



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2024-0152879  
(43) 공개일자 2024년10월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61K 47/68031 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7030827
- (22) 출원일자(국제) 2023년02월27일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년09월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2023/050203
- (87) 국제공개번호 WO 2023/161943  
국제공개일자 2023년08월31일
- (30) 우선권주장  
63/314,490 2022년02월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
넥틴 테라퓨틱스 리미티드  
이스라엘, 91390 예루살렘, 피.오. 박스 39135,  
하이-테크 캠퍼스 지배트 램
- (72) 발명자  
추케르만 핀카스  
이스라엘, 예루살렘, 아파트먼트 넘버 4, 6 슈무  
엘 나탄 스트리트  
아티에 아나스  
이스라엘, 9713825 예루살렘, 피.오. 박스 77155,  
슈파트, 24 알-하자즈 벤 유세프  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한얼

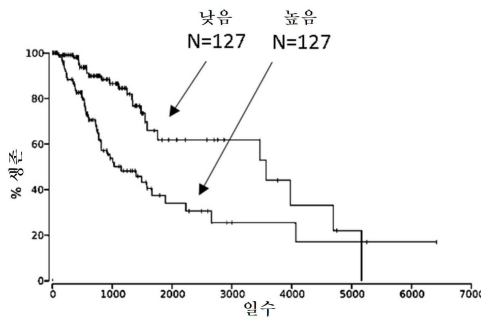
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **넥틴-2에 대한 인간화 항체 및 이의 약물 접합체**

**(57) 요약**

본 개시내용은 높은 친화성 및 특이성으로 인간 넥틴-2를 인식하고, CD112R에 대한 이의 결합을 억제하는 인간화 단클론 항체를 제공한다. 이들 항체는 세포독성 페이로드를 운반하고, Fc 감마 수용체와 상호작용하지 않는다. 본 개시내용은 상기 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 암 면역요법에서의 이의 사용을 위한 방법을 추가로 제공한다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

*A61K 47/68033* (2023.08)

*A61K 47/68037* (2023.08)

*A61K 47/6849* (2017.08)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/71* (2013.01)

*C07K 2317/73* (2013.01)

*C07K 2317/94* (2013.01)

(72) 발명자

**오비에다트 아크람**

이스라엘, 912930 예루살렘, 피.오 박스 29359

**시나몬 가이**

이스라엘, 6521214 텔 아비브, 45 발푸르 스트리트

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 넥틴-2에 특이적으로 결합되는 인간화 항체(humanized antibody), 또는 적어도 항원 결합 부위를 포함하는 이의 단편으로서, 여기서 항체, 또는 이의 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은

(i) 서열 번호 1-3에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및

(ii) 4개의 중쇄 (HC) 프레임워크 (FR) 서열의 세트로서, 여기서 FR-H1은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3는 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 (HC) 프레임워크 (FR) 서열의 세트

를 포함하고;

경쇄 가변 영역은

(i) 서열 번호 4-6에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및

(ii) 4개의 경쇄 (LC) 프레임워크 (FR) 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3는 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인, 4개의 경쇄 (LC) 프레임워크 (FR) 서열의 세트

를 포함하는, 인간 넥틴-2에 특이적으로 결합되는 인간화 항체, 또는 적어도 항원 결합 부위를 포함하는 이의 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 영역 서열을 포함하며; 경쇄는 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 영역 서열을 포함하는, 인간화 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간화 항체, 또는 이의 단편은

(i) 아미노산 서열 서열 번호 11을 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 12를 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄;

(ii) 아미노산 서열 서열 번호 15를 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 18을 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄;

(iii) 아미노산 서열 서열 번호 13을 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 17을 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄;

(iv) 아미노산 서열 서열 번호 14를 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 18을 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄;

(v) 아미노산 서열 서열 번호 15를 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 19를 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄; 및

(vi) 아미노산 서열 서열 번호 16을 갖는 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열 번호 20을 갖는 가변 영역을 포함하는 경쇄

로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄를 포함하는, 인간화 항체.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체, 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 서열 번호 11과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 12와 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하는, 인간화 항체.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 인간화 항체, 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 아미노산 서열 서열 번호 11을 갖는 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 아미노산 서열 서열 번호 12를 갖는 가변 영역을 포함하는, 인간화 항체.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 단클론 항체(humanized monoclonal antibody)는 IgG1, IgG4, 및 IgG2로부터 선택되는 중쇄 불변 영역을 갖는, 인간화 항체.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체는 Fc $\gamma$ R-매개 내재화(Fc $\gamma$ R-mediated internalization)를 방지하는 돌연변이된 Fc 도메인을 갖는, 인간화 항체.

**청구항 8**

제7항에 있어서, Fc 도메인은 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없는(null for binding), 인간화 항체.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체, 또는 이의 단편을 포함하는 접합체(conjugate).

**청구항 10**

제9항에 있어서, 인간화 항체, 또는 이의 단편은 세포독성 모이어티(cytotoxic moiety), 방사성 모이어티(radioactive moiety), 친화성 모이어티(affinity moiety), 또는 표지화 모이어티(labeling moiety)에 부착되는, 접합체.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 인간화 항체, 또는 이의 단편은 독소 (페이로드(payload))에 부착되는, 접합체.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 독소는 미세소관 억제제(microtubule inhibitor), DNA 합성 억제제(DNA synthesis inhibitor), 토포이소머라아제 억제제(topoisomerase inhibitor) 및 RNA 폴리머라아제 억제제(RNA polymerase inhibitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 접합체.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 미세소관 억제제는 아우리스타틴(auristatin) 또는 이의 유도체인, 접합체.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 아우리스타틴 유도체는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)인, 접합체.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 독소는 메이탄신(maytansine) 유도체인, 접합체.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 메이탄신 유도체는 DM4 또는 DM1인, 접합체.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 독소는 DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제인, 접합체.

**청구항 18**

제17항에 있어서, DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제는 DXd인, 접합체.

**청구항 19**

제17항에 있어서, DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제는 SN-38인, 접합체.

**청구항 20**

제11항에 있어서, 항체 및 독소는 링커(linker)를 통해 연결되는, 접합체.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 링커는 절단 가능한 것인, 접합체.

**청구항 22**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항체 또는 이의 단편의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는(encoding) 폴리뉴클레오티드(polynucleotide) 서열.

**청구항 23**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 인간화 항체 또는 항원 결합 단편, 및/또는 제9항 내지 제20항 중 어느 한 항의 접합체, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 암을 치료하는 데 사용하기 위한, 약학적 조성물.

**청구항 25**

치료적 유효량의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 인간화 항체 또는 이의 단편 또는 제9항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 접합체를 이를 필요로 하는 대상체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 암은 고형 암(solid cancer)인, 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 암은 전립선암(prostate cancer), 대장암(colorectal cancer), 간암(liver cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 위암(stomach cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 카르시노이드 종양(carcinoid tumor), 두경부암(head and neck cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 고환암(testis cancer), 요로상피암(urothelial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 흑색종(melanoma), 림프종(lymphoma) 및 폐암(lung cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 암은 대장 선암종(colorectal adenocarcinoma) 또는 폐 선암종인, 방법.

**청구항 29**

제25항에 있어서, 암은 혈액암인, 방법.

**청구항 30**

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 적어도 하나의 추가적인 항암 요법을 투여하거나 또는 수행하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 31**

대상체에서 암을 진단하거나 또는 예측하는 방법으로서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 인간화 항체 또는 단편을 사용하여 상기 대상체의 생물학적 샘플에서 넥틴-2의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 발명은 면역요법의 분야에 속하며, 항-넥틴-2 항체 및 항체-접합체(antibody-conjugates) 및 질환, 특히 암을 치료하기 위한 이를 포함하는 치료적 및 진단적 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암 면역요법은, 예를 들어, 종양 세포 상의 항원에 대해 특이적인 항체를 사용한 치료에 의해, 또는 항-종양 T 세포의 특이적 활성화에 의해 항-종양 면역 반응을 발생시키고 증강시키는 데 이용된다. 환자의 종양 세포에 대해 면역 세포 (예를 들어, T 세포)를 모집하는 능력은 그렇지 않으면 치료가 불가능하다고 간주되는 암 유형 및 전이를 퇴치하는 치료 방식을 제공한다.

[0003] T 세포 매개 면역 반응(T cell mediated immune response)은 면역 반응의 규모를 제어하는 공동-자극 신호와 공동-억제 신호 간의 균형에 의해 조절되는 복수개의 순차적인 단계를 포함한다. 면역 체크포인트(immune checkpoint)로 지칭되는 억제 신호는 자가-내성(self-tolerance)의 유지를 위해 그리고 면역-매개 부수적 조직 손상(immune-mediated collateral tissue damage)의 제한을 위해 중요하다. 이러한 억제 신호는 T 세포의 반응에 영향을 미치며, 면역 반응을 재형성한다.

[0004] 폴리오바이러스 수용체-관련 단백질-2(Poliiovirus Receptor-Related Protein-2), 폴리오바이러스 수용체-유사 2, CD112, 또는 PRR-2로도 명명되는 넥틴-2(Nectin-2)는 2개의 Ig-유사 C2-유형 도메인 및 Ig-유사 V-유형 도메인을 가진 단일 통과 막관통 당단백질(single pass transmembrane glycoprotein)이다. 넥틴-2는 세포의 기질 분자에 대한 세포 부착을 매개하는 데 관여하며 이는 부착 접합(adherent junction)의 원형질막(plasma membrane) 성분 중 하나로서 역할을 한다. 이는 또한 헤르페스 단순포진 바이러스(herpes simplex virus) 및 가성광견병 바이러스(pseudorabies virus)의 특정 돌연변이체 균주에 대한 진입 수용체로서 역할을 하며, 이는 이들 바이러스의 세포 간 확산에 관여한다. 이러한 유전자의 변이는 다발성 경화증의 중증도의 차이와 관련되어 있다. 중요하게는, 넥틴-2는 또한 T-세포 신호전달의 조절체로서 역할을 할 수 있다. 이는 이러한 표적 세포 상의 이것이 결합하는 수용체에 따라 T-세포 기능의 공동 자극제, 또는 공동 억제제일 수 있고; CD226 (DNAM-1)에 대한 결합 시, 이는 T-세포 증식 및 IL-2, 및 IFN $\gamma$ 의 것을 포함하는 사이토카인 생산을 자극하며, PVRL2 (CD112R), 및/또는 TIGIT (면역글로불린 및 ITIM 도메인을 가진 T-세포 면역수용체)와 상호 작용할 때, 이는 T-세포 증식 및 활성화를 억제한다. 이러한 상충되는 상호작용은 경쟁적이다.

[0005] 넥틴-2는 유방암 및 난소암을 포함하는 다양한 종양에서 과발현되는 것을 나타내었다 (Oshima et al. Molecular Cancer, 2013, 12:60). 종양 세포 상의 넥틴-2의 존재는 좋지 않은 예후 및 T 세포의 감소된 활성을 야기한다 (Stamm et al. Oncogene (2018) 37:5269-5280).

[0006] 미국 특허출원 제2017/0037133호는 혈액암, 특히 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia; AML)의 치료에 사용하기 위한 CD112 (넥틴-2, PVRL2), CD155 (PVR), 갈렉틴-9(Galectin-9), TIM-3 및/또는 TIGIT에 대한 억제제 (예를 들어, 항체)를 개시한다.

[0007] 국제 특허출원 번호 WO 2020/144697은 암 치료에 사용하기 위한, 인간 넥틴-2를 인식하여 TIGIT 및 CD112R과의 상호작용을 블로킹하는 단클론 항체 (mAb)를 개시한다.

[0008] 항체-약물 접합체 (antibody-drug conjugate; ADC)는 직접적인 종양 세포 사멸 및 방관자 면역 세포(bystander immune cell)의 결과에 따른 활성화 둘 모두를 위한 유망한 도구이다. 이러한 치료 물질은 세포독성 약물 (페이

로드(payload))에 연결되는 mAb로 구성되며, 원칙적으로 표적 항원을 발현하는 세포로의 특이적인 그것의 전달을 제한함으로써 이들 약물의 치료 범위를 넓히고, 이에 따라 전신 노출 및 독성을 줄이도록 설계된다.

[0009] 가능한 페이로드의 일례는 아우리스타틴(Auristatin), 미세소관-파괴 약물(microtubule-destroying drug)이다. 이는 돌라스타틴(dolastatin)으로 지칭되는 해양 무각 연체동물 돌라벨라 아우리쿨라리아(marine shell-less mollusk *Dolabella auricularia*)로부터 유래되었다. 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 및 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)와 같은 아우리스타틴의 다양한 유도체가 합성되었다. MMAE 및 MMAF는 Seattle Genetics에 의해 개발되었고, ADC에 대한 페이로드로서 사용되었다. MMAF 및 MMAE는 이의 장점 및 단점을 갖는다. MMAE는 MMAF보다 막 투과성이 더 높고, 더 낮은 IC50을 갖는다. 그러나, MMAF는 MMAE보다 더 친수성이며, 응집 경향이 더 낮아 더 낮은 전신 독성을 나타낸다 (park et al. *Molecules* 2019, 24, 2754).

