가변영역으로만 구성된 나노바디(VHH)를 구축한다.

[0092] 본 발명에서, 별도의 언급이 없는 한, 용어 "제1"(예를 들어, 제1 단백질 기능 영역, 제1 펩티드 사슬) 및 "제2"(예를 들어, 제2 단백질 기능 영역, 제2 펩티드 사슬)라는 용어는 참조 구별 또는 명확성을 위해 사용되며, 통상적인 순차적 의미를 갖지는 않는다.

[0093] 본 발명에서, 단일 말단 항체 분자는, 특별한 언급이 없는 한, 이중 특이적 항체 중 제1 단백질 기능 영역 분자 또는 제2 단백질 기능 영역 분자와 동일 또는 유사한 항체 분자, 예를 들어, 이중특이적 항체 중 제1 단백질 기능 영역 분자 또는 제2 단백질 기능 영역 분자와 동일 또는 유사한 항 TIGIT 단일 클론 항체, 항 PD-L1 단일 클론 항체, 또는 항 PD-L1 단일 도메인 항체를 지칭한다.

발명의 효과

[0094] 본 발명은 다음과 같은 효과 중 하나 이상을 달성한다:

[0095] (1) 본 발명의 항 TIGIT 항체는 친화도 및 특이성이 우수하다;

[0096] (2) 본 발명의 이중특이적 항체는 TIGIT에 특이적으로 매우 잘 결합할 수 있다;

[0097] (3) 본 발명의 이중특이적 항체는 PD-L1에 특이적으로 매우 잘 결합할 수 있다;

[0098] (4) 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 TIGIT 및 인간 PD-L1 단백질과 동시에 결합할 수 있다;

[0099] (5) 본 발명의 이중특이적 항체에서는, 제1 단백질 기능영역과 제2 단백질 기능영역 사이에 상승효과가 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체는 CD155/CD112 매개 TIGIT 하향 억제 신호전달 경로 및 PD-L1 매개 PD-1 하향 억제 신호전달 경로를 각각 경감시킬 수 있으며, 그의 활성은 두 단일 단부 항체 분자의 조합보다 우수하고; 및/또는 그의 생체 내 항종양 활성은 두 단일 단부 항체 분자의 조합보다 우수하다.

[0100] (6) 본 발명의 이중특이적 항체는 제조가 용이하다;

[0101] (7) 본 발명의 이중특이적 항체는 안정성이 우수하고, 반감기가 길다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 본 발명의 이중특이적 항체의 개략적인 구조도를 도시한다.

도 2a는 CHO 세포에서 과발현된 인간 PD-L1에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 2b는 CHO 세포에서 과발현된 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이 PD-L1에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 2c는 본 발명의 이중특이적 항체가 CHO 세포에서 과발현된 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 차단한다는 곡선을 도시한다.

도 3a는 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 3b는 CHO 세포에서 과발현된 시노몰구스 원숭이 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 3c는 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 3d는 본 발명의 이중특이적 항체가 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 곡선을 도시한다.

도 3e는 본 발명의 이중특이적 항체가 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 곡선을 도시한다.

도 4는 본 발명의 이중특이적 항체가 인간 PD-L1 및 인간 TIGIT 단백질에 동시에 결합하는 곡선을 도시한다.

도 5는 본 발명의 이중특이적 항체가 PD-1/PD-L1 및 TIGIT/CD155/CD112 신호전달 경로를 차단하는 곡선을 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 본 발명의 이중특이성 항체를 이용한 혼합 림프구 분석에서 사이토카인 방출량의 통계 그래프를 도시한다. 여기서, 도 6a 및 도 6b에 사용된 PBMC 세포 샘플은 서로 다른 기증자로부터 나온 것이다.

도 7은 A375와 인간 PBMC를 공동 접종한 B-NDG 마우스 모델에서 본 발명의 이중특이적 항체의 약동학(pharmacodynamic) 곡선을 도시한다.

도 8은 A375 및 인간 PBMC를 공동 접종한 B-NDG 마우스 모델에서 본 발명의 이중특이적 항체의 용량 의존적 약동학 곡선을 도시한다.

도 9는 인간 PD-L1/PD-1/TIGIT 형질전환 마우스 CT26 종양 모델에서 본 발명의 이중특이적 항체의 약동학 곡선을 도시한다.

도 10은 마우스에서 본 발명의 이중특이적 항체의 반감기 곡선을 도시한다.

도 11은 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 12는 CHO 세포 상에서 과발현된 시노몰구스 원숭이 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 13은 CHO 세포 상에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 도시한다.

도 14는 본 발명의 항-TIGIT 항체가 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 곡선을 도시한다.

도 15는 본 발명의 항-TIGIT 항체가 CHO 세포 상에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 곡선을 도시한다.

도 16은 활성화된 인간 1차 T 세포 상의 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 곡선을 도시한다.

본 발명에 관련된 서열은 하기 표 A에 나타나 있으며, 여기서 CDR은 각각 Kabat 넘버링 시스템에 따라 결정된다.

[표 A]

명칭 또는 의미	서열	서열번호
항-TIGIT 온전한 야생형 IgG1 항체 중쇄	QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKGLEW IGTVYYSGSTFHNPSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RVGPDVSHPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	1
링커 G4S	GGGGSGGGGS	2
항-PD-L1 단일 도메인 항체(VHH)	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRQAPGKGLEWVS SINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAK DPGGYAKGQGTQVTVSS	3
항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체 펩티드 사슬 #1	QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKGLEW IGTVYYSGSTFHNPSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RVGPDVSHPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSEVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYWMYWLRQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS	4
항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체 펩티드 사슬 #2(항-TIGIT 카파 경쇄)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	5
인간 PD-L1 세포외 단편 아미노산 서열	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQF VHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEV IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL DPEENHTAELVIPELPLAHPPNER	6
시노몰구스 원숭이 PD-L1 세포외 단편 아미노산 서열	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQF VHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMI SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEV IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRL DPEENHTAELVIPELPLALPPNERT	7

인간 TIGIT 세포외 단편 아미노산 서열	MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICN ADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYT GRIFLEVLESSVAEHGARFQIP	8
시노몰구스 원숭이 TIGIT 세포외 단편 아미노산 서열	MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWEQHDHSLLAIR NAELGWHIYPAFKDRVAPGPGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTY RGRIFLEVLESSVAEHSARFQI	9
항-TIGIT 온전한 야생형 IgG1 중쇄 항체의 HCDR1	SYDHYWT	10
항-TIGIT 온전한 야생형 IgG1 중쇄 항체의 HCDR2	TVYYSGSTFHNPSLKS	11
항-TIGIT 온전한 야생형 IgG1 중쇄 항체의 HCDR3	VGPDVSHPPFDY	12
항-TIGIT 카파 경쇄의 LCDR1	RASQSISSYLN	13
항-TIGIT 카파 경쇄의 LCDR2	AASSLQS	14
항-TIGIT 카파 경쇄의 LCDR3	QQSYSTPIT	15
항-PD-L1 VHH의 HCDR1	SYWMY	16
항-PD-L1 VHH의 HCDR2	SINSDSSSTYYRDSVKG	17
항-PD-L1 VHH의 HCDR3	DPGGYA	18
항-TIGIT 온전한 야생형 IgG1 중쇄 가변 영역(VH)	QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKGLEW IGTVYYSGSTFHNPSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RVGPDVSHPPFDYWGQGTLVTVSS	19
항-TIGIT 카파 경쇄 가변 영역(VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITF GGGTKVEIK	20
마우스 TIGIT 세포외 단편 아미노산 서열	TIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSVDLG WHVASVFSDRVVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGIYKGRIF LKVQESSDDRNGLAQFQTAPLG	21

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 본 발명은 구체적인 실시예와 함께 아래에서 상세히 설명될 것이다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위해 사용된 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니라는 점을 이해해야 한다. 하기 실시예에서 구체적인 조건을 명시하지 않은 실험방법은 대개 Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에 기술된 조건이나, 또는 제조업체가 권장하는 조건과 같은 통상적인 조건을 따랐다. 달리 명시되지 않는 한, 백분율과 부는 중량 기준이다.

[0104] 대조군 항체 아테졸리주맙(Atezolizumab): 항 PD-L1 단일 클론 항체, 상품명: Tecentriq, 로슈(Roche).

[0105] 대조군 항체 티라골루맙(Tiragolumab): 항-TIGIT 단일클론 항체, 로슈.

[0106] 실시예 1: 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 발현 및 정제

[0107] 본 실시예에서, 항-TIGIT 항체 중쇄 가변 영역(VH) 서열(서열 번호: 19)은 전체 유전자 합성법을 이용하여 합성되었고, 항-PD-L1 VHH(서열번호 3)를 2개의 링커 G4S(서열번호 2)를 통해 중쇄 C-말단에 연결하여, 서열번호 4에 기재된 펩티드 사슬 #1의 전체 길이 아미노산 서열을 얻었다. 또한, 항-TIGIT 경쇄 가변 영역(VL) 서열(서열번호: 20)은 전체 유전자 합성법을 이용하여 합성되었고, 카파 경쇄에 재조합되어 완전한 "VL-CL" 항체 경쇄 구조를 형성하였다. 획득된 펩티드 사슬 #2의 전체 길이 아미노산 서열은 서열번호 5에 기재되었다.

[0108] 분자 클로닝 기술을 이용하여 중쇄 및 경쇄 서열을 각각 pcDNA3.1 발현 프레임 내부로 구축하였고, 통상적인 발현은 Expi-293 발현 시스템을 통해 수행하였다. 형질감염 방법은 제품 설명서에 따라 진행되었으며, 세포 배양 5일 후 상청액을 채취하고, 단백질 A 마그네틱 비드(GenScript사로부터 구입)를 이용하여 목적 단백질을 정제하였다. 마그네틱 비드를 적절한 부피의 결합 완충액(PBS+0.1% Tween 20, pH 7.4)(마그네틱 비드 부피의 1 내지 4배)에 재현탁한 후, 샘플에 첨가하여 정제하고, 실온에서 1시간 동안 배양한 다음, 그 기간 동안 부드럽게 흔들어 주었다. 샘플을 마그네틱 스탠드(Beaver사로부터 구입)에 놓고, 상청액을 버리고 마그네틱 비드를 결합 완충액으로 3회 세척하였다. 마그네틱 비드 부피의 3 내지 5배량의 용출 완충액(0.1M 구연산나트륨, pH 3.2)을 첨가하고, 실온에서 5 내지 10분 동안 흔든 후, 다시 마그네틱 스탠드에 놓고, 용출 완충액을 수집한 후, 중화 완충액(1M Tris, pH 8.54)을 첨가한 수집 튜브에 넣고 잘 혼합하였다.

