



## (19) 대한민국특허청(KR)

## (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월20일

(11) 등록번호 10-2822525

(24) 등록일자 2025년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/24 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/2402 (2013.01)

A61K 38/47 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7031968(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년06월30일

심사청구일자 2023년10월18일

(85) 번역문제출일자 2023년09월19일

(65) 공개번호 10-2023-0142631

(43) 공개일자 2023년10월11일

(62) 원출원 특허 10-2019-7002051

원출원일자(국제) 2017년06월30일

심사청구일자 2020년06월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/040411

(87) 국제공개번호 WO 2018/006034

국제공개일자 2018년01월04일

(30) 우선권주장

62/357,645 2016년07월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080110810 A\*

KR1020150054768 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드  
더 유니버시티미국 캘리포니아 94305-2038 스탠포드 피오박스  
20386 메인 퀴드 오피스 오브 더 제너럴 카운셀  
빌딩170 3층

(72) 발명자

우즈 엘리엇 씨.

미국 캘리포니아 94010 벌링게임 벨뷰 애비뉴  
1210 아파트먼트 406

샤오 한

미국 캘리포니아 94303 이스트 팔로 알토 맨하탄  
애비뉴 2001 아파트먼트 314

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 한지혜

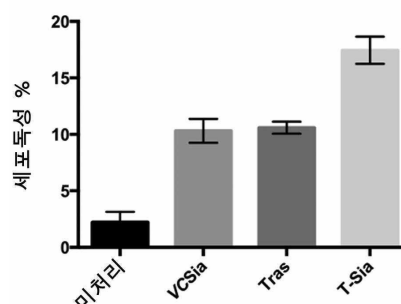
(54) 발명의 명칭 표적 세포 표면 편집을 위한 집합체

## (57) 요약

표적 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티와 표적 세포 표면 편집 효소를 포함하는 집합체가 제공된다. 또한 상기 집합체를 포함하는 조성물 및 키트뿐만 아니라, 상기 집합체를 사용하는 방법이 제공된다. 집합체를 만드는 방법도 또한 제공된다.

## 대표도

감마/델타 T세포



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6815* (2017.08)  
*A61K 47/6855* (2017.08)  
*A61K 47/6863* (2017.08)  
*A61K 47/6869* (2017.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 16/32* (2013.01)  
*C07K 19/00* (2023.08)  
*C07K 2319/33* (2013.01)  
*C07K 2319/74* (2013.01)

(72) 발명자

**베르토찌 캐롤린 알.**

미국 캘리포니아 94305-3301 스탠포드 스탠포드 유니버시티 디파트먼트 오브 케미스트리

**그레이 멜리사**

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 캠퍼스 서킷 10  
아파트먼트 328

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

접합체를 포함하는 개체에서 암을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 접합체는:

암세포의 세포 표면 분자에 결합하는 항체; 및

시알리다제를 포함하고,

상기 시알리다제는 항체에 접합되고, 접합되면 시알리다제는 상기 암세포의 표면에 존재하는 시알로글리칸을 절단할 수 있는, 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 항체가 IgG, 단일 사슬 Fv(scFv), Fab, (Fab)<sub>2</sub>, 또는 (scFv')<sub>2</sub>인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시알리다제가 상기 항체의 중쇄에 접합된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제3 항에 있어서, 상기 시알리다제가 항체의 Fc 영역에 접합된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제3 항에 있어서, 상기 시알리다제가 중쇄의 C-말단에 접합된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1 항에 있어서, 상기 시알리다제가 링커를 통해 항체에 접합된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제6 항에 있어서, 상기 링커가 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 8

제7 항에 있어서, 상기 접합체가 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제1 항에 있어서, 상기 세포 표면 분자가 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제1 항에 있어서, 상기 암 세포가 암종 세포, 유방암 세포, 난소 암 세포, 위암 세포 및 대장 암세포로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제9 항에 있어서, 상기 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자가 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제1 항에 있어서, 상기 시알리다제가 *퀴티푸스균* 시알리다제, *콜레라균* 시알리다제, 포유류 뉴라미니다제, 및 인간 뉴라미니다제로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제1 항에 있어서, 상기 시알리다제가 인간 뉴라미니다제(1), 인간 뉴라미니다제(2), 인간 뉴라미니다제(3), 및 인간 뉴라미니다제(4)로 이루어진 군에서 선택된 인간 뉴라미니다제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제1 항 내지 제13 항 중 어느 한 항의 약학적 조성물 및 이들을 요구하는 개체에 상기 약학적 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**



[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2016년 7월 1일자로 출원된 미국 예비 특허 출원 제62/357,645호를 원용하며, 그 출원은 그 전체가 본원에 참조로 편입되었다.

[0003] 연방 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 GM059907 및 CA108781 계약 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가진다.

## 배경 기술

[0005] 서문

[0006] 난치성 종양과의 전쟁에서 암에 대한 면역 반응을 향상시키는 치료법이 혁명적인 것으로 입증되고 있다. 면역 세포는 활성화 및 억제 수용체의 신호를 통합하여 까다로운 표적에 대한 반응을 결정한다. 활성화 신호는 병리학의 존재를 경고하고 억제 신호는 세포가 건강한 "자아"에 직면했다고 전한다. 성공적인 종양은 종종 억제 수용체에 대한 리간드를 과발현함으로써 면역 세포 인식을 방해하는 메커니즘을 진화시킨다. 이 발견은 PD-1 및 CTLA-4를 표적으로하는 임상적으로 승인된 T 세포 검사점 억제제에서 구체화된 바와 같이, 억제성 면역 세포 신호 전달을 차단하기 위한 새로운 치료 전략을 유도했다. 진행중인 전임상 연구는 여러 면역학 경로를 목표로 한 치료법들을 조합하는 것에 초점을 두고 있다. 예를 들어 다른 T 세포 검사점 억제제를 표적으로 하는 항체와 함께 병용된 PD-1/PD-L1에 대한 항체는 동종의 종양 모델에서 향상된 항 종양 활성을 입증한다. 이러한 개입에 대한 보완은 타고난 면역 세포, 특히 자연 살해(NK) 세포, 대식세포 및 수지상 세포를 표적화하는 치료법이다.

## 발명의 내용

[0007] 표적 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소를 포함하는 접합체가 제공된다. 또한 상기 접합체를 포함하는 조성물 및 키트뿐만 아니라 상기 접합체를 사용하는 방법이 제공된다. 접합체의 제조 방법 또한 제공된다.

## 도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 면역 회피 전략 및 면역 회피를 감소시키는 방법을 개략적으로 도시한다.

도 2는 항체-시알리다제 접합체의 제조 및 이것의 전기 영동 및 ESI-MS 분석을 묘사한다.

도 3은 시알리다제의 전기 영동 분석, 가수 분해 활성 및 유동 세포 계측법과 그 활동에 대한 영상 분석을 묘사한다.

도 4는 상이한 유방암 세포주에서 시알리다제 처리를 하거나 또는 하지 않은 다양한 수용체의 세포 표면 시알릴화 수준과 리간드 수준을 묘사한다.

도 5는 시알리다제의 부재 또는 존재 하에서 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성을 나타낸다.

도 6은 야생형과 열에 의해 불활성화된 콜레라균(*Vibrio cholerae*) 시알리다제의 특성 규명을 위해 사용된 다양한 분석을 묘사한다.

도 7은 콜레라균(*Vibrio cholerae*) 시알리다제, 쥐티푸스균(*Salmonella typhimurium*) 시알리다제, 항-Her2-IgG 및 그 접합체에 대한 ESI-MS 스펙트럼을 묘사한다.

도 8은 콜레라균의 시알리다제 및 항-HER2-IgG-Sia의 가수 분해 활동을 묘사한다. 쥐티푸스균 시알리다제 및 항-Her2-IgG-St Sia의 가수 분해 활성도 묘사된다.

도 9는 트라스투주맙-시알리다제 접합체 처리를 하거나 하지 않은 다양한 세포주에서 세포 표면 시알산의 수준을 보여주는 이미지를 묘사한다. 또한 다양한 세포주에서 2 개의 트라스투주맙-시알리다제 접합체에 의한 세포 표면 시알산의 제거를 비교하는 유동 세포 계측 데이터가 제시되어 있다.

도 10은 항 HER2-IgG-Sia 접합체의 부재 또는 존재 하에 다양한 세포주에 삼부쿠스 니그라(*Sambucus nigra*) 리간드를 보여주는 이미지를 묘사한다.

도 11은 항-Her2-IgG 또는 항-Her2-IgG-Sia의 존재 하에 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성을 묘사한다.

도 12는 HER-2 발현 암세포에 대항하는 트라스투주맙과 트라스투주맙-시알리다제 접합체의 활성을 묘사한다.

도 13 은 HER2 + 발현 암세포에 대항하는 시알리다제, 트라스투주맙과 트라스투주맙-시알리다제 접합체의 존재 하에 단리된 단구 개체군 및 분화된 대식세포의 Siglec 발현 수준 및 세포 독성을 묘사한다.

도 14는 HER2 + 발현 암세포에 대항하는 시알리다제, 트라스투주맙과 트라스투주맙-시알리다제 접합체의 존재 하에 단리된  $\gamma \delta$ T세포의 세포 독성을 묘사한다.

도 15는 지정된 차단형 항체의 부재 또는 존재 하에 항 Her2-IgG 또는 항 Her2-IgG와 시알리다제의 혼합물과의 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성을 묘사한다.

도 16은 백혈구에서 CD56 및 CD3 마커를 분석하는 유동 세포 계측 데이터를 묘사한다.

도 17은 시알리다제 처리가 리톡시맙에 의해 유도된 보체 의존성 세포 독성 (CDC)을 증강시키는 것을 나타내는 데이터를 도시한다.

도 18 은 Ramos 세포가 Daudi 세포보다 Siglec-9 리간드의 수준이 높다는 것을 나타내는 데이터를 묘사한다.

도 19 는 시알리다제가 리톡시맙을 보체 의존적 방식으로 증강시키는 것을 입증하는 데이터를 묘사한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 표적 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소를 포함하는 접합체가 제공된다. 또한 상기 접합체를 포함하는 조성물 및 키트뿐만 아니라 상기 접합체를 사용하는 방법이 제공된다. 접합체의 제조 방법이 또한 제공된다.
- [0010] 본 개시의 접합체, 조성물 및 방법이 보다 상세하게 설명되기 전에, 접합체, 조성물 및 방법은 설명된 일부 구현예에 한정되지 않으며, 당연히 이들이 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 일부 구현예를 설명하기 위한 것이며, 상기 접합체, 조성물 및 방법의 범위가 첨부된 청구범위에 의해서만 제한되므로, 제한하려는 것이 아님이 이해되어야 한다.
- [0011] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥상 달리 명백하게 진술되지 않는 한, 해당 범위의 상한값과 하한값 사이에서 하한값의 단위의 십분의 일까지의 각각의 개입된 값 및 상기 언급된 범위에서의 그 밖의 언급된 또는 개입된 값이 상기 접합체, 조성물 및 방법 내에 포괄됨이 이해되어야 한다. 이와 같이 더 작은 범위의 상한값 및 하한값은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 언급된 범위 내에서 구체적으로 배제된 모든 한계값에 해당하는 상기 접합체, 조성물 및 방법 내에 또한 포괄된다. 언급된 범위가 한계값들 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계값들 중 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위도 역시 상기 접합체, 조성물 및 방법 내에 포함된다.
- [0012] 특정 범위는 본 명세서에서 "약"이라는 용어가 앞에 오는 수치로 제시된다. "약"이라는 용어는 뒤의 오는 정확한 숫자뿐만 아니라 그 단어의 뒤에 오는 숫자에 가까운 또는 대략적으로 유사한 숫자에 대한 자구적 (literal) 지원을 제공하기 위해 본원에서 사용된다. 어떤 숫자가 구체적으로 인용된 숫자에 가까운지 또는 대략적으로 비슷한지를 결정할 때, 근사치인 미인용된 수는 그것이 제시된 맥락에서 구체적으로 인용된 수의 실질적으로 동등한 대응물을 제공한다.
- [0013] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 상기 접합체, 조성물 및 방법이 속한 기술분야의 당업자에 의해 공통적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 어떠한 접합체, 조성물 및 방법이 또한 상기 접합체, 조성물 및 방법의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 대표적인 예시적 접합체, 조성물 및 방법은 이제 기술된다.
- [0014] 본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 참조로써 편입됨을 구체적 및 개별적으로 표시되는 것처럼 본원에 참고 문헌으로 포함되며, 본원에 참조로서 편입되어 상기 간행물이 인용된 것과 관련된 물질 및/또는 방법을 개시 및 기술한다. 모든 간행물의 인용은 출원일 이전에 그 간행물의 인용을 위한 것이며, 현재의 접합체, 조성물 및 방법이 그러한 간행물보다 더 늦을 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안되며, 제공된 간행물의 날짜는 독립적으로 확인될 필요가 있는 실제 공개일과 다를 수 있다.
- [0015] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 단수 형태 "하나 (a)", "하나 (an)" 및 "그 (the)"는 문맥 상 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함함을 주목해야 한다. 또한 청구범위는 임의의 선택적인 요소를 배제하도록 작성되었을 수 있음이 주목된다. 이와 같이, 이 진술은 청구항 요소의 재인용 또는 "부정적인" 제한의

사용과 관련하여 "단독으로", "단지" 등과 같은 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로서의 역할을 하려는 것이다.

[0016] 명확한 설명을 위해, 별도의 구현예들의 맥락으로 기술된, 상기 접합체, 조성물 및 방법의 소정의 특징들이 단일 구현예에서 조합으로 역시 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간략화를 위해, 단일 구현예의 맥락으로 기술된, 상기 접합체, 조성물 및 방법의 다양한 특징은 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위 조합으로 역시 제공될 수 있다. 구현예의 모든 조합은 구체적으로 본 개시에 포함되며, 그러한 조합이 동작 가능한 프로세스 및/또는 구성을 포함하는 한도 내에서, 각각의 모든 조합이 개별적으로 또는 명시적으로 개시된 것처럼, 본 명세서에 개시된다. 또한, 그러한 변수를 설명하는 구현예에 열거된 모든 하위 조합은 본 발명의 접합체, 조성물 및 방법에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 모든 하위 조합이 본 명세서에서 개별적 및 명시적으로 개시된 것처럼 본원에 개시된다.

[0017] 본 개시를 읽을 때 당해기술의 숙련자에게 명백한 바와 같이, 여기에 기술되고 도시된 개별 구현예는 본 교시의 범위 또는 취지로부터 벗어남이 없이 다른 여러 구현예들의 특징과 쉽게 분리되거나 결합될 수 있는 개별적 구성 요소 및 특징을 갖는다. 언급된 모든 방법은 언급된 사건의 순서대로, 또는 논리적으로 가능한 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0018] 접합체

[0019] 위에 요약된 바와 같이, 본 개시의 양태에는 접합체가 포함된다. 일부 양태에서, 상기 접합체는 표적 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소를 포함한다.

[0020] 표적화 모이어티

[0021] 일부 구현예에 있어서, 본 발명의 접합체는 표적화 모이어티를 포함한다. 표적화 모이어티는 변할 수 있으며, 예를 들어, 표적 세포상의 세포 표면 분자의 성질에 기초하여 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 표적화 모이어티의 비제한적인 예에는 항체, 리간드, 앵타머, 나노 입자 및 소분자가 포함된다.

[0022] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는" 또는 "세포 표면 분자에 특이적인" 표적화 모이어티는 다른 세포 표면 분자와 비교하여 보다 큰 친화성으로 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티는 세포 표면 분자에 대한 결합 친화도  $K_d$ 가 약  $10^{-5}$  M 이하, 약  $10^{-6}$  M 이하 또는 약  $10^{-7}$  M 이하, 또는 약  $10^{-8}$  M 이하 또는 약  $10^{-9}$  M 이하,  $10^{-10}$  M 이하,  $10^{-11}$  M 이하 또는  $10^{-12}$  M 이하이다. 이러한 친화도는 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술 (예를 들어, BIAcore 2000 기기, 제조사가 제시한 일반 절차 사용), 방사 면역 측정법 또는 다른 방법과 같은 기존 기술을 사용하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0023] 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티는 항체이다. "항체" 및 "면역 글로불린"이란 용어에는 항체 또는 모든 이소타입의 면역 글로불린(예를 들어, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgE, IgD, IgA, IgM 등), 전체 항체 (예를 들어, 차례로 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 2개 이합체로 이루어진 테트라머로 구성된 항체); 단일 사슬 항체; 표적 세포의 세포 표면 분자에 대한 특이적 결합을 보유하는 항체의 단편(예를 들어, 전체 또는 단일 사슬 항체의 단편)(예컨대 비제한적으로 단일 사슬 Fv (scFv), Fab, (Fab')<sub>2</sub>, (scFv')<sub>2</sub> 및 디아바디가 포함); 키메라 항체; 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체(예를 들어, 인간화된 전체 항체, 인간화 절반 항체 또는 인간화 항체 단편); 및 항체의 항원-결합 부분 및 비-항체 단백질을 포함하는 융합 단백질이 포함된다. 항체는 예를 들어 생체 내 조영제, 방사성 동위 원소, 검출 가능한 생성물을 생성하는 효소, 형광 단백질 등으로 검출 가능하게 표지될 수 있다. 항체는 더 나아가 특정 결합 쌍, 예를 들어, 비오틴(비오틴-아비딘 특이적 결합 쌍의 구성원) 등의 구성원과 같은 다른 부분에 추가로 접합될 수 있다.

[0024] 일부 양태에서, 표적화 모이어티가 항체인 경우, 항체는 심지어 표적 세포 표면 편집 효소의 부재 하의 치료용 항체일 수 있는데, 예를 들어 암(예를 들어, 항체 의존성 세포 세포 독성 및/또는 다른 메카니즘), 면역 관련 장애, 내피 세포 관련 장애 등의 치료에서, 단독으로 효능을 갖는 항체이다. 예를 들어, 항체는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 치료용 항체일 수 있다.

[0025] 본 발명의 접합체에 사용될 수 있는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 항체의 비 제한적인 예에는 아데카투무맙, 아스크린과쿠맙, 시수투무맙, 코나투무맙, 다라투무맙, 드로지투맙, 두리고투맙, 두르바루맙, 두시기투맙, 엔포르투맙, 에노티쿠맙, 피지투무맙, 가니투맙,

글렘바투무맵, 인테투무맵, 이필리무맵, 이라투무맵, 이크루쿠맵, 렉사투무맵, 루카투무맵, 마파투무맵, 나르나투맵, 네시투무맵, 네스바쿠맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 마니투무맵, 파트리투맵, 프리투무맵, 라드레투맵, 라무시루맵, 텔로투무맵, 로바투무맵, 세리반투맵, 타렉스투맵, 테프로투무맵, 토베투맵, 반틱투맵, 베센쿠맵, 보투무맵, 잘루투무맵, 플란보투맵, 알투모맵, 아나투모맵, 아르시투모맵, 벡투모맵, 블리나투모맵, 데투모맵, 이브리투모맵, 민레투모맵, 미투모맵, 목세투모맵, 남투모맵, 노페투모맵, 켈투모맵, 핀투모맵, 라코투모맵, 사투모맵, 솔리토맵, 탐리투모맵, 테나투모맵, 토시투모맵, 트레멜리무맵, 아바고보맵, 이고보맵, 오레고노맵, 카프로맵, 에드레콜로맵, 나콜로맵, 아마톡시맵, 바비톡시맵, 브렌톡시맵, 세톡시맵, 데르로톡시맵, 디누톡시맵, 엔시톡시맵, 푸톡시맵, 기켄톡시맵, 인다톡시맵, 이사톡시맵, 마르게톡시맵, 리톡시맵, 실톡시맵, 유블리톡시맵, 에크로벡시맵, 아비투주맵, 알렘투주맵, 베바시주맵, 비바투주맵, 브론틱투주맵, 칸투주맵, 칸투주맵, 시타주투맵, 클리바투주맵, 다세투주맵, 템시주맵, 달로투주맵, 데닌투주맵, 엘로투주맵, 에막투주맵, 에미베투주맵, 에노블리투주맵, 에타라시주맵, 파를레투주맵, 픽라투주맵, 켄투주맵, 임가투주맵, 이노투주맵, 라베투주맵, 리파스투주맵, 린투주맵, 로르보투주맵, 롬레투주맵, 마투주맵, 밀라투주맵, 니모투주맵, 오비누투주맵, 오카라투주맵, 오틀레르투주맵, 오나르투주맵, 오포르투주맵, 파르사투주맵, 페르투주맵, 피나투주맵, 폴라투주맵, 시브로투주맵, 심투주맵, 타카투주맵, 티가투주맵, 트라스투주맵, 투고투주맵, 반도르투주맵, 바누치주맵, 벨투주맵, 보르세투주맵, 소피투주맵, 카투막소맵, 에르투막소맵, 데파톡시주맵, 온톡시주맵, 블론투베트맵, 탐투페트맵 또는 이의 항원 결합 변이체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "변이체"란 항체가 특정 항원 (예를 들어, 트라스투주맵에 대한 HER2)에 결합하지만, 모 항체보다 적은 또는 많은 아미노산을 갖고, 모 항체에 대해 하나 이상의 아미노산 치환을 가지거나, 그것의 조합을 갖는 것을 뜻한다.

[0026] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 암 치료용으로 승인된, 하기 표 1에 기재된, 치료 용 항체 또는 이의 항원 결합 변이체이다. 또한, 표 1에는 치료용 항체가 특이적으로 결합하는 상응하는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자뿐만 아니라 항체가 치료를 위해 승인된 암의 유형이 제공되어있다.

# 표 1

[0027] 암 치료제 승인 항체

세포 표면 분자	암 유형	항체
BCR-ABL	CML ALL	이마티닙, 다사티닙 닐로티닙, 보수티닙 포나티닙
CD19	ALL	블리나투모맵
CD20	NHL, CLL B 세포 NHL 전-B ALL	리톡시맵 오파투무맵 <sup>90</sup> Y-이브리투모맵 <sup>131</sup> I-토시투모맵
CD30	호지킨 림프종	브렌톡시맵 베도틴
CD33	AML	켄투주맵 오조가미신
CD52	CLL	알렘투주맵
CTLA-4	절제 불가능하거나 전이성 흑색종	이필리무맵
EGFR	CRC 머리와 목	세톡시맵 파니투무맵
EpCAM	악성 복수	카투막소맵
HER2	유방	트라스투주맵 페르투주맵
PAP	전립선	시폴레우셀-T
PD-1	전이성 흑색종 NSCLC	니볼루맵 렘브롤리주맵
VEGF	유방, 자궁 경부 CRC, NSCLC RCC, 난소 악교 모세포종	베바시주맵
VEGF-R2	위 NSCLC	라무시루맵

[0028] 표 1에 대한 약어는 다음과 같다 : ALL(급성 림프 구성 백혈병); AML( 급성 골수성 백혈병); BCR-ABL(중단 점 클러스터 영역 아벨손 타이로신 키나아제); CLL(만성 림프성 백혈병); CTLA-4(세포 독성 T-림프구-관련 항원 4); CRC(대장 암); EGFR(표피 성장 인자 수용체); EpCAM(상피 세포 부착 분자); HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2); NHL(비-호 지킨 림프종); NSCLC(비소 세포 폐암); PAP(전립선 산 포스파타제); PD-1(프로그램된 세포 살해 수용체 1); RCC(신장 세포 암종); VEGF(혈관 내피 성장 인자); VEGF-R2(혈관 내피 성장 인자 수용체 2).

[0029] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 하기 표 2에 기재된 치료 항체 또는 그것의 항원-결합 변이체이다. 또한 표 2에는 치료용 항체가 특이적으로 결합하는 상응하는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자뿐만 아니라 항체를 포함하는 접합체를 사용하여 치료될 수 있는 암 유형이 제공된다.