[0010] 단독으로 사용되거나 또는 예를 들어, 암에서 ADC와 같이 넥틴-2 발현과 관련된 질환에 대해 진단적으로 그리고 치료적으로 사용하기 위한 표적화 도구로서 사용될 수 있는, 안전하고 효능이 뛰어난 인간 넥틴-2를 인식하는 인간화 항체(humanized antibody)를 제공해야 하는 충족되지 않은 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

[0011] **발명의 요약**

[0012] 본 발명은 넥틴-2에 특이적으로 결합되는 인간화 항체를 제공한다. 더 많은 항체 클론으로부터 선택되는 본 발명의 인간화 항체는 다른 항-넥틴-2 항체와 비교되는 개선된 특성을 갖는다. 본 발명은 일부 실시양태에 따르면 항체 및 진단체 또는 치료제를 포함하는 접합체를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 이의 표면 상에 넥틴-2 수용체를 제시하는 종양 세포에 대해 상기 인간화 항체에 의해 표적화되는 세포독성 모이어티를 포함한다.

[0013] 상보성 결정 영역 (complementarity determining region; CDR) 서열 및 인간 프레임워크 (FW) 서열의 특이적 세트를 조합하고, 이들 서열에 특정 돌연변이를 도입하여 변형된 가변 영역 및 개선된 특성을 가진 항체를 생성함으로써 많은 인간화 항체를 생성하였다. 유리하게는, 본원에 기재된 새롭게 설계된 인간화 가변 영역은 항체의 형태 및 결합 친화도의 유지를 위해 중요한 잔기를 보존하고, 동시에 잠재적인 T 세포 에피토프의 발생률을 낮추고, 이에 따라 항체에 대한 면역 이상 반응(adverse immune response)의 위험을 최소화한다. 본원에 개시된 항체는 상동성, T-세포 에피토프, 주요 잔기, 및 예측된 구조를 포함하는 요인에 기반하여 설계되었다. 예상 외로, 본원에 개시된 인간화 항체는 모 키메라 항체(parental chimeric antibody)와 비교하여 개선된 생체안정성 (biostability)을 나타내었다.

[0014] 본원에 개시된 인간화 항체는 치료용 독소를 사용한 표적화된 항암 요법으로서 사용하기에 매우 적합한 것으로 밝혀졌다. 세포독성 모이어티에 접합된, 본원에 기재된 항-넥틴-2 단클론 인간화 항체가 다양한 종양 세포주의 강력한 사멸을 나타내는 것으로 현재 밝혀졌다. 본원에 기재된 항체를 사용하는 독소의 직접적 표적화(direct targeting)는 이러한 독소의 항-종양 효능을 증가시키는 잠재력을 가지며, 이는 이의 전신 독성을 감소시키며, 이에 따라 암 환자의 생존을 개선시킨다.

[0015] 인간 Fc 수용체 (FcγRs)는 Fc-이펙터 기능 예컨대 항체-의존적 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 및 항체 의존적 세포 식세포 작용(antibody dependent cellular phagocytosis; ADCP)을 활성화시킨다. 본 발명의 일부 ADC는 면역 세포 상에서 발현되는 FcγR에 의한 이의 결합을 상당히 감소시키는 하나 이상의 Fc 돌연변이를 포함하고, 이에 의해 이의 안전성 및 특이성을 증가시킨다. 독소에 연결되는, 특이적 Fc 돌연변이를 갖는 항-넥틴-2 단클론 인간화 항체를 포함하는 ADC가 항암 요법에 대해 매우 효과적이고, 안전하고 적합한 것으로 현재 밝혀졌다.

[0016] 본 발명의 발명자들은 처음으로 넥틴-2에 대해 표적화된 ADC가 암, 특히 고형 종양을 치료하는 데 매우 유용하다는 것을 나타내었다.

[0017] 제1 양태에 따르면, 본 발명은 인간 넥틴-2에 특이적으로 결합하는 인간화 항체, 또는 적어도 항원 결합 부위를 포함하는 이의 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 단편은 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 포함하고, 중쇄는 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 균으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하며; 경쇄는 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20으로 이루어진 균으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함한다.

- [0018] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 서열 번호 11과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 12와 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함한다.
- [0019] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 제시된 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 제시된 서열을 포함한다.
- [0020] 주어진 항체 분자의 CDR 서열을 결정하기 위한 본 기술분야에 알려진 여러 방법이 존재하지만, 명확한 표준 방법은 존재하지 않는다. 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR 서열의 결정은 본 기술분야에 알려진 임의의 방법에 따라 이루어질 수 있고, 이는 KABAT, Chothia 및 IMGT로서 알려진 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 선택된 세트의 CDR은 하나 초과와 방법에 의해 확인된 서열을 포함할 수 있고, 즉, 일부 CDR 서열은 KABAT를 사용하고 몇몇은 예를 들어 IMGT를 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, mAb 가변 영역의 CDR 서열은 IMGT 방법을 사용하여 결정된다.
- [0021] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 6개의 CDR 서열의 세트를 포함하며, 여기서 중쇄 CDR1은 서열 SYW를 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열 VYPGNSDS (서열 번호 8)을 포함하고, 중쇄 CDR3는 서열 LVGTFDY (서열 번호 3)을 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열 QNVGIN (서열 번호 10)을 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열 SAS를 포함하고, 경쇄 CDR3는 서열 QQYNTNPFT (서열 번호 6)을 포함한다.
- [0022] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 6개의 CDR 서열의 세트를 포함하며, 여기서 중쇄 CDR1은 서열 SYWIH (서열 번호 1)을 포함하고, 중쇄 CDR2는 서열 AVYPGNSDSNYNQKF(KA/QG) (서열 번호 2)를 포함하고, 중쇄 CDR3는 서열 LVGTFDY (서열 번호 3)을 포함하고, 경쇄 CDR1은 서열 (K/R)ASQNVGINV(V/A) (서열 번호 4)를 포함하고, 경쇄 CDR2는 서열 SASYRYS (서열 번호 5)를 포함하고, 경쇄 CDR3는 서열 QQYNTNPFT (서열 번호 6)을 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에 따르면, 중쇄 CDR2는 서열 AVYPGNSDSNYNQKFKA (서열 번호 41) 또는 AVYPGNSDSNYNQKFG (서열 번호 42)를 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, 경쇄 CDR1은 KASQNVGINV (서열 번호 43), KASQNVGINVA (서열 번호 44), RASQNVGINV (서열 번호 45) 및 RASQNVGINVA (서열 번호 46)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 및 6에 제시된 6개의 CDR 서열의 세트를 포함한다. 추가적인 예시적인 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 7, 8, 9, 10, (SAS), 및 6에 제시된 6개의 CDR 서열의 세트를 포함한다. 추가적인 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 1, 41, 3, 43, 5, 및 6에 제시된 6개의 CDR 서열의 세트를 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0026] i. 서열 번호 1-3에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0027] ii. 4개의 중쇄 프레임워크 (FR) 서열의 세트로서, FR-H1은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3는 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 프레임워크 (FR) 서열의 세트.
- [0028] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0029] i. 서열 번호 4-6에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0030] ii. 4개의 경쇄 프레임워크 (FR) 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3은 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인, 4개의 경쇄 프레임워크 (FR) 서열의 세트.
- [0031] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 중쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함하고:
- [0032] i. 서열 번호 1-3에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및

- [0033] ii. 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-H1은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3은 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트;
- [0034] 경쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함한다:
- [0035] i. 서열 번호 4-6에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0036] ii. 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3는 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인, 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트.
- [0037] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함하고:
- [0038] i. 서열 번호 7-9에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0039] ii. 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-H1은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3은 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트;
- [0040] 경쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함한다:
- [0041] i. 서열 번호 10, 서열 SAS, 및 서열 번호 6에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0042] ii. 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3는 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인, 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트.
- [0043] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체(humanized monoclonal antibody)의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하며; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 및 서열 번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간화 단클론 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하며; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 및 서열 번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 97% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간화 단클론 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 및 서열 번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 단클론 항체, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, 단일-도메인 항체, 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.
- [0045] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 IgG 단클론 항체이다. 일부 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 IgG4, IgG1, 및 IgG2로부터 선택되는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체 또는 이의 단편은 IgG4 하위클래스이다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 하위클래스이다.
- [0046] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 카파(kappa) 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0047] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 IgG1이고, 이는 서열 번호 47에 제시된 서열과 적어도 약 90%, 95%, 또는 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖는다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 IgG1이고, 이는 서열 번호 47에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖는다.
- [0048] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 서열 번호 49에 제시된 서열과 적어도 약 90%, 95%, 또는 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 카파 경쇄를 갖는다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 인간화 단클론 항체는 서열 번호 49에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 카파 경쇄를 갖는다.

- [0049] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 Fc $\gamma$ R-매개 내재화(Fc $\gamma$ R-mediated internalization)를 방지하는 돌연변이된 Fc 도메인을 갖는다.
- [0050] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 Fc 널 도메인(Fc null domain)을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, Fc 도메인은 면역 세포에서 발견되는 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없다(null for binding). 특정 예시적인 실시양태에 따르면, Fc 도메인은 CD64, CD32a, CD32b, CD16a, 및/또는 CD16b에 대해 결합하는 데 효능이 없다.
- [0051] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, IgG1 Fc 도메인은 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없다. 추가적인 실시양태에 따르면, IgG1 Fc 도메인은 하나 이상의 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, IgG1 Fc 도메인은 CD64, CD32a, CD32b, CD16a, 및/또는 CD16b에 대해 결합하는 데 효능이 없다.
- [0052] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 IgG를 포함한다: (i) 돌연변이 L235S를 갖는 인간 IgG1; (ii) 돌연변이 L235S 및 E272K를 갖는 인간 IgG1; (iii) 돌연변이 G237I를 갖는 인간 IgG1; (iv) 돌연변이 G237I 및 E272I를 갖는 인간 IgG1; (v) 돌연변이 G237I 및 V264R을 갖는 인간 IgG1; (vi) 돌연변이 V215A, E269R 및 K322A를 갖는 인간 IgG1; (vii) 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 갖는 인간 IgG1; (viii) 돌연변이 S228P, L235P 및 V264R을 갖는 인간 IgG4; (ix) 돌연변이 P238H를 갖는 인간 IgG2; 또는 (x) 돌연변이 P238H 및 V264R을 갖는 인간 IgG2. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0053] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 서열 번호 61-70으로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 서열을 포함한다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0054] 일부 실시양태에 따르면, 상기 기재된 인간화 항체 또는 이의 단편을 포함하는 접합체가 제공된다.
- [0055] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편은 일부 실시양태에 따르면 세포독성 모이어티(cytotoxic moiety), 방사성 모이어티(radioactive moiety), 또는 친화성(affinity) 또는 표지화 태그(labeling tag)에 부착된다.
- [0056] 본 발명에 따른 항체-약물 접합체 (ADC)는 본원에 기재된 바와 같은 인간화 항체, 임의의 링커(linker) 및 독소를 포함한다.
- [0057] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 직접적으로 또는 링커를 통해 독소 (페이로드)에 접합된다.
- [0058] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 미세소관 억제제(microtubule inhibitor), DNA 합성 억제제, 토포이소머라아제 억제제(topoisomerase inhibitor) 및 RNA 폴리머라아제 억제제(RNA polymerase inhibitor)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0059] 특정 실시양태에 따르면, 독소는 미세소관-과표 약물이다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 독소는 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 특정 실시양태에 따르면, 아우리스타틴 유도체는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)이다.
- [0060] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 사포린(saporin)이다.
- [0061] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 메이탄신(maytansine) 유도체이다. 특정 실시양태에 따르면, 메이탄신 유도체는 DM4 또는 DM1이다.
- [0062] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 퀴놀린 알칼로이드(quinoline alkaloid)이다. 특정 실시양태에 따르면, 퀴놀린 알칼로이드는 SN-38이다.
- [0063] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제이다. 일부 실시양태에 따르면, DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제는 엑사테칸(Exatecan) 또는 엑사테칸 유도체이고 특정 실시양태에 따르면, DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제는 DXd이다.
- [0064] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 항체에 직접적으로 연결된다. 다른 실시양태에 따르면, 항체 및 독소는 링커 또는 스페이스(spacer)를 통해 연결된다. 일부 실시양태에 따르면, 독소는 직접적으로 또는 링커 또는 스페이스를 통해 인간화 항체에 공유적으로 연결된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0065] 일부 실시양태에 따르면, 링커는 절단 가능하다. 다른 실시양태에 따르면, 링커는 절단 가능하지 않다. 일부 실

시양태에 따르면, 링커는 효소적으로 절단 가능한 링커이다. 특정 실시양태에 따르면, 링커는 pH-민감성 링커이다. 일부 실시양태에 따르면, 링커는 환원 가능한 링커 (설포(sulfo)-SPDB)이다.