[0109] 항 TIGIT/항PD-L1 이중특이적 항체(본 발명에서는 항 TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체라고도 함)를 얻었으며, 그 개략적인 구조를 도 1에 도시하였다.

[0110] 실시예 2: 항체 친화도 검출

[0111] 생물막층 광학 간섭 기술(ForteBio)을 이용하여 실시예 1에서 얻어진 이중특이적 항체와 그에 상응하는 단일 말단 항체 분자가 인간 및 시노몰구스 PD-L1 및 TIGIT에 결합하는 결합 해리 상수(K_D)를 결정하였다. ForteBio 친화도 측정은 기존 방법에 따라 수행하였고(Est, P 등, 항체-항원 친화도 및 에피토프 비닝(epitope binning)의 고처리량 용액 기반 측정. Mabs, 2013.5(2): p.270-8), 여기서 인간 PD-L1 세포외 단편 아미노산 서열, 시노몰구스 원숭이 PD-L1 세포외 단편 아미노산 서열, 인간 TIGIT 세포외 단편 아미노산 서열, 및 시노몰구스 원숭이 TIGIT 세포외 단편 아미노산 서열은 각각 서열번호 6-9에 기재되었다.

[0112] 자세한 절차는 다음과 같다: 센서를 분석 버퍼에서 30분 동안 오프라인으로 평형화한 다음, 60초 동안 온라인으로 검출하여 기준선을 설정하고, 친화도 검출을 위해 정제된 온전한 항체를 AHQ 센서에 1 nm 두께로 로딩하였다. 항체 로딩된 센서를 100 nM 인간 또는 시노몰구스 원숭이 PD-L1, TIGIT-his 항원에 안정기(plateau phase)까지 노출시킨 후, 해리 속도 측정을 위해 센서를 분석 완충액에 적어도 2분 동안 옮겼다. 1:1 결합 모델을 사용하여 동역학 분석을 수행하였다.

[0113] 인간, 시노몰구스 원숭이 PD-L1 및 TIGIT에 결합하는 이중특이적 항체 및 이에 상응하는 단일 말단 항체 분자의 K_D 값은 하기 표 1에 도시된 바와 같다.

표 1

[0114]

항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체 및 이에 상응하는 단일 말단 항체의 K_D 값				
항체	인간 PD-L1-his(K_D)	시노몰구스 원숭이 PD-L1-his(K_D)	인간 TIGIT-his(K_D)	시노몰구스 원숭이 TIGIT-his(K_D)
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	4.20E-09	3.40E-09	1.50E-09	1.60E-08
항-PD-L1 VHH	5.20E-09	5.30E-09	N.B.	N.B.
항-TIGIT mAb	N.B.	N.B.	1.40E-09	1.30E-08

[0115] 주; "N.B.": 결합 없음

[0116] 그 결과, 인간 PD-L1, 시노몰구스 원숭이 PD-L1, 인간 TIGIT, 및 시노몰구스 원숭이 TIGIT 항원에 대한 항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체의 1가 친화도 값은 각각 인간 PD-L1, 시노몰구스 원숭이 PD-L1, 인간 TIGIT 및 시노몰구스 원숭이 TIGIT 항원에 대한 단일 말단 항체 분자의 1가 친화도 값과 비슷하거나 심지어는 더 우수한 것으로 나타났다.

[0117] 실시예 3: 인간/시노몰구스 PD-L1을 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 및 차단 활성

[0118] 3.1 유세포 분석 검출 방법을 기반으로 한, CHO 세포에서 과발현된 인간/시노몰구스 원숭이 PD-L1에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 검출

[0119] 구체적으로, 인간 PD-L1을 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-huPD-L1 세포) 및 시노몰구스 원숭이 PD-L1을 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-cynoPD-L1 세포)는 MCS에 복제된 인간 PD-L1 및 시노몰구스 원숭이 PD-L1의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen사로부터 구입)를 형질감염시킴으로써 압력 스크리닝에 의해 생성되었다. 증식(expanded) 배양 후 과발현된 세포를 적절한 세포 밀도로 조절하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가한 다음, 원심분리하고 농도 차로(gradiently) 희석된 샘플을 첨가하여 시험하고, 4℃에서 30분 동안 배양하고; 그 다음 PBS로 2회 세척하고, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하고; 그 다음 PBS로 2회 세척하고 PBS에 재현탁된 세포를 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하여 해당 MFI를 계산하였다. 그래프패드(Graphpad) 소프트웨어는 EC_{50} 값을 얻기 위해 그래핑 분석에 사용되었다.

[0120] 그 결과는 표 2, 도 2a 및 도 2b에 도시되었다.

표 2

[0121]

PD-L1/PD-1 과발현 세포에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 및 차단 활성			
항체	인간 PD-L1(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	시노몰구스 원숭이 PD-L1(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	인간 PD-L1(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 PD-L1의 결합을 차단하는 IC_{50}
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	1.78	4.60	1.17
항-PD-L1 VHH	2.14	5.24	1.51

[0122] 그 결과, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체는 이의 PD-L1-말단 단일클론 항체 분자(항-PD-L1 VHH)와 유사하게 CHO 세포에서 과발현된 인간/시노몰구스 원숭이 PD-L1에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0123] 3.2 유세포 분석 검출을 기반으로, CHO 세포에서 과발현된 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 차단 활성 검출

[0124] 구체적으로, 인간 PD-1을 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-huPD-1 세포)는 MCS에 복제된 인간 PD-1의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen사로부터 구입)를 형질감염시킴으로써 압력 스크리닝에 의해 생성되었다. 시험할 정제된 항체를 PBS로 희석하고, 희석된 샘플을 96-웰 유세포 분석 플레이트, 60 μL/웰에 첨가하였다. 그 다음 비오틴화된 인간 PD-L1 단백질을 60 μL/웰로 첨가하여 최종 농도가 0.5 μg/mL가 되도록 혼합하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 증식 배양 후의 CHO-huPD-1 세포를 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도에 도달하도록 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 100 μL/웰로 첨가한 후 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 상기 공동 배양된 항체-항원 혼합물을 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS로 100배 희석된 스트렙토마이신 아비딘-R-피코에리트린 접합체(SAPE)를 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS로 재현탁한 세포를 100 μL/웰로 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하여 해당 MFI를 계산하였다. 그래프패드 소프트웨어는 IC_{50} 값을 얻기 위해 그래핑 분석에 사용되었다.

[0125] 그 결과를 표 2 및 도 2c에 나타냈다. 그 결과, CHO 세포에서 과발현된 인간 PD-L1에 대한 인간 PD-L1의 결합에 대한 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 차단 활성은 PD-L1 말단 단일클론 항체 분자(항-PD-L1 VHH)와 비슷하거나 더 우수하였다.

[0126] 실시예 4: 인간/시노몰구스 원숭이/마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 및 차단 활성

[0127] 4.1 유세포 분석 검출 방법을 기반으로, CHO 세포에서 과발현된 인간/시노몰구스 원숭이/마우스 TIGIT에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 검출

[0128] 구체적으로, 인간 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-huTIGIT 세포), 시노몰구스 원숭이 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-cynoTIGIT 세포) 및 마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-muTIGIT 세포)는 MCS에 복제된 인간 TIGIT, 시노몰구스 원숭이 TIGIT 및 마우스 TIGIT cDNA의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen사로부터 구입)를 형질감염시켰다. 증식 배양 후 과발현된 세포를 적절한 세포 밀도로 조절한 다음, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가하고, 원심분리한 후, 농도차로 희석된 시험 샘플을 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS에 재현탁된 세포를 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기로 검출하여 해당 MFI를 계산하였다. 그래프 분석을 위해 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 EC_{50} 값을 얻었다.

[0129] 결과를 표 3, 도 3a 내지 도 3c에 나타냈다.

표 3

[0130]

TIGIT를 과발현하는 세포에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성 및 차단 활성					
항체	인간 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	시노몰구스 원숭이 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	마우스 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	인간 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 IC_{50}	마우스 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 IC_{50}
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	0.83	2.32	1.94	0.43	0.75
항-TIGIT mAb	0.80	2.80	2.40	0.33	0.54

[0131] 그 결과, CHO 세포에서 과발현된 인간/시노몰구스 원숭이/마우스 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 결합 활성은 이의 TIGIT 말단 단일클론 항체 분자(항-TIGIT mAb)와 비슷하거나 심지어 더 우수한 것으로 나타났다.

[0132] 4.2 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합, 및 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합에 대한 유동 세포측정법을 기반으로 한, 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 차단 활성의 검출

[0133] 구체적으로, 증식 배양 후 CHO-huTIGIT 세포를 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포분석 플레이트에 100 μL/웰을 첨가하고, 원심분리하여 추후 사용하였다. 정제된 단일클론 항체를 400 nM에서 시작하여 총 12개 지점에 대해 3배 희석하여 PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 세포가 들어 있는 96-웰 유세포 분석 플레이트에 60 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그를 갖는 인간 CD155 단백질을 60 μL/웰로 첨가하여, 최종 농도 2 μg/mL에 도달하고 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS에 100 배 희석한 APC 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS에 재현탁된 세포를 100 μL/웰로 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기로 검출하여 해당 MFI를 계산하였다.

[0134] 증식 배양 후 CHO-muTIGIT 세포를 2×10^6 세포/mL의 세포 밀도에 도달하도록 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 추후 사용을 위해 원심분리하였다. 정제된 단일클론 항체를 400 nM에서 시작하여 총 12개 지점에 대해 3배 희석하여 PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 세포가 들어 있는 96-웰 유세포분석 플레이트에 60 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그를 갖는 마우스 CD155 단백질을 60 μL/웰로 첨가하여, 최종 농도 2 μg/mL에 도달하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS에 100 배 희석한 APC 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, PBS에 재현탁된 세포를 100 μL/웰로 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기로 검출하여 해당 MFI를 계산하였다. 그래프 분석을 위해 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 IC_{50} 값을 얻었다.

[0135] 그 결과를 표 3 및 도 3d 내지 도 3e에 나타냈다. 그 결과, CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합 및 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합에 대한, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 차단 활성은 TIGIT-말단 단일클론 항체 분자(항-TIGIT mAb)와 유사하였다.