**표 2**

[0030] 추가 항체, 세포 표면 분자 및 암 유형

세포 표면 분자	암 유형	항체
A2aR	NSCLC	PBF-509
AKAP4	NSCLC 난소	전임상성
BAGE	아교 모세포종 난소	전임상성
BORIS	전립선, 폐 식도	전임상성
CD22	ALL	에프라투주맙 목세투모맙 이노투주맙 오조가미신
CD73	고급 고형 종양	MED19447
CD137	고급 고형 종양	우레루맙 PF-05082566
CEA	CRC	PANVAC <sup>TM</sup> Ad5-[E1-, E2b-]-CEA(6D)
CS1	다발성 골수종	엘로투주맙
CTLA-4	악성 중피종	트레멜리무맙
EBAG9	방광	전임상성
EGF	NSCLC	CIMAvax
EGFR	NSCLC	네시투무맙
GAGE	자궁 경관	전임상성
GD2	신경 모세포종 망막 아세포종 흑색종 기타 고형 종양	디누톡시맙, hu3F8 hu14.18-IL-2, 3F8/OKT3bsAb 항-GD2 CAR GD2-KLH
gp100	흑색종	gp100:209-217(210M)
HPV-16	자궁 경관 SCCHN	HPV-16(E6, E7) TG4001, Lm-LLO-E7 pNGVL4a-CRT/E7, INO-3112
HSP105	CRC 방광	전임상성
IDH1	신경 교종	IDH1(R132H) p123-142
이디오 타입 (NeuGcGM3)	NSCLC, 유방 흑색종	라코투모맙
IDO1	유방, 흑색종 NSCLC	인독시모드 INCB024360 IDO1 펩티드 백신
KIR	림프종	리털루맙
LAG-3	유방, 헤마토-논리적 고급 고형 종양	BMS-986016 IMP321



LY6K	위 SCCHN	LY6K-177 펩티드 LY6K, CDCA1, IMP3
MAGE-A3	흑색종 NSCLC	recMAGE-A3 자스투모타이드
MAGE-C2	위의 흑색종 다발성 골수종	전임상성
MAGE-D4	CRC	전임상성
멜란-A	흑색종	MART-1 (26-35, 27L)
MET	NSCLC	오나르투주맵 티반티닙
MUC1	NSCLC, 유방 전립선	테세모티드, TG4010 PANVAC™
MUC4	췌장	전임상성
MUC16	난소	아바고보맵 오레고보맵
NY-ESO-1	난소 흑색종	NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ rV-NY-ESO-1; rF-NY-ESO-1
PD-1	B-세포 림프종 흑색종, CRC	피달리주맵 AMP-224, AMP-514
PD-L1	NSCLC, RCC 방광, 유방 흑색종, SCCHN	BMS-936559, 아테졸리주맵 두르발루맵, 아벨루맵
PRAME	NSCLC	전임상성
PSA	전립선	PROSTVAC®-VF
ROR1	CLL, 췌장암 폐, 유방	전임상성
시알릴-Tn	유방	테라토프
SPAG-9	전립선 암, CRC NSCLC, 난소 암	전임상성
SSX1	전립선 다발성 골수종	전임상성
서르비빈	흑색종 골종, 고형 종양	EMD640744 3가 펩티드 백신 트리펩티드 백신
텔로머라아제	췌장	테르토토타이드
TIM-3	흑색종, NHL NSCLC	전임상성
VISTA	흑색종, 방광	전임상성
WT1	난소, 자궁, AML 다발성 골수종	WT1 펩티드 백신
XAGE-1b	전립선	DC-기반 종양 백신
5T4	RCC, CRC 전립선	TroVax® 넵투모맵 에스타페나톡스

[0031]

표 2에 대한 약어는 다음과 같다: A2aR, 아데노신 A2a 수용체; AKAP4, A 키나아제 앵커 단백질 4; AML, 급성 골수성 백혈병; ALL, 급성 림프구성 백혈병; BAGE, B 흑색종 항원; BORIS, 각인된 지점의 규제자의 형태. CEA, 암 배자 항원; CLL, 만성 림프성 백혈병; CRC, 대장 암; CS1, CD2 서브셋 1; CTLA-4, 세포 독성 T-림프구-관련 항원 4; EBAG9, 에스트로겐 수용체 결합 부위 항원 9; EGF, 표피 성장 인자; EGFR, 표피 성장 인자 수용체; NSCLC, 비소 세포 폐암; GAGE, G 항원; GD2, 디시알로갈리오사이드 GD2; gp100, 당 단백질 100; HPV-16, 인간 유두종 바이러스 16; HSP105, 열-쇼크 단백질 105; IDH1, 이소 시트르산 탈수소 효소 타입 1; IDO1, 인돌아민-2,3-디옥시게나제 1; KIR, 킬러 세포 면역글로블린 유사 수용체; LAG-3, 림프구 활성화 유전자 3; LY6K, 림프구 항원 6 접합체 K; MAGE-A3, 흑색종 항원 3; MAGE-C2, 흑색종 항원 C2; MAGE-D4, 흑색종 항원 D4; Melan-A/MART-1, T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1; MET, N-메틸-N'-니트로소 구아니딘 인간 골육종 형질 전환 유전자; MUC1, 뮤신 1; MUC4, 뮤신 4; MUC16, 뮤신 16; NHL, 비-호지킨 림프종; NY-ESO-1, 뉴욕 식도 편평 세포 암종 1; PD-1, 프로그램된 세포 사멸 수용체 1; PD-L1, 프로그램된 세포 사멸 수용체 리간드 1; PRAME, 우선

적으로 발현된 흑색종 항원; PSA, 전립선 특이 항원; RCC, 신장 세포 암종; ROR1, 수용체 티로신 키나아 고아 수용체 1; SCCHN, 머리와 목의 편평 세포 암종; SPAG-9, 정자 관련 항원 9; SSX1, 활막 육종 X-염색체 중단점 1; TIM-3, T-세포 면역 글로불린 도메인 및 뮤신 도메인-3; VISTA, T-세포 활성화의 V-도메인 면역 글로불린 함유 억제제; WT1, Wilms'Tumor-1; XAGE-1b, X 염색체 항원 1b.

[0032] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 하기 표 3에 기재된 치료용 항체 또는 그의 항원 결합 변이체이다. 또한 표 3에는 치료용 항체가 특이적으로 결합하는 해당 종양 관련 세포 표면 분자 또는 종양 특이적 세포 표면 분자가 제시되어 있다.

### 표 3

[0033] 추가 항체 및 상응하는 세포 표면 분자

항체	세포 표면 분자
오레고보맙	CA125
기렌톡시맙	CAIX
오비누투주맙	CD20
오파투무맙	CD20
리톡시맙	CD20
알렙투주맙	CD52
이필리무맙	CTLA-4
트레멜리무맙	CTLA-4
세톡시맙	EGFR
네시투무맙	EGFR
파니투무맙	EGFR
자루투무맙	EGFR
에드레콜로맙	EpCAM (17-1A)
팔레투주맙	FR-알파
퍼투주맙	Her2
트라스투주맙	Her2
틸로투무맙	HGF
피기투무맙	IGF-1
가니투맙	IGF1R
두르바루맙	IGG1K
바비톡시맙	포스파티딜세린
오나르투주맙	산란 인자 수용체 키나아제
베바시주맙	VEGF-A
라뮤시루맙	VEGFR2

[0034] 일부 구현예에서, 본 발명의 접합체는 트라스투주맙, 세톡시맙, 다라투무맙, 기렌 톡시맙, 파니투무맙, 오파투 무맙, 리톡시맙 및 이들의 항원 결합 변이체로부터 선택된 표적화 모이어티로서 치료용 항체를 포함한다.

[0035] 일부 양태에서, 본 발명의 접합체는 표적화 모이어티로서 치료용 항체를 포함하고, 상기 치료용 항체는 트라스 투주맙 또는 그의 HER2 결합 변이체이다. 트라스투주맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 공지되어 있고 하기 표 4에 제공되어 있다.

### 표 4

[0036] 트라스투주맙 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열

트라스투주맙 경쇄 (서열식별번호: 1)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
-----------------------	---

트라스투주맙 중쇄 (서열식별번호 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIDTYIHWRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
----------------------	--

- [0037] 표적화 모이어티가 항체인 경우, 표적 세포 표면 편집 효소는 항체의 임의의 적합한 영역에 접합될 수 있다. 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 경쇄 폴리펩티드를 갖는 항체이고, 표적 세포 표면 편집 효소는 경쇄, 예를 들어 C-말단 또는 경쇄의 내부 영역에 접합된다. 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티는 중쇄 폴리펩티드를 갖는 항체이고 표적 세포 표면 편집 효소는 중쇄, 예를 들어 C-말단 또는 중쇄의 내부 영역에 접합된다. 중쇄를 갖는 항체가 파편 결정성(Fc) 영역을 포함하는 경우, 표적 세포 표면 편집 효소는 Fc 영역, 예를 들어 C-말단 또는 Fc 영역의 내부 영역에 접합될 수 있다.
- [0038] 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티는 리간드이다. 본 명세서에서 사용된 "리간드"는 생물학적 목적을 달성하기 위해 생체 분자와 복합체를 형성하는 물질이다. 리간드는 표적 세포의 표면 상의 세포 표면 분자와 복합체를 형성하는 순환 인자, 분비 인자, 사이토킨, 성장 인자, 호르몬, 펩티드, 폴리펩티드, 소분자 및 핵산에서 선택된 물질일 수 있다. 일부 양태에서, 표적화 모이어티가 리간드인 경우, 리간드는 세포 표면 분자와의 복합체 형성이 발생하도록 변형되지만, 이러한 복합체 형성의 정상적인 생물학적 결과는 발생하지 않는다. 일부 양태에서, 리간드는 표적 세포 상에 존재하는 세포 표면 수용체의 리간드이다. 관심 대상인 세포 표면 수용체에는, 비제한적으로, 수용체 티로신 키나아제 (RTK), 비-수용체 티로신 키나아제 (비-RTK), 성장 인자 수용체 등이 포함된다. 본 발명의 접합체에 표적화 모이어티로서 리간드가 포함되는 경우, 표적 세포 표면 편집 효소는 리간드의 임의의 적합한 영역, 예를 들어, 표적 세포 표면 분자에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 리간드의 능력을 간접하거나 실질적으로 방해하지 않는 부착 영역에 접합 될 수 있다.
- [0039] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 앵타머다. "앵타머"는 표적 세포 표면 분자에 특이적 결합 친화력을 갖는 핵산(예, 올리고뉴클레오타이드)을 의미한다. 앵타머는 표적 세포 표면 편집 효소의 표적화된 전달에 대한 특정 바람직한 성질, 예컨대 선택 및 합성의 용이성, 높은 결합 친화도 및 특이성, 낮은 면역원성 및 다용도 합성 접근 가능성을 보인다. 세포 표면 분자에 결합하는 앵타머는 알려져 있으며, 예를 들어, TTA1 (앵타머를 세포외 기질 단백질 인 테나신-C에 표적화하는 종양)이 포함된다. 본 발명의 접합체에 사용되는 앵타머에는 문헌 [Zhu et al. (2015) *ChenMedChem* 10 (1) : 39-45]; 썬 (Sun) 등 (2014) *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3 : e182; 및 Zhang et al. (2011) *Curr. Med. Chem.* 18 (27) : 4185-4194에 기술된 것들이 포함된다.
- [0040] 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티는 나노입자이다. 본원에 사용된 바와 같이, "나노 입자"는 1nm 내지 1000nm, 20nm 내지 750nm, 50nm 내지 500nm, 예컨대 100nm 내지 300nm, 예를 들어 120~200nm의 범위 중 적어도 하나의 치수를 갖는 입자이다. 나노 입자에는 임의의 적합한 형상, 예컨대 비제한적으로 구형, 회전 타원체형, 막대형, 디스크형, 피라미드형, 큐브형, 원통형, 나노나선형, 나노스프링형, 나노환형, 화살표형, 눈물-모양, 테트라포드형, 프리즘형 또는 임의의 다른 적합한 기하학적 또는 비-기하학적 형태를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 나노 입자는 그 표면 상에 본원에 기재된 하나 이상의 다른 표적화 모이어티, 예를 들어 항체, 리간드, 앵타머, 소분자 등을 포함한다. 본원의 접합체에 사용되는 나노 입자는 Wang et al. (2010) *Pharmacol. Res.* 62 (2) : 90-99; Rao et al. (2015) *ACS Nano* 9(6) : 5725-5740; 및 Byrne et al. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(15): 1615-1626에 기술된 것들을 포함한다.
- [0041] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 소분자다. "소분자"는 1000 원자 질량 단위 (amu) 이하의 분자량을 갖는 화합물을 의미한다. 일부 구현예에서, 소분자는 750amu 이하, 500amu 이하, 400amu 이하, 300amu 이하 또는 200amu 이하이다. 일부 양태에서, 소분자는 중합체에 존재하는 것과 같은 반복 분자 단위로 제조되지 않는다. 일부 양태에서, 표적 세포 표면 분자는 리간드가 소분자인 수용체이고, 접합체의 소분자는 수용체의 소분자 리간드(또는 그것의 유도체)이다. 관심 대상의 표적 세포에 접합체를 표적화하는 데 사용되는 소분자가 알려져 있다. 한 예로, 엽산 (FA) 유도체는 과발현되는 (예를 들어, 많은 상피 종양에서) 엽산 수용체에 결합하여 특정 유형의 암 세포를 효과적으로 표적화하는 것으로 나타났다. 예를 들어, Vergote et al. (2015) *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7 (4) : 206-218를 참조할 수 있다. 다른 예에서, 소분자 시그마-2는 암세포를 표적화하는 데 효과적이라는 것이 증명되었다. 예를 들어, Hashim et al. (2014) *Molecular Oncology* 8 (5) : 956-967를 참조할



수 있다. 시그마-2는 체장암 세포를 포함한 많은 증식 종양 세포에서 과발현되는 시그마-2 수용체의 소분자 리간드이다. 일부 양태에서, 본원의 접합체는 소분자 약물 접합체 (SMDC)와 관련하여 표적 세포상의 세포 표면 분자에 결합함으로써 관심 대상의 표적 세포에 접합체를 표적화하는 데 효과적임이 입증된 표적화 모이어티로서의 소분자를 포함한다.

[0042] 표적 세포 표면 편집 효소

[0043] 위에서 요약된 바와 같이, 본 발명의 접합체는 표적 세포 표면 편집 효소를 포함한다. 본원에 사용된 "표적 세포 표면 편집 효소"는 표적 세포의 상응하는 세포 표면 분자에 표적화 모이어티의 결합시, 표적 세포의 표면상의 하나 이상의 분자에서 구조적 변화를 초래하 효소이다. 일부 양태에서, 구조적 변화는 표적화 모이어티가 결합하는 세포 표면 분자에 대한 것이다. 다른 양태에서, 구조적 변화는 표적화 모이어티가 결합하는 세포 표면 분자 이외의 표적 세포의 표면상의 분자에 대한 것이다.

[0044] 일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 야생형 효소(즉, 자연계에서 발견되는 효소)이다. 다른 양태에서, 효소는 야생형 효소가 아니다. 예를 들어, 표적 세포 표면 편집 효소는 야생형 효소의 비-천연 유도체일 수 있다. 이러한 유도체는 상응하는 야생형 효소의 효소 활성을 적어도 부분적으로 보유한다. 사용될 수 있는 효소 유도체에는 상응하는 야생형 효소보다 적은 아미노산 또는 더 많은 아미노산을 갖는 것들이 포함된다. 다르게는 또는 부가적으로, 효소 유도체는 상응하는 야생형 효소에 대해 하나 이상의 아미노산 치환 또는 아미노산 변형을 포함할 수 있다.

[0045] 표적 세포의 표면 분자 내의 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 영향을 받는 구조적 변화의 예는 분자의 절단이다. 일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 절단된 분자는 중합체이다. 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 절단될 수 있는(예를 들어, 분해된) 세포 표면 중합체에는, 비제한적으로, 폴리펩티드, 폴리사카라이드, 당 단백질 등이 포함된다. 예를 들어, 표적 세포 표면 편집 효소는 표적 세포의 표면상의 폴리펩티드 (또는 그의 관심대상 하위군)를 절단하는 프로테아제일 수 있다. 일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 절단된 중합체는 다당류(또는 "글리칸"), 즉 글리코시드화된 당을 함유하는 분자이다. 그러한 구현예에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 예를 들어 글리코시드 가수 분해 효소(예를 들어, 시알리다제)일 수 있다.

[0046] 일부 구현예에 따라, 세포 표면 편집 효소는 표적 세포의 표면상의 분자 (예를 들어, 중합체)의 말단 잔기를 절단(예를 들어, 가수 분해)한다. 일부 양태에서, 말단 잔기는 올리고 사카라이드, 폴리사카라이드, 당단백질, 당 지질 및 강글리오사이드에서 선택된 분자 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 말단 잔기는 말단 시알산 잔기이다. 말단 잔기가 말단 시알산 잔기인 경우, 세포 표면 편집 효소는 시알산 (뉴라민산)의 글리코시드 결합을 절단하여 올리고사카라이드로부터 말단 시알산 잔기를 유리시키는 시알리다제(또는 상기 그것의 유도체)일 수 있다, 폴리사카라이드, 당단백질, 당지질 및 기타 기질을 포함한다.

[0047] 본 발명의 접합체에 사용될 수 있는 시알리다제에는, 비제한적으로, 원핵 세포 시알리다제 및 진핵 세포 시알리다제가 포함된다. 사용될 수 있는 원핵 세포 시알리다제에는 세균성 시알리다제가 포함된다. 본 발명의 접합체에서 사용되는 세균성 시알리다제의 한 예는 *퀴티푸스균* 시알리다제(예를 들어, UniProtKB-P29768)이다. 본 발명의 접합체에서 사용되는 세균성 시알리다제의 또 다른 예는 *콜레라균* 시알리다제(예를 들어, UniProtKB-POC6E9)이다. 사용될 수 있는 진핵 세포의 시알리다제에는 예를 들어, 포유류 시알리다제 및 비포유류 진핵 세포 시알리다제가 포함된다. 관심 대상의 포유 동물 시알리다제(또는 포유류 뉴라미니다아 제)는 영장류에서 유래한 시알리다제(예를 들어, 인간 또는 비인간 뉴라미니다제)를 포함한다. 일부 양태에서, 시알리다제는 인간 시알리다제다. 일부 구현예에서, 인간 시알리다제는 인간 뉴라미니다제1(예를 들어, UniProtKB-Q99519), 인간 뉴라미니다제2(예를 들어, UniProtKB-Q9Y3R4), 인간 뉴라미니다제 3(예를 들어, UniProtKB-Q9UQ49) 및 인간 뉴라미니다제 4(UniProtKB-Q8WWR8)에서 선택된다. 시알리다제는 상기 야생형 시알리다제 중 임의의 것의 유도체, 예컨대 절단된 유도체, 상응하는 야생형 시알리다제보다 많은 아미노산을 포함하는 유도체, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 유도체(예를 들어, 하나 이상의 보존적 치환, 하나 이상의 비보존적 치환, 비천연 아미노산으로 천연 아미노산의 치환 등) 등일 수 있음이 이해될 것이다. 유도체는 부모 야생형 시알리다제의 글리코시드 가수 분해 효소 활성의 적어도 일부를 보유한다.

**표 5**

[0048]

예시 시알리다제의 아미노산 서열

퀴터푸스균 시알리다제 (서열식별번호: 3)	TVEKSVVFKAEGEHTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFIDTAAARSTDGDKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMDPTCIVANIQQGRETILVMVGKWNNDKTWGAYRDKAPDWDVLVLYKSTDDGVTFSKVETNIHDIIVTKNGTISAMLGGVSGSLQLNDGKLVFPVQMVRTKNIITVLNTSFIYSTDGITSLSPSGYCEGFGSENNIIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAHSSAQNKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLRHLPIKSYN
콜레라균 시알리다제 (서열식별번호: 4)	ALFDYNATGDTFDSAPAKQGWMDNTNNGSGVLTNADGMPAWLVQIGGRAQWYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGMITNYANGTQRVLPISLDSSGNLVVEFEGQTGRVTLATGTAATEYHKFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGAAYRDIKFEIQGDVIFRGPDRIPSIVASSVTPGVVTAFAEKRVGGGDPGALSNTNDIITRTSRDGGITWDELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSSTNLVSVYARWPTDAAQNGDRKIPWMPNGIFYSVYDVASGNWQAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTSLNSQQDWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGSRKYVVTLSIDESGGLVANLNGVSAPIILQSEHAKVHSFHDYELQYSALNHTTLFVDGQQITTWAGEVVSQENNIQFGNADAQIDGRLHVQKIVLTQQGHNLVEFDAFYLAQQTPEVEKDLEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNPGPGHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSIYSDDGGSNWQTGSTLPIPRFWKSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDFNQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITWSLLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGSHFLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTWKGPVQLVNGASAYSIDIYQLDSENAIIVIVETDNSNMRILRMPITLLKQKLTLSQN

[0049]

일부 구현예에 있어서, 표적 세포 표면 편집 효소는 표적 세포의 표면상의 리간드를 편집(예를 들어, 전부 또는 일부를 절단)한다. 일부 구현예에서, 리간드는 면역 수용체의 리간드이다. 관심 대상의 면역 수용체 리간드는, 비제한적으로, 면역 억제성 수용체의 리간드를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 면역 억제성 수용체의 리간드를 절단하되, 상기 면역 억제성 수용체는 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구에서 선택되는 세포 상에 존재한다. 예로서, 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 편집된 표적 세포의 표면상의 리간드는 시알산 결합 Ig-유사 렉틴(Siglec) 수용체, 예를 들면, Siglec 7, Siglec 9 및/또는 기타 등등에 대한 리간드일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 이러한 리간드는 시알로글리 칸이다.

[0050]

일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 영향을 받는 표적 세포의 표면상의 분자의 구조적 변화는 분자의 산화이다.

[0051]

일부 구현예에서, 표적 세포 표면 편집 효소에 의해 영향을 받는 표적 세포의 표면상의 분자의 구조적 변화는 분자의 환원이다.

[0052]

일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 분자에 모이어티를 첨가함으로써 표적 세포의 표면상의 분자의 구조적 변화를 초래한다. 예를 들어, 표적 세포 표면 편집 효소는 작용기를 공여 분자에서 분자에 전달하는 트랜스퍼라제일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 표적 세포의 표면상의 분자에 인산기를 첨가하는 키나아제이다.

[0053]

일부 구현예에 있어서, 표적 세포 표면 편집 효소는 분자로부터 모이어티를 제거함으로써 표적 세포의 표면상의 분자의 구조적 변화를 초래한다. 예를 들어, 표적 세포 표면 편집 효소는 분자에서 수용체(acceptor) 분자로 작용기를 전달하는 트랜스퍼라제일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 표적 세포의 표면상의 분자에서 인산기를 제거하는 포스파타아제이다.

[0054]

표적 세포

[0055]

표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소는 표적화될 세포에 기초하여 선택될 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 표적 세포는 암세포, 면역 세포, 내피 세포 및 상피 세포 중에서 선택된다. 관심 대상의 표적 세포에는, 비제한적으로, 특정 질병이나 상태와 관련된 세포가 포함된다. 예를 들어, 표적 세포는 정상 기능 세포(예를 들어, 정상 기능하는 면역 세포 등)일 수 있으며, 세포 표면 편집 효소는 세포의 기능(이를 요구하는 개체에게 치료차원이 되는 방식)을 조절하는데, 예를 들어, 개체의 질병을 치료하는데 유익한 세포의 기능을 증진시킨다.

[0056]

다른 양태에서, 표적 세포는 정상 세포가 아니다. 관심 대상의 비정상적인 표적 세포에는, 비제한적으로, 암세포가 포함된다. "암 세포"는 비정상적인 세포 성장, 비정상적인 세포 증식, 밀도 의존적인 성장 억제의 손실, 고정-독립 성장 잠재력, 면역 손상된 비인간 동물 모델에서의 종양 성장 및/또는 발달의 촉진 능력 및/또는 세포 형질 전환의 임의의 적절한 지표로 특징지어질 수 있는 신생물성 세포 표현형을 나타내는 세포를 의미한다. "암 세포"는 본원에서 "종양 세포", "악성 세포" 또는 "암 세포"와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 고형 종양, 반고형 종양, 원발 종양, 전이성 종양 등의 암 세포를 아우른다. 일부 양태에서, 암세포는 암종 세포이다. 일부 구현예에 있어서, 암세포는 유방암 세포, 난소암 세포, 위암 세포, 결장암 세포 및 상기 표 1 및 표 2에

기재된 암 유형 중 임의의 암 세포 중에서 선택된다.

- [0057] 일부 양태에서, 표적 세포가 암 세포인 경우, 표적화 모이어티가 결합하는 암세포의 표면상의 분자는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자이다. "종양 관련 세포 표면 분자"는 정상 조직의 세포에서는 발현이 제한적이고 악성 세포에서는 발현되는 세포 표면 분자, 악성 대 정상 세포에서 훨씬 더 높은 밀도로 발현되는 세포 표면 분자 또는 발달적으로 발현되는 세포 표면 분자이다.
- [0058] 표적 세포가 암 세포인 경우, 암세포는 표적화 모이어티가 결합하는 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자를 발현할 수 있다. 일부 양태에서, 이러한 세포 표면 분자는 HER2, CD19, CD22, CD30, CD33, CD56, CD66/CEACAM5, CD70, CD74, CD79b, CD138, 네틴-4, 메소텔린, 막 분리 당 단백질NMB(GPNMB), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), SLC44A4, CA6, CA-IX, 인테그린, C-X-C 케모킨 수용체 유형 4(CXCR4), 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4 (CTLA-4), 뉴로필린-1(NRP1), 매트립타제, 상기 표 1, 표 2 및 표 3에 기재된 임의의 세포 표면 분자 및, 관심대상의 임의의 기타 종양-관련 또는 종양-특이적 세포 표면 분자에서 선택된다.
- [0059] 접합체 생성 방법
- [0060] 본 발명의 접합체를 제조하는 방법이 또한 제공된다.
- [0061] 표적화 모이어티 및/또는 표적 세포 표면 편집 효소를 생산하고자 하는 경우(예를 들어, 특정 표적화 모이어티 및/또는 표적 세포 표면 편집 효소가 상업적으로 이용 가능하지 않기 때문에), 상기 방법은 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소 중 하나 또는 전부를 포함할 수 있다.
- [0062] 원하는 접합체의 성분(즉, 표적화 모이어티 또는 표적 세포 표면 편집 효소)이 펩티드 또는 폴리펩티드인 경우, 제조합 방법을 사용하여 상기 성분을 제조할 수 있다. 예를 들어, 원하는 접합체의 성분을 인코딩하는 DNA를 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 상기 성분을 인코딩하는 DNA는 상기 성분의 발현을 보장하는 발현 벡터 내의 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 조절 서열에는, 비제한적으로, 프로모터(예, 자연적으로 연관된 또는 이중 프로모터), 신호 서열, 인핸서 요소 및 전사 종결 서열이 포함된다. 발현 조절 서열은 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 형질 전환 또는 형질 감염시킬 수 있는 벡터에서의 프로모터 시스템일 수 있다. 일단 벡터가 적절한 숙주에 혼입되면, 상기 숙주는 뉴클레오타이드 서열의 고수준 발현 및 성분의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에 유지된다.
- [0063] 원하는 접합체의 성분(즉, 표적화 모이어티 또는 표적 세포 표면 편집 효소)이 펩티드 또는 폴리펩티드인 경우, 성분은 화학적 펩티드 합성 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 상기 합성은 액상 또는 고상을 통해 진행될 수 있다. 서열의 C-말단 아미노산이 불용성 지지체에 부착된 후 서열 내의 잔류 아미노산이 순차적으로 첨가된 고체상 폴리 펩티드 합성(SPPS)은 원하는 접합체의 성분의 화학적 합성을 위한 적합한 방법의 예이다. 원하는 접합체의 성분. Fmoc 및 Boc과 같은 다양한 형태의 SPPS를 사용하여 구성 요소를 합성할 수 있다. 간단히 말해, 작은 불용성의 다공성 비드는 펩티드 사슬이 만들어지는 기능적 단위로 처리될 수 있다. 결합/탈보호의 사이클을 반복한 후, 부착된 고체상의 유리 N-말단 아민이 단일 N-보호 아미노산 단위에 커플 링된다. 이어서, 이 유닛은 탈보호되어, 추가 아미노산이 부착될 수 있는 새로운 N-말단 아민이 방출된다. 펩티드는 고체상에 고정된 채로 유지되고, 절단되기 전에 여과 과정을 거친다.
- [0064] (화학적으로 또는 제조합적으로) 합성되면, 상기 성분은 황산 암모늄 침전, 친화도 칼럼, 칼럼 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 정제, 겔 전기영동 등을 포함하는 당 업계의 표준 절차에 따라 정제 될 수 있다.
- [0065] 일단 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소가 수득되면, 다양한 접합 전략이 이용 가능하고, 특정 방법은 표적화 모이어티의 성질/유형 및 목적하는 접합체 내의 표적 세포 표면 편집 효소에 기초하여 선택될 수 있다(예를 들어, 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소에서 이용 가능한 또는 제공되는 반응성 작용기에 기초하여). 본 개시의 접합체를 생성하기 위해 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소를 안정하게 연관 시키는데 사용되는 생물접합(Bioconjugation) 전략은 Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 2nd edition, 2008년 4월 1일, Haugland, 1995, Methods Mol. Biol. 45:205-21; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chemistry 3:2 및 다른 곳에 기술된 것을 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에 있어서, 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소는 서로 직접적으로 접합되어 있다- 즉, 접합체의 성분들이 링커를 사용하지 않고 서로 접합된다. 다른 양태에서, 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소는 링커를 통해 서로 접합된다. 임의의 적합한 링커(들)이 사용될 수 있다. 본 발명의 접합체에 사용되는 링커에는 에스테르 링커, 아미드 링커, 말레이미드 또는 말레이미드계 링커; 발린-시트룰린 링커; 히드라

존 링커; N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB) 링커; 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트(SMCC) 링커; 비닐술포계 링커; 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어 비제한적으로, 테트라에틸렌 글리콜을 포함하는 링커; 프로판산을 포함하는 링커; 카프롤산(caproic acid)을 포함하는 링커 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 링커가 포함된다. 일부 양태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 펩티드 링커이다. 펩티드 링커는 가요성이거나 단단할 수 있다. 관심 대상인 펩티드 링커에는 비제한적으로, Chen et al. (2013) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(10):1357-1369에 기술된 것들이 포함된다. 일부 양태에서, 링커가 펩티드 링커인 경우, 접합체는 융합 단백질이다. 접합체가 융합 단백질인 경우, 본 발명은 이러한 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터, 및 이러한 융합 단백질, 핵산 및/또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포(예를 들어, 포유 동물 숙주 세포)를 추가로 제공한다. 일부 양태에서, 링커는 혈청에 안정적이다. 혈청에 안정적인 링커는 공지되어 있으며, 예를 들어, PEG, 술포 링커 (예를 들어, 페닐 옥사 디아졸 술포 링커(Patterson et al. (2014) *Bioconj. Chem.* 25(8):1402-7] 참조) 등을 포함하는 링커들이 포함된다.