- [0066] 일부 실시양태에 따르면, 링커는 말레이미도카프로일 (MC), 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노-벤질옥시카르보닐 (MC-VC-PAB), 말레이미도메틸 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), N-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) 및 Lys-PAB-CO (라이신-p-아미노벤질 -C=O)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0067] 일부 실시양태에 따르면, 상기 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 (encoding) 폴리뉴클레오티드(polynucleotide) 서열이 제공된다.
- [0068] 일부 실시양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 중쇄 가변 영역을 코딩하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 51-55로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0069] 일부 실시양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 경쇄 가변 영역을 코딩하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 56-60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0070] 일부 실시양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 중쇄 가변 영역을 코딩하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 51-55로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 경쇄 가변 영역을 코딩하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 56-60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0071] 일부 실시양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 중쇄 가변 영역을 코딩하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 51에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 인간화 항체 경쇄 가변 영역을 코딩하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 56에 제시된 서열을 포함한다.
- [0072] 일부 실시양태에 따르면, 상기 기재된 인간화 항체 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다.
- [0073] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 48에 제시된 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 50에 제시된 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.
- [0074] 일부 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 인간화 항체의 아미노산 사슬을 코딩하는 DNA 서열은 선도 서열(leader sequence)을 포함한다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, DNA 서열은 서열 번호 71에 제시된 선도 펩티드 서열을 코딩한다.
- [0075] 추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 인간화 항체 사슬 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 핵산 작제물을 제공한다. 일부 실시양태에 따르면, 핵산 작제물은 플라스미드이다.
- [0076] 또한, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포주가 기재되어 있다. 세포주는 본원에 기재된 바와 같은 인간화 항체 또는 이의 단편의 발현을 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 세포주는 포유동물 세포주 예컨대 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.
- [0077] 본 발명은, 다른 양태에 따르면, 본원에 기재된 인간화 항체 또는 항원 결합 단편 또는 상기 항체를 포함하는 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0078] 일부 실시양태에 따르면, 약학적 조성물은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다.
- [0079] 임의의 투여 방식이 이를 필요로 하는 대상체(subject)에 본 발명의 조성물을 전달하는 데 사용될 수 있으며 이는 비경구 및 경장(enteral) 투여 방식을 포함한다.
- [0080] 일부 실시양태에 따르면, 약학적 조성물은 주사 또는 주입을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에 따르면, 약학적 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 종양내 투여를 위해 제형화된다.
- [0081] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 인간화 항체 또는 이의 접합체의 치

료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0082] 일부 실시양태에 따르면, 암은 넥틴-2의 과발현을 특징으로 한다.
- [0083] 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양을 포함한다.
- [0084] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암(prostate cancer), 대장암(colorectal cancer), 간암(liver cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 위암(stomach cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 카르시노이드 종양(carcinoid tumor), 두경부암(head and neck cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 고환암(testis cancer), 요로상피암(urothelial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 흑색종(melanoma), 림프종(lymphoma) 및 폐암(lung cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0085] 일부 실시양태에 따르면, 암은 유방암이다. 일부 실시양태에 따르면, 암은 대장 선암종(colorectal adenocarcinoma) 또는 폐 선암종(lung adenocarcinoma)이다.
- [0086] 다른 실시양태에 따르면, 암은 혈액암(hematological cancer)이다. 일부 실시양태에 따르면, 혈액암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (chronic myeloid leukemia; CML), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia; ALL) 및 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia; CLL)을 포함하는 백혈병(leukemia); 호지킨병(Hodgkin disease) 및 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma)을 포함하는 림프종(lymphoma); 및 다발성 골수종(multiple myeloma)으로부터 선택된다.
- [0087] 일부 실시양태에 따르면, 대상체는 인간이다.
- [0088] 일부 실시양태에 따르면, 암을 치료하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 항암 요법을 투여하거나 수행하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, 추가적인 항암 요법은 수술, 화학요법, 방사선요법, 또는 면역요법이다.
- [0089] 일부 실시양태에 따르면, 암을 치료하는 방법은 본원에 기재된 인간화 항체 및 추가적인 항암제의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 추가적인 항암제는 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 면역-조절제, 활성화 림프구 세포, 키나아제 억제제 및 화학 치료제.
- [0090] 다른 실시양태에 따르면, 추가적인 면역-조절제는 인간 넥틴-2 이외에 항원에 대해 결합하는 항체, 항체 단편 또는 항체 접합체이다.
- [0091] 일부 실시양태에 따르면, 추가적인 면역-조절제는 면역 체크포인트 분자에 대한 항체이다. 일부 실시양태에 따르면, 추가적인 면역 조절제는 인간 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(programmed cell death protein 1; PD-1), PD-L1 및 PD-L2, 암배아 항원-관련 세포 부착 분자 1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1; CEACAM1), 림프구 활성화 유전자 3 (lymphocyte activation gene 3; LAG3), CD137, OX40 (CD134로도 지칭됨), 킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체 (killer cell immunoglobulin-like receptor; KIR), TIGIT, PVR, CTLA-4, NKG2A, GITR, 및 임의의 다른 체크포인트 분자 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 체크포인트 분자에 대한 항체이다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다. 특정 실시양태에 따르면, 추가적인 면역 조절제는 PD-1에 대한 항체이다. 일부 실시양태에 따르면, 추가적인 면역 조절제는 CTLA-4에 대한 항체이다.
- [0092] 일부 실시양태에 따르면, 항암제는 다음의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 에르비투스(erbitux), 시타라빈(cytarabine), 플루다라빈(fludarabine), 플루오로우라실(flourouracil), 메르캅토피린(mercaptopurine), 메토티렉세이트(methotrexate), 티오구아닌(thioguanine), 겐시타빈(gemcitabine), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 클로람부실(chlorambucil), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 티오테파(thiotepa), 다카르바진(dacarbazine), 블레오마이신(bleomycin), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토마이신(mitomycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide) 및 이들의 임의의 조합. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0093] 일부 실시양태에 따르면, 암을 치료하는 방법은 대상체에서 전이의 형성, 성장 또는 확산을 방지하거나 감소시키는 것을 포함한다.

- [0094] 추가적인 양태에 따르면, 본 발명은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 인간 넥틴-2에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 독소를 포함하는 항체-약물 접합체를 제공한다.
- [0095] 암 및 독소는 상기 기재된 바와 같다.
- [0096] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 돌연변이된 Fc 도메인을 포함한다.
- [0097] 본 발명은 일 양태에 따라 대상체에서 암을 진단하거나 예측하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 인간화 항체, 단편 또는 접합체를 사용하여 상기 대상체의 생물학적 샘플에서 넥틴-2의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0098] 본 발명은 다른 양태에 따라 넥틴-2의 발현을 결정하거나 정량화하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계 및 복합체 형성의 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0099] 일부 실시양태에 따르면, 넥틴-2의 발현을 검출하거나 정량화하기 위한 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0100] i. 넥틴-2에 대해 특이적인 항체 또는 적어도 항원-결합부를 포함하는 이의 항체 단편과 함께 샘플을 인큐베이션하는 단계;
- [0101] ii. 검출 가능한 프로브를 사용하여 결합된 넥틴-2를 검출하는 단계.
- [0102] 일부 실시양태에 따르면, 상기 방법은 추가로 하기의 단계를 포함한다:
- [0103] iii. 알려진 양의 넥틴-2를 포함하는 참조 샘플로부터 얻은 표준 곡선에 대해 (ii)의 양을 비교하는 단계; 및
- [0104] iv. 표준 곡선으로부터 샘플에서의 넥틴-2의 양을 계산하는 단계.
- [0105] 일부 특정 실시양태에 따르면, 샘플은 체액 또는 고체 조직이다. 일부 실시양태에서, 방법은 시험관 내에서 또는 생체 외에서 수행된다.
- [0106] 생물학적 샘플에서 넥틴-2의 발현을 측정하기 위한 키트가 또한 제공되며, 이는 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편 및 넥틴-2 발현을 측정하기 위한 수단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 키트의 사용법을 알려주는 설명 자료를 추가로 포함한다.
- [0107] 본 발명의 추가 실시양태 및 전체 적용 가능성 범위는 아래에 주어진 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 예는 발명의 바람직한 실시양태를 나타내지만, 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화 및 수정은 이러한 상세한 설명으로부터 본 기술분야의 당업자에게 자명해질 것이므로 단지 예시를 위해 주어지는 것으로 이해되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0108] **도 1a-1c**는 저-등급 신경교종(glioma) (도 1a), 신장 투명 신세포 암종(Kidney Renal Clear Cell Carcinoma) (도 1b) 및 폐 선암종 (도 1c) 환자의 생존 확률과 넥틴-2 mRNA 수준 (표시된 바와 같이 높거나 낮음)의 상관관계를 도시한다. 데이터 세트는 TCGA 사이트로부터 얻었고, oncolnc.org 사이트 (<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>)를 사용하여 분석되었다. N은 분석에 포함된 환자의 수를 표시한다.
- 도 2**는 면역 세포 상에서 발현되는 수용체와 종양에 의해 또는 항원 제시 세포 (antigen presenting cell; APC) 상에서 발현되는 넥틴-2 (CD112)에 대한 이의 각각의 친화도의 개략도이다. TIGIT는 여러 면역 세포 (예를 들어, T 및 NK 세포) 상의 공동-억제 수용체이며; DNAM-1 (CD226으로도 명명됨)은 여러 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 상의 활성화 수용체이며; CD112R (PVRIG로도 명명됨) 및 TIGIT는 림프구 면역 세포 (예를 들어, T 및 NK 세포) 상의 공동-억제 수용체이며; 넥틴-2는 주로 CD112R (직사각형)에 대한 그것의 고친화성 결합을 통해 면역 세포에 대한 억제 리간드로서 역할을 한다.
- 도 3**은 넥틴-2 발현에 대해 양성인 종양의 백분율을 나타내는 그래프이다. 데이터는 HPA012759 mAb (항 넥틴-2; Sigma-Aldrich®)를 사용하여 proteintlas.com으로부터 얻었다. 17/20 지표에서 넥틴-2의 중간-높은 막 발현이 보인다.
- 도 4a-4c**는 모 (키메라) 항-넥틴2 mAb의 인간화 변이체의 개선된 세포와의 결합을 도시한다. 연속 희석된 mAb 인간화 변이체의 결합에 대해 FACS 분석에 의해 넥틴-2 발현 세포를 분석하였다. EC-50 값은 각각의 변이체에 대해 계산되며, 키메라 Ab (HOKO)의 EC-50 값에 대비하여 기록되며, 이는 1로 설정되었다. 도 4a - 인간 넥틴-2

를 발현하는 293T 세포에 대한 EC-50 결합 배수 변화. 도 4b - 넥틴-2 (XP\_007995342.1)를 자연적으로 발현하는 아프리카 녹색 원숭이 (AFG, 클로로세부스(Chlorocebus))로부터 유래된 Vero 세포에 대한 EC-50 결합 배수 변화. 도 4c - 66-0.81nM의 농도의 항-넥틴-2 인간화 클론의 존재하에서 인간 넥틴-2를 과발현하는 CHO(K)1 세포에 대한 CD112R-Fc 결합의 FACS 분석에 의해 평가되는 경우, 상이한 인간화 mAb 변이체에 의한 CD112R 블로킹(blocking)의 결과. 최저 용량에서 >70% 블로킹 능력을 유지하는 변이체를 우수한 것으로 간주하였다.

**도 5a-5c**는 인간화 항-넥틴-2 ADC 변이체의 사멸 효과를 도시한다. ADC는 사포린 (ZAP)에 기반하며, A549 표적 세포 (폐 선암종)은 넥틴-2를 발현하는 것으로 확인되었다. 도 5a는 2개의 농도에서 시험되는 다른 인간화 변이체와 비교하여 선도 클론 H3K3의 우수한 사멸 효과를 나타낸다. 도 5b는 인간화 H3K3와 H4K2 변이체 사이의 ADC 활성의 비슷한 수준을 도시한다. 도 5c - 3개의 농도에서의 키메라 mAb (HOKO)와 인간화 H3K3 변이체 사이의 ADC 활성의 비슷한 수준. H3K3는 또한 FcγR-널 Fc(FcγR-null Fc)를 갖고, 이 변이체의 효능에 영향을 미치지 않는 IgG2-P238H 상에 그래프팅(grafting) 되었을 때 시험되었다. NS (유의미하지 않음)로 나타나지 않는 한, 모든 사멸 결과는 유의미하다 ( $p < 0.001$ , 이원 t-시험(two-way t-test)).