[0136] 실시예 5: 인간 TIGIT 및 인간 PD-L1에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중 특이적 항체의 공동 결합 활성

[0137] 인간 TIGIT 및 인간 PD-L1 단백질에 대한 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중 특이적 항체의 공동 결합 활성은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)을 기반으로 검출되었다.

[0138] 구체적으로, 인간 TIGIT 단백질을 지침에 따라 용해시키고, 1× ELISA 코팅 용액으로 1 μg/mL로 희석하고, 96-웰 ELISA 플레이트에 100 μL/웰로 코팅한 후, 필름으로 덮은 다음, 4℃에서 밤새 방치하였다. 코팅액은 버리고, 1×PBST로 3회 세척을 실시한 후, 실온에서 2시간 동안 차단하기 위해 200 μL/웰에서 5% BSA/PBS를 첨가하였다. 차단 용액을 버리고, 1% BSA/PBS에 농도차 희석하여 시험하고자 하는 항체를 100 μL/웰로 첨가한 후, 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 항체 희석액은 버리고, 1×PBST로 3회 세척하고, 1% BSA/PBS에 희석된 비오틴 표지 PD-L1 단백질을 100 μL/웰로 첨가하여 최종 농도가 1 μg/mL가 되도록 한 후, 실온에서 1시간 동안

배양하였다. 항원 희석액은 버리고, 1×PBST로 3회 세척한 다음, 1% BSA/PBS에 희석된 SA-HRP를 100 μL/웰로 첨가한 후, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. SA-HRP 희석액은 버리고, 1×PBST로 3회 세척한 후, ELISA 발색액을 100 μL/웰로 첨가하여 실온에서 1 내지 3분 동안 반응시킨 다음, ELISA 정지액(stop solution)을 50 μL/웰로 첨가하여 450 nm에서의 흡광도 값을 판독하였다. 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 농도-흡광도 값 결합 곡선을 작성하였다.

[0139] 결과를 도 4에 나타냈다. 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체는 인간 TIGIT 및 인간 PD-L1 단백질에 동시에 결합할 수 있었다.

[0140] 실시예 6: 루시퍼라제 리포터 유전자 시스템에서 PD-1/PD-L1 및 TIGIT/CD155/CD112 신호전달 경로에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 활성 차단

[0141] PD-1/PD-L1 및 TIGIT/CD155/CD112 신호전달 경로를 동시에 차단하기 위한 세포 수준에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 활성을 추가로 검출하기 위하여, 본 실시에에서는 다음과 같은 루시퍼라제 리포터 유전자 시스템을 구축하였다. 간략히 설명하면, 렌티바이러스를 사용하여 세포를 형질감염시켜 인간 CD155, 인간 CD112, 인간 PD-L1 및 OKT-3 scFv를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1), 및 인간 TIGIT, 인간 PD-1, 및 NF-AT 루시페라아제 리포터 유전자(Promega사로부터 구입)를 과발현하는 Jurkat 세포주(Jurkat-TIGIT-PD-1-luc)를 구축하였고, 이후 이 리포터 유전자 시스템을 사용하여 관련 실험을 수행하였다.

[0142] 구체적으로, CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1 기능성 세포를 소화를 통해 얻고, 원하는 세포 밀도에 도달하도록 조정한 후, 96-웰 백색 바닥 플레이트에 100 μL/웰을 첨가하고 밤새 접착되도록 배양하였다. 다음날, Jurkat-TIGIT-PD-1-luc 이펙터 세포의 현탁액을 제조하고, 시험할 샘플을 반응 배지로 농도차로 희석하였다. 흰색 바닥 플레이트를 꺼내고, 피펫팅으로 배양 상청액을 제거한 후, 흰색 바닥 플레이트에 상기 희석 샘플을 40 μL/웰로 첨가하고, Jurkat-TIGIT-PD-1-luc 이펙터 세포의 현탁액을 40 μL/웰로 첨가하고, 인큐베이터에서 6시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션을 수행하였며, 이 시간 동안 Bio-Glo TM 시약을 실온으로 냉각하였다. 배양이 완료된 후, 세포를 꺼내어 실온에서 5분 동안 평형화시켰다. Bio-Glo TM 시약을 80 μL/웰로 첨가하였고, 다기능 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 형광 신호 값을 판독하였다.

[0143] 결과는 도 5에 도시하였다. 그 결과, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체가 각각 CD155/CD112-매개 TIGIT 하류 억제 신호전달 경로 및 PD-L1-매개 PD-1 하류 억제 신호전달 경로를 방출할 수 있음을 보여주었으며, 이는 리포터 유전자 루시퍼라제 발현을 상향조절할 수 있으며, 그 활성은 두 개의 단일 말단 항체 분자의 조합보다 우수하였다.

[0144] 실시예 7: 혼합 림프구 분석에서 T 세포 활성화에 대한 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 활성

[0145] 본 실시예에서, 혼합 림프구 반응(MLR) 분석을 사용하여 T 세포 활성화에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 활성을 검출하였다. 상세한 실험 방법은 다음과 같았다:

[0146] PBMC 세포(SAILYBIO, XFB-HP100B사로부터 구입)를 소생시키고 원심분리하였다. PBMC 세포를 X-VIVO-15 배지 10 mL(LONZA사로부터 구입)에 재현탁하고, 37℃의 세포배양 배양기에서 2시간 동안 배양하여 비부착성 세포를 제거하였다. DC 배지 10 mL [X-VIVO-15 배지에 10 ng/mL GM-CSF(R&D사로부터 구입) 및 20 ng/mL의 IL-4(R&D사로부터 구입)로 보충]를 첨가하여 3일 동안 배양한 후, DC 배지 5 mL를 보충하여 6일째까지 배양하였고; 그 다음 DC 성숙 배지[X-VIVO-15 배지에 1,000 U/mL TNF-α(R&D사로부터 구입), 10 ng/mL IL-6(R&D사로부터 구입), 5 ng/mL IL-1β(R&D사로부터 구입), 및 1μM PGE2(Tocris 사로부터 구입)를 첨가하였음]를 첨가하고 2일 동안 배양한 다음 성숙한 DC 세포를 수집하고 X-VIVO-15 배지를 사용하여 세포 밀도를 2×10^5 세포/mL로 조정하였다.

[0147] 다른 기증자로부터의 PBMC 세포(SAILY BIO사로부터 구입, XFB-HP100B)를 소생시키고 원심분리하였다. PBMC 세포를 10 mL의 X-VIVO-15 배지에 재현탁시켰다. T 세포 단리 키트(Stemcell사로부터 구입)를 사용하여 T 세포를 농축하였고, X-VIVO-15를 사용하여 T 세포를 재현탁하였으며, 세포 밀도를 2×10^6 세포/mL로 조정하였다. T 세포 현탁액을 위에서 수집한 성숙한 DC 세포와 1:1의 부피 비로 혼합하고, 96-웰 U-바닥 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하였다.

[0148] 시험하고자 하는 항체 샘플은 X-VIVO-15 배지로 200 nM에서 시작하여 총 5 점간 10 배 희석하고, 상기 혼합세포 웰에 100 μL/웰로 첨가하여 5일 동안 배양한 다음, 상청액을 수집한 후, ELISA(eBioscience사로부터 구입) 방법을 이용하여 IFN-γ 발현 수준을 검출하였다.

[0149] 결과는 도 6a 및 6b에 나타냈다. 그 결과, 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체가 MLR 실험에서 우수한 생물학적 활성을 나타냈으며, T 세포 활성화 수준이 2개의 단일 말단 항체 분자의 조합의 활성과 비슷하였다.

[0150] 실시예 8: 혼합 A375 및 인간 PBMC를 접종한 B-NDG 마우스에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 생체내 약동학 연구

[0151] 본 실험에서는, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 항종양 효과는 혼합된 A375(Addexbio사로부터 구입, C0020004, 인간 악성 흑색종 세포) 및 인간 PBMC 세포(Shanghai Miles-bio, A10S033014/PB100C)로 접종된 B-NDG 마우스 모델(A375 huPBMC 모델)에서 결정되었다. 여기서, 인간 면역체계를 국소적으로 재구성한 인간화 종양 마우스 모델은 면역 결핍 마우스에 인간 면역 세포(PBMC)를 접종함으로써 생성되었다.

[0152] 구체적으로, A375 세포와 인간 PBMC를 1:1의 동일한 부피 비로 먼저 혼합하여 0.1 mL의 세포 현탁액을 얻은 후, 마우스의 오른쪽 복부 사타구니에 피하 주사하여 A375 huPBMC 모델을 확립하였다. 그룹화는 평균 종양 부피가 약 200 mm^3에 도달했을 때 수행하였다. 치료를 위해 서로 다른 투여량과 동일한 투여 부피의 PBS 또는 항체를 복강 내 투여하였으며, 각 그룹당 6 마리의 마우스를 사용하였다. 각 그룹의 마우스의 종양 부피 및 체중 변화를 2 내지 3일에 1회 모니터링 빈도로 모니터링하였고, 모니터링은 2 내지 3주 동안 지속적으로 수행하였다. 투여량 및 투여방법은 표 4에 나타냈다.

표 4

[0153]

A375 huPBMC 모델에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 투여량 요법		
그룹	투여량	투여 빈도/횟수
PBS	N/A	Q2d×3
항-PD-L1 VHH	2.5 mg/kg	Q2d×3
항-TIGIT mAb	5 mg/kg	Q2d×3
항-PD-L1 VHH+항-TIGIT mAb	2.5 mg/kg+5 mg/kg	Q2d×3
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	6 mg/kg	Q2d×3

[0154] 주: 항-PD-L1 VHH, 항-TIGIT mAb, 및 항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체의 분자량은 각각 약 75 KD, 150 KD 및 175 KD이었다. 투여량은 각 성분의 등몰 농도를 기준으로 하였다.

[0155] 그 결과를 도 7에 나타냈다. 그 결과, 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체는 상당한 항종양 효과를 나타냈으며, 2개의 단일-말단 항체 분자의 조합보다 효과가 더 우수한 것으로 나타났다.