[0067] 링커를 통해 표적화 모이어티와 표적 세포 표면 편집 효소를 연결하기 위한 수많은 전략이 이용 가능하다. 예를 들어, 접합체의 한 성분은 링커를 성분에 공유 결합시킴으로써 유도체화 될 수 있되, 상기 링커는 그 성분상의 "화학 핸들러"와 반응할 수 있는 작용기를 가지며, 상기 링커는 다른 구성 요소의 "화학 핸들러"와 반응할 수 있는 제 2 작용기를 가질 수 있다. 링커상의 작용기는 다양할 수 있으며, 원하는 접합체의 성분상의 화학 핸들러와의 상용성에 기초하여 선택될 수 있다. 접합체 성분은 이미 링커의 작용기와 반응하는데 유용한 작용기를 포함할 수 있거나, 또는 원하는 접합체의 성분들 중 하나 또는 둘 모두에 그러한 작용기가 제공될 수도 있다. 접합체의 성분을 링커에 결합시키는 데 사용될 수 있는 작용기에는, 비제한적으로, 활성 에스테르, 이소시아네이트, 이미도에스테르, 히드라지드, 아미노기, 알데히드, 케톤, 광반응성 기, 말레이미드기, 알파-할로-아세틸기, 에폭사이드, 아지르딘 등이 포함된다. 시약들, 예컨대 아이오도아세트아미드, 말레이미드, 벤질 할라이드 및 브로모메틸케톤과 같은 시약은 티올의 S-알킬화에 의해 반응하여 안정된 티오 에테르 생성물을 생성한다. 예를 들어, pH 6.5-7.5에서, 말레이미드 작용기는 설프하이드릴기와 반응하여 안정된 티오에테르 결합을 형성한다. NBD 할라이드와 같은 아릴화 시약은 친핵체의 의한 방향족 할라이드의 유사 치환에 의해 티올 또는 아민과 반응한다. 티올 레이트 음이온이 중성 티올보다 더 나은 친핵체이기 때문에, 시스테인이 그것의 pKa(단백질 구조 문맥에 따라, 약 8.3)보다 더 높은 반응성을 보인다. 또한 티올은 이소티오시아네이트 및 숙신이미딜 에스테르를 비롯한 특정 아민 반응 시약과 반응한다. TS-Link 시약 시리즈가 가역성 티올 변형에 사용될 수 있다.

[0068] 아민 반응기와 관련하여, 1 차 아민이 폴리펩티드 사슬의 N-말단 및 라이신(Lys, K) 아미노산 잔기의 측쇄에 존재한다. 전형적인 생물학적 또는 단백질 샘플에서 이용 가능한 작용기 중에서, 1차 아민은 특히 친핵성이어서 몇몇 반응성기와의 접합을 위한 준비된 표적이 된다. 예를 들어, NHS 에스테르는 카르복실레이트 분자의 카르보디이미드-활성화에 의해 형성된 반응기이다. NHS 에스테르로 활성화된 가교결합제 및 표지 화합물은 생리학적 내지 약 알칼리성 조건(pH 7.2 내지 9)에서 1 차 아민과 반응하여 안정적인 아미드 결합을 생성한다. 상기 반응은 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 방출한다. 또한 예로서, 이미도에스테르 가교 결합제는 1차 아민과 반응하여 아미딘 결합을 형성한다. 이미도에스테르 가교 결합제는 알칼리성 pH에서 아민과 빠르게 반응하지만 짧은 반감기를 갖는다. pH가 알칼리성이 됨에 따라, 아민과의 반감기 및 반응성이 증가한다. 따라서 가교 결합은 pH 8에서보다 pH 10에서 수행될 때 보다 효율적이다. 아미딘 형성이 pH 8-10 사이에서 선호되지만 pH 10 미만의 반응 조건은 부반응을 일으킬 수 있다.

[0069] 다수의 다른 합성 화학 작용기가 1 차 아민 예컨대, 비제한적으로, 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 아실아지드, 술포닐 클로라이드, 알데히드, 글리옥살, 에폭시드, 옥시란, 카보네이트, 아릴 할라이드, 카보디이미드, 무수물 및 플루오로페닐 에스테르와 화학 결합을 형성할 것이다. 이러한 작용기는 아실화 또는 알킬화에 의해 아민에 접합된다.

[0070] 일 구현예에 있어서, 표적화 모이어티, 표적 세포 표면 편집 효소 또는 둘 다에 있는 화학 핸들러가 상기 화학 핸들러를 갖는 비천연 아미노산을 상기 성분에 혼입시킴으로써 제공된다. 비천연 아미노산은 화학적 합성 또는 제조법 접근법을 통해, 예컨대 숙주 세포에서 번역 동안 비천연 아미노산의 혼입을 위해 적절한 직교 아미노 아실 tRNA 합성 효소-tRNA 쌍을 사용하여, 혼입될 수 있다. 상기 성분에 존재하는 비천연 아미노산의 작용기는 아지드, 알킨, 알켄, 아미노-옥시, 히드라진, 알데히드, 니트론, 니트릴 옥사이드, 시클로프로펜, 노르보르넨, 이소시아나화물, 할로젠화아릴, 보론산 또는 기타 적합한 작용기일 수 있고, 링커상의 작용기가 비천연 아미노산의 작용기와 반응하도록 선택된다(또는 그 반대도 성립됨).



- [0071] 다른 양태에서, 표적화 모이어티, 표적 세포 표면 편집 효소 또는 둘 모두에 존재하는 화학 핸들러는 비천연 아미노산을 수반하지 않는 접근법을 사용하여 제공된다. 예를 들어, 비천연 아미노산(들)을 함유하지 않는 성분은, 예컨대 반응성 이탈기 또는 다른 친전자성 작용기를 갖는 링커 구조체와의 치환 반응에서 친핵체로서 상기 성분의 친핵성 작용기(예컨대, 리신의 N-말단 아민 또는 일차 아민, 또는 임의의 다른 친핵성 아미노기)를 이용함으로써 링커에 접합될 수 있다.
- [0072] 일부 양태에서, 표적 세포 표면 편집 효소가 표적화 모이어티에 자리-특이적으로 접합되거나, 표적화 모이어티가 표적 세포 표면 편집 효소에 자리-특이적으로 접합되거나, 또는 둘 모두이다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티 및/또는 표적 세포 표면 편집 효소의 미리 결정된 위치에 반응성 작용기를 갖는 비천연 아미노산을 혼입시킴으로써 자리-특이적 접합이 달성된다. 비천연 아미노산을 단백질에 자리 특이적으로 결합시키기 위한 세부 사항은 예를 들어, Young & Schultz (2010) *J. Biol. Chem.* 285:11039-11044에서 찾을 수 있다.
- [0073] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 C-말단 알데히드 태그를 가지며, 부위-특이적 결합은 C-말단 알데히드를 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)와 반응시키고, 이어서 바이시클로논인-N-히드록시 숙신이미드 에스테르(BCN-NHS)로 표지된 표적 세포 표면 편집 효소와 반응시킴으로써 달성된다. 이와 같은 예시적인 구현예는 아래의 실험 섹션에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0074] 일부 양태에서, 표적화 모이어티는 C-말단 알데히드 태그를 갖고, 자리 특이적 접합은 C-말단 알데히드를 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)와 반응시킴으로써 얻어진다. 표적 세포 표면 편집 효소 알데히드 태그 서열(SLCTPSRGS)을 가지며, 자리-특이적 접합은 알데히드 태그 시스테인을 디벤조시클로옥틴-테트라폴리에틸렌글리콜 말레이미드(DBCO-PEG4-말레이미드)와 반응시킨 후, TEG-N<sub>3</sub>으로 표지된 표적화 모이어티와 반응시킴으로써 달성된다. 이와 같은 예시적인 구현예는 아래의 실험 섹션에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0075] 따라서, 본 발명의 양태는 표적 세포의 표면상의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티에 표적 세포 표면 편집 효소를 접합하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 하나 이상의(예를 들어, 둘 이상, 셋 이상, 넷 또는 그 이상 등) 표적 세포의 표면 편집 효소가 표적화 모이어티에 접합될 수 있다. 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소는 본원에 기재된 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소 중 임의의 것일 수 있다. 하나의 예로서, 일부 구현예에서, 표적 세포 표면 편집 효소는 시알리다제(예를 들어, 본원에 기술된 시알리다제 중 임의의 것)이고 표적화 모이어티는 항체 (예를 들어, 본원에 기술된 임의의 항체, 예컨대 항-HER2 항체 (예를 들어, 트라스투자맷), 세툽시맷, 다라투 무맷, 기렌투시맷, 파니투무맷, 오파투무맷, 리툽시맷 등)이다. 상술한 바와 같이, 접합은 표적화 모이어티, 표적 세포 표면 편집 효소 또는 둘 모두와 관련하여 자리-특이적일 수 있다(예컨대, 소정 위치의 비천연 아미노산의 작용기를 통한).
- [0076] 조성물
- [0077] 또한, 본 발명의 접합체를 포함하는 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 본원에 기재된 임의의 접합체(예를 들어, 본원에 기재된 표적화 모이어티 및 표적 세포 표면 편집 효소 중 임의의 것을 갖는 접합체)를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 조성물은 액체 매질 중에 존재하는 본 발명의 접합체를 포함한다. 상기 액체 매질은 물, 완충 용액 등과 같은 수성 액체 매질 일 수 있다. 하나 이상의 첨가제, 예컨대 염 (예를 들어, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>), 완충제(트리스 완충액, N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술포산) (HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄 술포산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄 술포산 나트륨 염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술포산(MOPS), N-트리스[히드록시메틸]메틸-3-아미노프로판술포산(TAPS) 등), 용해제, 세정제 (Tween-20 등의 비이온계 세제), 리보뉴클레아제 억제제, 글리세롤, 킬레이트제 등이 이러한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0078] 약제학적 조성물도 제공된다. 약제학적 조성물은 본 발명의 접합체 중 임의의 것 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 약제학적 조성물은 일반적으로 치료 차원의 유효량의 접합체를 포함한다. "치료 차원의 유효량"은 대조군과 비교하여, 원하는 결과를 생성하기에 충분한 투여량, 예를 들어 표적 세포 또는 그것의 군집과 관련된 질병 또는 장애의 징후의 감소와 같은 유익한 또는 원하는 치료적(또한 예방적) 결과를 초래하기에 충분한 양을 의미한다. 유효량은 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 접합체는 치료적 투여를 위한 다양한 제형에 혼입될 수 있다. 보다 구체적으로, 접합체는 적절한 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 희석제와 조합하여 약제학적 조성물로 제제화될 수 있고, 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태의 제제, 예컨대 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 연고, 용액, 주사제, 흡입제 및 에어로졸로 제형화될 수 있다.

- [0080] 환자에게 투여하기에 적합한 (예를 들어, 인간 투여에 적합한) 본 개시의 접합체의 제형은 일반적으로 무균이며, 추가로 선택된 투여 경로에 따라 환자에게 투여하기에 금기시되는 검출 가능한 발열원 또는 다른 오염물이 존재하지 않을 것이다.
- [0081] 약제학적 투여 형태에서, 접합체는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여되거나, 또는 단독으로 또는 기타 약제학적으로 활성인 화합물, 예를 들어, 항암제 (예컨대 비제한적으로, 소분자 항암제), 면역 체크 포인트 억제제 및 이들의 임의의 조합물과 적절히 연합하거나 조합하여 사용될 수 있다. 하기 방법 및 담체/부형제는 단지 예일뿐이며 결코 제한적인 것은 아니다.
- [0082] 경구 제제의 경우, 접합체는 단독으로 또는 적절한 첨가제와의 조합으로 사용되어 예를 들어 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 통상의 첨가제로; 결정질 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제로; 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨 카르복시 메틸셀룰로오스와 같은 붕괴제로; 활석 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제로; 그리고 원한다면 희석제, 완충제, 습윤제, 방부제 및 향료로 정제, 분말, 과립 또는 캡슐을 제조할 수 있다.
- [0083] 접합체는 비경구(예컨대, 정맥내, 동맥내, 근육내, 근육내, 뇌내, 뇌 실내, 척수강내, 피하 등) 투여를 위해 제형화될 수 있다. 일부 양태에서, 접합체는 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 또는 기타 유사한 오일, 합성 지방산 글리세라이드, 고급 지방산 또는 프로필렌 글리콜의 에스테르에서 상기 접합체를 용해, 현탁 또는 유화 시킴으로써; 그리고 원한다면 통상적인 첨가제, 예컨대 용해화제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 방부제를 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0084] 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 원하는 순도를 갖는 접합체를 임의의 생리 학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 안정화제, 계면 활성제, 완충제 및/또는 긴장성 제제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 허용 가능한 담체, 부형제 및/또는 안정제는 사용된 용량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이며, 완충제, 예컨대 인산염, 시트르산 및 기타 유기산; 항산화제, 예컨대 아스코르빈산, 글루타티온, 시스테인, 메티오닌 및 시트르산; 방부제 (예를 들어, 에탄올, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로로-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드 또는 이들의 조합); 아미노산, 예컨대 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 라이신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린 및 이들의 조합; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 젤라틴 또는 혈청 알부민; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 트레할로스, 수크로오스, 락토오스, 글루코오스, 만노오스, 말토오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 소르보스, 라피노스, 글루코사민, N-메틸글루코사민, 갈락토사민 및 뉴라민산; 및/또는 비이온성 계면 활성제, 예컨대 Tween, Brij Pluronic, Triton-X 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.
- [0085] 약제학적 조성물은 액체 형태, 동결건조 형태 또는 동결 건조된 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있되, 상기 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액으로 재구성된다. 동결건조된 조성물을 재구성하기 위한 표준 절차는 일정량의 순수한 물(전형적으로 동결 건조 중에 제거된 부피와 동등함)을 첨가하되; 항균제를 포함하는 용액은 비경구 투여용 약제학적 조성물의 제조에 사용될 수 있다.
- [0086] 접합체의 수성 제제는 pH 완충 용액, 예를 들어 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0, 또는 약 5.5의 pH 범위에서 제조될 수 있다. 이 범위 내의 pH에 적합한 완충액의 예에는 인산염-, 히스티딘-, 시트레이트-, 숙신산염-, 아세테이트 완충액 및 기타 유기산 완충액을 포함한다. 완충액 농도는 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM 일 수 있는데, 예를 들어 완충액에 따라 그리고 제형의 원하는 긴장도에 따라 달라질 수 있다.
- [0087] 긴장성 제제(tonicity agent)가 제형에 포함되어 제형의 긴장도를 조절할 수 있다. 예시적인 긴장성 제제에는 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린 및, 아미노산, 당류 및 이들의 조합의 군에서 유래된 임의의 성분이 포함된다. 일부 구현예에서, 수성 제형은, 고장성 (hypertonic) 또는 저삼투압(hypotonic) 용액이 적합할 수 있지만, 등장성이다. "등장 성(isotonic)"이란 용어는 생리 식염수 또는 혈청과 같이 비교되는 다른 용액과 동일한 긴장성을 갖는 용액을 의미한다. 긴장성 제제는 약 5 mM 내지 약 350 mM, 예를 들어 100 mM 내지 350 mM의 양으로 사용될 수 있다.
- [0088] 계면 활성제는 또한 응집을 감소시키고 및/또는 제형에서 미립자의 형성을 최소화하고 및/또는 흡착을 감소시키기 위해 제형에 첨가될 수 있다. 예시적인 계면 활성제에는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(Tween), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르(Triton-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시 프로

필렌 공중 합체(Poloxamer, Pluronic) 및 소듐 도데실 설페이트(SDS)가 포함된다. 적합한 폴리옥시에틸렌 소르비탄-지방산 에스테르의 예는 폴리소르베이트 20(Tween 20<sup>TM</sup> 상표로 판매 중) 및 폴리소르베이트 80(Tween 80<sup>TM</sup> 상표로 판매 중)이다. 적합한 폴리옥시에틸렌-폴리 프로필렌 공중합체의 예는 Pluronic®F68 또는 Poloxamer 188<sup>TM</sup>이라는 이름으로 판매되는 것들이다. 적합한 폴리옥시에틸렌 알킬에테르의 예는 Brij<sup>TM</sup>이라는 상표로 시판되는 것이다. 예시적인 계면 활성제 농도는 약 0.001% 내지 약 1% w/v 범위일 수 있다.

[0089] 동결건조 공정동안 불안정화 조건으로부터 접합체를 보호하기 위해 동결건조보호제 (lyoprotectant)가 첨가될 수도 있다. 예를 들어, 공지된 항균제는 당(포도당 및 수크로오스 포함); 폴리올(만니톨, 소르비톨 및 글리세롤 포함); 및 아미노산(알라닌, 글리신 및 글루탐산 포함)을 포함한다. 항균제는 약 10 mM 내지 500 mM의 양으로 포함될 수 있다.

[0090] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 접합체 및 하나 이상의 상기 확인된 제제(예를 들어, 계면 활성제, 완충제, 안정제, 긴장성 제제)를 포함하고, 본질적으로 하나 이상의 방부제, 예컨대 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, p-클로로-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 및 이들의 조합물이 없다. 다른 구현예에서, 방부제는 제형에, 예를 들어 약 0.001 내지 약 2% (w / v)의 농도로 포함된다.

[0091] 방법

[0092] 상기 요약된 바와 같이, 본 발명의 접합체의 사용 방법 또한 제공된다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 임의의 것을 치료차원의 유효량으로 그것을 요구하는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0093] 일부 양태에서, 투여는 개체의 면역 경로를 조절한다. 예를 들어, 투여는 면역 억제성 수용체 경로, 보체 경로, 쌍을 이루는 면역 글로불린 유사 타입 2 수용체(PILR) 경로 및 자연 살해 2군, 구성원 D 단백질(NKG2D) 경로로부터 선택된 면역 경로를 조절할 수 있다. 일부 양태에서, 표적 세포는 그것의 표면 상에 리간드를 포함하고, 투여는 표적 세포 표면 편집 효소에 의한 리간드의 편집을 초래한다. 리간드는 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 방식으로 편집될 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 리간드의 편집은 리간드의 전부 또는 일부의 절단을 포함한다. 단지 하나의 예로서, 리간드는 시알로글리칸일 수 있고, 표적 세포 표면 편집 효소는 시알리다제일 수 있으며, 편집은 시알로글리칸의 말단 시알산 잔기의 절단을 포함할 수 있다. 접합체의 시알리다제는 박테리아 시알리다제, 포유류 뉴라미니다제 등일 수 있다. 상기 접합체의 시알리다제가 포유류 뉴라미니다제인 경우, 포유류 뉴라미니다제는 인간 뉴라미니다제, 예를 들어, 인간 뉴라미니다제 1, 인간 뉴라미니다제 2, 인간 뉴라미니다제 3 및 인간 뉴라미니다제 4에서 선택된 인간 뉴라미니다제일 수 있다.

[0094] 투여가 표적 세포 표면 편집 효소에 의한 표적 세포상의 리간드의 편집을 초래할 때, 리간드는 면역 억제성 수용체의 리간드일 수 있다. 일부 양태에서, 리간드는 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단구, 호중구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로 이루어진 군에서 선택된 면역 세포 상에 존재하는 면역 억제성 수용체의 리간드이다. 일부 구현예에서, 면역 억제성 수용체는 시알산 결합 Ig-유사 렉틴(Siglec) 수용체이다.

[0095] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 예를 들어, 암을 치료하기 위해 암을 가진 개체에게 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 암은, 비제한적으로, 상기 표 1 및 표 2에 기재된 임의의 암을 포함한다. 상기 접합체는 상기 개체의 암세포의 표면 상에서 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양-특이적 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티(예를 들어, 상기 표 1, 표 2 및 표 3에 기재된 임의의 항체와 같은 치료용 항체)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 암세포는 암종 세포이다. 일부 구현예에서, 암세포는 유방암 세포, 난소 암 세포, 위암 세포, 결장암 세포 및 상기 표 1 및 표 2에 기재된 암 유형 중 임의의 암 세포 중에서 선택된다. 일부 양태에서, 세포 표면 분자는 인간 상피 성장 인자 수용체 2(HER2)이다. 세포 표면 분자가 HER2 인 경우, 표적화는 예를 들어 항 HER2 항체(예를 들어, 트라스투자맷 또는 다른 적절한 항 HER2 항체)일 수 있다.

[0096] 일부 구현예에서, 투여는 본 개체의 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 접합체는 항체인 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 이를 요구 하는 개체가 암을 가지고, 상기 접합체의 표적화 모이어티가 표 1에 기재된 항체이고, 상기 방법이 표 1에 기재된 바와 같은 항체에 상응하는 동일한 또는 상이한 유형의 암을 치료(예를 들어, 향상된 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)에 의해)하기 위한 것이다.

[0097] 일부 양태에서, 투여는 본원의 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 접합체는 항체인 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 이를 요구하는 개체가 암을 가지고, 상기 접합체의 표적화 모이어

티가 표 2에 기재된 항체이고, 상기 방법이 표 2에 기재된 항체에 상응하는 동일한 또는 상이한 유형의 암을 치료(예를 들어, 향상된 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)에 의해)하기 위한 것이다.

[0098] 일부 구현예에서, 투여는 본원의 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 접합체는 항체인 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 이것을 요구하는 개체가 암을 가지고, 상기 접합체의 표적화 모이어티가 표 3에 기재된 항체이고, 상기 방법이 암을 치료(예를 들어, 향상된 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)에 의해)하기 위한 것이다.

[0099] 일부 양태에서, 투여는 본 발명의 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 접합체는 트라스투자맷, 세톡시맷, 다라투무맷, 기렌톡시맷, 파니투무맷, 오파투무맷 및 리톡시맷에서 선택되는 항체인 표적화 모이어티를 포함한다.

[0100] 본 발명의 접합체는 *생체 내* 및 *생체 외* 방법뿐만 아니라 전신 및 국소 투여 경로를 비롯한 약물 전달에 적합한 임의의 이용 가능한 방법 및 경로를 사용하여 개체에 투여된다. 종래 및 약제학적으로 허용되는 투여 경로에는 비강 내, 근육 내, 기관 내, 피하, 피내, 국소 투여, 안구, 정맥 내, 동맥 내, 비강, 구강, 및 투여의 다른 장 내 및 비경구 경로가 포함된다. 접 투여 경로는 합체 및/또는 원하는 효과에 따라, 원하는 경우 조합하거나 조절할 수 있다. 접합체는 단일 투여량 또는 다중 투여량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체는 경구 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 흡입 경로를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 비강 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 국소 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 안구 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 두개 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 정맥 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체는 예를 들어 전신 전달(예를 들어, 정맥 내 주입)을 위해 또는 국소 자리에 주사에 의해 투여된다.

[0101] 주제 방법에 따라 여러 개체가 치료될 수 있다. 일반적으로 이러한 개체는 포유 동물의 범주에 속하는 유기체를 설명하기 위해 광범위하게 사용되는 "포유 동물"로, 예컨대 육식 동물 (예를 들어, 개와 고양이), 설치류 (예를 들어, 생쥐, 기니아 피그 및 래트) 및 영장류 (예를 들어, 인간, 침팬지 및 원숭이)이다. 일부 구현예에서, 개체는 사람이다.

[0102] "치료하다" 또는 "치료"는 개체를 괴롭히는 병리학적 상태와 관련된 증상의 적어도 개선을 의미하되, 개선은 광범위하게 사용되어 매개 변수의 크기, 예를 들어, (상기 표적 세포의 표면의 편집이 유리한 경우) 표적 세포 또는 이것의 군집과 관련된 (또는 이것에 의해 유발되는) 질병 또는 장애와 같이, 치료될 병리학적 상태와 관련된 증상의 감소를 가리킨다. 이와 같이, 치료는 또한 병리학적 상태 또는 적어도 이와 관련된 증상이 완전히 억제되거나, 예로 일어나는 것이 방지되거나, 중지되거나 예로 종결되어, 개체가 더 이상 병리학적 상태 또는 적어도 상기 병태를 특징짓는 증상으로 고생하지 않는 상황을 포함한다.