**도 6a-6c**는 다양한 독소에 접합된 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 ADC는 다양한 고휘 종양 세포주의 강력한 사멸을 유발한다는 것을 입증한다. 도면은 72 시간의 인큐베이션 이후 상이한 암 표적에 걸쳐 그리고 상이한 ADC 농도에서 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> ADC의 상당한 사멸 활성을 나타낸다. 도 6a는 RKO 세포 (대장 선암종)의 사멸을 도시한다. 도 6b는 MDA-MB-231 세포 (삼중 음성 유방암)의 사멸을 도시한다. 도 6c는 A549 세포 (폐 선암종)의 사멸을 도시한다. NS (유의미하지 않음)로 나타나지 않는 한, 표적 세포의 사멸은 유의미하였다 ( $p < 0.001$ ). 모든 ADC가 독성 효과를 가졌지만, 이의 크기는 접합된 독소와 표적 세포의 특성에 따라 변화되었다. 여전히, MMAE 또는 MMAF를 포함하는 ADC는 모든 표적 세포에 걸쳐 모든 다른 것보다 우수하였다.

**도 7**은 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 ADC가 고친화성 FcγR - CD64와의 상호작용을 통해 내재화되지 않은 것을 입증한다. 넥틴-2가 아닌 인간 CD64 (hCD64)를 과발현하는 CHO-K1 세포 또는 CHO-K1 세포를 두 버전의 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> ADC (MMAE 또는 DM4에 접합됨)와 함께 또는 hIgG4 (S228P) 또는 hIgG1 Fc (둘다 DM4에 접합됨)을 갖는 ADC와 관련 없는 대조군과 함께 12ug/ml에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 특정한 증가된 사멸은 hIgG4 또는 hIgG1이 사용되었을 때 CD64 양성 세포에 대해 보여졌으나, FcγR<sup>mut1</sup> Fc H3K3 ADC 변이체가 사용되었을 때에는 보이지 않았다. 이 배경에는 표적 세포에 의한 넥틴-2 또는 CD64 발현과 관계없이 비특이적 사멸이 DM4에 의해 유도되었음을 주목한다.

**도 8**은 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 ADC가 혈액 세포주의 강력한 사멸을 유도하였음을 입증한다. 나타낸 링커-페이로드 조합을 가진 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> Ab를 HL-60 세포 (AML 모델)과 함께 9-1 μg/ml의 농도에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. DM1을 제외하고 모든 링커-페이로드 조합은 고용량에서 >90% 사멸을 야기하고, 시험되는 모든 용량에서 유의미한 사멸을 야기하였다 ( $p < 0.001$ ).

**도 9a-9b**는 누드 암컷 마우스(Nude female mice)에 s.c. 이식한 혈액 종양 세포주인 HL-60에 대한 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 ADC의 생체내 효능을 도시한다. 도 9a는 링커 페이로드 (LP)의 상이한 조합으로의 처리의 효과를 비교한다. LP 조합들 중 2개가 유의미한 효과를 가졌다: DM4는 유의미한 종양 성장 억제 (TGI,  $p < 0.05$ )를 야기하였고, 한편 완전한 종양 퇴행이 MMAE에 대해 보여졌다. MMAE-기반 ADC의 효과는 다른 처리를 포함하지 않고 도 9b에서 나타났다.

**도 10**은 고휘 (대장 선암종) 종양 세포주, RKO에 대한 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 ADC (1107-MC-VC-MMAE)의 생체내 효능을 도시한다. 비어 있는 비히클은 대조군으로서 사용되었다.

**도 11**을 TNBC에 대해 승인된 ADC 약물인 트로델비(Trodelvy) (사시투주맙 고비테칸(Sacituzumab govitecan))과 비교되는, Dxd에 연결된 인간화 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> 항-넥틴-2 mAb (NTX1107)에 의한 MDA-MB-231 (삼중 음성 유방암 또는 TNBC) 세포의 시험관내 사멸을 도시한다. 두 ADC는 동일한 클래스의 세포독성 페이로드 (즉, 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제)이다. MDA-MB-231 세포를 표시된 농도의 이들 ADC의 존재하에서 인큐베이션하였다. 120시간 이후 사멸을 평가하였다. 표적 세포의 강력한 사멸은 두 ADC에 의해 유도되었고, 두 농도에서 트로델비가 유의미하게 우수하였다 ( $***p < 0.0005$ ).

도 12는 누드 암컷 마우스의 MDA-MB-231 s.c. 종양 모델에 대한 트로텔비와 비교되는 인간화 H3K3-FcgR<sup>m11</sup> 항-넥틴-2 ADC (NTX1107)의 생체내 효능을 도시한다. NTX1107-Dxd는 종양 성장을 유의미하게 억제하여 종양 성장정지(tumor stasis)를 야기할 수 있으며, 한편 트로텔비는 동일한 처리 요법으로 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

도 13은 누드 암컷 마우스의 MDA-MB-231 s.c. 종양 모델에 대한 H3K3-FcgR<sup>m11</sup>-Dxd (NTX1107-Dxd)을 사용한 생체내 처리의 효과를 H3K3-FcgR<sup>m11</sup> MMAE (NTX1107-MMAE)의 것과 비교한다. 완전한 종양 퇴행은 H NTX1107-MMAE에 대해 보여졌으며 7/7 마우스는 연구 종료 시 측정 가능한 종양이 없었다. 종양 퇴행은 NTX1107-Dxd에 대해 보여졌으며 4/7 마우스는 연구 종료 시 측정 가능한 종양이 없었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0109] 본 발명은 넥틴-2를 인식하는 인간화 단클론 항체를 제공한다. 유리하게는, 발명의 항체는 거의 완전하게 인간화되며, 이에 따라 항체에 대한 면역 이상 반응의 위험이 회피되고, 이에 따라 인간에게 사용하는 데 안전할 수 있다. 발명의 항체는 고유한 CDR 서열 및 신규 인간화 프레임워크 서열 및 디자인을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0110] 본 발명은 일부 실시양태에서 암을 치료하는 데 유용한 본원에 기재된 인간화 항체를 포함하는, 항체-약물 접합체, 또는 ADC를 추가로 제공한다.
- [0111] 하기 설명에서, 임의의 특정한 설명은 다양한 실시양태의 완전한 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 본 기술분야의 당업자는 제공된 실시양태가 이러한 설명 없이 실시될 수 있는 것으로 이해할 것이다. 맥락에서 달리 요구되지 않는 한, 명세서 및 아래의 청구항 전반에서, 단어 "포함하다(comprise)" 및 이의 변형어, 예컨대 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 개방적, 포괄적 의미로, 즉, "포함하지만 이에 제한되지 않는"과 같이 해석되어야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 맥락에서 분명하게 달리 언급하지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 또한, 용어 "또는"은 맥락에서 분명하게 달리 언급하지 않는 한, 일반적으로 "및/또는"을 포함하는 이의 의미로 이용된다. 또한, 본원에 제공된 제목은 단지 편의를 위한 것이며, 청구된 실시양태의 범위 또는 의미를 해석하지 않는다.
- [0112] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "약"은 언급된 양의 10% 이하만큼 근사한 양과 관련된다.
- [0113] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "넥틴-2" 또는 "넥틴 세포 부착 분자 2"는 CD112, 및 PVRL2로도 알려진 인간 원형질막 당단백질을 지칭한다. 넥틴-2 단백질은 두 Ig-유사 C2-유형 도메인 및 Ig-유사 V-유형 도메인을 갖는 단일-통과 I형 막 당단백질이다. 이 단백질은 부착 접합의 원형질막 성분 중 하나이다. 이는 또한 헤르페스 단순포진 바이러스 및 가성광견병 바이러스의 특정 돌연변이체 균주에 대한 진입체로서 역할을 하며, 이는 이들 바이러스의 세포 간 확산에 관여한다. 발명에 따른 예시적인 넥틴-2는 SwissPort, UniPort 및 GenBank 기호 또는 등록 번호: Gene ID: 5819, Q92692, I68093, NP\_001036189.1, NP\_002847.1, 및 # Q92692로 제시되어 있다.
- [0114] 일 양태에 따르면, 본 발명은 넥틴-2에 특이적으로 결합하는 인간화 항체, 또는 적어도 항원 결합 부위를 포함하는 이의 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 중쇄는 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 균으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하며; 경쇄는 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20으로 이루어진 균으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함한다.
- [0115] 다른 양태에 따르면, 본 발명은 넥틴-2에 특이적으로 결합하는 인간화 항체, 또는 적어도 항원 결합 부위를 포함하는 이의 단편을 제공하며, 여기서 항체, 또는 이의 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함하고:
- [0116] (i) 서열 번호 1-3에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0117] (ii) 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-H1 (프레임워크 중쇄 번호 1)은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 균으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3는 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 균으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트;
- [0118] 경쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함한다:

- [0119] (i) 서열 번호 4-6에 제시된 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0120] (ii) 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1 (프레임워크 경쇄 번호 1)은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3는 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인, 4개의 경쇄 프레임워크 서열.
- [0121] 프레임워크는 사슬 가변 영역의 비-CDR 서열이다. FR-H1은 가변 중쇄에서 CDR1 앞에 있는 서열이고, FR-H2는 CDR1과 CDR2 사이에 있는 서열이고, FR-H3는 CDR2와 CDR3 사이에 있는 서열이고, FR-H4는 CDR3 뒤에 있는 서열이다. FR-L1은 가변 경쇄에서 CDR1 앞에 있는 서열이고, FR-L2는 CDR1과 CDR2 사이에 있는 서열이고, FR-L3는 CDR2와 CDR3 사이에 있는 서열이고, FR-L4는 CDR3 뒤에 있는 서열이다.
- [0122] 추가적인 양태에 따르면, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 중쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함하며:
- [0123] i. 3개의 CDR 서열의 세트로서, CDR이 서열 SYW, 서열 번호 8, 및 서열 번호 3을 포함하는, 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0124] ii. 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-H1은 서열 번호 21, 25, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H2는 서열 번호 22이고; FR-H3는 서열 번호 23, 26, 28, 및 29로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-H4는 서열 번호 24인, 4개의 중쇄 프레임워크 서열의 세트.
- [0125] 경쇄 가변 영역은 다음의 것을 포함한다:
- [0126] i. 3개의 CDR 서열의 세트로서, CDR은 서열 번호 10, SAS, 및 서열 번호 6에 제시된 서열을 포함하는, 3개의 CDR 서열의 세트; 및
- [0127] ii. 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트로서, 여기서 FR-L1은 서열 번호 30, 34, 37, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L2는 서열 번호 31 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L3는 서열 번호 32, 36, 38, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되고; FR-L4는 서열 번호 33인 4개의 경쇄 프레임워크 서열의 세트.
- [0128] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체 또는 이의 단편은 CDR이 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR이 서열 번호 10, SAS, 및 서열 번호 6 서열을 포함하는 3개의 CDR 서열의 세트를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0129] 제공된 항체 중에는 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체 및 다중반응성 항체), 및 항체 단편이 있다. 항체는 항체-접합체 및 항체를 포함하는 분자, 예컨대 키메라 분자를 포함한다. 따라서, 항체는, 비제한적으로, 전장뿐만 아니라 임의의 수의 면역글로불린 클래스 및/또는 아이소타입 (isotype) (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE 및 IgM)을 포함하는 이의 임의의 특이적 결합부와 같은 이의 결합 특이성을 보유하는 이의 단편 및 일부; 및 비제한적으로 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 및 scFv (단일 사슬 또는 관련 口물질)을 포함하는 생물학적으로 관련된 (항원-결합) 단편 또는 이의 특이적 결합부를 포함한다. 단클론 항체는 일반적으로 실질적으로 균질한 항체의 조성물 내에 있는 것이며; 이에 따라 단클론 항체 조성물 내에 포함된 임의의 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생된 돌연변이를 제외하고 동일하다. 다클론 항체는 일반적으로 2개 이상의 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해 유도되는 다양한 서열의 상이한 항체를 포함하는 제제이다. 단클론 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다. 단클론 항체는 인간 IgG4 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0130] 본원에서 용어 "항체"는 가장 광의의 의미로 사용되며, 다클론 및 단클론 항체를 포함하며 이는 온전한 항체, 및 단편 항원 결합 (Fab) 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG (rIgG) 단편, 단일 사슬 가변 단편 (sFv 또는 scFv)을 포함하는 단일 사슬 항체 단편, 및 단일 도메인 항체 (예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편을 포함하는 이의 기능적 (항원-결합) 항체 단편을 포함한다. 상기 용어는 유전자 조작되고/되거나 그렇지 않으면 변형된 형태의 면역글로불린, 예컨대 인트라바디 (intrabody), 펩티바디 (peptibody), 완전 인간 항체, 인간화 항체 및 헤테로접합 항체, 다중특이적, 예를 들어, 이중특이적 항체, 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody) 및 테트라바디 (tetrabody), 탠덤 (tandem) 디-scFv, 탠덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급하지 않는 한, 용어 "항체"는 이의 기능적 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 온전한 또는 전장 항체를 포괄하며 이는 IgG 및 이의 하위-클래스를 포함하는 임의의 클래스 또는 하위-클래스의 항체, IgM, IgE, IgA, 및 IgD를 포함한다. 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다. 항체는 인간 IgG4 불변 영

역을 포함할 수 있다.