[0156] 실시예 9: 혼합된 A375 및 인간 PBMC를 접종한 B-NDG 마우스에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 생체 내 투여 용량 의존적 약동학 연구

[0157] 본 실험에서 A375 huPBMC 모델은 피하 혼합 접종에 의해 확립되었다(모델 확립 단계는 실시예 8과 동일함). 평균 종양 부피가 약 300 mm^3에 도달했을 때, 마우스들을 그룹으로 나누었다. 치료를 위해 상이한 투여량과 동일한 부피의 PBS 또는 이중특이적 항체를 각 그룹에 6 마리씩 복강 내 투여하였다. 각 그룹에서 마우스의 종양 부피와 체중의 변화를 2 내지 3일에 1회의 모니터링 빈도로 모니터링하고, 2 내지 3주 동안 지속적으로 모니터링을 수행하였다. 투여량 및 투여 방법은 표 5에 나타냈다.

표 5

[0158]

항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 투여 용량 의존적 종양 억제 활성에 대한 실험 프로토콜		
그룹	투여량	투여 빈도/횟수
PBS	N/A	Q3-4d×3
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	1.2 mg/kg	Q3-4d×3
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	6 mg/kg	Q3-4d×3
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	30 mg/kg	Q3-4d×3

[0159] 결과를 도 8에 도시하였다. 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체는 투여용량 의존적으로 마우스 종양의 성장을 상당히 억제할 수 있었다.

[0160] 실시예 10: huPD-L1/PD-1/TIGIT KI 마우스에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 생체내 약동학 연구

[0161] 본 실험에서는, CT-26-huPD-L1 종양 세포(인간 PD-L1을 CT26 마우스 결장암 세포에 노킹(knock)한 제품, Jiangsu Gempharmatech사로부터 구입)를 인간 PD-L1/PD-1/TIGIT 형질전환 마우스(huPD-L1/PD-1/TIGIT KI 마우스)에 이식함으로써 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 항종양 효과를 확인하였다.

[0162] 구체적으로, CT-26-huPD-L1 세포 현탁액을 먼저 제조하고, 약 5×10^5개의 세포를 포함하는 0.1 mL를 마우스의 오른쪽 복부 사타구니에 피하 주사하여 CT-26-huPD-L1 종양 보유 마우스 모델을 확립하였다. 평균 종양 부피가 80 내지 120 mm^3에 도달했을 때, 마우스를 그룹으로 나누었다. 치료를 위해, 각 그룹당 6 마리의 마우스를 대상으로 서로 다른 투여량과 동일한 부피의 PBS 또는 항체를 복강내 주사로 투여하였다. 각 그룹의 마우스의 종양 부피 및 체중 변화를 2 내지 3일에 1회의 모니터링 빈도로 모니터링하였고, 모니터링은 2 내지 3주 동안 지속적으로 수행하였다. 투여량 및 투여방법은 표 6에 도시하였다.

표 6

[0163]

항-huPD-L1/PD-1/TIGIT KI 마우스 모델에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 투여 요법		
그룹	투여량	투여 빈도/횟수
PBS	N/A	Q2d＝5
아테졸리주맙	10 mg/kg	Q2d＝5
티라골루맙	10 mg/kg	Q2d＝5
아테졸리주맙+티라골루맙	10mg/kg + 10mg/kg	Q2d＝5
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체	12mg/kg	Q2d＝5

[0164] 그 결과를 도 9에 나타냈다. 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 효능은 임상 약물 조합(아테졸리주맙 + 티라골루맙)과 유사하였으며, 항종양 활성은 두 단일클론 항체 그룹에 비해 우수하였다.

[0165] 실시예 11: 마우스에서 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 생체내 반감기 연구

[0166] 꼬리 정맥 단일 주사 방법을 이용하여 마우스에서 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 반감기를 검출하였다.

[0167] 구체적으로, 실험용 Balb/c 마우스는 수컷 3 마리와 암컷 3 마리로 12/12시간의 명암 조절 환경과 온도 24℃±2℃, 습도 40% 내지 70%에서 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 사육하였다. 실험 당일, Balb/c 마우스에게 10 mg/kg의 투여량으로 단일클론 항체 분자를 단일 꼬리 정맥 주사로 투여하였다. 채혈 시점: 투여 후 5분, 0.5시간, 2시간, 6시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간, 336시간, 및 504시간에 마우스의 안와(orbit)에서 혈액을 채취하였다. 혈액 샘플 전체를 2 내지 8℃에서 30분 동안 방치한 후, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 생성된 혈청을 2℃ 내지 8℃, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 -80℃에 보관하였다. 혈청 내 이중특이적 항체 분자의 양은 ELISA에 의해 검출되었다.

[0168] 결과를 도 10에 도시하였다. 그 결과, 마우스에 단회 주사 후 본 발명의 항-TIGIT/항-PD-L1 이중특이적 항체의 반감기가 189시간인 것으로 나타났다.

[0169] 제조 실시예 1: 항-TIGIT 단일클론 항체 제조

[0170] 항-TIGIT 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열은 서열번호 19에 기재됨)을 인간 IgG1 중쇄 불변 영역뿐만 아니라 L234A 및 L235A 변형이 있는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역으로 재조합하였다. 또한, 경쇄 가변영역(아미노산 서열은 서열번호 20으로 기재됨)을 인간 카파 경쇄 불변영역에 재조합하고, 항-TIGIT 단일클론 항체를 55796-G1 및 55796-G1G1LALA로 각각 명명하였다. 일시적 발현 및 정제는 HEK293 발현 시스템을 통해 수행하였다. 구체적인 조작은 다음과 같다: 화학적 형질감염 방법을 이용하여 항체 중쇄 및 경쇄를 갖는 pcDNA3.1 벡터를 HEK293 세포에 전달하고, 37℃, 8% CO_2에서 7일 동안 배양하였다. 세포질종(cytochylema)을 수집하고 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상청액을 취하여 단백질 A로 정제하고, SEC를 사용하여 항체 순도를 검출하고, 내독소 함량도 동일하게 조절하였다.

[0171] 제조된 항-TIGIT 단일클론 항체 55796-G1 및 55796-G1LALA를 하기 시험예 1 내지 3에 사용하였다.

[0172] 시험예 1: 항-TIGIT 단일클론 항체의 친화도 검출

[0173] 바이오필름 층 광간섭 기술(ForteBio)을 이용하여 인간, 게잡이(cynomolgus) 원숭이 및 마우스 TIGIT 결합에 있어서 제조예 1에서 제조된 항-TIGIT 단일클론 항체의 결합 해리상수(K_D)를 결정하였다. Fortebio 친화도 측정은 기존 방법(Este, P et al. High Throughput Solution-based Measurement of Antibody-Antigen Affinity and Epitope Binning. Mabs, 2013.5(2): p.270-8)에 따라 수행하였다. 여기서, 인간 TIGIT의 세포외 아미노산 서열, 시노몰구스 원숭이 TIGIT의 세포외 아미노산 서열, 및 마우스 TIGIT의 세포외 아미노산 서열은 각각 서열 번호 8, 9 및 21에 기재되었다.

[0174] 인간, 시노몰구스 원숭이, 및 마우스 TIGIT-his 단백질에 대한 온전한 항체(즉, 원래 Adimab으로부터 얻어진 전체 길이 IgG)의 1가 친화도를 측정하였다. 센서를 분석 완충액에서 20분 동안 오프라인으로 평형화한 후, 120초 동안 온라인으로 검출을 수행하여 기준선을 확립하고, 온전한 TIGIT 항체를 AHQ 센서에 로딩하여 친화도 검출을 위해 1 nm의 두께에 도달하였다. 항체 로딩 센서를 100 nM TIGIT-his 항원에서 안정기까지 배양한 다음, 해리 속도 측정을 위해 센서를 분석 완충액으로 2분 이상 전달하였다. 1:1 결합 모델을 사용하여 동역학 분석을 수행하였다.

[0175] 상기 결정 방법에서, 측정된 K_D 값은 하기 표 7에 도시되었다:

표 7

[0176]

항 TIGIT 단일클론 항체의 K_D 값			
항체	인간 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도	시노몰구스 원숭이 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도	마우스 TIGIT-his 단백질에 대한 IgG의 1가 친화도
55796-G1	1.99E-10	4.72E-09	9.60E-08
55796-G1LALA	2.10E-10	4.90E-09	6.10E-08
티라골루맙	8.70E-10	3.50E-09	NA

[0177] 주: "NA": 이용할 수 없음.

[0178] 표 7의 결과를 통해 다음과 같은 사실을 알 수 있다:

[0179] (1) 인간 TIGIT-his 단백질에 대한 항-TIGIT 단일클론 항체의 1가 친화도는 대조군 분자 티라골루맙보다 높았다;

[0180] (2) 시노몰구스 원숭이 TIGIT-his 단백질에 대한 항-TIGIT 단일클론 항체의 1가 친화도는 대조군 분자 티라골루맙과 유사하였다;

[0181] (3) 항-TIGIT 단일클론 항체는 마우스 TIGIT와 교차결합 활성을 나타냈다.

[0182] 시험예 2: 인간/시노몰구스 원숭이/마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 항-TIGIT 단일클론 항체의 결합 활성 및 차단 활성

[0183] 2.1 유세포 분석법을 기반으로, CHO 세포에서 과발현된 인간/시노몰구스 원숭이/마우스 TIGIT에 대한 항 TIGIT 단일클론 항체의 결합 활성 검출

[0184] 구체적으로, 인간 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-huTIGIT 세포), 시노몰구스 원숭이 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-cynoTIGIT 세포), 및 마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO-S 세포(CHO-muTIGIT 세포)는, MCS에 복제된 인간 TIGIT, 시노몰구스 원숭이 TIGIT, 및 마우스 TIGIT cDNA의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen사로부터 구입)를 형질감염시킴으로써 압력 스크리닝에 의해 생성되었다. 증식 배양 후, 과발현 세포를 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가하였다. 원심분리 후, 농도차 희석된 시험 샘플을 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS에 재현탁된 세포를 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출한 후, 해당 MFI를 계산하였다. 그래프 분석을 위해 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 EC_{50} 값을 얻었다. 그 결과를 표 8, 및 도 11 내지 13에 나타냈다.

[0185] 2.2 CHO 세포에서 과발현된 인간 TIGIT에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하고, 그리고 CHO 세포에서 과발현된 마우스 TIGIT에 대한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 유세포 분석법에 기초한 항-TIGIT 단일클론 항체의 차단 활성 검출

[0186] 구체적으로, 증식 배양 후 CHO-huTIGIT 세포는 세포밀도 2×10^6 세포/mL로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 100 μL/웰로 첨가한 후, 원심분리하여 추후 사용하였다. 정제된 단일클론 항체를 400 nM에서 시작하여 총 12개 지점에 대해 3배 희석하여 PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 세포가 있는 상기 96-웰 유세포 분석 플레이트에 60 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그를 갖는 인간 CD155 단백질을 60 μL/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μg/mL에 도달하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 100배 희석한 APC 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS에 재현탁된 세포를 100 μL/웰로 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기로 검출하고 해당 MFI를 계산하였다.