[0103] 투약은 치료할 질병 상태의 심각성과 반응성에 달려 있다. 최적의 투약 일정은 개체의 몸에서 접합체 축적의 측정으로부터 계산할 수 있다. 관리 의사는 최적의 투약량, 투약 방법 및 반복률을 결정할 수 있다. 최적 투약량은 접합체의 상대적인 효능에 따라 달라질 수 있으며, *시험 관내* 및 *생체 내* 동물 모델 등에 효과적인 것으로 밝혀진 EC<sub>50</sub>에 기초하여 일반적으로 추정될 수 있다. 일반적으로 투약량은 체중kg 당 0.01 µg 내지 100g이고, 일일, 주간, 월간 또는 연간으로 1 회 이상 제공될 수 있다. 치료 의사는 측정된 체류시간 및 체액 또는 조직에서의 약물 농도에 근거한 투약 반복률을 예측할 수 있다. 성공적인 치료 후에, 질병 상태의 재발을 방지하기 위해 환자에게 유지 요법을 실시하게하는 것이 바람직 할 수 있는데, 상기 접합체는 유지 용량으로 일일 1 회 이상 내지 몇 달에 한번씩, 6 개월마다, 매년 1 회, 또는 기타의 다른 적절한 빈도로 투여된다.

[0104] 본 발명의 치료 방법은 개체에 단일 유형의 접합체를 투여하는 단계를 포함하거나, 또는 개체에 2 종 이상의 접합체(예를 들어, 상이한 접합체의 콕테일)를 투여하는 단계를 포함할 수 있되, 2 종 이상의 접합체는 동일한 유형 또는 상이한 유형의 표적 세포의 표면을 편집하도록 설계될 수 있다.

[0105] 일부 양태에서, 본 발명의 접합체는 병용 요법의 일부로서 제 2의 치료제와 조합하여 개체에게 투여된다. 이러한 투여는 접합체 및 제 2 제제를 동시에 투여하거나 또는 접합체 및 제 2제제를 순차적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 개체는 암을 가지고 있고, 제 2 치료제는 항암제이다. 관심 대상인 항암제에는, 비제한적으로, 항암 항체 (예를 들어, 상기 표 1, 2 및 3에 기재된 항체 중 임의의 것), 소분자 항암제 등이 포함된다.

[0106] 일부 구현예에서, 제 2 치료제는 소분자 항암제로 하기에서 선택된다: 아비라테론, 벤다무스틴, 백사로텐, 보르테조밋, 클로파라빈, 데시타빈, 엑세메스탄, 테모졸로미드, 아파티닙, 악시티닙, 보수티닙, 카보잔티닙, 크리조티닙, 다브라페닙, 다사티닙, 에를로티닙, 게피티닙, 이브루티닙, 이마티닙, 라파티닙, 닐로티닙, 파조파닙, 포



나티닙, 레고라페닙, 톱소리티닙, 소라페닙, 수니티닙, 반데타닙, 베무라페닙, 엔잘루타미드, 폴베스트란트, 에피루비신, 익사베필론, 델라라빈, 비스모데깁, 카바지탁셀, 페메트렉세드, 아자시티딘, 카르필조밋, 에베롤리무스, 템시플리무스, 에리블린, 오마세탁신, 트라메티닙, 레나리도미드, 포마리도미드, 로미렘신, 보리노스탁, 브리가티닙, 리보시클립, 미도스타우린, 텔로스리스탁 에틸, 니라파립, 카보잔티닙, 렌바티닙, 루카파립, 그라니세트론, 드로나비놀, 베네토클락스, 알렉티닙, 콤비멘티닙, 파노비노스탁, 팔보시클립, 탈리모겐, 라헤르파렘백, 렌바티닙, 트리플루리딘 및 티피라실, 익사조닙, 소니데깁, 오시메르티닙, 롤라피탄트, 우리딘 트리아 세테이트, 트라벡테딘, 네퓨미탄트 및 팔로노세트론, 베리노스탁, 이브루티닙, 올라파립, 이데알리십 및 세르티닙.

[0107] 일부 양태에서, 제 2 치료제는 면역 체크 포인트 억제제이다. 관심 대상의 면역 체크 포인트 억제제에는 비제한적으로, PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM3, LAG3 또는 B7 계열 구성원을 표적으로하는 억제제(예를 들어, 항체)가 포함된다.

[0108] 일부 구현예에서, 접합체 및 제 2 치료제는 개별 용도로 승인된 투여 요법에 따라 투여된다. 일부 구현예에서, 접합체가 제 2 치료제의 투여없이 투여될 때 이용되는 것과 비교하여, 제 2 치료제의 투여는 개체에 투여된 접합체가 1 회 이상의 낮은 및/또는 적은 빈도의 투여량 및/또는 더 적은 수의 주기를 수반하는 투약 요법에 따라 투여되도록 한다. 일부 양태에서, 제 2 치료제가 접합체의 투여없이 투여될 때 이용되는 것과 비교하여, 접합체의 투여는 개체에 투여된 제 2 치료제가 1 회 이상의 낮은 및/또는 적은 빈도의 투여량 및/또는 더 적은 수의 주기를 수반하는 투약 요법에 따라 투여되도록 한다.

[0109] 일부 양태에서, 병용 투여되는 약제에 대한 바람직한 상대 투여 요법은 예를 들어 *생체 외*, *생체 내* 및/또는 *시험 관내* 모델을 사용하여 경험적으로 평가 또는 결정될 수 있고; 일부 구현예에서, 그러한 평가 또는 실험적 결정은 환자 군집(예를 들어, 상관 관계가 확립되도록)에서, 또는 다르게는 관심 대상의 특정 개체에서 *생체 내* 로 이루어진다.

[0110] 일부 양태에서, 접합체 및 제 2 치료제의 1 회 이상의 투여는 개체에 동시에 투여되고; 이러한 일부 구현예에서, 그러한 제제는 동일한 약제학적 조성물에 존재하여 투여될 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서, 접합체 및 제 2 치료제는 상이한 조성 및/또는 상이한시간에 개체에게 투여된다. 예를 들어, 접합체가 제 2 치료제의 투여 전에(예를 들어, 특정 주기로) 투여될 수 있다. 다르게는, 제 2 치료제가 접합체의 투여 전에(예를 들어, 특정 주기로) 투여될 수 있다. 투여될 제 2 약제는 투여될 제 1 약제의 투여 후 적어도 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 또는 5일 또는 그 이상에 시작되는 주기로 투여될 수 있다.

[0111] 키트

[0112] 상기 요약된 바와 같이, 본 발명은 키트를 제공한다. 일부 구현예에 있어서, 키트는 본 발명의 접합체 또는 조성물 중 임의의 것을 포함한다. 키트는 예를 들어, 본 발명의 방법을 실시하는데 사용된다. 예를 들어, 본 방법을 실시하기 위한 키트는 단위 투여량으로 존재하는 본 발명의 조성물의 양, 예를 들어 앰플 또는 다중 투여형을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 키트는 본원의 접합체를 포함하는 조성물의 하나 이상의 (예를 들어, 2 개 이상의) 단위 투여량(예를 들어, 앰플)을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "단위 투여 형태"는 인간 및 동물 대상체를 위한 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각 단위는 목적하는 효과를 내기에 충분한 양으로 계산된 본 개시의 화. 합물의 소정량을 함유한다. 단위 투여량의 양은 다양한 인자, 예컨대 사용된 특정 접합체, 달성될 효과 및, 대상체 내에서 접합체와 관련된 약력학에 의존한다. 또 다른 구현예에서, 키트는 단일 다중 투여량의 조성물을 포함할 수 있다.

[0113] 키트의 구성 요소는 별도의 용기에 있거나, 다중 성분이 단일 용기에 존재할 수도 있다. 적합한 용기에는 단일 튜브(예를 들어, 바이알), 플레이트의 하나 이상의 웰(예를 들어, 96-웰 플레이트, 384-웰 플레이트 등) 등이 포함된다.

[0114] 일부 구현예에 있어서, 본 발명의 키트는 이를 요구하는 개체를 치료하기 위해 조성물 사용을 위한 지침서를 포함한다. 설명서는 적절한 기록 매체에 기록될 수 있다. 예를 들어, 설명서는 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기재 상에 인쇄될 수 있다. 따라서, 설명서는 포장 삽입물로서 키트의 용기 내에, 또는 키트 또는 그것의 성분의 용기의 표지에(즉, 포장 또는 하위 포장과 연관됨) 존재할 수 있다. 다른 구현예에서, 설명서는 적절한 컴퓨터 판독 가능 저장 매체, 예를 들어 휴대용 플래시 드라이브, DVD, CD-ROM, 디스켓 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 제공된다. 또 다른 구현예에서, 실제 설명서가 키트에 존재하지 않고, 예를 들어 인터넷을 통해 원격 공급원으로부터 설명서를 얻는 수단이 제공된다. 이와 같은 구현예의 일례는 설명서가 보여질 수 있거나 설

명서가 다운로드될 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 상기 설명서와 함께, 상기 설명서를 획득하기 위한 수단이 적절한 기관에 기록된다.

[0115] 하기의 실시예는 예시로서 제공되는 것이지 한정하기 위한 것은 아니다.

[0116] 실험

[0117] 재료 및 방법

[0118] PBS 완충액, DPBS 완충액, DMEM, RPMI-1640 배지 및 열-불활성화된 태아 소 혈청을 Corning-Mediatech로부터 취득하였다. X-VIVO 15 무혈청 배지는 Lonza로부터 구입하였다. LB 한천, 2xYT 및 항생제-항균제는 Fisher Scientific으로부터 구입하였고, SDS-PAGE를 위한 4-12% 비스-트리스 겔은 Bio-Rad에서 구입하였다. 열에 의해 불활성화된 남성 AB 혈청은 Sigma-Aldrich에서 구입했다. 인간 재조합 IL-2, 인간 재조합 IL-4 및 인간 재조합 IL-13은 Biolegend로부터 구입하였다. 알데히드 태그를 갖는 인간화된 항-Her2-IgG는 Catalent Pharma Solutions(Emeryville, CA)로부터의 선물이었다. 흡광도 스펙트럼은 SpectraMax i3x (Molecular Devices)로 측정 하였다. Pierce 대용량 내 독소 제거 스핀 칼럼, Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit 및 LDH 세포 독성 분석 키트는 Thermo Fisher Scientific에서 구입했다. 바이시클로노닌-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (BCN-NHS)와 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)는 Berry & Associates, Inc.에서 구입했다. 디벤조시클로옥탄-테트라폴리에틸렌글리콜-말레이미드(DBCO-PEG4-말레이미드)는 Click Chemistry Tools에서 구입하였다. Biosynth International Inc.로부터 2'-(4-메틸움벨리페틸)-α-D-N-아세틸뉴라민산 (MuNeuNAc)을 얻었다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 추가 정제없이 사용하였다.

[0119] 하기 항체 및 재조합 단백질을 사용하였다: Siglec-7-Fc 키메라, Siglec-9-Fc 키메라, NKG2D-Fc 키메라 단백질, AF488 표지된 항-Siglec-7 mAb(클론 194211) 및 차단하는 항-NGK2D mAb(클론 149810)은 R&D Systems로부터 구입하였다. 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-표지 *Sambucus nigra* (SNA) 렉틴은 EY Laboratories에서 입수했다. AF647-표지 항-Her2 mAb (클론 24D2), AF647-표지 항-CD16 mAb (클론 3G8), AF647-표지 항-CD56 mAb (클론 HCD56), 차단 항-Siglec-7 mAb (클론 S7.7), 차단 항-Siglec-9 mAb(클론 K8)를 Biolegend로부터 취득하였다. TRITC-표지된 항-Fc mAb는 Jackson ImmunoResearch로부터 구입하였다. FITC-표지 항-CD3 mAb (클론 BW264/56)는 Miltenyi Biotec으로부터 구입하였다. C-말단 알데히드-태그를 갖는 인간화된 항-Her2-IgG는 Catalent Pharma Solutions (Emeryville, CA)로부터의 선물이었다.

[0120] 세포주 및 세포 배양

[0121] 유방암 세포 SKBR3, HCC-1954, MDA-MB-453, ZR-75-1, BT-20, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 입수하였다. SKBR3, HCC-1954, ZR-75-1 및 MDA-MB-468을 10% 열로 불활성화된 태아 소 혈청, 0.4% 항생제-항균제 및 L-글루타민 (300mg/L)이 보충된 RPMI-1640 배지에 유지시켰다. MDA-MB-453, BT-20 및 MDA-MB-231을 10% 열로 불활성화된 태아 소 혈청, 0.4% 항생제-항진균제, L-포도당(4.5g/L), L-글루타민(584 mg/L) 및 피루브산 나트륨(110mg/L)이 보충된 DMEM 배지에 유지시켰다.

[0122] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 건강한 혈액 은행 기증자로부터 취득했고, Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, GE-17-1440-02) 밀도 구배 분리를 사용하여 분리하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 MACS NK 세포 분리 키트 (Miltenyi Biotec, 130-092-657) 및 LS 칼럼 (Miltenyi Biotec, 130-042-401)을 사용하여 음성 선별에 의해 PBMC로부터 NK 세포를 분리하고, 5% 열로 불활성화된 남성 AB 혈청(Sigma-Aldrich) 및 100ng/mL의 재조합 인간 인터루킨-2(IL-2) (Biolegend)가 보충된 X-VIVO에서 사용 전에 밤새도록 배양하였다. NK 세포 농축은 유동 세포 계측법에 의해 확인되어 >95% CD56+/CD3-세포를 유도하였다(도 16 참조). Pan 단핵구 분리 키트(Miltenyi Biotec 130-096-537)를 사용하여 PBMC로부터 단핵구를 분리하였다. CD16+ 단핵구 분리 키트(Miltenyi Biotec 130-091-765)를 사용하여 PBMC로부터 CD16+ 단구를 분리하였다. 신선한 PBMC를 분리 한 후, M1 및 M2-편광 대 식세포는 먼저 37°C에서 2시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 중 무혈청 RPMI T75 플라스크(Fisher Scientific 1368065)에서 갖 분리된 PBMC를 우선 플레이팅하고, 이후 배지를 제거하고 세포를 인산염 완충 식염수 (PBS + Ca + Mg)로 3 회 세척하여 단핵구를 분리함으로써, 취득하였다. RPMI + 20% 열에 의해 불활성화된 소 태아 혈청에서 6 일 동안 50ng/mL의 재조합 인간 GM-CSF(PeproTech 300-03)와 함께 잔류 단핵구를 배양하고, 이어서 4일 동안 10% 열에 의해 불활성화된 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI에서 100ng/mL의 박테리아 리포폴리사카라이드(Invivogen tlrl-3pelps) 및 20ng/mL의 재조합 인간 IFN γ (PeproTech 300-02BC)와 함께 배양하여, M1-극성 세포를 생성시켰다. RPMI + 20% 열에 의해 불활성화된 태아 소 혈청에서 6 일 동안 단핵구를 50ng/mL의 재조합 인간 M-CSF(PeproTech 300-25)와 함께 배양한 다음, 20ng/mL의 재조합 인간 IL-13 (담체 없음) (Biolegend 571102) 및

100ng/mL 재조합 인간 IL-4 (담체 없음) (Biolegend 574004)와 4일 동안 배양함으로써, M2-극성 대식세포를 생성시켰다. 인간  $\gamma \delta$  T 세포는 EasySep™ 인간 감마/델타 T 세포 분리 키트(Stemcell Tech 19255)로 부정적인 선택에 의해 PBMC에서 분리하였다.

[0123] FACS 분석 :

[0124] 시알리다제, 항-Her2-IgG, 항-Her2-IgG-시아, 또는 PBS 대조군과 함께 세포를 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. PBS로 3 회 세척한 후, 하기의 선택 프로브를 함유하는 0.5% 소 혈청 알부민(BSA)을 갖는 저온 PBS에서 세포를 재현탁하였다: 항체, 용액에서 사전복합된 2 차 항-Fc 항체를 갖는 수용체-Fc 융합 단백질, 또는 FITC로 표지된 SNA 렉틴. 세포와 항체/융합 단백질을 4°C에서 30분 동안 어둠 속에서 배양하였다. 0.5% BSA를 함유한 PBS로 3 회 세척 한 후, 세포를 0.5% BSA를 함유 한 PBS에서 성장시킨 다음, 유동 세포 계측법으로 분석하였다. 모든 유동 세포계측 데이터는 FlowJo v. 10.0 (Tree Star)을 사용하여 분석하였다.

[0125] 시알리다제의 발현 및 정제:

[0126] 콜레라균(*Vibrio cholerae*) 시알리다제 유전자를 함유하는 플라스미드 pCVD364로 형질 전환된 대장균(*Escherichia coli*) C600은 Eric R. Vimr 교수(University of Illinois, Urbana-Champaign)로부터 얻었다. 세포를 37 °C에서 12시간 동안 암피실린 (100  $\mu$ g/mL)이 보충된 2xYT 배지에서 성장시켰다. 배양 후, 4,700 x g에서 10 분 동안 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 그리고 펠릿을 삼투 충격 완충액(20% 수크로오스, 1mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재현탁시키고 실온에서 10분 동안 부드럽게 진탕시켰다. 세포를 원심 분리 (9,000  $\times$  g, 10분 동안)하여 수집하고 펠릿을 얼음처럼 차가운 순수에 재현탁시켰다. 4°C에서 10분간 배양한 후, 9,000  $\times$  g에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 수득하였다. 단백질을 정제하기 위해, 샘플을 0.02M Tris-HCl 완충액 (pH 7.6)으로 재구성된 Amicon 한외 여과 장치(막 분자 질량 차단, 30,000Da)를 사용하여 추가로 농축하고, HitrapQ-HP 음이온 교환기 칼럼 (GE Healthcare Life Sciences, 17-1154-01)에 장입하였다. 단백질을 5mL/분의 유속으로 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 7.6) 중의 NaCl 구배로 용출시켰다. 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색된 SDS-PAGE에 의해 측정된 예상 분자량을 갖는 단백질 분획을 수집하고 고이게 하였다. 높은 용량의 내독소 제거 스피ن 키트(Thermo Fisher Scientific, 88275)를 사용하여 내독소를 제거하고, 샘플의 내독소 농도를 LAL 발색성 내 독소 정량 키트 (Thermo Fisher Scientific, 88282)로 측정하였다.

[0127] 쥘티푸스균(*Salmonella typhimurium*) 시알리다제 유전자는 N 말단 헥사히스티딘 태그 및 C-말단 알데히드 태그 (SLCPTSRGS)를 갖는 pET151 벡터로 클로닝하고, BL21(DE3) 유능 대장균(NEB C2527H)로 형질변환시켰다. 세포는 0.6의 광학 밀도에 도달할 때까지 37° C에서 암피실린(100  $\mu$ g/mL)이 보충된 2xYT 배지에서 성장시킨 다음, 0.3 mM IPTG를 첨가하여 세포를 37°C에서 16시간 동안 진탕하며 성장시켰다. 배양 후, 4,700 x g에서 10 분 동안 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 그리고 펠릿을 50mL 용해 완충액(인산 완충 식염수(Fisher Scientific MT21040cv) + 150 mM NaCl + 10 mM 이미다졸)에 재현탁시켰다. 프로테아제 억제제 정제(Sigma 5892970001) 및 1 $\mu$ L의 뉴클레아제(Thermo Scientific-Pierce 88702)를 첨가하고 용해 완충액 중의 세포를 4°C에서 2시간 동안 진탕 배양하였다. 세포를 균질화기를 통해 용해시키고, 250 mM 이미다졸 용출을 갖는 니켈-NTA 수지(Thermo Fisher 88221)를 사용하여 정제하였다. SDS-PAGE에 의해 측정된 예상 분자량을 갖는 단백질 분획을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하고 수집하였다. 높은 용량의 내독소 제거 스피ن 키트(Thermo Fisher Scientific, 88275)를 사용하여 내독소를 제거하고 샘플의 내 독소 농도를 LAL 발색성 내독소 정량 키트(Thermo Fisher Scientific, 88282)로 측정하였다.

[0128] MuNeuNAc를 이용한 시알리다제의 활성 분석 :

[0129] 0.1 mM 2'-(4-메틸움벨리페릴)- $\alpha$ -D-N-아세틸뉴라민산(MuNeuNAc, Biosynth International Inc.)을 함유한 50  $\mu$  L 용액에 시알리다제 5  $\mu$  L( $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Mg}^{2+}$  가 함유된 DPBS 완충액 중 30~60nM, pH 7.0)를  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Mg}^{2+}$  (pH 7.0)을 함유하는 DPBS 완충액 중에 용해시켰다. 37°C에서 10분간 배양한 후, 혼합물을 0.1M 글리신-NaOH 완충액(pH 10.4) 150 $\mu$ L로 희석시켰다. 형광 분광 광도계(여기 360nm; 방출 440nm)로 형광을 판독하였다. 활성은 U/mg로서 보고되며, 단위는 DPBS 완충액(pH 7)에서 분당 1  $\mu$ mol의 메틸움벨리페론을 방출하는데 필요한 효소의 양으로 정의된다.

[0130] 항 Her2-IgG-Sia의 제조 :

[0131] 정제된 콜레라균 시알리다제( $\text{Ca}^{2+}$  와  $\text{Mg}^{2+}$ 를 함유한 DPBS 완충액(pH 7.0) 중 2 mg/mL)를 4°C에서 밤새 12 당량의 비시클로노닌-N-히드록시 숙신이미드 에스테르(BCN-NHS)와 밤새 반응시켰다. PD-10 탈염 칼럼(GE Healthcare

Life Sciences, 17-0851-01)을 사용하여 과량의 링커를 제거하였다. 표지의 정도는 ESI-MS에 의해 측정하였다(도 6b 참조). C-말단 알데히드-태그를 갖는 인간화된 항-Her2-IgG를 이전에 기술된 바와 같이 생성하였다. 항-HER2-IgG-시아는 우선 pH 4.5, 37℃에서 10일간 100 mM 암모늄 아세테이트 완충액에서 C-말단 알데히드 태그를 갖는 항-HER2-IgG(120 μM)를 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)(10 mM)에 결속시키고, 이어서 PD-10 탈염 칼럼(GE Healthcare Life Sciences, 17-0851-01)을 사용하여 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>(pH 7.0)를 함유한 DPBS 완충액으로 완충액 교환을 실행함으로써, 제조하였다. 이어서 생성된 접합체를 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>(pH 7.0)를 함유한 DPBS 완충액에서 총 단백질 농도 120mg/mL에서 1:28의 물비로 표지된 시알리다제에 결속시켰다. 실온에서 3일 동안 배양 후, 항-Her2-IgG-Sia를 크기 배제 크로마토그래피 Superdex 200으로 정제하였다. 정제된 생성물을 SDS-PAGE 겔 및 ESI-MS로 분석하였다.

[0132] 정제된 *퀴티푸스균* 시알리다제(Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>를 함유한 DPBS 완충액 중 3mg/mL, pH 7.0)를 DBCO-PEG4-말레이미드 20당량과 4℃에서 밤새 반응시켰다. 과량의 링커는 PD-10 탈염 칼럼(GE Healthcare Life Sciences, 17-0851-01)을 사용하여 제거하였다. 표지의 정도는 ESI-MS에 의해 측정되었다(도 6b 참조). C-말단 알데히드-태그를 갖는 인간화된 항-Her2-IgG를 이전에 기술된 바와 같이 생성하였다. 항HER2-IgG-시아는 우선 pH 4.5, 37℃에서 10일간 100nM의 암모늄 아세테이트 완충액에서 C-말단 알데히드 태그를 갖는 항 HER2-IgG(120 μM)를 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)(10nM)에 결속시키고, 이어서 PD-10 탈염 칼럼(GE Healthcare Life Sciences, 17-0851)을 사용하여 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>(pH 7.0)를 함유한 DPBS 완충액에서 완충액 교환을 실시함으로써, 제조하였다. 이어서, 생성된 접합체를 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>(pH 7.0)를 함유한 DPBS 완충액 중 총 단백질 농도 25mg/mL에서 1:14의 물비로 표지된 시알리다제에 결속시켰다. 실온에서 3 일 동안 배양한 후, 항-Her2-IgG-Sia를 크기 배제 크로마토 그래피 Superdex 200으로 정제하였다. 정제된 생성물을 SDS-PAGE 겔 및 ESI-MS로 분석하였다.

[0133] 세포 독성 검정:

[0134] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs), NK 세포, 단핵구, CD16+ 단핵 세포, M1 대식 세포, 또는 M2 대식세포의 ADCC 활성의 결과로서 유방암 세포로부터의 락테이트 탈수소 효소 (LDH) 방출을 측정함으로써 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)을 분석하였다. 시알리다제 또는 단클론 항체의 존재 또는 부재 하에 다양한 효과기/표적(E/T) 비율로 종양 세포(표적 세포)를 PBMC, NK 세포, 단핵구 또는 대식세포(이펙터 세포)와 세 차례 공동 배양하였다. 전형적인 실험에서, 이펙터 세포 100 μL를 표적 세포 100 μL를 함유한 V 바닥 96-웰 플레이트에 2×10<sup>5</sup> 세포/㎖로 첨가하였다. 4시간 후, 상청액을 수집하고, 제조자의 프로토콜에 따라 LDH 세포 독성 검정 키트(Thermo Fisher Scientific, 88954)를 사용하여 LDH 방출을 측정하였다. 490nm에서의 흡광도를 SpectraMax i3x (Molecular Devices)로 측정하였다. 특정 용해는 100 × (실험-이펙터 세포 자발 방출-표적 세포 자발 방출) / (표적 세포 최대 방출-표적 세포 자발 방출)로서 계산 하였다.

[0135] 형광 현미경 :

[0136] 접합체의 HER2-특이적 효소 활성의 시각화를 위해, 세포를 37℃의 PBS 완충액에서 1시간 동안 항 HER2-IgG-시아의 농도를 다양하게 하며 배양하였다. PBS 로 세척한 후, 이어서 실온에서 20분간 4% 포르말데히드로 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 PBS 중의 0.5% BSA로 3회 세척하고, 이어서 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 완만하게 진탕하면서 실온의 암실에서 30분 동안 PBS 중의 0.5% BSA에서 FITC로 표지된 SNA(1:100) 및 AF647로 표지된 항-Her2 항체(1:100)와 함께 세포를 배양하였다. PBS 중 0.5% BSA로 3회 세척한 후, Nikon A1R + 공명 스캐닝 공 초점 현미경을 사용하여 영상화하기 직전에 DAPI(10 mM 스톱에서 1:1250 희석)를 첨가 하였다.

[0137] NK-종양 세포 시냅스의 시각화를 위해: 종양 세포를 37℃에서 1시간 동안 PBS 완충액 중 6nM 항-Her2-IgG 또는 6nM 항-Her2-IgG-Sia와 함께 배양하였다. 새롭게 단리된 NK 세포를 2:1의 E/T 비율로 종양 세포에 첨가하고, 37℃에서 15분 동안 함께 배양하였다. PBS로 세척한 후, 실온에서 20 분 동안 PBS 중의 4% 포르말데히드로 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS 중의 0.5% BSA로 3 회 세척하고, 이어서 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 실온의 암실에서 30분 동안, 세포를 PBS 완충액에서 완만하게 진탕하면서 AF488로 표지된 항-Siglec7(1 : 100), TRITC로 표지된 항-Fc(1 : 400) 및 AF647로 표지된 항-CD16(1 : 100)의 혼합물과 함께 배양하였다. PBS 중 0.5% BSA로 3회 세척 한 후, Nikon A1R + 공명 스캐닝 공초점 현미경을 사용하여 영상화 직



전에 DAPI (10 mM 스톱에서 1:1250 희석)를 첨가하였다.