- [0131] 주어진 중쇄 또는 경쇄 가변 서열로부터의 CDR 식별 또는 결정은 통상적으로 본 기술분야에 알려진 몇몇 방법 중 하나를 사용하여 이루어진다. 예를 들어, 이러한 결정은 Kabat (Wu T.T and Kabat E.A., *J Exp Med*, 1970; 132:211-50) 및 IMGT (Lefranc M-P, et al., *Dev Comp Immunol*, 2003, 27:55-77)에 따라 이루어진다.
- [0132] 용어 "서열을 갖는 CDR" 또는 유사 용어가 사용되는 경우, 이는 CDR이 특정 서열을 포함하는 옵션과 또한 CDR이 특정 서열로 이루어지는 옵션을 포함한다.
- [0133] 항체의 항원 특이성은 초가변 영역 (HVR), 즉, 항원-결합 부위를 함께 형성하는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 고유한 CDR 서열에 기반한다.
- [0134] 제공된 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편"은 온전한 항체가 결합되는 항원에 결합되는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는, 비제한적으로, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자 (예를 들어, scFv 또는 sFv); 및 항체 단편으로부터 형성되는 다중특이적 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 scFv와 같은 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는 단일-사슬 항체 단편이다.
- [0135] "인간화" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비-인간 CDR로부터 유래되고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역 (FR) 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래되는 항체이다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서, 통상적으로 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위한 인간화가 진행된 비-인간 항체의 변이체와 관련된다. 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체에서의 일부 FR 잔기는 비-인간 항체 (예를 들어, CDR 잔기가 유래되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환되어, 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 개선한다.
- [0136] Fc 도메인에서의 아미노산 잔기는 효능이 없도록 치환될 수 있으며, 이는 Fc 도메인이 Fc 수용체에 결합되지 않거나 또는 결합의 결과로서 어떠한 Fc 수용체 신호전달도 야기하지 않도록 이와 같이 낮은 친화성 및/또는 결합성으로 결합될 수 있음을 의미한다. Fc 도메인은 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없을 수 있다. Fc 도메인이 결합하는 데 효능이 없게 될 수 있는 일부 예시적인 Fc $\gamma$  수용체는, 비제한적으로, Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32a), Fc $\gamma$ RIIB (CD32b), Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a), Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a) F158 변이체, Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a) V158 변이체, 또는 Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b)일 수 있다. Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합을 감소시키는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상의 아미노산 치환을 가질 수 있다.
- [0137] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 Fc $\gamma$ R-매개 내재화를 방지하는 돌연변이된 Fc 도메인을 갖는다.
- [0138] 일부 실시양태에 따르면, 인간화 항체는 Fc $\gamma$  도메인을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, Fc 도메인은 Fc $\gamma$  수용체에 대해 결합하는 데 효능이 없다.
- [0139] 본원에 사용되는 바와 같은, "Fc $\gamma$  널"은 Fc $\gamma$  수용체 중 하나 이상에 대한 약한 결합 내지 이에 대한 결합 부재를 나타내는 도메인과 관련된다.
- [0140] 항체-약물 접합체
- [0141] 일 양태에 따르면, 본 발명은 독소에 융합되는 본원에 기재된 바와 같은 인간화 항체를 포함하는 접합체를 제공한다.
- [0142] 일부 실시양태에 따르면, 접합체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 중쇄는 서열 번호 11, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하고; 경쇄는 서열 번호 12, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함한다.
- [0143] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 미세소관 억제제, DNA 합성 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 및 RNA 폴리머라아제 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0144] 특정 실시양태에 따르면, 독소는 미세소관-과과 약물이다. 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 독소는 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 특정 실시양태에 따르면, 아우리스타틴 유도체는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)이다.

- [0145] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 사포닌(saponin)이다.
- [0146] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 메이탄신 유도체이다. 특정 실시양태에 따르면, 메이탄신 유도체는 DM4 또는 DM1이다.
- [0147] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 퀴놀린 알칼로이드이다. 특정 실시양태에 따르면, 퀴놀린 알칼로이드는 SN-38이다.
- [0148] 추가적인 실시양태에 따르면, 독소는 MMAE, MMAF, 사포닌, DM4, DM1, SN-38, 칼리케아미신(Calicheamicin), DXd, PBD, 듀오카마이신(Duocarmycin), 샌드라마이신(Sandramycin), 알파-아마니틴(alpha-Amanitin), 케토신(Chaetocin), 다우노루비신, 17-AAG, 아그로셀린 A(Agrochelins A), 독소루비신, 메토티렉세이트, 콜히친(Colchicine), 코디세핀(Cordycepin), 히그롤리딘(Hygrolidin), 헤르보시디엔(Herboxidiene), 페룰레놀(Ferulenol), 쿠르볼린(Curvulin), 잉글레린 A(Englerin A), 탈토불린(Taltobulin), 트립톨리드(Triptolide), 크립토피신(Cryptophycin), 및 네모루비신(Nemorubicin)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0149] 일부 실시양태에 따르면, 독소는 DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제이다. 특정 실시양태에 따르면, DNA 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제는 DXd이다.
- [0150] 독소 명칭은 본원에서 기술분야에 알려진 바와 같이 사용된다. 적합한 페이로드의 비제한적인 예는 다음의 것을 포함한다:
- [0151] - DM1 - N<sup>2'</sup>-테아세틸-N<sup>2'</sup>-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신- 튜블린 억제제.
- [0152] - DM4 - N<sup>2'</sup>-테아세틸-N<sup>2'</sup>-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)- 라브탄신(Ravtansine) - 튜블린 억제제.
- [0153] - SN-38 - 위치 4 및 11에서의 2개의 추가적인 에틸 치환기뿐만 아니라 위치 4 및 9에서의 2개의 추가적인 하이드록시 치환기를 갖는 (4S)-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14-디온인 피라노인돌리지노퀴놀린의 클래스의 구성원인, 효능이 강한 DNA 토포이소머라아제 I 억제제.
- [0154] - DXd - 엑사테칸 유도체, 효능이 강한 DNA 토포이소머라아제 I 억제제 (예를 들어 Cat. 번호: MCE<sup>®</sup>의 HY-13631D).
- [0155] - MMAF - 모노메틸 아우리스타틴 F - 화학식 C39H65N5O8을 갖는, 튜블린 억제제.
- [0156] - MMEA - 모노메틸 아우리스타틴 E- 화학식 C39H67N5O7을 갖는, 튜블린 억제제.
- [0157] 일부 실시양태에 따르면, 항체는 독소에 직접적으로 연결된다. 다른 실시양태에 따르면, 항체 및 독소는 링커를 통해 연결된다. 일부 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 인간화는 독소에 공유적으로 연결된다.
- [0158] 일부 실시양태에 따르면, 링커는 절단 가능하다. 추가적인 실시양태에 따르면, 링커는 절단 가능하지 않다.
- [0159] 일부 실시양태에 따르면, 링커는 pH 또는 산화환원 전위의 변화에 반응하여 절단된다. 일부 실시양태에 따르면, 링커는 리소좀 효소와 접촉될 때 절단된다.
- [0160] 본 발명은 다른 양태에 따르면 본원에 기재된 인간화 항체 또는 항원 결합 단편 또는 상기 항체를 포함하는 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0161] 다른 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 넥틴-2의 과발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 넥틴-2 과발현과 관련된 암 유형은 Cancer Genome Atlas (TCGA)와 같은 알려진 데이터 베이스를 사용하여 확인될 수 있다. 특정 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 조성물로 치료 가능한 암은 부신 피질 암종 (adrenocortical carcinoma; ACC), 혈액소성 신세포 암종 (chromophobe renal cell carcinoma; KICH), 간세포 암종 (liver hepatocellular carcinoma; LIHC), 결장 및 직장 선암종 (colon and rectal adenocarcinoma; COAD, READ), 췌장관 선암종 (pancreatic ductal adenocarcinoma; PAAD), 갈색세포종 (pheochromocytoma) & 부신경절종(paraganglioma) (PCPG), 유두상 신장 암종 (papillary kidney carcinoma; KIRP), 폐 선암종 (LUAD), 두경부 편평세포 암종 (head and neck squamous cell carcinoma; HNSC), 전립선 선암종 (prostate adenocarcinoma; PRAD), 자궁체부 자궁내막 암종 (uterine corpus endometrial carcinoma; UCEC), 자궁경부암 (CESC), 피부 흑색종 (cutaneous melanoma; SKCM), 중피종 (mesothelioma; MESO), 요로상피 방광암 (urothelial bladder cancer; BLCA), 투명세포 신장 암종 (clear cell kidney carcinoma; KIRC), 폐 편

평세포 암종 (lung squamous cell carcinoma; LUSC), 자궁암육종 (uterine carcinosarcoma; UCS), 육종 (sarcoma; SARC), 난소 장액성 낭선암종 (ovarian serous cystadenocarcinoma; OV), 유두상 갑상선 암종 (papillary thyroid carcinoma; THCA), 다형성 교모세포종 (glioblastoma multiforme; GBM), 유방암 (BRCA), 저등급 신경교종 (LGG), 및 확산성 대형 B세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphoma; DLBC)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.

- [0162] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "개체", "환자" 또는 "대상체"는 기재된 조성물 및 방법이 치료하는 데 유용한 적어도 하나의 질환을 가지는 것으로 진단 받았거나, 질환에 이환되었을 것으로 의심되거나, 또는 질환이 발병할 위험이 있는 개체를 지칭한다. 일부 실시양태에 따르면, 개체는 포유동물이다. 일부 실시양태에 따르면, 포유동물은 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 라마, 알파카 또는 야크이다. 일부 실시양태에 따르면, 개체는 인간이다.
- [0163] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "유효량"은 포유동물에 투여되었을 때 생물학적 효과를 일으키는 치료량을 지칭한다. 생물학적 효과는 수용체 리간드 상호작용 (예를 들어, PVR-TIGIT, PD-1-PD-L1/PD-L2)의 억제 또는 차단, 신호 전달 경로의 억제, 종양 성장 감소, 종양 전이 감소, 또는 종양을 가진 동물의 생존 기간 연장을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "치료량"은 치료 효과를 발휘하도록 계산된 약물의 농도이다. 치료량은 개체 집단에서 치료 반응을 유도할 수 있는 복용량 범위를 포괄한다. 포유동물은 인간 개체일 수 있다. 인간 개체는 종양을 가졌거나 또는 가지는 것으로 의심되거나 또는 가지고 있는 중일 수 있다.
- [0164] 본원에 사용되는 용어 "조합" 또는 "조합 치료"는 조합될 물품의 동시 투여 또는 조합될 물품의 순차적 투여를 지칭할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 조합이 물품의 순차적 투여를 지칭하는 경우, 물품은 임의의 시간적 순서로 투여될 수 있다.
- [0165] 본원에 사용되는 바와 같은 "체크포인트 억제제"는 유기체에서 T 세포의 항-종양/암 활성을 부정적으로 조절하는 유기체에 의해 생성된 생물학적 분자 ("체크포인트 분자")를 억제하는 약물을 지칭한다. 체크포인트 분자는 제한 없이 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM-3, LAG-3, VISTA, SIGLEC7, PVR, TIGIT, IDO, KIR, A2AR, B7-H3, B7H4, CEACAM1, 및 CD112R을 포함한다.
- [0166] 본 발명의 분자는 잘 알려진 바와 같이 활성 성분과 약학적으로 허용 가능하고, 호환 가능한 부형체에 용해되거나, 분산되거나 또는 이와 혼합된다. 적합한 부형체는, 예를 들어 물, 식염수, 인산 완충 식염수 (PBS), 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 또는 기타 및 이들의 조합이다. 다른 적합한 담체는 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한, 요망되는 경우, 조성물은 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제와 같은 소량의 보조 물질을 포함할 수 있다.
- [0167] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "치료"는 치유적 치료 및 예방적 또는 예비적 조치 둘 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 개체에는 이미 장애를 갖고 있는 개체뿐만 아니라 장애가 예방되어야 할 개체가 포함된다.
- [0168] 용어 "암"과 "종양"은 조절 이상이 있는 세포 성장을 특징으로 하는, 포유동물의 생리학적 상태와 관련된다. 암은 세포 그룹이 제어되지 않는 성장 또는 원하지 않는 성장을 보이는 질환의 한 부류이다. 암 세포는 또한 다른 위치로도 퍼질 수 있으며, 이는 전이 형성으로 이어질 수 있다. 신체 내에서의 암 세포 확산은, 예를 들어, 림프관 혈액을 통해 일어날 수 있다. 제어되지 않는 성장, 침습, 및 전이 형성은 또한 암의 악성 특성이라고도 한다. 이러한 악성 특성은 일반적으로 침습하거나 전이하지 않는 양성 종양과 암을 차별화한다.
- [0169] 일부 실시양태에 따르면, 암을 치료하는 방법은 적어도 하나의 추가적인 항암제의 투여를 포함하는 치료 요법의 일부로서 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0170] 일부 실시양태에 따르면, 항암제는 항대사물질, 세포분열 억제제, 탁산, 토포이소머라아제 억제제, 토포이소머라아제 II 억제제, 아스파라기나제, 알킬화제, 항종양 항생제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.
- [0171] 일부 실시양태에 따르면, 항대사물질은 시타라빈, 플루다라빈, 플루오로우라실, 메르캅토피린, 메토티렉세이트, 티오구아닌, 젬시타빈 및 하이드록시우레아로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 세포분열 억제제는 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 토포이소머라아제 억제제는 토포테칸(topotecan) 및 이리노테칸(irinotecan)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 알킬화제는 부설판(busulfan), 카르무스틴, 로무스틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 시스플라틴, 카보플라틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 벨팔란, 티오테파, 다카르바진 및 프로카르바진(procarbazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 항종양 항생제는 블레오마

이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미토마이신, 미톡산트론 및 플리카마이신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 토포이소머라아제 II는 에토포사이드 및 테니포사이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.