[0187] 증식 배양 후 CHO-muTIGIT 세포의 세포 밀도를 2×10^6 세포/mL로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 100 μL/웰로 첨가한 후, 원심분리하여 추후 사용하였다. 정제된 단일클론 항체를 400 nM에서 시작하여 총 12개 지점에 대해 3배 희석하여 PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 세포가 있는 상기 96-웰 유세포 분석 플레이트에 60 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 마우스 IgG2a Fc 태그를 갖는 마우스 CD155 단백질을 60 μL/웰로 첨가하여 최종 농도 2 μg/mL에 도달하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 100배 희석한 APC 염소 항-마우스 IgG 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS에 재현탁된 세포를 100 μL/웰로 첨가하고 CytoFlex 유세포 분석기로 검출하고 해당 MFI를 계산하였다. 그래프 분석을 위해 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 IC_{50} 값을 얻었다. 결과를 표 8 및 도 14 내지 15에 나타냈다.

표 8

[0188]

과발현 세포의 결합을 차단하는, 항-TIGIT 단일클론 항체의 활성 요약					
항체	인간 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	시노몰구스 원숭이 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	마우스 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포에 결합하는 EC_{50}	인간 TIGIT(nM)를 과발현하는 CHO 세포에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 IC_{50}	마우스 TIGIT(nM)을 과발현하는 CHO 세포를 기반으로 한 마우스 CD155의 결합을 차단하는 IC_{50}
55796-G1	0.96	1.32	2.96	0.24	1.50
55796-G1LALA	0.84	1.34	3.36	0.37	1.56
티라골루맙	1.35	4.18	N.B.	0.63	NA

[0189] 주: "N.B.": 결합 없음; 및 "NA": 이용할 수 없음.

[0190] 표 8 및 도 11 내지 13으로부터, 본 발명의 항-TIGIT 단일클론 항체에 대해 다음과 같은 사실을 알 수 있다:

[0191] (1) CHO 세포 표면에 과발현된 인간 TIGIT 단백질에 대한 결합 활성이 대조군 분자 티라골루맙의 결합 활성보다 우수하였다;

[0192] (2) CHO 세포 표면에 과발현된 시노몰구스 원숭이 TIGIT 단백질에 대한 결합 활성이 대조군 분자 티라골루맙의 결합 활성보다 우수하였다;

[0193] (3) CHO 세포 표면에 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 대한 상당한 결합을 나타냈다.

[0194] 표 8 및 도 14 내지 15로부터 본 발명의 항-TIGIT 단일클론 항체에 대해 다음과 같은 사실을 알 수 있다:

[0195] (1) CHO 세포 표면에 과발현된 인간 TIGIT 단백질에 대한 인간 CD155의 결합을 차단하는 능력은 대조군 분자 티라골루맙의 차단 능력보다 우수하였다;

[0196] (2) CHO 세포의 세포 표면에 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 결합된 항-TIGIT 항체 분자는 CHO 세포의 표면에 과발현된 마우스 TIGIT 단백질에 대한 마우스 CD155의 결합을 상당히 차단할 수 있었다.

[0197] 시험예 3: 일차 T 세포 표면의 TIGIT에 대한 항-TIGIT 단일클론 항체의 결합

[0198] 활성화된 T 세포 표면 상의 TIGIT에 대한 본 발명의 항-TIGIT 항체의 결합 활성은 유세포 분석 검출 방법을 기반으로 검출되었다.

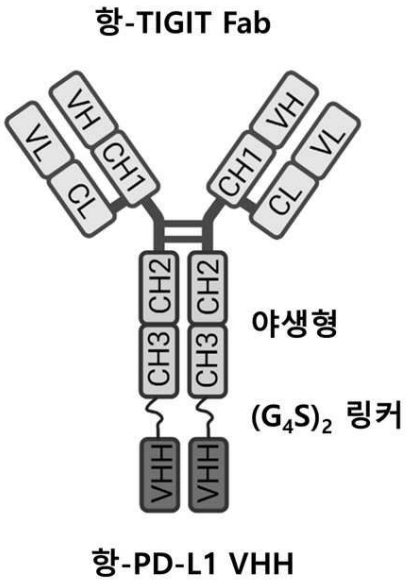
[0199] 구체적으로, 인간 PBMC를 STEMCELL(stemcell, Cat. No.: #17951C)에서 제공하는 실험 프로토콜에 따라 분류하여 인간 전체 T 세포를 얻었다. X-VIVO15 배지(lonza사로부터 구입, Cat. No. 04-418Q)를 사용하여 T 세포의 농도를 1.0×10^6 세포/mL로 조정한 후, 1 μL의 IL-2 스톡 용액(1백만 IU)을 첨가하고, 한편 CD3/CD28 Dynabeads(gibco사로부터 구입, 번호: 11132D)를 1:1(비드-세포)로 첨가하고 37℃의 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 활성화된 T 세포를 적절한 세포 밀도로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에 첨가하였다. 원심분리 후, 농도차 희석된 시험 샘플을 첨가하고 4℃에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 적절한 농도로 희석된 형광 2차 항체를 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS에 재현탁된 세포를 첨가하고, CytoFlex 유세포 분석기에서 검출하고 해당 MFI를 계산하였다.

[0200] 결과를 도 16에 도시하였다. 그 결과, 본 발명의 항-TIGIT 항체 55796-G1 및 55796-G1LALA가 T 세포 표면의 TIGIT 분자에 결합할 수 있으며, 그들의 결합 활성이 대조군 분자 티라골루맙의 결합 활성보다 우수하였다.

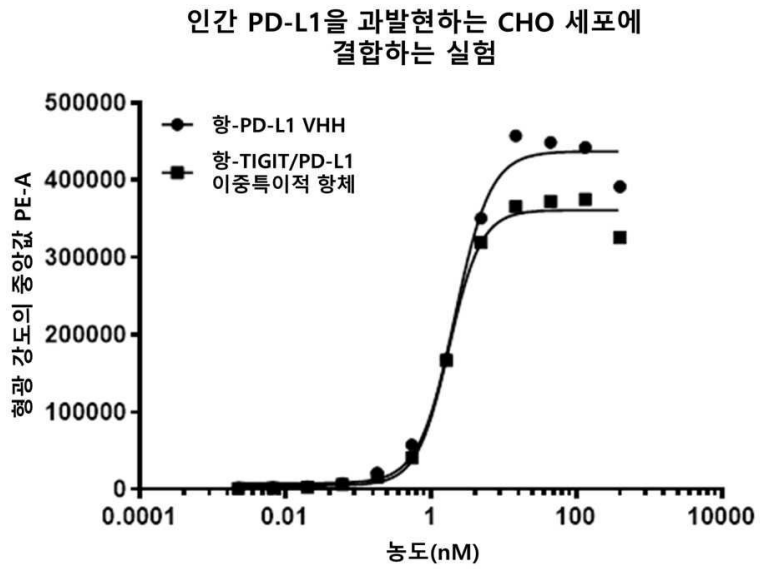
[0201] 본 발명의 특정 구현예가 상세히 설명되었지만, 당업자는 개시된 모든 교시에 따라 이러한 세부사항에 대해 다양한 수정 및 대체가 이루어질 수 있고, 이러한 변경은 모두 본 발명의 범위 내에 속하고 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 첨부된 청구범위 및 이의 임의의 동등물로써 주어진다.

도면

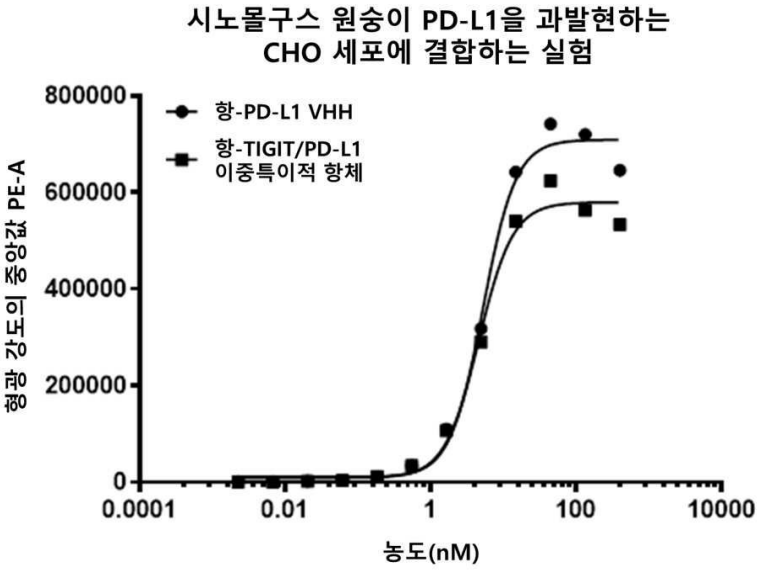
도면1



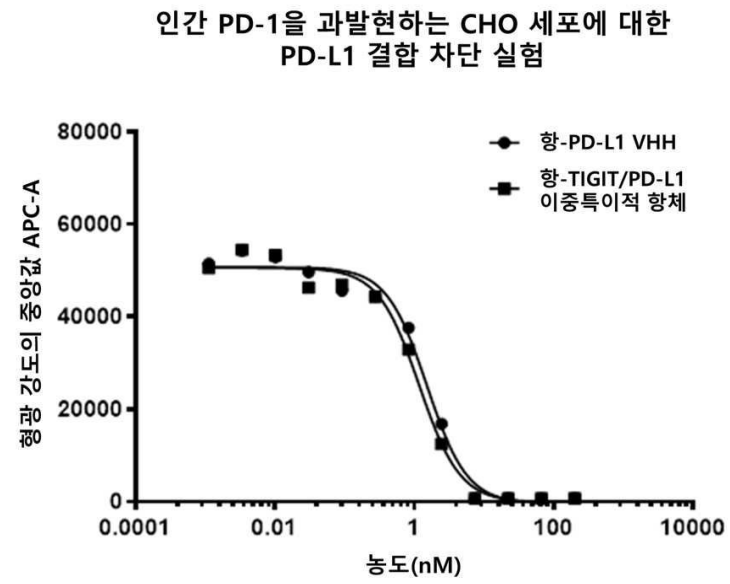
도면2a


인간 PD-L1을 과발현하는 CHO 세포에
결합하는 실험
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
형광 강도의 중앙값 PE-A
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)