#### [0138] 통계 분석:

[0139] 통계 분석은 Prism 6을 사용하여 수행하였다. 데이터는 3 회의 실험의 평균  $\pm$  SD로 나타내었고, 유의성은 달리 명시하지 않는 한  $t$ -검정을 사용하여 결정하였다.  $** = p < 0.005$ ,  $* = p < 0.05$ ,  $p > 0.05$ 는 유의한 것으로 간주하였다.

#### [0140] 서문

[0141] 시알산 잔기에서 종결되는 글리칸은, 충분히 풍부한 경우, 보체 인자 H를 모집하고 대체 보체 캐스케이드를 하향 조절하는 등, 예를 들어 대부분의 유형의 백혈구에서 발견되는 면역 억제성 시알산 결합 Ig-유사 렉틴(Siglecs)을 면역 시냅스에 모집함으로써, 여러 경로를 통한 면역 활성화를 억제하는 "건장한 자아"의 신호를 생성한다. 시알릴화 상태는 면역학적 인식을 유발하거나 회피하는 세포의 능력에 중요한 역할을 한다.

[0142] 시알릴화된 글리칸의 상향 조절은 예후가 좋지 않고 종양의 면역 원성이 감소하는 것과 관련이 있다. 암 세포의 과도한 시알릴화는 항체 의존성 세포 매개 세포 독성 (ADCC)의 주요 매개체인 NK 세포에 의한 면역 감시의 회피에 기여할 수 있다. 시알릴화된 글리칸의 고밀도 군집은 NK 세포와 관련된 Siglec-7 및/또는 Siglec-9를 면역 시냅스에 모집할 수 있다(도 1). PD-1과 마찬가지로, 이 Siglec은 활성화하는 NK 세포 수용체의 신호 억제를 매개하는 세포액내 면역수용체 타이로신계 억제(ITIM) 모티프를 가지고 있다(그림 1). 종양 표적의 조작된 과도한 시알릴화는 Siglec-7-의존적 방식으로 본래의 NK 세포 살상뿐만 아니라 ADCC를 예방한다. 마찬가지로, 시알리다제로 종양 세포를 처리하여 시알산을 효소적으로 제거하면, 차단 항체로 Siglec-7 또는-9의 억제가 강화되듯이, 마찬가지로 NK 세포에 의한 살상이 강화된다. 암세포 글리칸의 시알릴화는 또한 NK-활성화 수용체, 자연 살해 그룹 2d (NKG2D)의 동종 리간드와의 상호 작용을 방해(도 1)함으로써, 종양 세포에서 NK-활성화 신호를 감소시킨다. 반대로 세포 표면 시알산을 제거하면 NKG2D-리간드 결합을 증가시켜 NK 세포 활성화가 촉진된다. 따라서, 종양 진행의 미세 진화 과정 동안, 과도한 시알릴화는 NK 활성화 신호를 감소시키면서 면역 시냅스로부터 유출되는 NK 억제 신호를 강화시킴으로써 선택적 이점을 제공한다.

[0143] 시알산을 사용하여 NK-활성화 수용체 및 NK-저해 수용체를 표적화하는 면역 회피 전략이 도 1에 개략적으로 도시되었다. 시알산을 과발현하는 암세포에서, 과도하게 시알릴화된 글리칸이 NK-억제 수용체와 상호 작용하여 NK-세포 활성화의 억제를 초래한다. 항체-시알리다제에 의한 세포 표면 시알산의 제거는 시알릴화된 글리칸과 NK-억제성 수용체의 상호작용을 없애고, NK 활성화 수용체와 그 리간드 간의 결합을 증가시킴으로써, NK 세포-매개 ADCC에 대한 종양 세포 감수성을 향상시킨다.

[0144] 종양 특이적 탈시알릴화(desialylation)가 NK 세포에 의한 종양 세포 용해를 강화시키는 강력한 개입일 수 있음이 추론되었다. 항체 효소 접합체(AEC)가 종양 세포 글리코칼릭스를 선택적으로 편집하고 많은 항체 항암제에 의해 치료되는 치료적으로 중요한 기전인 ADCC에 의한 NK 세포 살해를 강화할 수 있다고 보고되었다. 재조합 시알리다제는 HER2-표적화 치료용 단일클론 항체 트라스투주맵에 화학적으로 융합되었다. 항체-시알리다제 접합체는 HER2-의존적 방식으로 종양 세포를 탈시알릴화시키고, NKG2D 결합을 증진시키며 억제성 Siglec에 대한 리간드를 파괴하면서, 트라스투주맵 단독과 비교하여 NK 세포 살해를 증폭시켰다(도 1).

#### [0145] 실시예 1-콜레라균 및 쿼티푸스균 시알리다제의 적합성

[0146] 트라스투주맵 AEC에 대한 적절한 시알리다제를 동정하기 위해, 전술한 바와 같이 효소 패널을 발현 및 정제하고(도 3a 및 b), 이러한 목적으로 콜레라균 및 쿼티푸스균 시알리다제가 확인되었다. 콜레라균 및 쿼티푸스균 시알리다제는 전술한 바와 같이 발현 및 정제하였다. 단백질의 순도는 SDS-PAGE 겔 및 ESI-MS에 의해 측정하였다(도 2b, 2e 및 3b, 및 7a, 7f). 배양된 세포 1 리터에서 약 15mg의 효소를 정제하여, 앞서 보도된 바와 같이 형광 물질 기질인 2'-(4-메틸움벨리페틸)- $\alpha$ -D-N-아세틸뉴라민산(MuNeuNAc)으로 측정했을 때 콜레라균은 10U/mg 이상의 시험 관내 가수 분해 활성을, 그리고 쿼티푸스균은 114를 나타내었는데, 단위는 DPBS 완충액(pH 7)에서 분당 메틸움벨리페틸 1 $\mu$ mol을 해제하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 콜레라균 시알리다제가 세포 표면 글리칸에서 시알산을 효율적으로 제거할 수 있는지 여부를 알아보기 위해, FITC로 표지된 *삼부쿠스 니그라* 아글루티닌(SNA)을 사용하여 세포 표면 표지에 미치는 영향을 시험하였다. 또한, Siglec-7, Siglec-9 또는 NKG2D의 세포외 영역을 포함하는 수용체-Fc 키메라를 사용하여 세포 표지에 대한 콜레라균 처리의 효과를 평가 하였다. 1시간 동안 37 C에서 시알리다제에 의한 다양한 종양 세포주의 탈시알릴화가 크게 Siglec-7-Fc 및 Siglec-9-Fc 키메라(도 4)뿐만 아니라 SNA의 결합을 감소시켰다. SNA 결합의 감소와 함께, NKG2D-Fc 키메라의 결합 능력의

증가는 시알리다제 처리 후 대부분의 유방암 세포주에서 관찰되었다(도 4d).

[0147] 항체-시알리다제 접합체의 제조 및 특성화를 도 2에 나타내었다. 도 2a는 항체-비브리오 콜레라 시알리다제 접합체의 제조를 개략적으로 도시한다. 도 2b는 쿠마시 염색에 의해 시각화된 비 환원 조건(레인 3, 4 및 5) 및 환원 조건(레인 6, 7, 및 8)에서 시알리다제, 트라스투주맙 및 시알리다제-트라스투주맙 접합체의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 사전 염색된 단백질 사다리: 레인 1, 2 및 9. 도 2c는 콜레라균 시알리다제를 갖는 항체 시알리다제 접합체의 ESI-MS를 나타낸다. 도 2d는 항체-쥐티푸스균 시알리다제 접합체의 제조를 개략적으로 도시한다. 도 2e는 쿠마시 염색에 의해 시각화 된, 비환원 조건 하에서의 시알리다제, DBCO-변형된 시알리다제, 트라스투주맙 및 트라스투주맙-시알리다제 접합체(레인 3, 4, 5 및 6) 및 환원 조건 하에서의 트라스투주맙 및 트라스투주맙-시알리다제 접합체(레인 7 및 8)의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 사전 염색된 단백질 사다리: 레인 1, 2 및 9. 도 2f는 살모넬라균 시알리다제와의 항체-시알리다제 접합체의 ESI-MS를 나타낸다.

[0148] 도 3은 시알리다제 패닐의 특성을 나타낸다. 도 3a는 기질 2'-(4-메틸옵벨리페틸)- $\alpha$ -D-N-아세틸뉴라민산(MuNeuNAc) 상의 시알리다제의 활성을 나타낸다. 야생형 인간 뉴라미니다제 2, 인간 뉴라미니다제 3, 콜레라균 시알리다제, 쥐티푸스균 시알리다제, 클로스트리디움 퍼프린젠스 시알리다제 및 A. 우레아 파시안 시알리아제의 SDS-PAGE 분석을 도 3b에 나타내었는데, 이들은 쿠마시 염색에 의해 시각화된다. 도 3c는 콜레라균, 쥐티푸스균, 및 ZR-75-1 유방암 세포에서 유래된 인간 뉴라미니다제 2에 의한 Siglec 9 리간드 절단의 유동 세포 계측을 보여준다. BT-20 세포상의 Siglec-7 리간드는 도 3d에 나타난 바와 같이 콜레라균 시알리다제로 처리 한 후에 효율적으로 제거하였다.

[0149] 시알리다제 처리 유무에 따른 상이한 유방암 세포주의 세포 표면 시알릴화 수준의 분석을 도 4a에 나타내었다. 시알리다제 처리 유무에 관계없이 상이한 유방암 세포주에서의 Siglec-7의 리간드 수준을 도 4b에 나타내었다. 시알리다제 처리의 유무에 관계없이 상이한 유방암 세포주에서의 Siglec-9의 리간드 수준을 도 4c에 나타내었다. 시알리다제 처리의 유무에 관계없이 상이한 유방암 세포주에서의 NKG2D의 리간드 수준을 도 4d에 나타내었다.

[0150] 실시예 2-세포 표면 시알 산의 제거가 ADCC에 대한 감수성을 향상시킨다

[0151] 세포 표면 시알산의 제거가 NK 세포 매개 ADCC에 대한 감수성을 향상시킬 수 있음을 입증하기 위해, 정제된 인간 말초 혈액 NK 세포를 사용하여 30nm 트라스투주맙의 존재 하에 시알리다제 처리를 하거나 하지 않으며 SKBR3(HER2 3+), MDA-MB-453 (HER2 2+) 및 BT-20 (HER2 1+)세포주로 ADCC 분석을 수행하였다. 최대 세포 살해의 대략 5%~100% 증가가 다양한 시알리다제 처리 세포주를 갖는 트라스투주맙 유도 ADCC에서 관찰되었다(도 5). 강화된 ADCC가 시알리다제 효소 활성에 기인함을 확인하기 위해, 열에 의해 불활성화된 콜레라균 시알리다제를 사용하는 가수 분해 활성 분석 및 ADCC 분석도 수행하였다. 20 분간 80°C로 가열하여 콜레라균 시알리다제를 불활성화시키자 글리칸을 함유한 시알산에 대한 가수 분해 활성이 상실되었을 뿐만 아니라 ADCC에서 증진 효과가 상실되었다(도 6). 시알리다제를 트라스투주맙에 접합시킴으로써 세포 표면상의 시알리다제의 국소 농도를 증가시키는 것이 근접 강화된 활성을 제공하고 더 나아가 상기 효과를 강화시킬뿐만 아니라 조직 특이적 방식으로 효소 활성의 난잡함을 제한할 것으로 예상되었다.

[0152] 도 5a는 항-Her2-IgG(Tras)의 존재 하에 또는 항-HER2-IgG 및 인간 뉴리미니다제 2(Neu2), 인간 뉴리미니다제 3(Neu3), 콜레라균 시알리다제(VCSia), 쥐티푸스균 시알리다제(STSia), 아스트로박테르 우레아파시엔 시알리다제(AUSia) 또는 클로스트리디움 퍼프린젠스 시알리다제(CPSia)의 존재 하에, BT-20 유방암 세포(미처리) 단독에 대한 건강한 공여자로부터 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성을 보여준다. 도 5b는 시알리다제(30 nM), 항-Her2-IgG(30 nM), 또는 2:1 및 4:1의 E/T 비율의 시알리다제(30 nM)와 항-Her2-IgG(30 nM)의 혼합물의 존재 또는 부재 하에, 상이한 유방암 세포에 대한 건강한 공여자로부터 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성을 나타낸다. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ .

[0153] 도 6은 야생형 및 열에 의해 불활성화된 콜레라균 시알리다제의 특성을 나타낸다. 항-Her2-IgG(30nM), 시알리다제(30nM), 항-Her2-IgG (30nM)와 시알리다제 (30nM)의 혼합물, 또는 열에 의해 불활성화된 시알리다제(HI-시알리다제 30nM) 또는, E/T 비가 4:1인 항 Her2-IgG (30nM) 및 열에 의해 불활성화된 시알리다제(30nM)의 혼합물의 부재 또는 존재 하에, BT-20 세포에 대한 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성이 도 6a에 도시되었다. 2'-(4-메틸옵벨리페틸)- $\alpha$ -D-N-아세틸뉴라민산(MuNeuNAc)을 이용한 야생형과 열에 의해 불활성화된 콜레라균 시알리다제의 가수 분해 작용이 도 6b에 도시되었다. 30 nM 야생형 시알리다제 또는 열에 의해 불활성화된 시알리다제 처리의 유무에 관계 없이, BT-20 세포상의 삼부쿠스 니그라 렉틴(SNA) 리간드의 수준이 도 6c에 도시되었다. 30 nM 야생형 시알리다제 또는 열에 의해 불활성화된 시알리다제 처리의 유무에 관계없이, BT-20 세포상의

Siglec-7 리간드의 수준이 도 6d에 도시되었다. 30 nM 야생형 시알리다제 또는 열에 의해 불활성화된 시알리다제 처리의 유무에 관계 없이, BT-20 세포상의 Siglec-9 리간드의 수준이 도 6e에 도시되었다. 30 nM 야생형 시알리다제 또는 열에 의해 불활성화된 시알리다제 처리의 유무에 관계 없이, BT-20 세포상의 NKG2D 리간드의 수준이 도 6f에 도시되었다. <sup>\*\*</sup>*P* < 0.005, NS : 유의하지 않음.

[0154] 실시예 3-항체-시알리다제 접합체의 제조 및 특성 규명

[0155] 시알리다제-트라스투주맵 AEC를 설계할 때 주요 관심사는 ADCC를 개시하는 상호 작용인 Fc $\gamma$ RIII(CD16)에 대한 결합을 저해하지 않는 효소 접합을 위한 자리를 확인하는 것이었다. 항원-약물 접합체(ADC) 분야에서 영감을 얻은 것은 면역 작동기 기능을 방해하지 않도록 부착 자리가 조정되었다는 점이다. 따라서 시알리다제는 Fc $\gamma$ RIII가 결합하는 C<sub>4</sub>d 도메인으로부터 멀리 떨어진 트라스투주맵 중쇄의 C-말단 근처를 연결하도록 선택되었다. 자리 특이적 접합을 위한 알데히드 태그 방법은 단백질-단백질 화학적 융합체 및 자리-특이적 항체-약물 접합체의 조합에 사용된 선례에 기초하여 사용하였다. C-말단 알데히드 태그를 갖는 트라스투주맵 (항-Her2-IgG)을 전술한 바와 같이 수득하였다. 작용화된 항체를 먼저 아미노옥시-테트라에틸렌글리콜-아지드(아미노옥시-TEG-N<sub>3</sub>)에 결속시켰다(도 2a). 병행하여, 시알리다제를 제조하였다. *콜레라균* 시알리다제를 임의로 바이시클로노닌-*N*-히드록시숙신이미드 에스터(BCN-NHS)로 리신 잔기 상에서 작용화하였다. 발색 반응시킨 후, 과량의 링커를 제거하고, 시알리다제의 BCN-NHS 변형의 정도를 ESI-MS에 의해 측정하였다(도 7b). 최종적으로, 아 지드 작용화된 링커로 장식된 트라스투주맵을 구리가 없는 클릭 화학 작용을 통해 BCN-작용화된 *콜레라균* 시알리다제에 접합하였다(도 2a). 목적하는 접합체를 크기-배제 칼럼을 사용하여 정제하고 그의 겔보기 분자량(항-Her2-IgG-Sia, ca. 312 kDa)를 SDS-PAGE로 확인하였다(도 2b). ESI-MS 분석은 시알리다제가 트라스투주맵의 중쇄에 공유결합되었음(도 2c 및 도 7e) 확인하였다. 형광 기질인 MuNeuNAc를 사용하여 최종 AEC의 시알리다제 활성을 평가하였다. 화학적 접합 과정 후에 85% 이상의 효소 활성이 남아 있었다(도 8). 대안적으로, 쥐티푸스균 시알리다제를 DBCO-PEG4-말레이미드와 발색 반응시켜 C-말단 알데히드 태그 상의 시스템인에 자리 특이적으로 접합시켰다; 이어서 과량의 링커를 제거하고, *쥐티푸스균* 시알리다제에 DBCO의 접합을 ESI-MS에 의해 완료된 것으로 결정하였다(도 7g). 마지막으로, 아지드 링커를 갖는 트라스투주맵을 구리가 없는 클릭 화학 작용을 통해 DBCO로 작용화된 *쥐티푸스균* 시알리다제에 접합시켰다(도 2d). 목적하는 접합체를 크기-배제 칼럼을 사용하여 정제하고, SDS-PAGE에 의해 그의 겔보기 분자량(항-HER2-IgG-St Sia, 약 240 kDa)을 확인하였다(도 2e). ESI-MS 분석은 시알리다제가 트라스투주맵의 중쇄에 공유 결합되어 있음을 확인하였다(도 2f 및 도 7h). 최종 AEC의 시알리다제 활성은 형광 기질인 MuNeuNAc를 사용하여 평가하였다. 유리 알데히드-태그가 붙은 시알리다제에 비해 효소 활성의 약간의 증가는 C-말단 태그 상의 유리 시스템인에 대한 화학적 접합 처리 후에 나타났다(도 8).

[0156] 도 7은 시알리다제, 항-Her2-IgG 및 이의 접합체의 ESI-MS 스펙트럼을 도시한다. 정제된 *콜레라균* 시알리다제의 ESI-MS 스펙트럼이 도 7a에 도시되었다. 1:12 몰비로 BCN-NHS로 표지된 *콜레라균* 시알리다제의 ESI-MS 스펙트럼이 도 7b에 도시되었다. C-말단 알데히드 태그를 갖는 항-Her2-IgG의 ESI-MS 스펙트럼이 도 7c에 도시되었다. 아미노 옥시-TEG-아지드와 접합된 C-말단 알데히드 태그를 갖는 항-Her2-IgG의 ESI-MS 스펙트럼이 도 7d에 도시되었다. 항 Her2-IgG-Sia의 ESI-MS 스펙트럼이 도 7e에 도시되었다. 정제된 *쥐티푸스균* 시알리다제의 ESI-MS가 도 7f에 도시되었다. 1:20 몰비의 DBCO-PEG4-말레이미드로 표지된 *쥐티푸스균*의 ESI-MS가 도 7g에 도시되었다. 항 *HER2-ST-IgG-Sia*의 ESI-MS 스펙트럼

[0157] 도 8은 기질 2'-(4-메틸옵벨리페틸)- $\alpha$ -D-*N*-아세틸뉴라민산(MuNeuNAc)에 대한 *쥐티푸스균* 시알리다제 및 항-Her2-IgG-St Sia 뿐만 아니라 *콜레라균* 시알리다제 및 항-Her2-IgG-Sia의 가수 분해 활성을 보여준다 .

[0158] 더 나아가 항 HER2-IgG-Sia가 구체적으로 HER2 발현 세포 상의 시알산을 제거할 수 있음을 입증하기 위해, SKBR3(HER2 3+) 및 MDA-MB-468(HER2 0)을 6nm 또는 60nm 항-Her2-IgG-Sia의 부재 또는 존재 하에 배양하였다. 도 9 및 도 10에 도시된 바와 같이, 6nm의 항 Her2-IgG-Sia로 1시간 처리한 결과, MDA-MB-468 세포가 존재하는 경우에도 SKBR3 세포가 선택적으로 탈시알틸화되었다(도 9). 그러나 이와 같은 효과는 용량에 따라 다르다. SKBR3 및 MDA-MB-468 세포의 표면 시알산 수준은 모두 60nm의 항 Her2-IgG-Sia에서 1시간 처리하여 감소시켰다. 이와 같은 효과는 다양한 농도의 항-Her2-IgG-Sia로 처리된 세포의 혼합물에 대해 유동 세포 계측법을 사용하여 정량화 하였다(도 9a). 그러나, 렉틴 도메인이 결여된 작은 시알리다제(항 HER2-IgG-ST-Sia)에서, 오프-타겟 HER2 0 MDA-MB-468 세포의 표면 시알산 수준이 약 1  $\mu$ M 항-Her2-IgG-St-Sia 접합체의 훨씬 높은 농도까지 그대로 남아있었다(도 9b).

[0159] 도 9는 상이한 HER2-발현 암세포와의 트라스투주맵 및 트라스투주맵-시알리다제 접합체의 시험 관내 특성을 나



타낸다. HER2-고 발현 세포주인 SKBR3상의 세포 표면 시알산은 6nm 트라스투주맵-시알리다제 접합체를 사용하여 선택적으로 제거 될 수 있다. 기준자, 25  $\mu$ m.

[0160] 도 10은 항 Her2-IgG-Sia 접합체의 부재 또는 존재 하에서 SKBR3 및 MDA-MB-468 세포 상의 SNA 리간드를 나타낸다. 항 Her2-IgG-Sia 접합체의 부재 또는 존재 하에서 SKBR3 및 MDA-MB-468 세포의 개별 배양물 상의 SNA 리간드가 도 10a에 도시되었다. 세포를 37℃에서 1시간 동안 RPMI-1640 배지에서 6nM 항-Her2-IgG-Sia 접합체 또는 PBS와 함께 배양하고 FITC-표지 SNA 렉틴, AF647-표지된 항-Her2 및 DAPI 핵 염색으로 염색하였다. 항-Her2-IgG-Sia 접합체의 부재 또는 존재 하에 SKBR3 및 MDA-MB-468 세포의 혼합물 상의 SNA 리간드가 도 10b에 도시되었다. SKBR3 및 MDA-MB-468 세포를 1 : 1 비율로 혼합하고 밤새 배양 하였다. 세포 혼합물을 37 °C에서 1 시간 동안 6nM 또는 60nM 항-Her2-IgG-Sia 접합체의 부재 또는 존재 하에 배양하였다. 기준자 = 25  $\mu$ m.

[0161] NK 세포 매개 ADCC에 대한 항체-시알리다제의 효과를 평가하기 위해, 4:1 및 8:1의 효과기/표적(E/T) 비율의 항 Her2-IgG 또는 항 Her2-IgG-Sia의 존재 하에 다양한 유방암 세포주 (SKBR3, HER2 3+; HCC-1954, HER2 3+; MDA-MB-453, HER2 2+; ZR-75-1, HER2 1+; BT-20, HER2 1+; MDA-MB-231, HER2 1+; MDA-MB-468, HER2 0)를 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. 항 Her2-IgG와 비교하여, 항 Her2-IgG-Sia는 HER2 1+ 세포주 ZR-75-1, BT-20 및 MDA-MB-231에서 최대 세포 살해의 33%에서 140% 증가를 보였다(도 11). 또한, 시알리다제 (30nM), 항 HER2-의 IgG(30nM) 또는 항 HER2-IgG-Sia (30nM)의 부재 또는 존재 하에 다양한 E/T비율로 BT-20 세포를 정제된 인간 말초 혈액 NK 세포에 노출시켰다(도 12a). BT-20 세포주의 시알리다제 단독 치료는 다른 E/T 비율에서 거의 NK 세포 매개 세포 독성을 나타내지 않았다. 항 Her2-IgG와 비교하여, 항 Her2-IgG-Sia는 다양한 비율에서 현저히 향상된 세포 분해를 보였다. E/T 비가 4일 때, 가장 큰 향상이 관찰되었다: 항 Her2-IgG-Sia에 대한 46%  $\pm$  1 세포 용해 대 항-Her2-IgG에 대한 21%  $\pm$  1. NK 세포가 고갈된 PBMC가 세포 용해를 거의 보이지 않기 때문에 ADCC가 NK 세포에 의해 매개되는 것을 확인시켜 입증하였다(도 12b).

[0162] 도 11은 E/T 비가 4:1 및 8:1로 항 Her2-IgG(30nM) 또는 항 Her2-IgG-Sia (30nM)의 존재 하에 상이한 유방암 세포에 대한 건강한 공여자로부터 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성 데이터를 나타낸다.

[0163] 도 12는 상이한 HER2-발현 암 세포에 대한 트라스투주맵 및 트라스투주맵-시알리다제 접합체의 시험 관내 활성을 나타낸다. NK 세포를 사용하여 시알리다제 (30nM), 항-Her2-IgG (30nM) 및 항-Her2-IgG-Sia(30nM)의 부재 또는 존재 하에서 BT-20 세포로 수행한 세포 독성 검정이 도 12a에 도시되었다. NK 세포가 고갈된 PBMC를 사용하여 시알리다제 (30nM), 항 Her2-IgG (30nM) 및 항 Her2-IgG-Sia (30nM)의 부재 또는 존재 하에 BT-20 세포로 수행한 세포 독성 검정 결과가 도 12b에 도시되었다. Siglec-7-Fc, Siglec-9-Fc 및 NKG2D-Fc 결과와 관련된 ADCC의 증진에서 관찰된 추세가 12c~12f에 도시되었다. 표시된 농도의 트라스투주맵 및 트라스투주맵-시알리다제 접합체의 존재 하에 상이한 HER2-발현 암세포에 대한 NK 세포의 세포 독성 활성이 도 12g~12j에 도시되었다. 트라스투주맵 또는 트라스투주맵-시알리다제(트라스투주맵-시알리다제) 접합체 처리에 의한 NK 세포 상의 Siglec-7 분포의 형광 현미경 분석이 도 12k에 도시되었다. Siglec-7은 접합체를 사용하여 SKBR3 세포 상에 시알 산을 제거한 후, NK-종양 시냅스에 대한 Siglec-7의 모집이 상실되었다. 기준자, 10  $\mu$ m, \*\*  $P$  < 0.005.