[0172] 본 발명은 다른 양태에 따르면 치료적 유효량의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 약학적 조성물, 및 PD-1, PD-L1, CTLA-4 또는 CD112R 신호전달의 억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암에 이환된 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 폐암, 결장암(colon cancer), 교모세포종(glioblastoma), 췌장암, 유방암, 방광암, 신장암, 두경부암, 난소암, 자궁경부암 또는 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, PD-1 신호전달의 억제제는 PD-1에 결합되는 항체 또는 이의 단편이다. 특정 실시양태에서, PD-1에 결합되는 항체 또는 이의 단편은 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), AMP-514, 티스렐리주맙(Tislelizumab), 스파르탈리주맙(Spartalizumab), 또는 이의 PD-1 결합 단편이다. 특정 실시양태에서, PD-1 신호전달의 억제제는 PD-L1 또는 PD-L2에 특이적으로 결합되는 항체이다. 특정 실시양태에서, PD-L1 또는 PD-L2에 특이적으로 결합하는 항체는 두르발루맙(Durvalumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab), 아벨루맙(Avelumab), BMS-936559, 또는 FAZ053, 또는 이의 PD-L1 또는 PD-L2 결합 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, PD-1 신호전달의 억제제는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 결합하는 Fc-융합 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, Fc-융합 단백질은 AMP-224 또는 이의 PD-1 결합 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, PD-1 신호전달의 억제제는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 소분자 억제제를 포함한다. 특정 실시양태에서, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 신호전달의 소분자 억제제는 다음의 것 중 하나 이상을 포함한다: N-(2-((2-메톡시-6-((2-메틸[1,1'-비페닐]-3-일)메톡시)피리딘-3-일)메틸)아미노)에틸)아세트아미드 (BMS 202); (2-((3-시아노벤질)옥시)-4-((3-(2,3-디하이드로벤조[b][1,4]디옥신-6-일)-2-메틸벤질)옥시)-5-메틸벤질)-D-세린 하이드로클로라이드; (2R,4R)-1-(5-클로로-2-((3-시아노벤질)옥시)-4-((3-(2,3-디하이드로벤조[b][1,4]디옥신-6-일)-2-메틸벤질)옥시)벤질)-4-하이드록시피롤리딘-2-카르복실산; 3-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일)-1-페닐인돌; 3-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일)-1-페닐-1h-인돌; L- $\alpha$ -글루타민, N2,N6-비스(L-세틸-L-아스파라기닐-L-트레오닐-L-세틸-L- $\alpha$ -글루타미닐-L-세틸-L-페닐알라닐)-L-라이실-L-페닐알라닐-L-아르기닐-L-발릴-L-트레오닐-L-글루타미닐-L-류실-L-알라닐-L-프롤릴-L-라이실-L-알라닐-L-글루타미닐-L-이소류실-L-라이실; (2S)-1-[[2,6-디메톡시-4-((2-메틸[1,1'-비페닐]-3-일)메톡시)페닐]메틸]-2-피페리딘카르복실산; 글리신아미드, N-(2-메르캅토아세틸)-L-페닐알라닐-N-메틸-L-알라닐-L-아스파라기닐-L-프롤릴-L-히스티딜-L-류실-N-메틸글리실-L-트립토판-L-세틸-L-트립토판-N-메틸-L-노르류실-N-메틸-L-노르류실-L-아르기닐-L-시스테인-, 시클릭 (1→14)-티오에테르; 또는 이의 유도체 또는 유사체.

[0173] 또한, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 혼합하는 것을 포함하는, 암에 이환된 개체에서 암을 치료하기 위한 조성물의 제조 방법이 본원에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 결장암, 췌장암, 유방암, 방광암, 신장암, 두경부암, 난소암, 교모세포종, 자궁경부암, 전립선암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0174] 또한, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현 및 분비를 가능하게 하는 데 충분한 조건하에서 세포 배양 배지에서 본원에 기재된 세포주를 인큐베이션하는 것을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0175] 일부 특정 실시양태에 따르면, 추가적인 항암제는 베바시주맙(bevacizumab), 카보플라틴, 사이클로포스파미드, 독소루비신 염산염, 젠시타빈 염산염, 토포테칸 염산염, 티오테파 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다.

[0176] **실시예**

[0177] 이하에서 상기 설명과 함께 하기 실시예를 참조하며, 비제한적인 방식으로 발명을 예시한다.

[0178] 일반적으로, 본원에서 사용된 명명법, 및 본 발명에 이용된 실험실 절차는 분자적, 생화학적, 미생물학적, 면역학적 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 잘 알려진 절차를 언급하는 다른 일반적인 참조문헌은 독자의 편의를 위해 이 문헌 전반에 제공된다.

[0179] **실시예 1. 넥틴-2 mRNA의 고발현은 다양한 암 환자의 좋지 않은 생존 확률과 상관 관계가 있다.**

[0180] 넥틴-2 mRNA 발현 수준과 생존 확률 사이의 상관 관계는 TCGA 사이트의 데이터로부터 조사되었고, oncolnc.org 사이트, ([https:// doi.org/10.7717/peerj-cs.67](https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67))를 사용하여 분석하였다. 넥틴-2 mRNA 발현 수준은 저등급 신경교종 (도 1a; p=5.22E-5), 신장 투명 신세포 암종 (도 1b; p=0.00037) 및 폐 선암종 (도 1c; p=0.0319)에 대

해 도 1에서 화살표로 표시한 바와 같이, 낮은 그리고 높은 발현체의 2개의 하위그룹으로 환자를 구분하기 위한 기준이었다.

[0181] 실시예 2. 넥틴-2는 특정 수용체를 통해 면역 세포에 결합하여 영향을 미친다.

[0182] 도 2의 개략도는 면역 세포 상에서 발현되는 수용체와 종양에 의해 또는 항원 제시 세포 (APC) 상에서 발현되는 넥틴-2에 대한 이의 각각의 친화성을 보여준다. TIGIT는 면역 세포 예컨대 T 및 NK 세포 상의 공동-억제 수용체와 관련되고; DNAM-1 (CD226으로도 명명됨)은 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 상의 활성화 수용체와 관련되고; CD112R (PVRIG로도 명명됨)은 림프구 면역 세포 (예를 들어, T 및 NK 세포) 상의 공동-억제 수용체와 관련되고; 넥틴-2 (CD112)는 주로 CD112R에 대한 이의 결합을 통해 면역 세포에 대한 억제 리간드로서 역할을 한다. 본 발명에 따르면, 인간화 항-넥틴-2 mAb는 이의 고친화성 수용체 CD112R과의 넥틴-2 상호작용을 블로킹하고, 특정 독소 전달 및 사멸에 대해 암 세포를 표적화할 수 있다.

[0183] 실시예 3. 넥틴-2는 대부분의 고형 종양 상에서 발현된다.

[0184] 데이터베이스 Proteina1as.com은 넥틴-2의 모든 명칭 (NECTIN2, CD112, HVEB, PRR2, PVRL2, PVRR2)에 대해 조사하였다. 병리학 범주하에서, 3개의 상이한 mAb를 사용한 데이터가 발견되었다. HPA0127569 mAb는 직교 방법 (orthogonal method)으로 검증되었기 때문에 가장 높은 검증 점수 (향상됨)를 받았다. 따라서, 다양한 종양에 걸친 발현 데이터는 이 클론에 대해서만 선택되었으며, 도 3에 도시되어 있다. 그래프는 넥틴-2 발현에 대해 양성인 종양의 백분율을 나타낸다. 17/20 지표에서 넥틴-2의 막 발현은 중간-높은 수준으로 보여진다.

[0185] 실시예 4. 인간화 항-넥틴-2 mAb의 개선된 특성

[0186] 특허출원 공개번호 W02020144697에 개시된 첫과 항-인간 넥틴-2 클론 2.11을 인간화에 대한 선도 mAb로서 선택하였다. 구조 분석에 기초하여, 인간화 변이체를 생성하는 데 사용된 큰 예비적 세트의 서열 세그먼트를 식별하였다. 이들 세그먼트를 선택하여 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 펩티드 결합의 실리코 분석을 위한 iTope™ 기술 (Perry et al., 2008)을 사용하고 그리고 알려진 항체 서열-관련 T 세포 에피토프의 TCED™ (Bryson et al., 2010)을 사용하여 분석하였다. 인간 MHC 클래스 II에 대한 주요 비-인간 생식세포 결합체로서 식별되거나, 또는 TCED™에 대한 유의미한 히트(significant hit)로 점수가 매겨진 서열 세그먼트를 폐기하였다. 이것으로 감소된 세트의 세그먼트가 생성되었고, 이들의 조합이 상기 기재된 바와 같이 추가로 분석되어 세그먼트들 간의 접합이 잠재적인 T 세포 에피토프를 포함하지 않는 것을 보장하였다. 선택된 서열 세그먼트를 주요 T 세포 에피토프가 없는 완전한 V 영역 서열로 조립하였다. 5개의 중쇄 (VH1 내지 VH5) 및 5개의 경쇄 (VK1 내지 VK5) 서열을 이후 선택하였다. 표 1에서의 데이터는 iTope™ 알고리즘의 판독 결과를 나타낸다. 항-약물 항체 (ADA) 생성에 대한 잠재성을 줄이기 위해, mAb의 서열을 MHCII의 잠재적 결합에 대해 분석하였다. 주요 위험은 중간 친화성 결합 펩티드와 구분되는 고친화성 결합 펩티드와 연관되어 있다.

**표 1**

인간화 항-백틴-2 mAb의 개선된 특성. 선도 약물 선별을 위한 인간화 변이체를 생성하기 위해 사용되는 모 (V0) 및 인간화 가변 중쇄 (VH1-5) 및 경쇄 (Vk1-5)의 예측된 MHCII 에피토프 (iTope 점수)의 예시.

중쇄

예측된 친화성 MHCII	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
중간	5	6	4	4	4	3
높음	8	4	3	3	1	1

경쇄

예측된 친화성 MHCII	Vk0	Vk1	Vk2	Vk3	Vk4	Vk5
중간	8	4	3	3	3	1
높음	4	3	3	2	2	2

[0187]

[0188]

모 중쇄 (VH0)는 8개의 예측된 고친화성 모티프(motif)를 가졌고, 모 경쇄 (Vk0)는 4개의 이러한 모티프를 가졌다. 인간화 과정에 따라, 중쇄에 대한 예측된 고친화성 MHCII 에피토프의 수는 3개 (VH2, VH3)로 또는 심지어 1개 (VH4, VH5)로 감소되었고, 경쇄의 경우 예측된 고친화성 MHCII 모티프는 2개 (VK3-5)로 감소되었다.

[0189]

이에 따라, 인간화 과정은 mAb에 대한 면역원성을 유발할 수 있는 예측된 고친화성 MHCII 모티프의 대부분을 제거하였다.

[0190]

인간화된 변이체의 안정성은 단백질과 제형의 안정성을 등급화하는 잘 확립된 방법인 열 램프 안정성(thermal ramp stability) 실험을 통해 평가되었다. 단백질의 변성 프로파일(denaturation profile)은 이의 열 안정성에 대한 정보를 제공하고, 구조적 및 제형화 완충제 변형(formulation buffer modification)을 평가하기 위한 구조적 '핑거프린트(fingerprint)'를 나타낸다. 단백질의 열적 구조적 안정성의 널리 사용되는 척도는 그것이 본래 상태에서 변성된 상태로 풀려지는(unfolding) 온도이다.