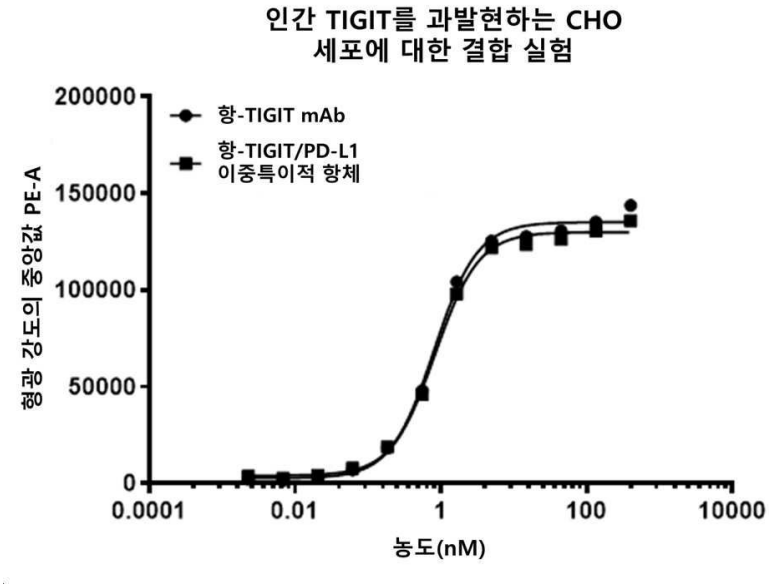
도면2b


시노몰구스 원숭이 PD-L1을 과발현하는
CHO 세포에 결합하는 실험
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
형광 강도의 중앙값 PE-A
800000
600000
400000
200000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)

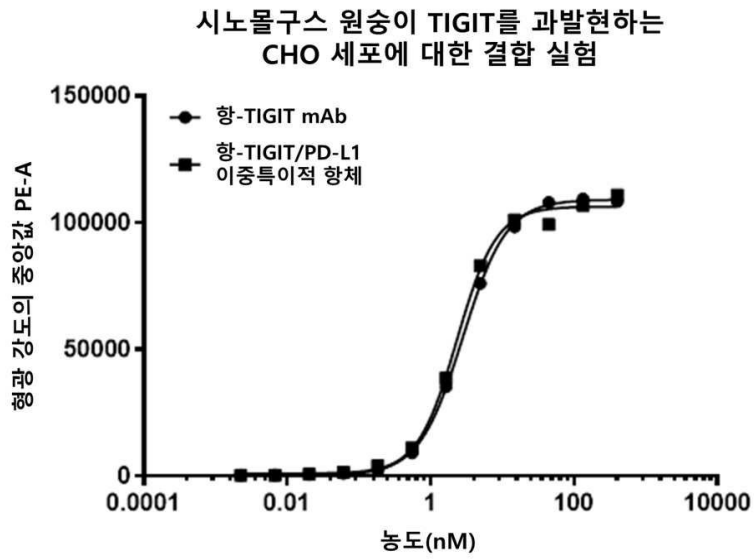
도면2c


인간 PD-1을 과발현하는 CHO 세포에 대한
PD-L1 결합 차단 실험
형광 강도의 중앙값 APC-A
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체

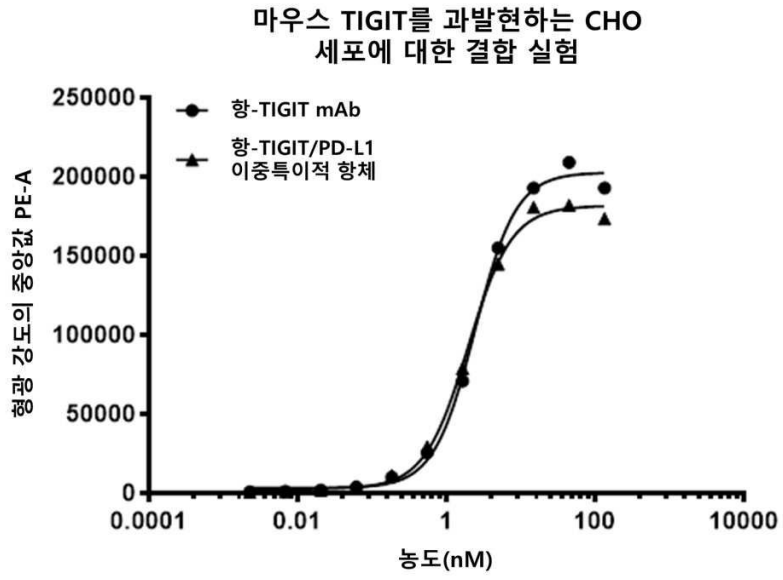
도면3a


인간 TIGIT를 과발현하는 CHO
세포에 대한 결합 실험
형광 강도의 중앙값 PE-A
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)
항-TIGIT mAb
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체

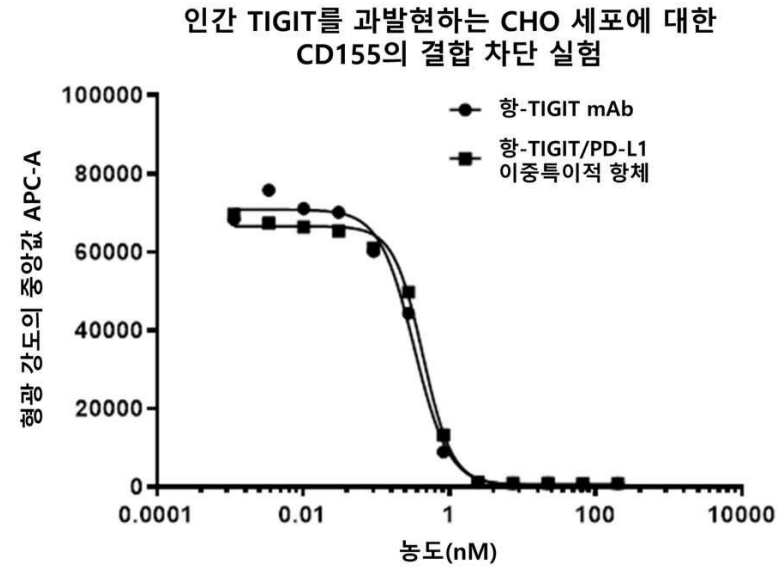
도면3b


시노몰구스 원숭이 TIGIT를 과발현하는
CHO 세포에 대한 결합 실험
항-TIGIT mAb
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
형광 강도의 중앙값 PE-A
150000
100000
50000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)

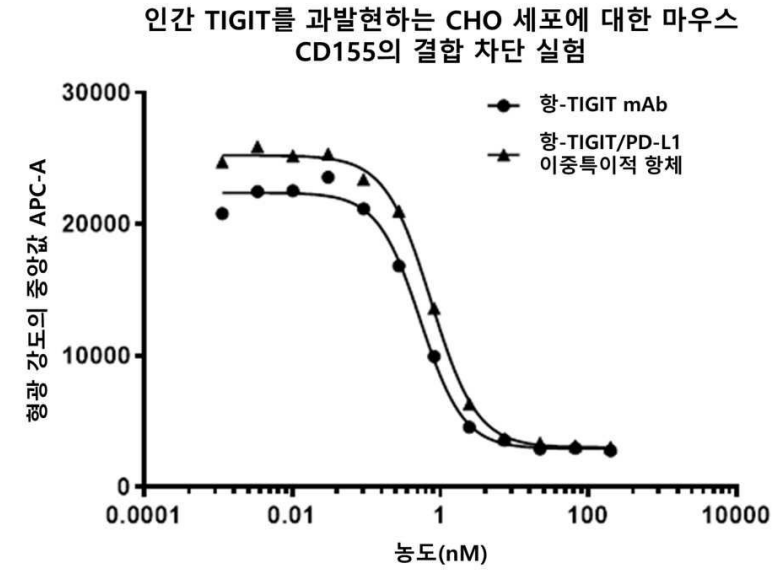
도면3c


마우스 TIGIT를 과발현하는 CHO
세포에 대한 결합 실험
항-TIGIT mAb
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
형광 강도의 중앙값 PE-A
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)

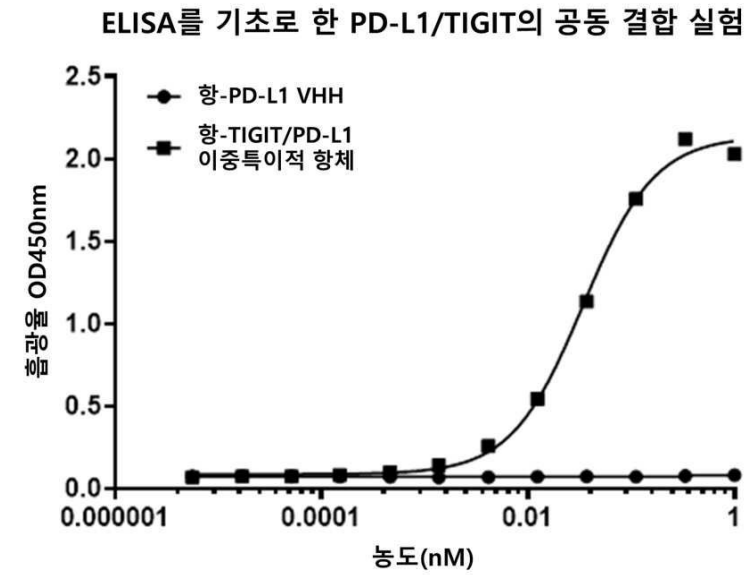
도면3d


인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한
CD155의 결합 차단 실험
형광 강도의 중앙값 APC-A
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)
항-TIGIT mAb
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체