[0164] 단핵구 및 대식세포가 매개하는 세포 독성에 대한 항체-시알리다제 접합체의 효과를 평가하기 위해, 다양한 효과기/표적 비율로 콜레라균 시알리다제 단독(VCSia), 항 HER2-IgG(Tras) 또는 항 HER2-IgG-Sia (T-Sia)의 존재 하에서, 유방암 세포주(SKBR3, HER2 3+; BT-20, HER2 1+)를 사용하여 세포독성 검증을 수행하였다. 전체 단핵구 군집이 종양 세포의 전반적인 살해를 거의 나타내지 않았지만, Siglecs 3, 7 및 9를 주로 발현하는 단리된 CD16+ 단구는, 항-Her2-IgG (Tras)로의 치료와 비교하여, 접합체 항-Her2-IgG-Sia (T-Sia)로 처리했을 때 약 100%의 증가를 입증하였다(도 13). Siglec 3, 6, 7 및 9를 발현하는 분화된 M1 대식세포와 Siglec 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11을 발현하는 M2 대식 세포가 둘 다 트라스투주맵 단독으로 사용했을 때와 상반되게 트라스투주맵-시알리다제를 사용하여 종양 세포의 세포 독성 파괴를 증가를 나타내는 것으로 보인다(도 13).  $\gamma$   $\delta$  T 세포 매개 세포 독성은 또한 트라스투주맵(Tras) 또는 시알리다제(VCSia) 단독으로 처리하는 것보다 트라스투주맵-시알리다제 접합체(T-Sia)에 의해 강화될 수 있다 (도 14).

[0165] 도 13a는 유동 세포 계측에 의해 측정된 인간 단리된 단핵구 군집의 Siglec 발현 수준을 나타낸다. 도 13b에는 콜레라균 시알리다제, 항 HER2-IgG(Tras) 또는 항 Her2-IgG-Sia (T-Sia)와, 그리고 1: 8의 T/E비율로 24시간 배양 후, BT-20 유방암 세포에 대한 단리된 인간 단핵 세포의 세포 독성 데이터가 도시되었다. 도 13c는 단구 개체군으로부터 단리된 CD16+ 단핵구의 siglec 수용체 발현 수준을 나타낸다. 도 13d는 콜레라균 시알리다제, 항 HER2-IgG(Tras) 또는 항 Her2-IgG-Sia(T-Sia) 및 BT-20 유방암 세포와 함께 4시간 배양 후 건강한 공여자의



CD16 + 단핵 세포의 세포 독성 데이터를 보여준다. 도 13e는 이전에 기술된 바와 같이 M1 대식세포로 분화된 건강한 공여자에게서 유래된 단리된 단핵구의 siglec 수용체 발현 수준을 나타낸다. 도 13f는 콜레라균 시알리다제, 항 HER2-IgG(Tras) 또는 항-Her2-IgG-Sia(T-Sia) 및 SK-B-3 유방암 세포 R과 함께 24시간 배양한 후 건강한 공여자로부터 단리된 단핵구에서 분화된 M1 대식 세포에서 유래된 세포 독성 데이터를 나타낸다. 도 13g는 이전에 기술된 바와 같이 M2 대식세포로 분화된 건강한 공여자로부터 단리된 단핵 세포의 Siglec 수용체 발현 수준을 나타낸다. 도 13h는 콜레라균 시알리다제, 항 HER2-IgG (Tras) 또는 항 Her2-IgG-Sia (T-Sia) 및 SK-BR-3 유방암 세포와 함께 24시간 배양한 후 건강한 공여자로부터 단리된 단핵구로부터 분화된 M2 대식세포로부터의 세포 독성 데이터를 나타낸다. 도 13i는 (13e 및 13f)로부터의 M2 매크로파지의 CD16 발현 수준을 나타낸다.

[0166] 도 14는 콜레라균 시알리다제, 항 HER2-IgG (Tras) 또는 항 Her2-IgG-Sia (T-Sia) 및 SK-BR-3 세포의 존재 하에서 5:1의 E:T 비율로 단리된  $\lambda \sigma$  T세포의 독성을 나타낸다.

[0167] 실시예 4-항체-시알리다제 접합체를 사용한 향상된 ADCC의 기전

[0168] 이전의 연구들은 암세포의 과도한 시알릴화가 억제성 수용체, Siglec-7과 Siglec-9의 결합을 강화시킬뿐만 아니라 활성화 수용체 NKG2D의 결합을 감소시킴으로써 NK 매개 세포 독성을 감소시킨다는 것을 제안했다. 트라스투주맙-시알리다제 접합체를 사용하여 증가된 ADCC의 기전을 탐색하기 위해, ADCC의 배수 증가는 다양한 유방암 세포주에서의 수용체 결합과 상관 관계가 있었다. NK-매개 ADCC의 가장 높은 증가를 갖는 세포주는 Siglec-7 및 Siglec-9 결합의 최고 수준과 상관 관계가 있다(도 12c-12e). Siglec-7 및 Siglec-9 표면 리간드의 가장 높은 발현을 보이는 BT-20 및 ZR-75-1 세포를 트라스투주맙-시알리다제 접합체로 처리하면 트라스투주맙 단독 투여에 비해 ADCC가 2 배 이상 향상되었다. 대조적으로, 상기 접합체는 Siglec-7 및 Siglec-9 표면 리간드의 최저 발현을 갖는 MDA-MB-453 세포의 ADCC에서 무의미한 개선을 제공하였다. 항-Her2-IgG-Sia가 활성화 수용체 NKG2D와의 상호 작용의 향상과 함께 억제 수용체인 Siglec-7 및 Siglec-9의 결합 감소를 통해 ADCC를 향상시키고 있음을 추가로 실체화하기 위해, Siglec-7, Siglec-9 및 NKG2D에 대한 차단 항체가 사용되어 리간드-수용체 상호 작용을 특이적으로 차단하였다. 5  $\mu$ g/mL의 항-Siglec-7과 항-Siglec-9 항체는 항-Her2-IgG를 사용한 BT-20 세포에 대한 NK 세포의 세포 독성을 현저히 증가시켰지만 항-Her2-IgG와 시알리다제의 혼합물에서는 그렇지 않았다(도 15). 또한, NKG2D 수용체의 차단은 항-Her2-IgG-매개 ADCC와 비교하여 항-Her2-IgG 및 시알리다제의 혼합물로 처리된 세포에서 ADCC에 더 큰 효과를 나타냈다 (도 15).

[0169] 도 15는 4:1의 E/T 비율로 5  $\mu$ g/mL 차단 항-NKG2D (클론 149810), 항-Siglec-7 (클론 S7.7), 항-Siglec-9 (클론 S9), 항-Siglec-7(클론 S7.7)과 항 Siglec-9(클론 S9)의 혼합물, 또는 마우스 IgG1 아이소 타입 항체(클론 MOPC-21)의 부재 또는 존재 하에, 항-Her2-IgG(30nM) 또는 항 Her2-IgG(30nM) 및 시알리다제 (30nM)의 혼합물을 사용한 BT-20 세포에 대한 건강한 공여자로부터의 단리된 말초 혈액 NK 세포의 세포 독성에 관한 결과를 나타낸다. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , ns : 유의하지 않음.

[0170] 실시예 5-항체-시알리다제 접합체와 항체 단독의 비교

[0171] 항 HER2-IgG단독과 대비하여, ADCC를 유도하는 항 HER2-IgG-Sia의 능력을 직접적으로 비교하기 위해, 세포 독성에 대한 용량 반응을 하기의 네 개의 다른 유방암 세포주를 사용하여 측정하였다: SKBR3을 (HER2 3+), ZR-75-1(HER2 1+), BT-20(HER2 1+), MDA-MB-468(HER2 0). 항 Her2-IgG와 비교하여, 항-Her2-IgG-Sia는 E/T 비가 4 인 세 가지 HER2-발현 세포주 모두에서 더 큰 세포 독성이 있다. HER2 3+ 세포주의 경우, 항 HER2-IgG-Sia( $EC_{50}$ 이 76  $\pm$  14 pM)가 SKBR3 세포를 죽였는데, 항 HER2-IgG( $EC_{50}$ 이 177  $\pm$  54 pM)보다 약간 좋았다. HER2 1+ 세포주 ZR-75-1 및 BT-20과 관련하여, 항 HER2-IgG-Sia가 항 HER2-IgG보다 ~10 배 더 많은 세포 독성을 나타냈다( ZR-75-1 세포 : 항 Her2-IgG-Sia  $EC_{50}$  135  $\pm$  47pM, 항 Her2-IgG  $EC_{50}$  1143  $\pm$  274pM, BT-20 세포: 항 Her2-IgG-Sia  $EC_{50}$  170  $\pm$  34pM, 항 Her2-IgG  $EC_{50}$  1,823  $\pm$  850 PM) (도 12g~12j 및 표 6). HER2 음성 세포주인 MDA-MB-468의 용해가 항-Her2-IgG 또는 항-Her2-IgG-Sia에서 관찰되지 않았다(도 12j). 이어서, 항 HER2-IgG-Sia와 항 HER2-IgG와 미접합된 시알리다제의 혼합물(항 HER2-의 IgG/시알리다제)의 혼합물을 시험하였다. 항 HER2-IgG-Sia는 SKBR3 세포(항 HER2-IgG-Sia  $EC_{50}$  76  $\pm$  14 pM; 항 HER2-IgG/시알리다제  $EC_{50}$  136  $\pm$  52 pM), ZR-75-1 세포(항 Her2-IgG-Sia  $EC_{50}$  135  $\pm$  47pM; 항 Her2-IgG/시알리다제  $EC_{50}$  492  $\pm$  67pM ) 및 BT-20 세포 (항 Her2-IgG-시아  $EC_{50}$  170  $\pm$  34 pM; 항 HER2-의 IgG/ 시알리다제  $EC_{50}$  692  $\pm$  156 PM)에서 더 낮은  $EC_{50}$  보였다(표 6). 항 HER2-IgG 및 미접합된 시알리다제의 혼합물 대비, 상기 접합체의 향상된 효능은 효소 활성의 근접 효과의

증거이다.

[표 6]

항-Her2-IgG, 항 Her2-IgG 및 시알리다제의 혼합물, 또는 항 Her2-IgG-Sia 접합체에 의해 유도된 다양한 인간 유방암 세포에 대한 단리된 NK 세포의 세포 독성 활성. (ND는 탐지되지 않음을 뜻함).

세포주	HER2 수준	EC <sub>50</sub> (pM) / 최대 살해(%)		
		항-Her2-IgG	항-Her2-IgG/시알리다제	항-Her2-IgG-Sia
SKBR3	3+	177±54 / 61±3	136±52 / 64±4	76±14 / 66±2
HCC-1954	3+	360±67 / 46±2	212±50 / 46±2	238±41 / 49±2
MDA-MB-453	2+	110±27 / 71±3	77±17 / 78±3	22±5 / 75±2
ZR-75-1	1+	1143±274 / 14±1	492±67 / 34±1	135±47 / 34±2
BT-20	1+	1823±850 / 21±1	692±156 / 51±2	170±34 / 46±1
MDA-MB-231	1+	N.D. / 6±1	N.D. / 10±1	N.D. / 10±1
MDA-MB-468	-	N.D. / 2±1	N.D. / N.D.	N.D. / 3±1

실시에 6-시알리다제 처리가 리톡시맙으로 유도된 CDC를 증강시킨다

Daudi 또는 Ramos 세포주인 B 세포 림프종 세포를 시알리다제 또는 PBS 대조군으로 37 °C에서 1시간 동안 처리하여 세포 표면을 탈시아릴화한 다음, 정상적인 인간 혈청(1: 4, 보체 단백질로 보충) 및 리톡시맙(10 µg / ml)을 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 37°C에서 배양되도록 방치하였다. 상청액을 수집하고 세포 살해(세포 독성)를 용균된 세포로부터의 LDH 방출을 측정하는 키트를 사용하여 측정된 다음, 완전히 세제로 용해된 세포('100% 살해(killing)' 표준)와 비교하였다. 도 17: SiaSe: 시알리다제로 처리된 세포, 리톡시맙 없음. 리톡산(리톡산): PBS로 처리된 10 µg/mL 리톡시맙. SiaSe + 리톡산 : 시알리다제로 처리된 10 µg / mL 리톡시맙. \* p < 0.05

Daudi 세포는 리톡시맙으로 유도된 보체 의존성 세포 독성(CDC)이 ~10% 증가한다. 반면 Ramos는 탈시아릴화 후 거의 2 배의 CDC를 경험하였다.

실시에 7-Ramos 세포는 Daudi 세포보다 Siglec-9 리간드의 수준이 더 높다.

앞의 예제에서 Ramos 세포에서 보여지는 탈시아릴화에 의한 CDC에 대한 더 큰 효과는 더 높은 초기 시알릴화에 의해 설명될 수 있다.

Siglec-Fc 융합 단백질을 5 µg/ml Sig-FC 및 4 µg/ml 항Fc 보조에서 사전 착화시키고, 이어서 4 °C에서 30 분 동안 세포와 함께 배양하였다. 이어서 세포를 3회 세척하고 유동 세포 계측법을 수행하였다. 별도로, 세포가 항-Fc 이차 항체(동일한 4 µg/ml) 로 처리한 다음, 상기와 같이 세척한 후, 유동 세포 계측을 수행하였다. Siglec-Fc 융합체로 처리된 세포의 형광이 2 차적으로 처리된 세포에 비해 증가하는 것은 결합이 Siglec-Fc 단백질 덕분이지, 제2차 시약 때문이 아님을 시사한다.

도 18은 Daudi 및 Ramos 세포주의 3 차례 실험 복제물의 Siglec-9-Fc 결합의 평균 +/-표준 편차를 도시한다. Ramos 세포는 ~ 25% 이상의 Siglec-9 결합을 보여줌으로써, 그들의 세포 표면에 더 많은 시알산을 전시한다.

실시에 8-시알리다제가 보체-의존성 방식으로 리톡시맙을 증강시킨다

보체 단백질 C1q는 보체 의존성 세포 독성의 '고전 경로'의 중요한 시작 요소이다. 이것은 표적 세포 상에 항체를 결합시키는 C1 접합체를 형성하는 데 도움을 주고, 이어서 세포 살해를 유도하는 보체 캐스케이드를 시작한다. 도 19에 도시된 바와 같이, C1q없이, 시알리다제 및/또는 리톡시맙은 세포를 효율적으로 용해시키지 않는다. 이 데이터는 시알리다제 치료가 고전 경로를 통해 리톡시맙으로 유도된 CDC를 강화한다는 것을 시사한다. 이들 실험은 도 17에서와 같이 수행하였으나, 빨간 막대의 경우, 정상적인 인간 혈청 대신에 C1q가 고갈된 혈청을 첨가하였다. 파란색 막대는 정상적인 사람 혈청으로 처리된 세포를 나타낸다. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

면역 시냅스에 미치는 항체-시알리다제 접합체의 효과

이전 연구에서 Siglec-7은 NK 표적 세포 면역 시냅스에 모집되어 면역 수용체 티로신계 저해 모티브(ITIM)를 통해 억제 신호를 유도한다는 것이 입증되었다. 면역 시냅스에 미치는 접합된 시알리다제의 효과를 평가하기 위해, 면역 시냅스를 ADCC 동안 영상화하였다. SKBR3 세포를 항 Her2-IgG 또는 항 Her2-IgG-Sia와 미리 배양한 다음, 정제된 사람 말초 혈액 NK 세포와 함께 배양하여 시냅스 형성을 유도하였다. 이어서, 세포를 Siglec-7, HER2, Fc γ (CD16)에 대해 고정 및 염색하고, 형광 현미경으로 영상화하였다. 항-Her2-IgG 치료로, Siglec-7은 NK 세포로 형성된 면역 학적 시냅스에서 Fc γ (CD16)와 공-위치하며, 이것은 NK 세포 활성화의 억제 수용체로서

의 역할과 일치한다(도 12k). 대조적으로, 항 Her2-IgG-Sia로 처리된 SKBR3 세포는 CD16의 효율적인 모집에도 불구하고 Siglec-7의 모집이 거의 보이지 않는다. 이러한 결과는 트라스투주맙-시알리다제 접합체가 ADCC를 촉진시키면서 면역-암세포 시냅스를 효과적으로 재형성함을 시사한다.

- [0186] 여기, ADCC에 대한 감수성을 향상시키기 위해 조직 특이적 세포 표면 글리칸 편집을 수행할 수 있는 새로운 부류의 접합체가 보고된다. 상기 접합체는 다중 면역 자극 경로를 동시에 표적으로 하는 단일 항체 요법의 첫 번째 수단을 제공한다. 항체-시알리다제 접합체로의 종양 세포의 치료는 Fc-Fc $\gamma$  (CD16) 상호 작용을 통해 NK 세포를 적극적으로 모집할뿐만 아니라, 또한 종양 면역 시냅스에 억제성 Siglec 수용체를 효과적으로 억제하고 정확한 글리코칼릭스 편집을 통해 활성화 NKG2D 리간드를 노출시킨다. 트라스투주맙 치료에 비해, 신규한 트라스투주맙-시알리다제 접합체는 효율적으로 NK 세포가 HER2-발현 암 세포를 죽이도록 지시할 수 있고, 심지어 항원이 풍성하지 않은 유방암 세포를 표적으로 하는 데 더욱 효율적이다. 이것은 트라스투주맙이 현재 매우 높은 HER2 발현 수준을 지닌 환자에게만 처방되므로 중등도의 HER2 발현 종양을 치료할 수 있는 능력에 중요한 의미가 있다.
- [0187] 주목할 만하게, 대식세포와 돌기 세포는 또한 억제성 Siglecs (각각 Siglec-9와-5)를 발현한다. 따라서, 과도한 시알릴화는 세포와 보체 인자에 의한 타고난 면역 표적화에 대해 광범위하게 보호될 수 있다.
- [0188] 단일 암 경로를 목표로 하는 현재의 암 면역 요법과는 달리, 글리코칼릭스 편집은 면역 체계의 군비의 여러 지점을 걸쳐 여러 경로에 영향을 미칠 수 있다.
- [0189] 첨부된 청구 범위에도 불구하고, 본 개시는 다음 조항에 의해 정의된다 :
- [0190] 1. 하기를 포함하는 접합체:
- [0191] 표적 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티; 및
- [0192] 표적 세포 표면 편집 효소.
- [0193] 2. 제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 항체, 리간드, 앵타머, 나노 입자 및 소분자로 이루어진 군에서 선택되는 것인 접합체.
- [0194] 3. 제2항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 항체인 것인 접합체.
- [0195] 4. 제3항에 있어서, 상기 항체가 IgG, 단일 사슬 Fv(scFv), Fab, (Fab)<sub>2</sub>, 또는 (scFv')<sub>2</sub>인 것인 접합체.
- [0196] 5. 제3항에 있어서, 상기 항체가 IgG1인 것인 접합체.
- [0197] 6. 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 단클론 항체인 것인 방법.
- [0198] 7. 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간화된 또는 인간 항체인 것인 방법.
- [0199] 8. 제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 상기 항체의 경쇄에 접합된 것인 접합체.
- [0200] 9. 제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 상기 항체의 중쇄에 접합된 것인 접합체.
- [0201] 10. 제9항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 항체의 Fc 영역에 접합된 것인 접합체.
- [0202] 11. 제9항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 중쇄의 C-말단에 접합된 것인 접합체.
- [0203] 12. 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 상기 표적화 모이어티에 자리 특이적으로 접합된 것인 접합체.
- [0204] 13. 제12항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 자리 특이적으로 접합되는 비-천연 아미노산을 포함하는 것인 접합체.
- [0205] 14. 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 링커를 통해 상기 표적화 모이어티에 접합된 것인 접합체.
- [0206] 15. 제14항에 있어서, 상기 링커가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 것인 접합체.
- [0207] 16. 제14항에 있어서, 상기 링커가 펩티드인 것인 접합체.

- [0208] 17. 제16항에 있어서, 상기 접합체가 융합 단백질인 것인 접합체.
- [0209] 18. 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포가 암 세포, 면역 세포 및 내피 세포로 이루어진 군에서 선택된 것인 접합체.
- [0210] 19. 제18항에 있어서, 상기 표적 세포가 암 세포인 것인 접합체.
- [0211] 20. 제19항에 있어서, 상기 세포 표면 분자가 종양-관련 세포 표면 분자인 것인 접합체.
- [0212] 21. 제19항에 있어서, 상기 세포 표면 분자가 종양-특이적 세포 표면 분자인 것인 접합체.
- [0213] 22. 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암 세포가 암종 세포인 것인 접합체.
- [0214] 23. 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암 세포가 유방암 세포, 난소 암 세포, 위암 세포 및 대장 암세포로 이루어진 군에서 선택된 것인 접합체.
- [0215] 24. 제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 세포 표면 분자가 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)인 것인 접합체.
- [0216] 25. 제24항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 트라스투주맙인 것인 접합체.
- [0217] 26. 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 세특시맙, 다라투무맙, 기렌특시맙, 파니투무맙, 오파투무맙 및 리툽시맙으로 이루어진 군에서 선택된 것인 접합체.
- [0218] 27. 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 상기 표적 세포의 표면 분자를 절단하거나, 상기 표적 세포의 표면 분자를 산화시키거나, 상기 표적 세포의 표면 분자를 축소시키거나, 상기 표적 세포의 표면 분자에 모이어티를 첨가하거나, 또는 상기 표적 세포의 표면 분자에서 모이어티를 제거하는 것인 접합체.
- [0219] 28. 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 상기 표적 세포의 표면 분자를 절단하는 것인 접합체.
- [0220] 29. 제28항에 있어서, 상기 표적 세포의 표면 분자가 리간드인 것인 접합체.
- [0221] 30. 제29항에 있어서, 상기 리간드가 면역 억제성 수용체의 리간드인 것인 접합체.
- [0222] 31. 제30항에 있어서, 면역 억제성 수용체가 자연살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로 이루어진 군에서 선택된 면역 세포 상에 존재하는 것인 접합체.
- [0223] 32. 제31항에 있어서, 면역 억제성 수용체가 시알산-결합 Ig 유사 렉틴(Siglec) 수용체인 것인 접합체.
- [0224] 33. 제32항에 있어서, 상기 Siglec 수용체가 Siglec 7인 것인 접합체.
- [0225] 34. 제32항에 있어서, 상기 Siglec 수용체가 Siglec 9인 것인 접합체.
- [0226] 35. 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드가 시알로글리칸인 것인 접합체.
- [0227] 36. 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 시알리다제인 것인 접합체.
- [0228] 37. 제36항에 있어서, 상기 시알리다제가 *퀴티푸스균* 시알리다제인 것인 접합체.
- [0229] 38. 제36항에 있어서, 상기 시알리다제가 *콜레라균* 시알리다제인 것인 접합체.
- [0230] 39. 제36항에 있어서, 상기 시알리다제가 포유류 뉴라미니다제인 것인 접합체.
- [0231] 40. 제39항에 있어서, 상기 포유류 뉴라미니다제가 인간 뉴라미니다제인 것인 접합체.
- [0232] 41. 제40항에 있어서, 상기 인간 뉴라미니다제가 인간 뉴라미니다제(1), 인간 뉴라미니다제(2), 인간 뉴라미니다제(3), 및 인간 뉴라미니다제(4)로 이루어진 군에서 선택된 것인 접합체.
- [0233] 42. 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티에 접합된 두 개 이상의 대상 세포 표면 편집 효소를 포함하는 접합체.
- [0234] 43. 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 접합체; 및
- [0235] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0236] 44. 제43항에 있어서, 상기 조성물이 비경구 투여용으로 제형화된 것인 조성물.