[0191]

다수의 단백질의 경우, 이러한 풀러지는 과정은 좁은 온도 범위에서 발생하며 이 전환의 중간 지점은 '융점' 또는 'Tm'으로 명명된다. 단백질의 융점을 결정하기 위해, UNcle은 단백질이 구조적 변화를 겪을 때 시프로 오렌지(Sypro Orange) (단백질의 노출된 소수성 영역에 결합됨)의 형광을 측정한다. 증가된 Tm은 그것이 보다 안정한 Ab로 예측되기 때문에 Ab 선도 선별에서의 요망되는 특징이다.

[0192]

정제된 선도 인간화 항체 변이체를, 2회로, 시프로 오렌지 (160x 저장 용액 중)가 20x 용액의 최종 농도로 첨가되는 PBS에서 0.5 mg/ml의 최종 시험 농도까지 희석하였다. 9 µL의 각 샘플 혼합물을 UNi 마이크로큐벳에 2회 장입하였다. 램프 속도가 0.3 °C/분이고, 473 nm에서 여기되는 15 - 95°C의 열 램프에 샘플을 적용하였다. 전체 방출 스펙트럼을 250-720 nm에서 수집하였고, 510 - 680 nm 사이의 곡선하 면적을 사용하여 전이 곡선의 변곡점 (Tonset 및 Tm)을 계산하였다. 표 2에 보여지는 바와 같이, 시험되는 모든 항체의 경우, Tm1 및 Tonset은 키메라 항체 (VH0/Vk0)와 비교하여 인간화 변이체에 대해 더 높았다.

**표 2**

UNCle 생체안정성 플랫폼을 사용하여 결정되는 바와 같은, 모/키메라 (VH0/Vκ0) 항체에 대한 그리고 6개의 정제된 선도 인간화 변이체에 대한 열 안정성 값의 요약. 5 섭씨 온도 초과와 Tonset 및 Tm1 둘다의 개선된 안정성 (폴립(unfolding)의 측정)은 유의미한 것으로 간주되었고, 굵은 글씨체로 표시된다.

변이체	평균 Tonset (°C)	평균 Tm1 (°C)
VH0/Vκ0	58.1	67.3
VH3/Vκ3	<b>65.6</b>	<b>74.3</b>
VH4/Vκ2	60.7	71.9
VH4/Vκ3	60.6	70.8
VH5/Vκ3	58.8	72.7
VH5/Vκ4	59.9	68.3
VH5/Vκ5	61.3	69.4

[0193]

[0194]

**실시예 5. 넥틴-2의 개선된 결합, 및 인간화 항-넥틴-2 mAb에 의한 CD112R 결합의 블로킹**

[0195]

293T 세포, (단백질 식별기호: Q92692) 및 클로로세부스 (아프리카 녹색 원숭이, AFG) Vero 세포에 의해 발현된 인간 넥틴-2에 대한 인간화 항-넥틴-2 mAb 결합을 평가하였고, EC50 값을 확립하였다. AFG는 인간 넥틴-2에 대해 97% 유사성을 갖는 넥틴-2 단백질 (XP\_007995342.1)을 발현한다. 도 4a 및 4b는 인간 및 AFG 세포로 발현된 넥틴-2 각각에 대한 EC50 값의 배수 변화를 도시한다. 두 세포주를 웰당  $0.5 \times 10^5$  개의 세포로 플레이팅(plating)하였다. 키메라 (HOK0) 및 인간화 mAb를 20-0.001 nM의 농도 범위로 첨가하였다. 검출을 위해, 항-인간-APC Ab를 1:200으로 희석하여 사용하였다 (Jackson Immunoresearch AB\_2340526). 세포를 FACS 및 EC50으로 분석하고, 계산하여 키메라 Ab의 것과 비교하였다 (배수 개선). 이 분석은 키메라 mAb와 비교하여 인간화 변이체의 개선된 결합과 원숭이 넥틴-2에 대한 유사한 정도의 교차-반응성(cross-reactivity)을 보여주었다 (도 4a 대 4b). 인간화 Ab의 블로킹 능력을 평가하기 위해, 인간 넥틴-2를 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 과발현시켰다. 도 4c는 66-0.81nM의 범위의 농도의 표시된 인간화 Ab의 존재하에서  $10^5$  개의 CHO-h넥틴-2/웰을 30nM의 인간 CD112R-mIgG2a와 함께 인큐베이션하였을 때 생성된 데이터를 나타낸다. 결합된 CD112R을 1:200으로 희석된 αmIgG2a-647 (Jackson Immunoresearch Cat 115-607-186)을 사용하여 검출하고 그 다음 FACS 분석을 후속하였다. 알 수 있는 바와 같이, 모든 인간화 변이체는 전체 블로킹 능력을 유지하였다.

[0196]

**실시예 6. 항-h넥틴-2 인간화 변이체 H3K3은 Fc 비의존적 방식으로 ADC 드라이버(driver)로서 역할을 할 수 있다**

[0197]

ADC로서 역할을 하는 mAb의 능력을 평가하기 위해, 스트렙타비딘-사포린 (ZAP), IT-27-250 (ATS)를 사용하였다. 도 5에 나타난 mAb를 1:1 비로 비오티닐화 키트 Ab207195 (Abcam)를 사용하여 비오티닐화시켰다. 도 5a는 표적으로서 A549 (폐 선암종) 세포 및 상위 인간화 클론을 포함하는 초기 스크린(screen)의 결과를 도시한다. 웰당  $2 \times 10^3$  개의 세포를 플레이팅하고, 4-6 기간에 걸쳐 부착될 수 있게 하였다. ADC를 첨가하였고, 세포를 ADC와 함께 인큐베이션하였다. 72시간 후, 분석물을 수확하였고, 종양 세포 사멸을 표준 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 세포 생존도 측정(Cell Viability Assay) - (Promega G9242)를 사용하여 평가하였다. 클론 H3K3만이 강

력한 사멸을 나타내었다. 그 다음, 클론 H3K3을 클론 H4K2와 직접적으로 비교하였다 (도 5b). 두 클론은 강력한 사멸을 나타내었고, H3K3는 우수한 개발가능성 특성으로 인해 향후 분석을 위해 선택되었다. 키메라 모 클론 및 클론 H3K3 (IgG1)의 FcγR<sup>mut1</sup> 변이체 (IgG2-P238H)(FcγR<sup>mut1</sup>에서, g는 감마 또는 γ에 대한 것임)를 상기 조건하에서 시험하였고, 결과는 도 5c에 나타나 있다. 키메라 및 인간화 H3K3 변이체 둘 모두에 의한 유의미한 사멸 (p<0.001)은 모든 농도의 이들 ADC에서 보여졌고, FcγR<sup>mut1</sup> 변이체는 hIgG1 클론과 비교하여 동일한 수준의 표적 T 세포 사멸을 유발하였다.

[0198] 실시예 7. 항-h넥틴-2 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> ADC는 시험관 내에서 고휘형 종양 세포주의 강력한 사멸을 유발한다

[0199] 추가적인 H3K3-FcγR<sup>mut1</sup> mAb를 표 3에 나타난 바와 같이 인간 IgG1의 힌지 영역에서 중요 잔기를 돌연변이시킴으로써 생성하였다.

**표 3**

H3K3-기반 ADC에 대한 인간화 IgG1 FcγR<sup>mut1</sup> 링커-페이로드 조합을 위한 Fc-치환, 방출 메커니즘, 및 관련 약물 대 항체 비 (drug-to-antibody ratio; DAR)의 요약.

Fc- 돌연변이 (FcγR <sup>mut1</sup> )	링커	페이로드	방출 메커니즘	평균 DAR (LC-MS)
hIgG1 G237I	MC-VC-PAB	MMAE	단백질 분해 절단	4.3
hIgG1 G237I	MC	MMAF	분해	4.2
hIgG1 L235S	SMCC	DM1	분해	4.0
hIgG1 L235S	SPDB	DM4	산화환원	4.2
hIgG1 L235S/G237I	Lys-PAB-CO	SN38	pH	8

[0200]

[0201] 제시된 링커 페이로드 조합은 요망되는 방출 메커니즘에 따라 선택되었고, Abzena LTD에 의한 표준 프로토콜에 따라 생성하였다. 간략하게는, mAb를 환원시키고, 과량의 링커-페이로드와 함께 인큐베이션하여, 8의 목표 DAR을 가졌던 SN-38을 제외하고 모든 링커-페이로드에 대해 4의 요망되는 약물 항체 비 (DAR)를 얻었다. 최종 생성물을 이후 정제하였고, LC/MS 방법에 의해 DAR을 확립하였다. 다양한 고휘형 종양을 나타내는 선택된 종양 세포주를 사용하여 다양한 링커-페이로드 조합의 효능을 시험관 내에서 평가하였다. 나타낸 표적 세포를 웰당 2x10<sup>3</sup> 개의 세포로 플레이팅하였고, 4-6 기간에 걸쳐 부착될 수 있게 하였다. ADC를 5-배 희석을 사용하여 4-0.16 μg/ml의 농도로 첨가하였고, 세포를 ADC와 함께 인큐베이션하였다. 72시간 후, 분석물을 수확하였고, 종양 세포 사멸을 표준 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 세포 생존도 검정 - (Promega G9242)를 사용하여 평가하였다. RKO 세포 (대장 선암종), MDA-MB-231 세포 (삼중 음성 유방암) 및 A549 세포 (폐 선암종)의 강력한 사멸은 각각 도 6a-6c에 도시되어 있다. 양측 연구 t-시험(two-tailed student t-test)에 의해 NS (유의미하지 않음, p>0.05)로 나타나지 않는 한, 표적 세포의 사멸은 유의미하였다 (p<0.001).

[0202] 실시예 8. 선택된 FcγR<sup>mut1</sup> 돌연변이는 FcγR을 통해 ADC 사멸을 방지한다

[0203] 이의 FcγR에 대한 Ab Fc 결합에 기인하고, ADC의 비특이적 효과에 기여할 수 있는 인간화 항-넥틴-2 ADC에 의한 비-표적 특이적 사멸의 정도를 평가하기 위해, 고친화성 Fc 수용체 hCD64 (CHO-hCD64)를 과발현하는 CHO 세포를 생성하였다. 이들 세포는 인간 넥틴-2를 발현하지 않고, 이에 따라 표적-특이적 사멸은 없을 것으로 예측

된다. 모 CHO 세포 및 CHO-hCD64를 웰당  $2 \times 10^3$  개의 세포로 플레이팅하고, 4-6 시간에 걸쳐 부착될 수 있게 하였다. 상이한 Fc 변이체 ADC를  $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하였다. 72시간의 인큐베이션 후, 분석물을 수확하였고, 종양 세포 사멸을 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 세포 생존도 검정 - (Promega G9242)를 사용하여 평가하였다.

[0204] 도 7에 보여지는 바와 같이, 두 IgG4-S228P 및 hIgG1-양성 대조군은 예측된 바와 같이 모 CHO 세포와 비교하여 CHO-hCD64 세포의 상당하게 더 높은 정도의 사멸을 유발하였다. 다른 한편, IgG1 G237I 치환은 모 및 hCD64 과 발현 세포 둘다의 유사하게 낮은 수준의 사멸을 초래하였다 (비-특이적 사멸). 이들 결과는 FcγR<sup>nu11</sup> 변이체가 고 친화성 FcγR CD64에 의해 결합되어 내재화되지 않았음을 확인한다.

[0205] **실시예 9. 항-h넥틴-2 인간화 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup> ADC는 시험관 내에서 혈액 종양 세포주 HL-60의 강력한 사멸을 유발한다**

[0206] HL-60 세포 (AML 모델)을 웰당  $2 \times 10^3$  개의 세포로 플레이팅하였고, ADC를 3-배 희석을 사용하여  $9-1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 세포를 72시간 동안 ADC와 함께 인큐베이션하였다. 이후, 분석물을 수확하였고, 종양 세포 사멸을 상기 기재된 바와 같이 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 세포 생존도 검정 - (Promega G9242)를 사용하여 평가하였다. 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, (그래프에서 나타난) DM1 페이로드를 제외하고, 모든 다른 화합물은 시험되는 모든 농도에서 표적의 유의미한 사멸을 유발하였고, 모두 최고 농도 (>60nM)에서 90% 사멸을 초과하였다. 이들 결과에 기반하여 SMCC-DM1 링커 페이로드를 향후 실험으로부터 배제하였다.