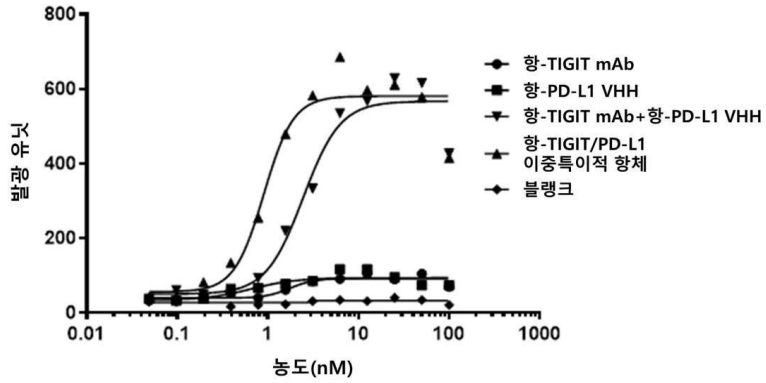
도면3e


인간 TIGIT를 과발현하는 CHO 세포에 대한 마우스
CD155의 결합 차단 실험
형광 강도의 중앙값 APC-A
30000
20000
10000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
농도(nM)
항-TIGIT mAb
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체

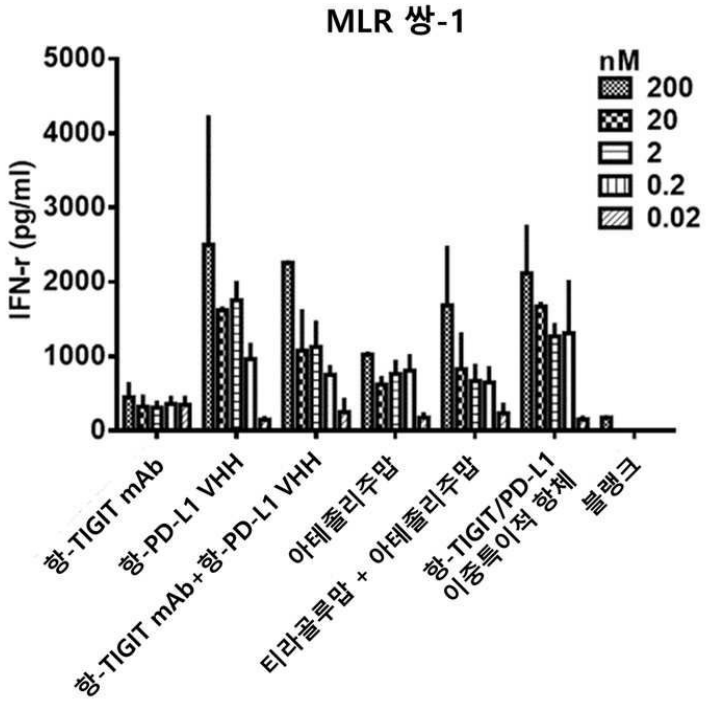
도면4


ELISA를 기초로 한 PD-L1/TIGIT의 공동 결합 실험
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
흡광율 OD450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.000001
0.0001
0.01
1
농도(nM)

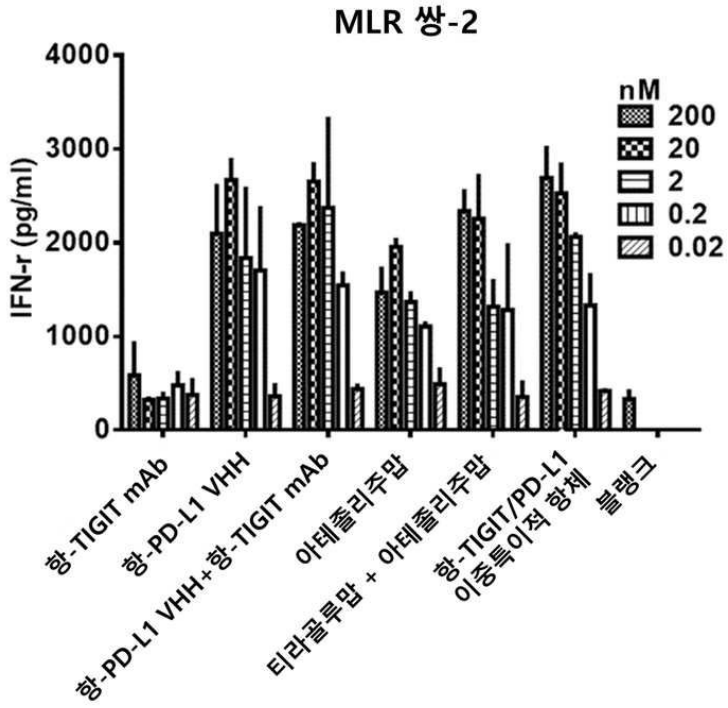
도면5


발광 유닛
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도(nM)
항-TIGIT mAb
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT mAb+항-PD-L1 VHH
항-TIGIT/PD-L1
이중특이적 항체
블랭크

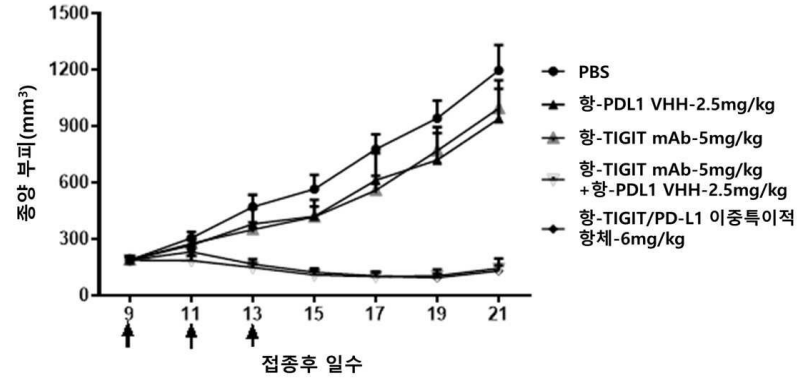
도면6a


MLR 쌍-1
IFN-r (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
nM
200
20
2
0.2
0.02
항-TIGIT mAb
항-PD-L1 VHH
항-TIGIT mAb+항-PD-L1 VHH
아테졸리주맙
티라골루맙 + 아테졸리주맙
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체
블랭크

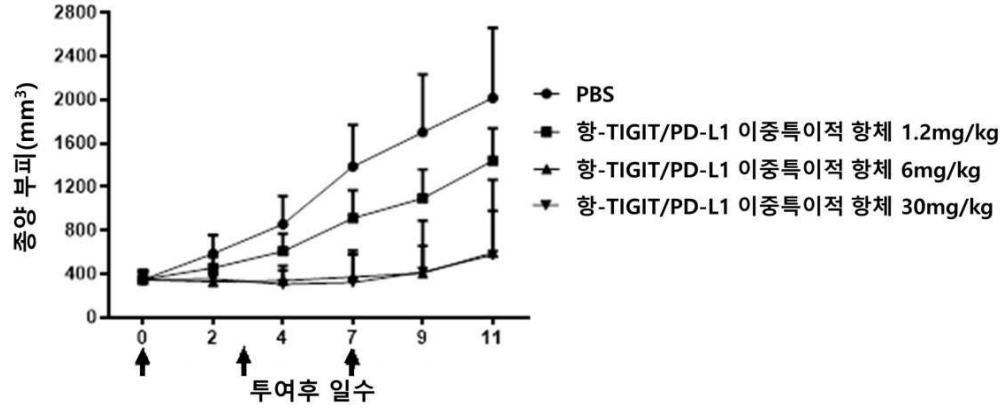
도면6b


MLR 쌍-2
IFN-r (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
nM
200
20
2
0.2
0.02
항-TIGIT mAb
항-PD-L1 VHH
항-PD-L1 VHH+항-TIGIT mAb
아테졸리주맙
티라골루맙 + 아테졸리주맙
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체
블랭크

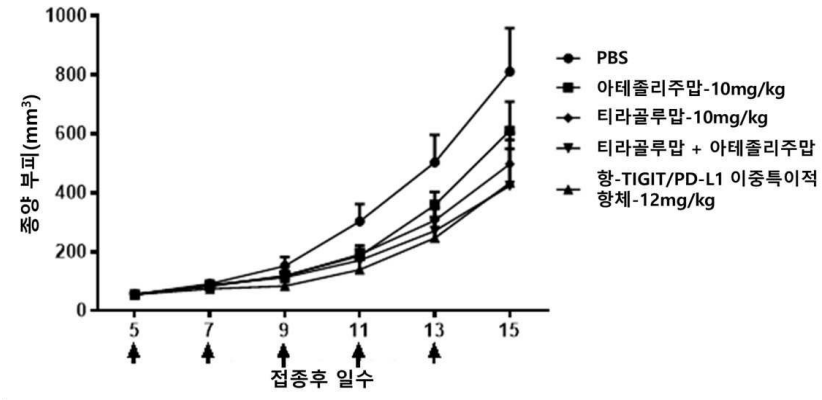
도면7


종양 부피(mm³)
1500
1200
900
600
300
0
9
11
13
15
17
19
21
접종후 일수
PBS
항-PDL1 VHH-2.5mg/kg
항-TIGIT mAb-5mg/kg
항-TIGIT mAb-5mg/kg
+항-PDL1 VHH-2.5mg/kg
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적
항체-6mg/kg

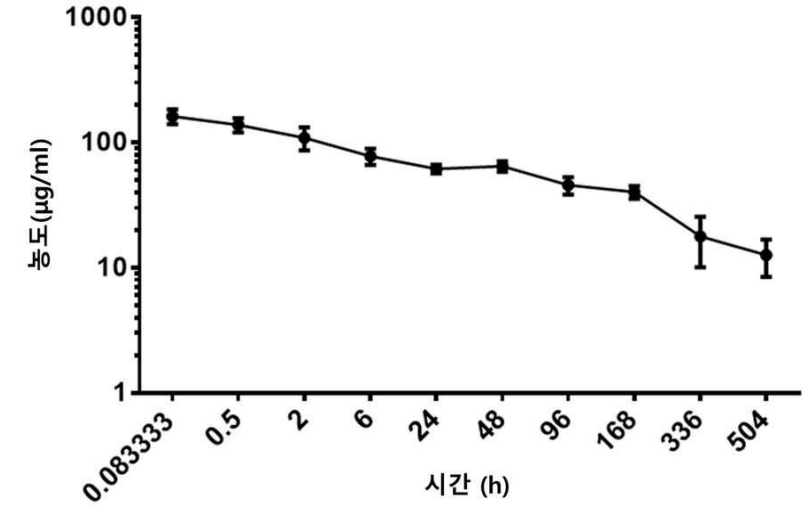
도면8


종양 부피(mm³)
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
0
2
4
7
9
11
투여후 일수
PBS
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체 1.2mg/kg
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체 6mg/kg
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적 항체 30mg/kg