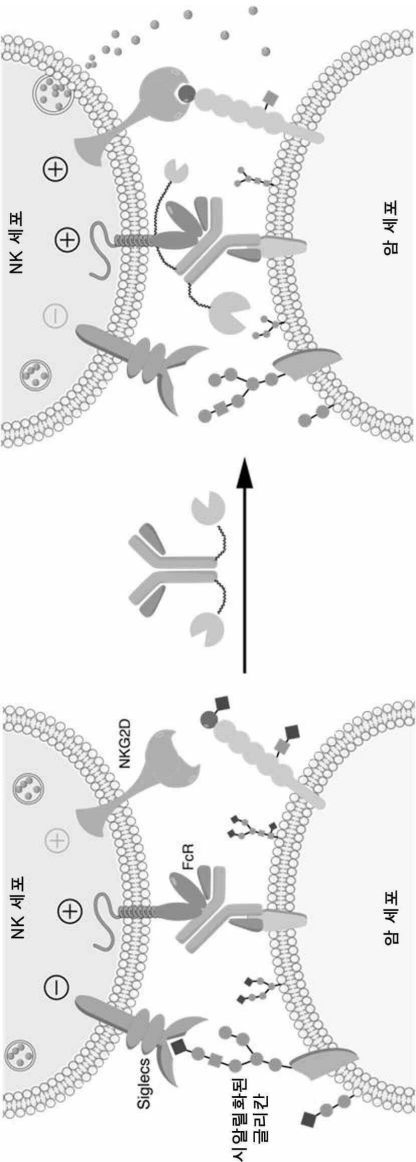
- [0237] 45. 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 집합체 또는 제43항 또는 제44항의 조성물을, 그것을 요구하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0238] 46. 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 집합체 또는 제43항 또는 제44항의 조성물을, 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.
- [0239] 47. 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 집합체 또는 제40항 또는 제41항의 조성물을, 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)을 요구하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 ADCC향상 방법.
- [0240] 48. 제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 개체에게서 면역 경로를 변조하는 것인 방법.
- [0241] 49. 제48항에 있어서, 상기 면역 경로가 면역 억제성 수용체 경로, 보체 경로, 쌍을 이룬 면역 글로불린 유사 제 2 형 수용체 (PILR) 경로 및 자연살해 2군 구성원 D 단백질(NKG2D) 경로로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.
- [0242] 50. 제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포가 그것의 표면 상에 리간드를 포함하고, 상기 투여가 상기 표적 세포 표면 편집 효소에 의한 리간드의 편집을 초래하는 것인 방법.
- [0243] 51. 제50항에 있어서, 상기 리간드의 편집이 상기 리간드의 전부 또는 일부분의 절단을 포함하는 것인 방법.
- [0244] 52. 제50항 또는 제51항에 있어서, 상기 리간드가 면역 억제성 수용체의 리간드인 것인 방법.
- [0245] 53. 제52항에 있어서, 상기 면역 억제성 수용체가 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로 이루어진 군에서 선택된 면역 세포 상에 존재하는 것인 방법.
- [0246] 54. 제53항에 있어서, 상기 면역 억제성 수용체가 시알산-결합 Ig-유사 렉틴(Siglec) 수용체인 것인 방법.
- [0247] 55. 제54항에 있어서, 상기 Siglec 수용체가 Siglec 7인 것인 방법.
- [0248] 56. 제54항에 있어서, 상기 Siglec 수용체가 Siglec 9인 것인 방법.
- [0249] 57. 제50항 내지 제56항에 있어서, 상기 리간드가 시알로글리칸인 것인 방법.
- [0250] 58. 제57항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 시알리다제인 것인 방법.
- [0251] 59. 제58항에 있어서, 상기 시알리다제가 *퀴티푸스균* 시알리다제인 것인 방법.
- [0252] 60. 제58항에 있어서, 상기 시알리다제가 *콜레라균* 시알리다제인 것인 방법.
- [0253] 61. 제58항에 있어서, 상기 시알리다제가 포유류 뉴라미니다제인 것인 방법.
- [0254] 62. 제61항에 있어서, 상기 포유류 뉴라미니다제가 인간 뉴라미니다제인 것인 방법.
- [0255] 63. 제62항에 있어서, 상기 인간 뉴라미니다제가 인간 뉴라미니다제(1), 인간 뉴라미니다제(2), 인간 뉴라미니다제(3) 및 인간 뉴라미니다제(4)로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.
- [0256] 64. 제50항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소에 의한 리간드의 편집이 표적 세포 표면의 NKG2D 리간드에 결합하는 자연 살해 2군 구성원 D 단백질(NKG2D)을 증가시킴으로써 자연 살해 (NK) 세포 활성을 향상시키는 것인 방법.
- [0257] 65. 제45항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 각 개체가 암을 갖는 것이고, 상기 집합체가 상기 개체의 암 세포의 표면 상의 종양-관련 세포 표면 분자 또는 종양 특이적 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티를 포함하는 것인 방법.
- [0258] 66. 제65항에 있어서, 상기 암 세포가 암종 세포인 것인 방법.
- [0259] 67. 제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 암 세포가 유방암 세포, 난소 암 세포, 위암 세포 및 결장암 세포로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.
- [0260] 68. 제66항 또는 제67항에 있어서, 상기 세포 표면 분자가 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)인 것인 방법.
- [0261] 69. 제68항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 트라스투주맙인 것인 방법.
- [0262] 70. 제45항 내지 제63항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 세톡시맙, 다라투무맙, 기렌톡시맙, 파니투무맙, 오

파투무맙 및 리톡시맙으로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.

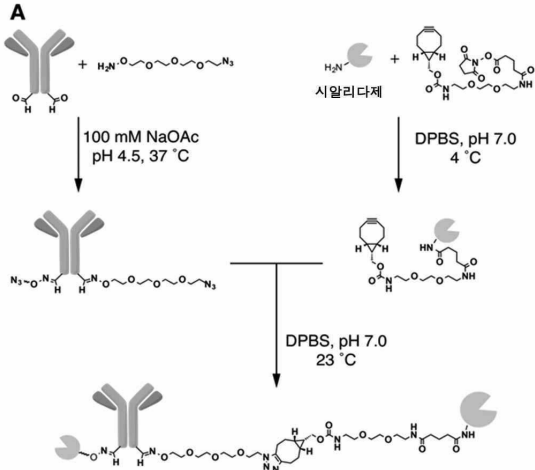
- [0263] 71. 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 접합체 또는 제43항 또는 제44항의 조성물을 포함하는 키트.
- [0264] 72. 제71항에 있어서, 상기 키트가 하나 이상의 단위 투여량으로 접합체 또는 조성물을 포함하는 것인 키트.
- [0265] 73. 제72항에 있어서, 상기 키트가 둘 이상의 단위 투여량으로 접합체 또는 조성물을 포함하는 것인 키트.
- [0266] 74. 제71항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체 또는 조성물을 사용하여 이들을 요구하는 개체를 치료하기 위한 설명서를 포함하는 키트.
- [0267] 75. 제74항에 있어서, 상기 개체가 암을 가지고, 상기 설명서가 접합체 또는 조성물의 치료학적 유효량을 상기 개체에게 투여하여 암을 치료하기 위한 것인 키트.
- [0268] 76. 표적 세포 표면 편집 효소를 표적 세포의 표면 상의 세포 표면 분자에 결합하는 표적화 모이어티에 접합시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0269] 77. 제76항에 있어서, 상기 접합이 표적 세포 표면 편집 효소를 표적화 모이어티에 자리 특이적으로 접합시키는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0270] 78. 제77항에 있어서, 상기 접합이 상기 표적 세포 표면 편집 효소를 상기 표적화 모이어티의 비 천연 아미노산에 자리 특이적으로 접합시키는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0271] 79. 제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 링커를 통해 상기 표적화 모이어티에 접합되는 것인 방법.
- [0272] 80. 제79항에 있어서, 상기 링커가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 것인 방법.
- [0273] 81. 제79항에 있어서, 상기 링커가 펩티드인 것인 방법.
- [0274] 82. 제81항에 있어서, 상기 접합체가 융합 단백질인 것인 방법.
- [0275] 83. 제76항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포 표면 편집 효소가 시알리다제이고 상기 표적화 모이어티가 항체인 것인 방법.
- [0276] 84. 제83항에 있어서, 상기 항체가 항-HER2 항체인 것인 방법.
- [0277] 85. 제84항에 있어서, 상기 항체가 트라스투자맙인 것인 방법.
- [0278] 86. 제83항에 있어서, 상기 항체가 세톡시맙, 다라투무맙, 기렌톡시맙, 파니투무맙, 오파투무맙 및 리톡시맙으로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.
- [0279] 87. 제82항의 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.
- [0280] 88. 제87항의 핵산에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터.
- [0281] 89. 제87항의 핵산 또는 제 88항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0282] 90. 제89항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 숙주 세포인 것인 숙주 세포.
- [0283] 따라서 전술한 내용은 단순히 본 발명의 원리를 예증한다. 이 기술 분야의 숙련가는 본원에 명시적으로 기술되거나 도시되지 않았지만 본 발명의 원리를 구현하고, 그 취지 및 범위 내에 포함되는 다양한 응용을 고안할 수 있을 것이다. 또한 본원에 언급된 모든 예시 및 조건부 주장들은 기본적으로 독자들이 본 발명의 원리와 본 발명자들이 이 분야를 발전시키는 데 기여한 개념을 이해할 수 있도록 돕기 위한 것이며, 구체적으로 인용된 그런 예시와 조건에 한정됨이 없이 해석해야 한다. 또한 본 발명의 원리, 양태 및 구현예와 그것의 구체적인 실시예를 설명하는 본원의 모든 서술은 그것의 구조적 및 기능적 균등물 모두를 포함한다. 또한 그런 균등물에는 현재 알려진 균등물 및 향후 개발되는 것, 즉 구조와 관계 없이 동일한 기능을 제공하는 개발 요소들이 모두 포함된다. 따라서 본 발명의 범위는 여기에 도시되고 기술된 예시적 구현예에 한정되지 않는다. 오히려 본 발명의 범위 및 취지는 다음에 의해 구체화된다.

도면

도면1



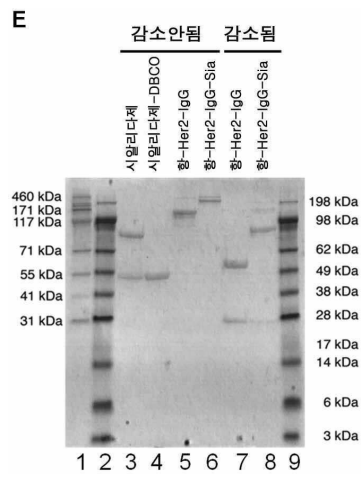
도면2a



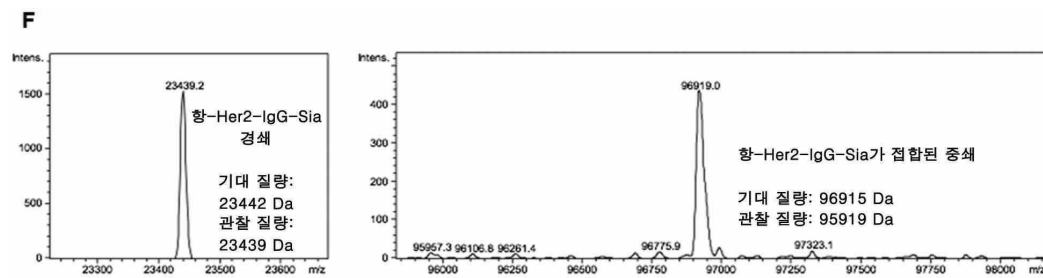




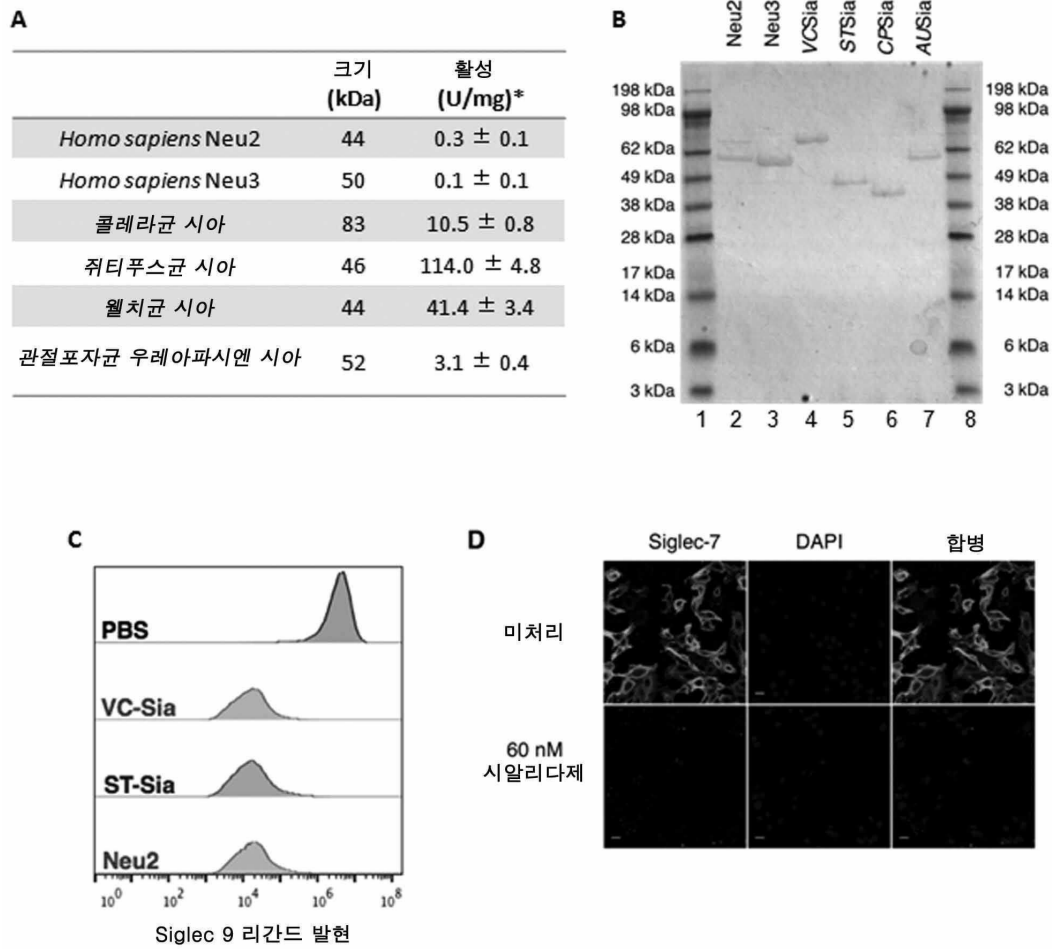
도면2e



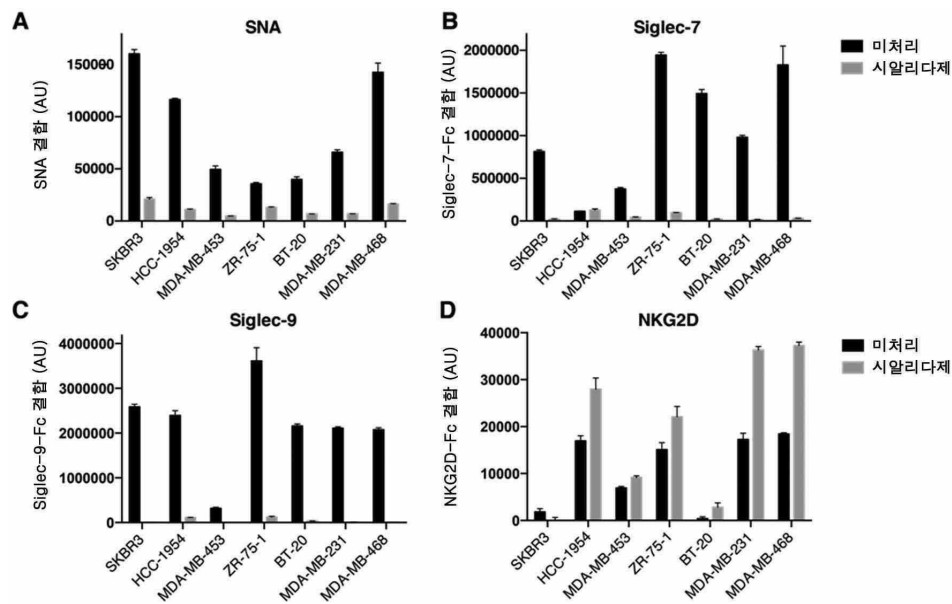
도면2f



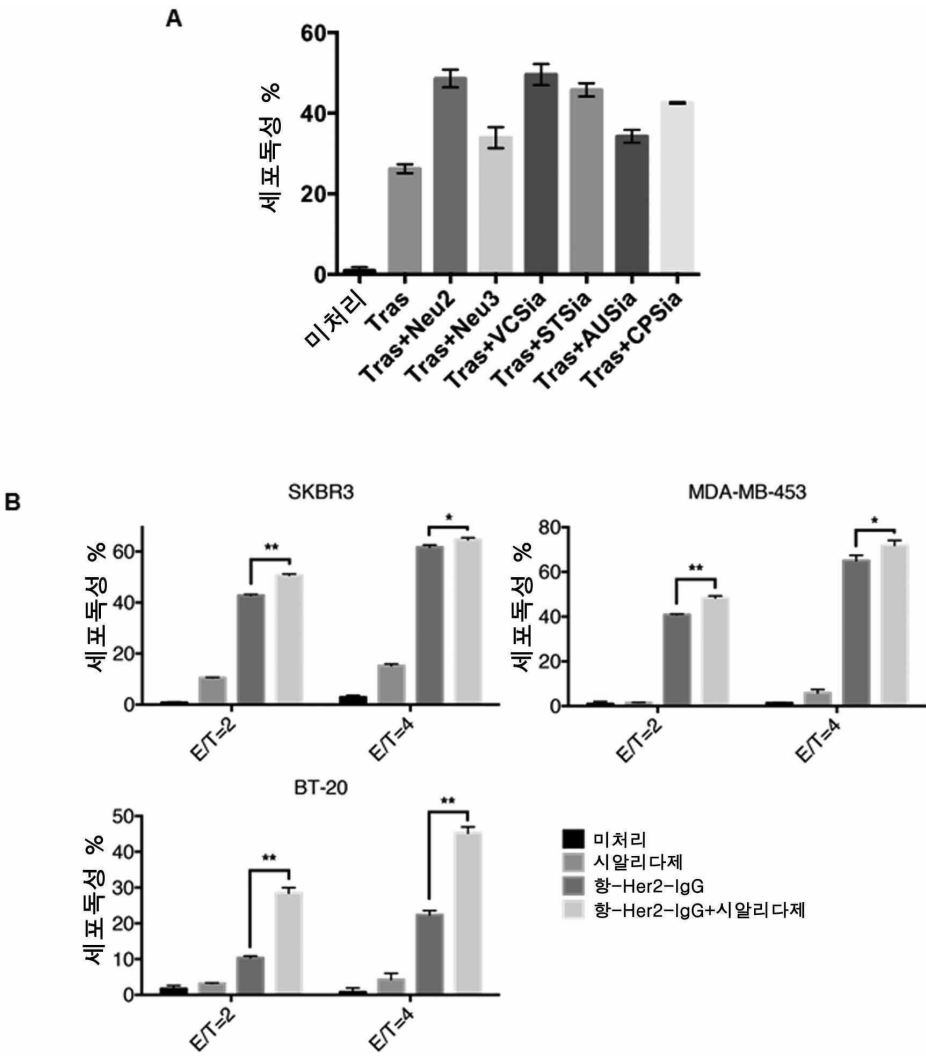
도면3



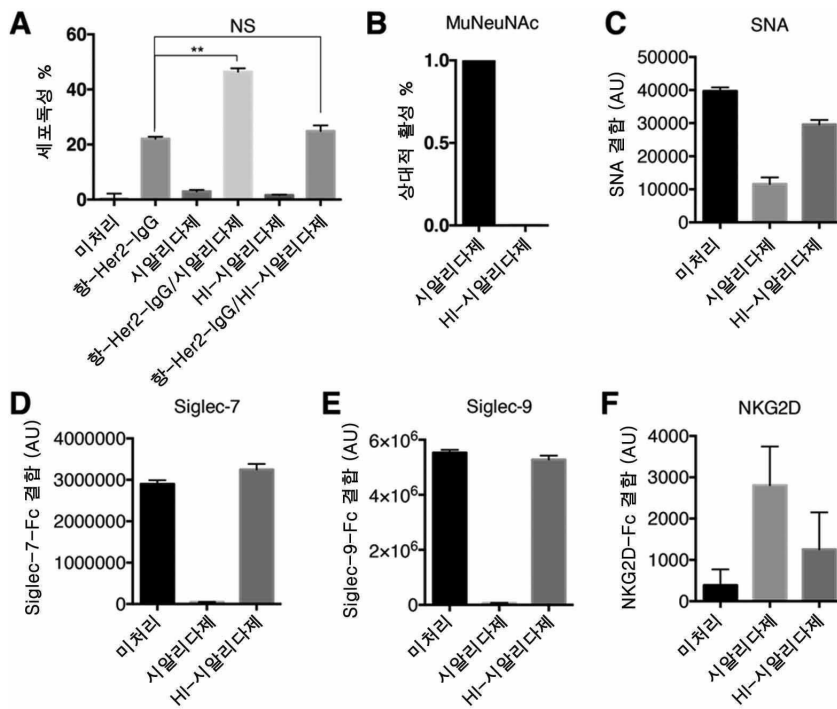
도면4



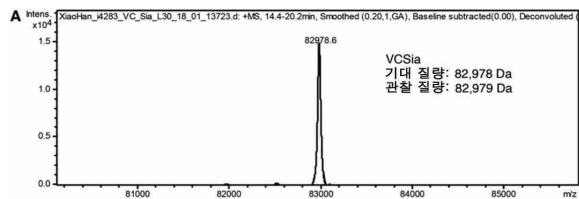
도면5



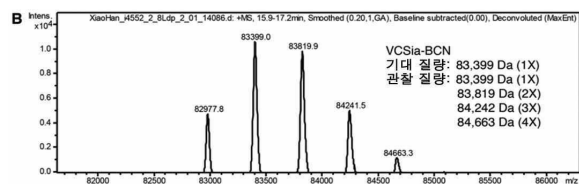
도면6



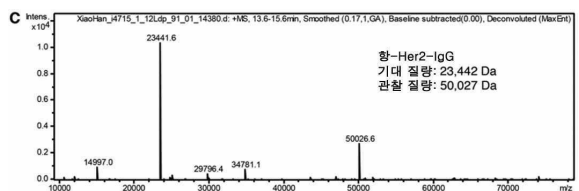
도면7a



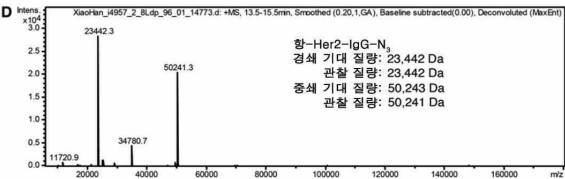
도면7b



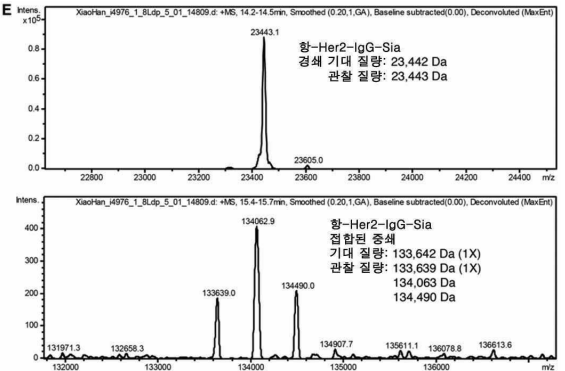
도면7c



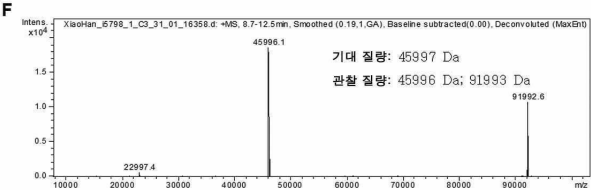
도면7d



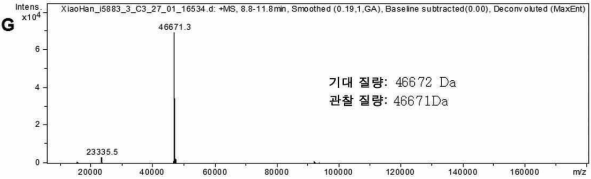
도면7e



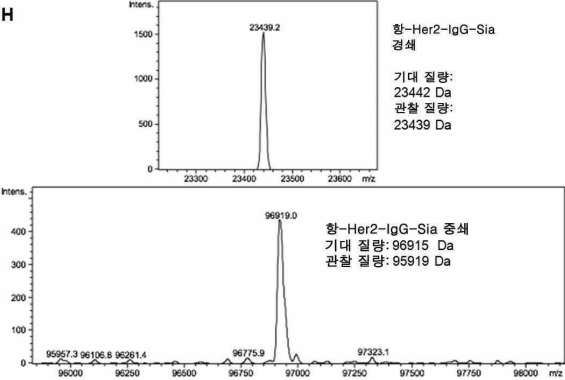
도면7f



도면7g

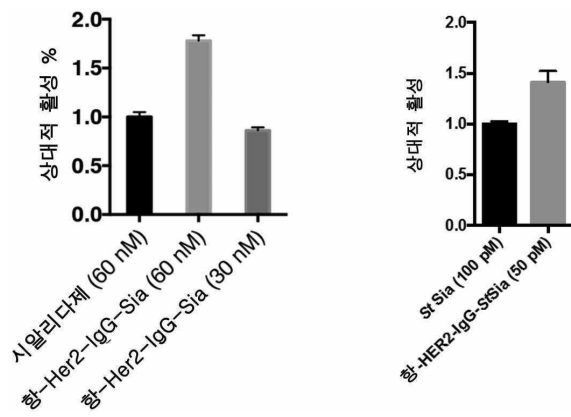


도면7h

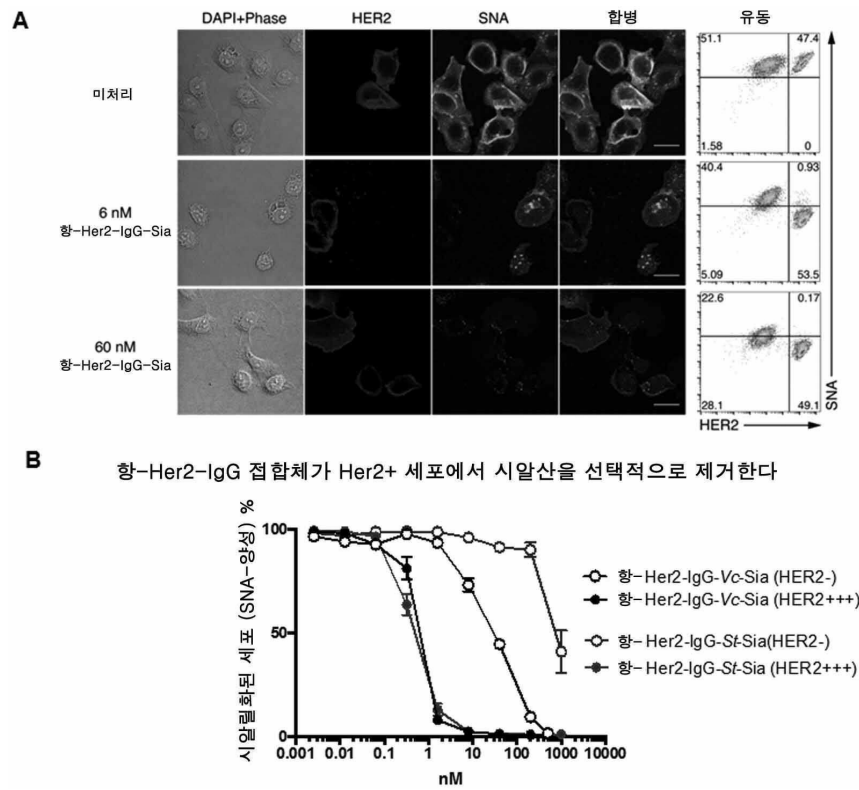




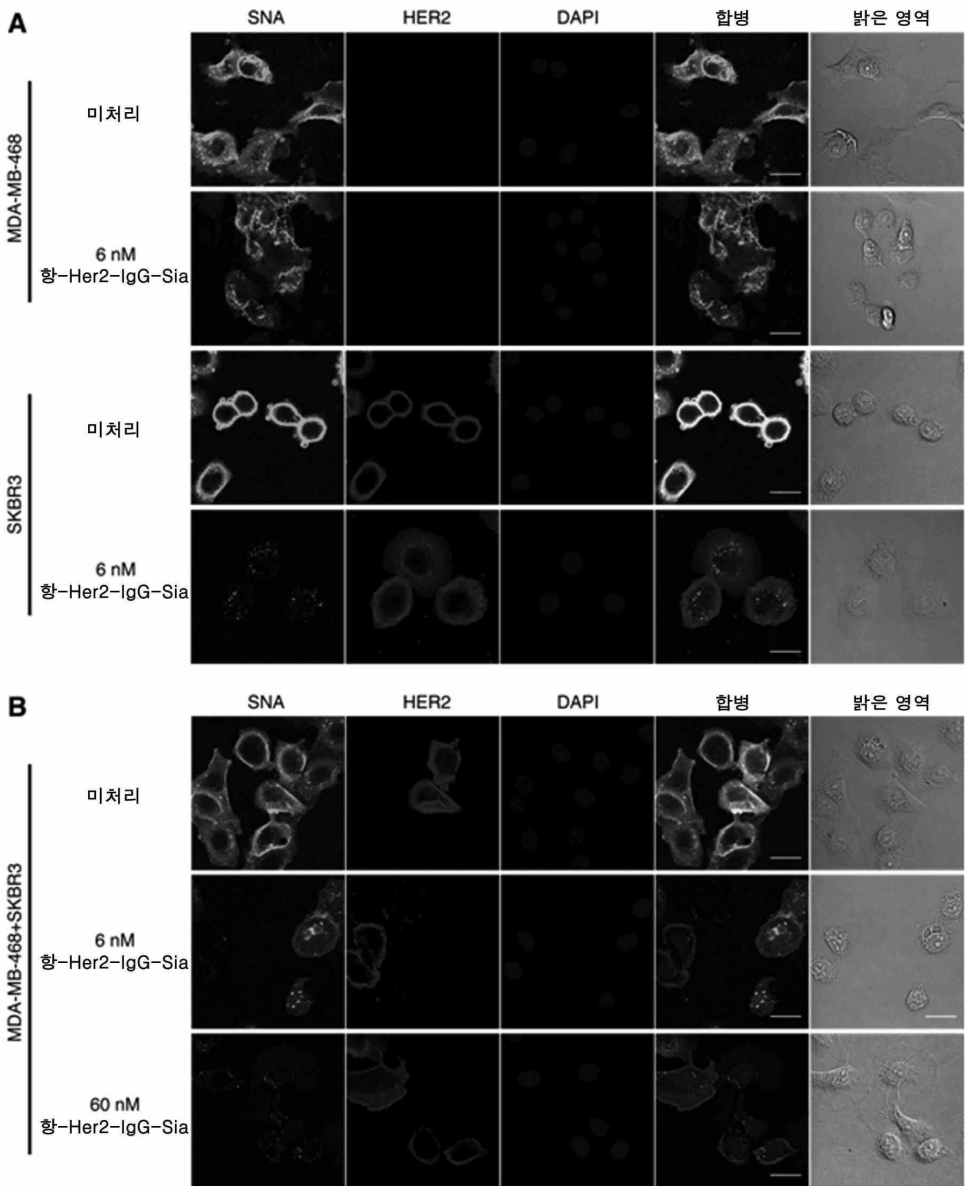
도면8



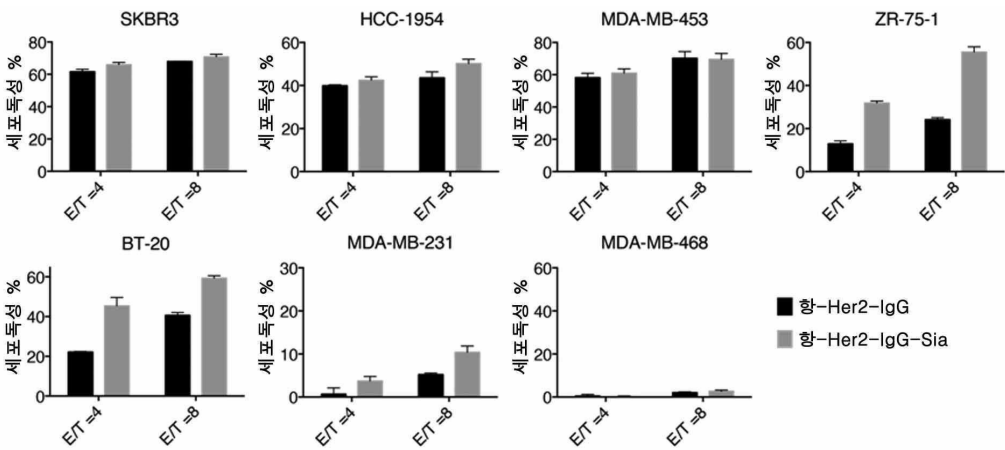
도면9



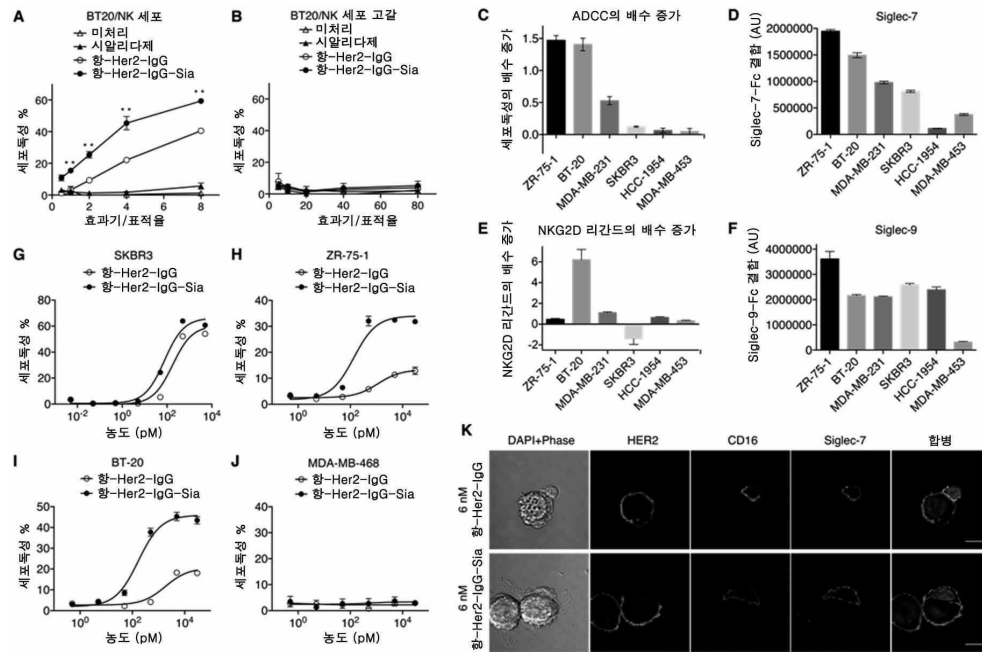
도면10



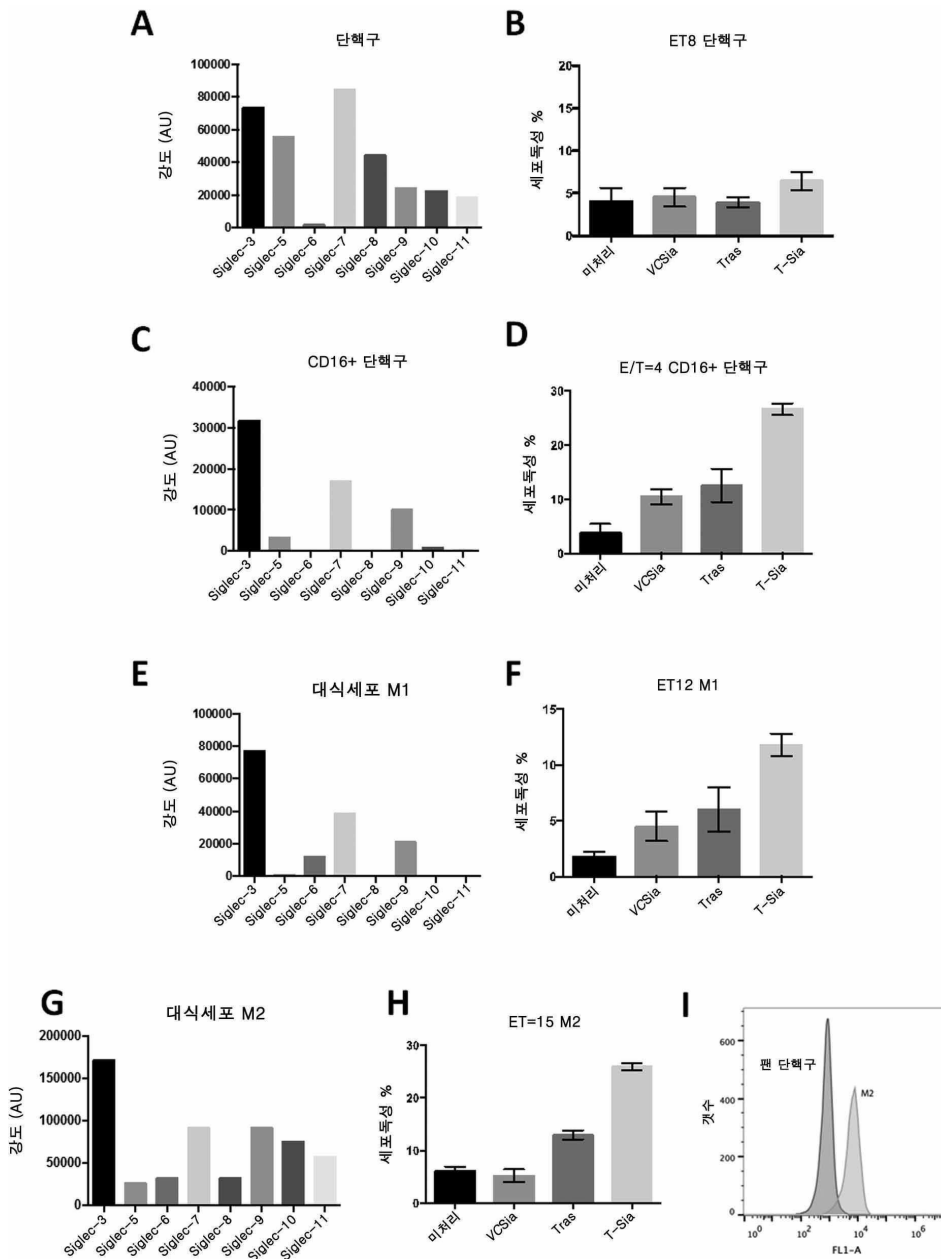
도면11



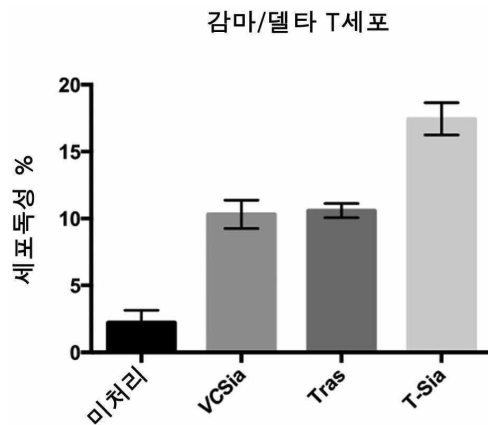
도면12



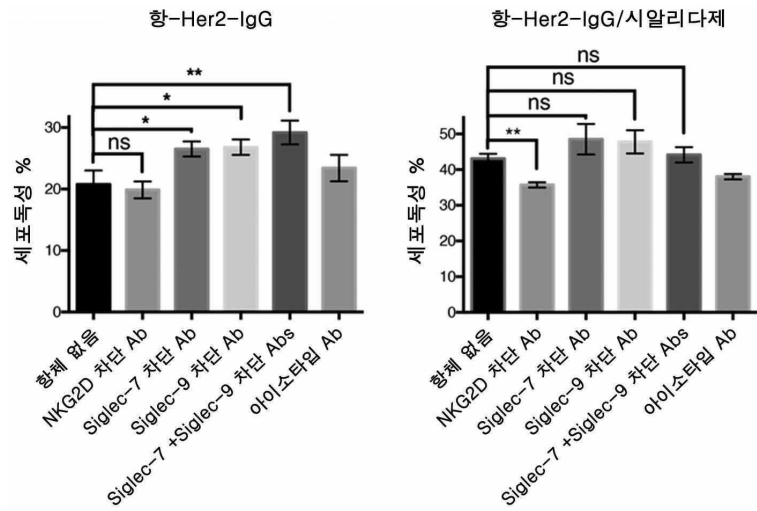
도면13



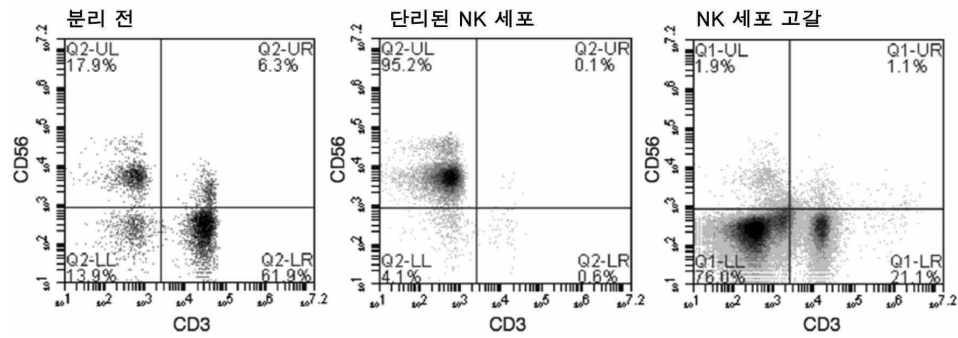
도면14



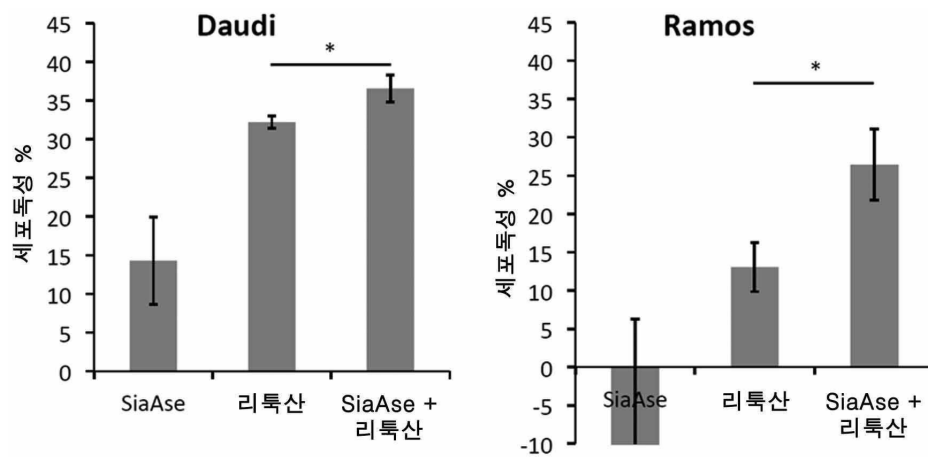
도면15



도면16

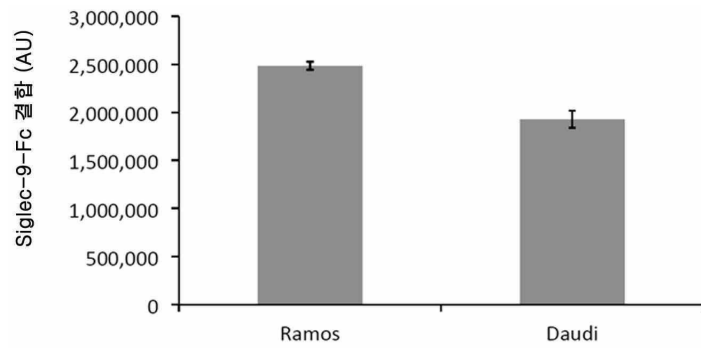


도면17

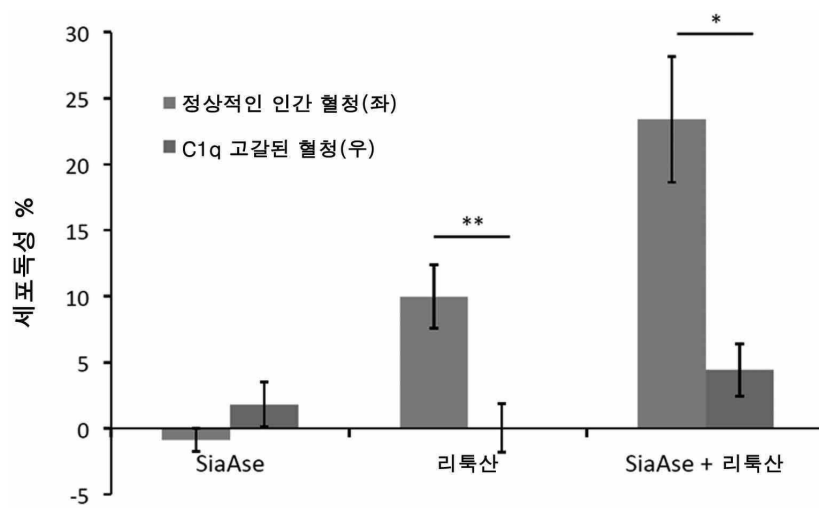




도면18



도면19



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Woods, Elliot C

Xiao, Han

Bertozzi, Carolyn R

Gray, Melissa

<120> CONJUGATES FOR TARGETED CELL SURFACE EDITING

<130> STAN-1302WO

<150> 62357645

<151> 2016-07-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 2

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 3

<211> 381

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium sialidase

<400> 3

Thr Val Glu Lys Ser Val Val Phe Lys Ala Glu Gly Glu His Phe Thr

1 5 10 15

Asp Gln Lys Gly Asn Thr Ile Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr

20 25 30

Lys Tyr Phe Arg Ile Pro Ala Met Cys Thr Thr Ser Lys Gly Thr Ile

35 40 45

Val Val Phe Ala Asp Ala Arg His Asn Thr Ala Ser Asp Gln Ser Phe

50 55 60

Ile Asp Thr Ala Ala Ala Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Asn

65 70 75 80

Lys Lys Ile Ala Ile Tyr Asn Asp Arg Val Asn Ser Lys Leu Ser Arg

85 90 95

Val Met Asp Pro Thr Cys Ile Val Ala Asn Ile Gln Gly Arg Glu Thr

100 105 110

Ile Leu Val Met Val Gly Lys Trp Asn Asn Asn Asp Lys Thr Trp Gly

115 120 125

Ala Tyr Arg Asp Lys Ala Pro Asp Thr Asp Trp Asp Leu Val Leu Tyr

130 135 140

Lys Ser Thr Asp Asp Gly Val Thr Phe Ser Lys Val Glu Thr Asn Ile

145 150 155 160

His Asp Ile Val Thr Lys Asn Gly Thr Ile Ser Ala Met Leu Gly Gly

165 170 175

Val Gly Ser Gly Leu Gln Leu Asn Asp Gly Lys Leu Val Phe Pro Val

180 185 190

Gln Met Val Arg Thr Lys Asn Ile Thr Thr Val Leu Asn Thr Ser Phe

195 200 205



Ile Tyr Ser Thr Asp Gly Ile Thr Trp Ser Leu Pro Ser Gly Tyr Cys  
210 215 220

Glu Gly Phe Gly Ser Glu Asn Asn Ile Ile Glu Phe Asn Ala Ser Leu  
225 230 235 240

Val Asn Asn Ile Arg Asn Ser Gly Leu Arg Arg Ser Phe Glu Thr Lys  
245 250 255

Asp Phe Gly Lys Thr Trp Thr Glu Phe Pro Pro Met Asp Lys Lys Val  
260 265 270

Asp Asn Arg Asn His Gly Val Gln Gly Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ser  
275 280 285

Gly Asn Lys Leu Val Ala Ala His Ser Ser Ala Gln Asn Lys Asn Asn  
290 295 300

Asp Tyr Thr Arg Ser Asp Ile Ser Leu Tyr Ala His Asn Leu Tyr Ser  
305 310 315 320

Gly Glu Val Lys Leu Ile Asp Asp Phe Tyr Pro Lys Val Gly Asn Ala  
325 330 335

Ser Gly Ala Gly Tyr Ser Cys Leu Ser Tyr Arg Lys Asn Val Asp Lys  
340 345 350

Glu Thr Leu Tyr Val Val Tyr Glu Ala Asn Gly Ser Ile Glu Phe Gln  
355 360 365

Asp Leu Ser Arg His Leu Pro Val Ile Lys Ser Tyr Asn  
370 375 380

<210> 4

<211> 757

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae sialidase

<400> 4

Ala Leu Phe Asp Tyr Asn Ala Thr Gly Asp Thr Glu Phe Asp Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Lys Gln Gly Trp Met Gln Asp Asn Thr Asn Asn Gly Ser Gly Val

20

25

30

Leu Thr Asn Ala Asp Gly Met Pro Ala Trp Leu Val Gln Gly Ile Gly  
 35 40 45  
 Gly Arg Ala Gln Trp Thr Tyr Ser Leu Ser Thr Asn Gln His Ala Gln  
 50 55 60  
 Ala Ser Ser Phe Gly Trp Arg Met Thr Thr Glu Met Lys Val Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Met Ile Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Gly Thr Gln Arg Val Leu  
 85 90 95  
 Pro Ile Ile Ser Leu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Val Val Glu Phe Glu  
 100 105 110  
 Gly Gln Thr Gly Arg Thr Val Leu Ala Thr Gly Thr Ala Ala Thr Glu  
 115 120 125  
 Tyr His Lys Phe Glu Leu Val Phe Leu Pro Gly Ser Asn Pro Ser Ala  
 130 135 140  
 Ser Phe Tyr Phe Asp Gly Lys Leu Ile Arg Asp Asn Ile Gln Pro Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Ser Lys Gln Asn Met Ile Val Trp Gly Asn Gly Ser Ser Asn Thr  
 165 170 175  
 Asp Gly Val Ala Ala Tyr Arg Asp Ile Lys Phe Glu Ile Gln Gly Asp  
 180 185 190  
 Val Ile Phe Arg Gly Pro Asp Arg Ile Pro Ser Ile Val Ala Ser Ser  
 195 200 205  
 Val Thr Pro Gly Val Val Thr Ala Phe Ala Glu Lys Arg Val Gly Gly  
 210 215 220  
 Gly Asp Pro Gly Ala Leu Ser Asn Thr Asn Asp Ile Ile Thr Arg Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Arg Asp Gly Gly Ile Thr Trp Asp Thr Glu Leu Asn Leu Thr Glu  
 245 250 255  
 Gln Ile Asn Val Ser Asp Glu Phe Asp Phe Ser Asp Pro Arg Pro Ile  
 260 265 270  
 Tyr Asp Pro Ser Ser Asn Thr Val Leu Val Ser Tyr Ala Arg Trp Pro

275                      280                      285  
 Thr Asp Ala Ala Gln Asn Gly Asp Arg Ile Lys Pro Trp Met Pro Asn  
 290                      295                      300  
 Gly Ile Phe Tyr Ser Val Tyr Asp Val Ala Ser Gly Asn Trp Gln Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Ile Asp Val Thr Asp Gln Val Lys Glu Arg Ser Phe Gln Ile Ala  
 325                      330                      335  
 Gly Trp Gly Gly Ser Glu Leu Tyr Arg Arg Asn Thr Ser Leu Asn Ser  
  
 340                      345                      350  
 Gln Gln Asp Trp Gln Ser Asn Ala Lys Ile Arg Ile Val Asp Gly Ala  
 355                      360                      365  
 Ala Asn Gln Ile Gln Val Ala Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Val Val Thr  
 370                      375                      380  
 Leu Ser Ile Asp Glu Ser Gly Gly Leu Val Ala Asn Leu Asn Gly Val  
 385                      390                      395                      400  
 Ser Ala Pro Ile Ile Leu Gln Ser Glu His Ala Lys Val His Ser Phe  
  
 405                      410                      415  
 His Asp Tyr Glu Leu Gln Tyr Ser Ala Leu Asn His Thr Thr Thr Leu  
 420                      425                      430  
 Phe Val Asp Gly Gln Gln Ile Thr Thr Trp Ala Gly Glu Val Ser Gln  
 435                      440                      445  
 Glu Asn Asn Ile Gln Phe Gly Asn Ala Asp Ala Gln Ile Asp Gly Arg  
 450                      455                      460  
 Leu His Val Gln Lys Ile Val Leu Thr Gln Gln Gly His Asn Leu Val  
  
 465                      470                      475                      480  
 Glu Phe Asp Ala Phe Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Glu Val Glu Lys  
 485                      490                      495  
 Asp Leu Glu Lys Leu Gly Trp Thr Lys Ile Lys Thr Gly Asn Thr Met  
 500                      505                      510  
 Ser Leu Tyr Gly Asn Ala Ser Val Asn Pro Gly Pro Gly His Gly Ile  
 515                      520                      525

Thr Leu Thr Arg Gln Gln Asn Ile Ser Gly Ser Gln Asn Gly Arg Leu

530

535

540

Ile Tyr Pro Ala Ile Val Leu Asp Arg Phe Phe Leu Asn Val Met Ser

545

550

555

560

Ile Tyr Ser Asp Asp Gly Gly Ser Asn Trp Gln Thr Gly Ser Thr Leu

565

570

575

Pro Ile Pro Phe Arg Trp Lys Ser Ser Ser Ile Leu Glu Thr Leu Glu

580

585

590

Pro Ser Glu Ala Asp Met Val Glu Leu Gln Asn Gly Asp Leu Leu Leu

595

600

605

Thr Ala Arg Leu Asp Phe Asn Gln Ile Val Asn Gly Val Asn Tyr Ser

610

615

620

Pro Arg Gln Gln Phe Leu Ser Lys Asp Gly Gly Ile Thr Trp Ser Leu

625

630

635

640

Leu Glu Ala Asn Asn Ala Asn Val Phe Ser Asn Ile Ser Thr Gly Thr

645

650

655

Val Asp Ala Ser Ile Thr Arg Phe Glu Gln Ser Asp Gly Ser His Phe

660

665

670

Leu Leu Phe Thr Asn Pro Gln Gly Asn Pro Ala Gly Thr Asn Gly Arg

675

680

685

Gln Asn Leu Gly Leu Trp Phe Ser Phe Asp Glu Gly Val Thr Trp Lys

690

695

700

Gly Pro Ile Gln Leu Val Asn Gly Ala Ser Ala Tyr Ser Asp Ile Tyr

705

710

715

720

Gln Leu Asp Ser Glu Asn Ala Ile Val Ile Val Glu Thr Asp Asn Ser

725

730

735

Asn Met Arg Ile Leu Arg Met Pro Ile Thr Leu Leu Lys Gln Lys Leu

740

745

750

Thr Leu Ser Gln Asn

755