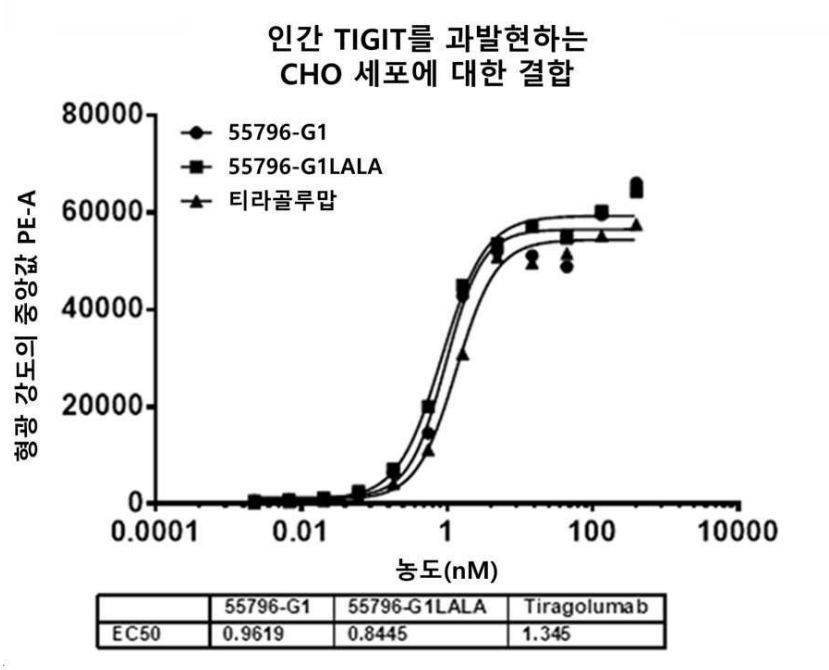
도면9


종양 부피(mm³)
1000
800
600
400
200
0
5
7
9
11
13
15
접종후 일수
PBS
아테졸리주맙-10mg/kg
티라골루맙-10mg/kg
티라골루맙 + 아테졸리주맙
항-TIGIT/PD-L1 이중특이적
항체-12mg/kg

도면10

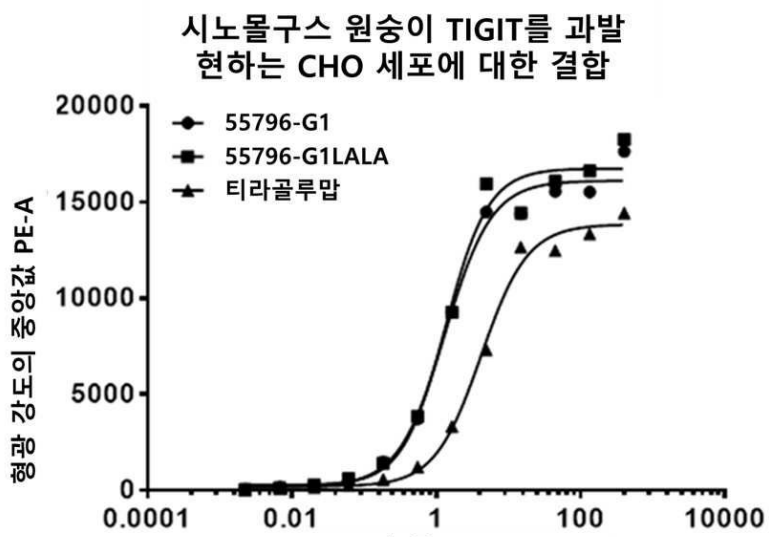


도면11



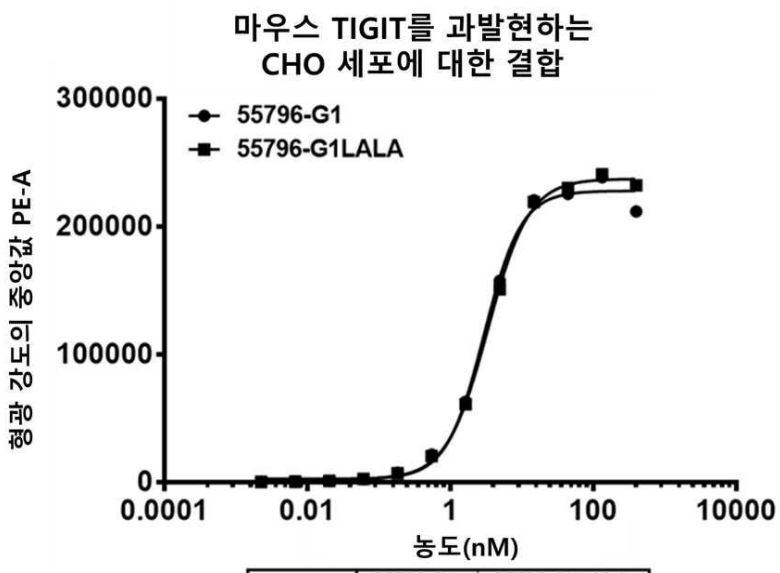
	55796-G1	55796-G1LALA	Tiragolumab
EC50	0.9619	0.8445	1.345

도면12



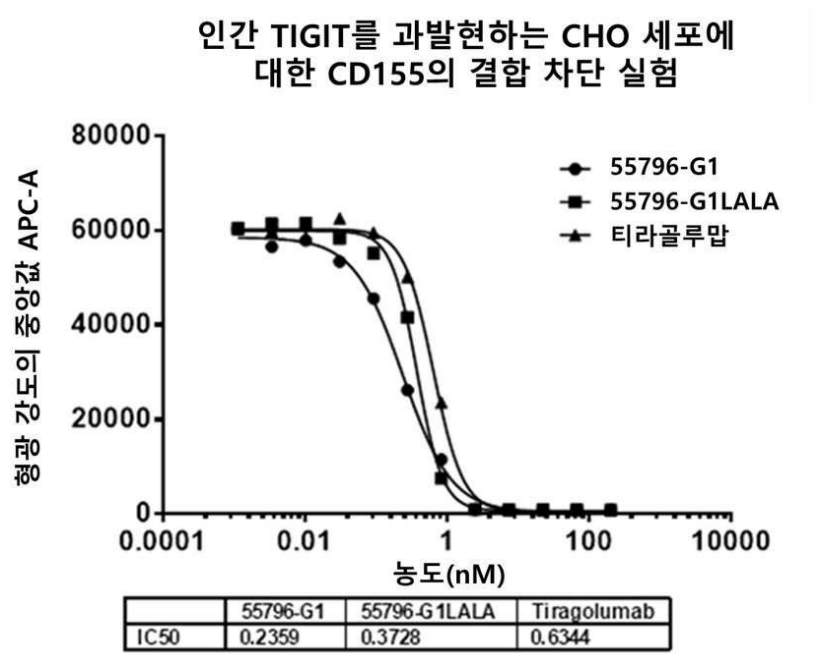
	55796-G1	55796-G1LALA	Tiragolumab
EC50	1.318	1.337	4.178

도면13



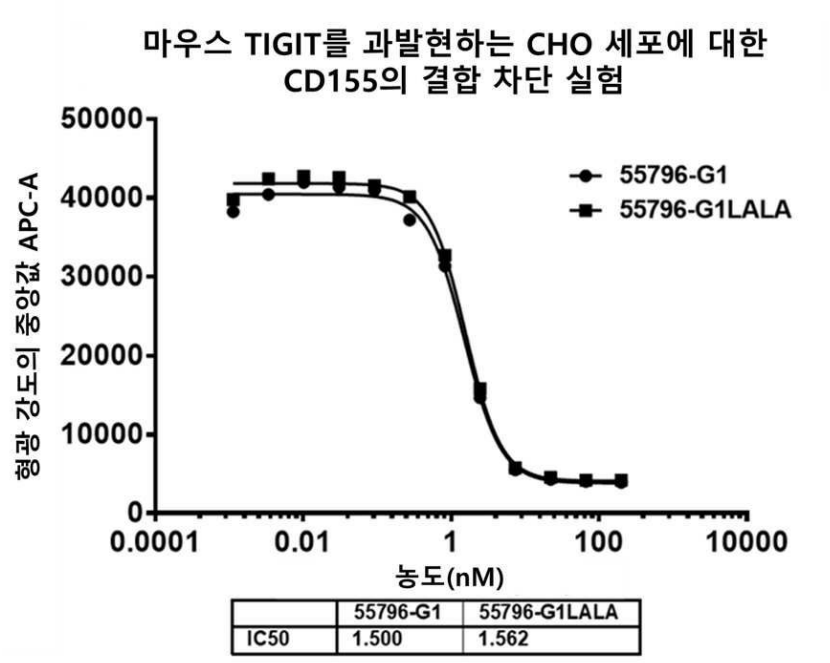
	55796-G1	55796-G1LALA
EC50	2.962	3.358

도면14



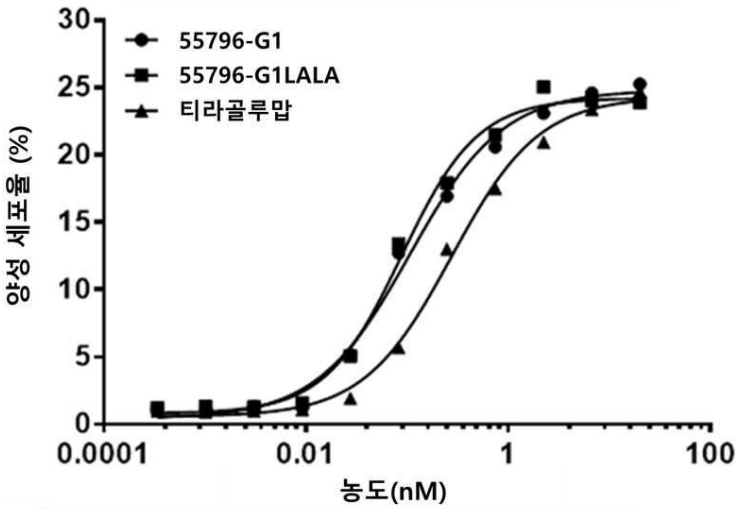
	55796-G1	55796-G1LALA	Tiragolumab
IC50	0.2359	0.3728	0.6344

도면15



	55796-G1	55796-G1LALA
IC50	1.500	1.562

도면16



	55796-G1	55796-G1LALA	Tiragolumab
EC50	0.1059	0.08779	0.2736

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.