[0207] **실시예 10. 항-h넥틴-2 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MC-VC-PAB-MMAE ADC는 공격적 AML 모델에서 종양 퇴행을 유발한다**

[0208] 누드 암컷 마우스 (n=25)에 1:1 매트릭젤(Matrigel) 중의  $10 \times 10^6$  개의 HL-60 세포를 s.c. 주사하였다. 종양의 평균 체적이  $205 \text{ mm}^3$ 에 도달되었을 때, 마우스를 5개의 그룹 (그룹당 n=5)으로 무작위화하고, PBS (비히클), H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAE, H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAF, H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-DM4 또는 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-SN-38의 i.v. 주사에 의해 맹검 방식으로 처리하였다. 모든 처리는  $5 \text{ mg}/\text{kg}$ 으로 4일마다 4회 연속 용량으로 주어졌다. 도 9a에서 알 수 있는 바와 같이, 무작위화 후 23일차에, H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAF 및 SN-38 변이체는 종양 성장을 약화시키지 못하였다. H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-DM4는 49%의 유의미한 종양 성장 억제 (TGI)를 유발하였고, 한편 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAE는 유의미한 종양 퇴행을 유발하였다. 도 9b는 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAE의 평균 효과를 나타낸다.

[0209] **실시예 11. 항h넥틴-2 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MC-VC-PAB-MMAE ADC는 공격적 결장 선암종 모델에서 종양 퇴행을 유발한다**

[0210] 누드 암컷 마우스 (그룹당 n=5)에 1:1 매트릭젤 중의  $5 \times 10^6$  개의 RKO 세포를 SC 주사하였다. 종양의 평균 체적이  $160 \text{ mm}^3$ 에 도달되었을 때, 마우스를 2개의 그룹으로 무작위화하고, 4일마다  $5 \text{ mg}/\text{kg}$ 으로 4회 연속 용량으로 PBS (비히클) 또는 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAE (1107-MC-VC-MMAE)의 i.v. 주사에 의해 맹검 방식으로 처리하였다. 무작위화 후 13일차에, H3K3-FcγR<sup>nu11</sup>-MMAE는 도 10에서 알 수 있는 바와 같이 유의미한 종양 퇴행을 유발하였고, 이는 비히클 처리된 그룹과 비교하여 >80% TGI를 나타낸다.

[0211] **실시예 12. 항-h넥틴-2 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup> mAb는 트로델비와 비교하여 유사한 시험관내 사멸 활성을 갖는다**

[0212] 시험관내 사멸 검정 (도 11)을 위해, MDA-MB-231 표적 세포를 웰당  $2 \times 10^3$  개의 세포로 플레이팅하였고, 4-6 시간에 걸쳐 부착될 수 있게 하였다. 그 다음, Dxd에 연결된 H3K3-FcγR<sup>nu11</sup> 항-넥틴-2 mAb (NTX1107) 및 TNBC에 대해 승인된 ADC 약물인 트로델비 (사시투주맙 고비테칸)을  $12 \mu\text{g}/\text{ml}$  (어두운 회색 막대) 및  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  (밝은 회색 막대)의 농도로 첨가하였다. 중요하게는, 두 ADC는 동일한 클래스의 세포독성 페이로드 (즉, 토포이소머라아제 I (TOP1) 억제제)를 사용한다. 세포를 120 시간 동안 ADC와 함께 인큐베이션하였고 그 이후 종양 세포 사멸을 표준 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 세포 생존도 검정 - (Promega G9242)를 사용하여 평가하였다. MDA-MB-231 세포의 강력한 사멸은 두 ADC에 의해 유도되었고, 두 농도에서 트로델비의 우수성은 유의미하였다 (\*\*\*p < 0.0005).

[0213] 실시예 13. 트로텔비가 아닌 토포이소머라아제 1 억제제에 접합된 항-h넥틴-2 H3K3-FcgR<sup>mu11</sup>은 생체 내에서 공격적인 MDA-MB-231 종양의 성장을 억제한다

[0214] 누드 암컷 마우스 (그룹당 n=7)에 1:1 매트릭셀 중의 5x10<sup>6</sup> 개의 MDA-MB-231 세포를 s.c. 주사하였다. 종양의 평균 체적이 230 mm<sup>3</sup>에 도달되었을 때, 마우스를 처리 그룹으로 무작위화하고, 4일마다 5 mg/kg에서 3회 연속 용량으로 PBS (비히클), NTX1107-Dxd, 또는 트로텔비의 i.v. 주사에 의해 맹검 방식으로 처리하였다. 종양 성장에 대한 트로텔비 처리에 대한 효과는 없었다.

[0215] 도 12에서 보여지는 바와 같이, NTX1107-Dxd는 종양 성장을 유의미하게 억제할 수 있었다 (\*p<0.02, \*\*<0.005, \*\*\*p < 0.0005). 이러한 발견은 예상하지 못한 것이며, 그 이유는 트로텔비의 시험관내 사멸 효능은 NTX1107-Dxd의 것보다 더 높았고 (도 11), 트로텔비는 TNBC에 대한 승인한 ADC이었기 때문이다. 이러한 발견은 항-넥틴-2 (NTX1107)이 독특하게 고품 종양의 치료를 위한 강력한 ADC임을 시사한다.

[0216] 실시예 14. 항-h넥틴-2 H3K3-FcgR<sup>mu11</sup>은 튜블린 또는 TOP1 표적화제에 접합될 때 생체 내에서 공격적인 MDA-MB-231 종양을 퇴행시킬 수 있다

[0217] 누드 암컷 마우스 (그룹당 n=7)에 1:1 매트릭셀 중의 5x10<sup>6</sup> 개의 MDA-MB-231 세포를 s.c. 주사하였다. 종양의 평균 체적이 210 mm<sup>3</sup>에 도달되었을 때, 마우스를 처리 그룹으로 무작위화하고, 4일마다 5회 연속 용량으로 PBS (비히클), H3K3-FcgR<sup>mu11</sup> (NTX1107)-MMAE, 또는 NTX1107-Dxd의 i.v. 주사에 의해 맹검 방식으로 처리하였다. 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, NTX1107-MMAE로 처리된 모든 동물은 연구의 종료 시 검출 가능한 종양을 가지지 않았다. NTX1107-Dxd로 처리된 동물의 경우, 4마리는 종양이 없었고, 한편 나머지 3마리의 경우, 평균 종양 체적은 210mm<sup>3</sup>이었고, 이는 종양 성장중지를 나타낸다. 이러한 발견은 본원에 기재된 넥틴-2를 표적화하는 인간화 항체 (NTX1107)가 독특하게는 다양한 클래스의 페이로드를 사용하는 경우 고품 종양의 치료를 위한 강력한 ADC를 형성할 수 있음을 시사한다.

[0218] 서열

표 4

CDR 서열:

설명	KABAT	IMGT	중복 서열
중쇄 CDR1	SYWIH (서열 번호 1)	GYIFTSYW (서열 번호 7)	SYW
중쇄 CDR2	AVYPGNSDSNYNQKF(KA/QG) (서열 번호 2)	VYPGNSDS (서열 번호 8)	서열 번호 8
중쇄 CDR3	LVGTFDY (서열 번호 3)	TKLVGTFDY (서열 번호 9)	서열 번호 3
경쇄 CDR1	(K/R)ASQNVGINV(V/A) (서열 번호 4)	QNVGIN (서열 번호 10)	서열 번호 10
경쇄 CDR2	SASYRYS (서열 번호 5)	SAS	SAS
경쇄 CDR3	QQYNTNPFT (서열 번호 6)	서열 번호 6	서열 번호 6

[0219]

[0220]

서열 번호 11 - 중쇄 가변 영역 NT20-11\_VH3

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
DSNYNQKFKARVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGT  
TVSS

[0221]

[0222]

서열 번호 12 - 경쇄 가변 영역 NT20-11\_Vk3

DIQMTQSPSTLSASVGRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTITSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0223]

[0224]

서열 번호 13 - 중쇄 가변 영역 NT20-11\_VH1

EVQLVQSGTELKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
DSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTKLVGTFDYWGQGT  
TVSS

[0225]

[0226]

서열 번호 14 - 중쇄 가변 영역 NT20-11\_VH2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
DSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGT  
TVSS

[0227]

- [0228] 서열 번호 15 - 중쇄 가변 영역 NT20-11\_VH4  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
 DSNYNQKFQGRVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTV  
 TVSS
- [0229]
- [0230] 서열 번호 16 - 중쇄 가변 영역 NT20-11\_VH5  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
 DSNYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTV  
 TVSS
- [0231]
- [0232] 서열 번호 17 - 경쇄 가변 영역 NT20-11\_Vk1  
 DIVMTQSPSFLSASVGDRSVTCKASQNVGINVVWYQQRAGQPPKTLIYSASYRYSG  
 VPDRFTGSGSGTDFLTITSSSLQSEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK
- [0233]
- [0234] 서열 번호 18 - 경쇄 가변 영역 NT20-11\_Vk2  
 DIVMTQSPSTLSASVGDRSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSG  
 VPDRFTGSGSGTDFLTITSSSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK
- [0235]
- [0236] 서열 번호 19 - 경쇄 가변 영역 NT20-11\_Vk4  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSG  
 VPDRFSGSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK
- [0237]
- [0238] 서열 번호 20 - 경쇄 가변 영역 NT20-11\_Vk5  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVAWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSG  
 VPDRFSGSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK
- [0239]

표 5

인간화 중쇄 가변 영역의 프레임워크 (비-CDR) 서열.

사슬	FR-H1	FR-H2	FR-H3	FR-H4
VH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYIFT (서열 번호 21)	WVRQPPGKGLEWI G (서열 번호 22)	RVTITAVTSTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYC TK (서열 번호 23)	WGQGTTVTV SS (서열 번호 24)
VH1	EVQLVQSGTELKKPGSSV KVSKASGYIFT (서열 번호 25)	WVRQPPGKGLEWI G (서열 번호 22)	RATITAVTSTSTAYM ELSSLTSEDSAVYYCT K (서열 번호 26)	WGQGTTVTV SS (서열 번호 24)
VH2	EVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYIFT (서열 번호 27)	WVRQPPGKGLEWI G (서열 번호 22)	RATITAVTSTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYC TK (서열 번호 28)	WGQGTTVTV SS (서열 번호 24)
VH4	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYIFT (서열 번호 21)	WVRQPPGKGLEWI G (서열 번호 22)	RVTITAVTSTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYC TK (서열 번호 23)	WGQGTTVTV SS (서열 번호 24)
VH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYIFT (서열 번호 21)	WVRQPPGKGLEWI G (서열 번호 22)	RVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYC TK (서열 번호 29)	WGQGTTVTV SS (서열 번호 24)

[0240]

표 6

인간화 경쇄 가변 영역의 프레임워크 (비-CDR) 서열.

사슬	FR-L1	FR-L2	FR-L3	FR-L4
LK3	DIQMTQSPSTLSASVGDR VSVTC (서열 번호 30)	WYQQKPGQPPKTLIY (서열 번호 31)	GVPDRFSGSGGTD TLTISSLQAEDLAEYF C (서열 번호 32)	FGQGTKLEI K (서열 번호 33)
LK1	DIVMTQSPSFLSASVGDR VSVTC (서열 번호 34)	WYQQRAGQPPKTLIY (서열 번호 35)	GVPDRFTGSGGTD TLTISSLQSEDLAEYF C (서열 번호 36)	FGQGTKLEI K (서열 번호 33)
LK2	DIVMTQSPSTLSASVGDR VSVTC (서열 번호 37)	WYQQKPGQPPKTLIY (서열 번호 31)	GVPDRFTGSGGTD TLTISSLQAEDLAEYF C (서열 번호 38)	FGQGTKLEI K (서열 번호 33)
LK4	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITC (서열 번호 39)	WYQQKPGQPPKTLIY (서열 번호 31)	GVPDRFSGSGGTD TLTISSLQAEDVAVYY C (서열 번호 40)	FGQGTKLEI K (서열 번호 33)
LK5	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITC (서열 번호 39)	WYQQKPGQPPKTLIY (서열 번호 31)	GVPDRFSGSGGTD TLTISSLQAEDVAVYY C (서열 번호 40)	FGQGTKLEI K (서열 번호 33)

[0241]

[0242]

서열 번호 41 - HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFKA

[0243]

서열 번호 42 - HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFQG

[0244]

서열 번호 43 - LC CDR1 KASQNVGINVV

[0245]

서열 번호 44 - LC CDR1 KASQNVGINVA

[0246]

서열 번호 45 - LC CDR1 RASQNVGINVV

[0247]

서열 번호 46 - LC CDR1 RASQNVGINVA

[0248]

서열 번호 47 - VH3 전장 hIgG1 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS  
DSNYNQKFKARVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTKLVGTFDYWGQTTV  
TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

[0249]

AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC  
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0250]

[0251]

서열 번호 48 - DNA 서열 VH3 전장 hIgG1

caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacgggcagcagcgtgaaagtg  
 agctgcaaagcagcggctatattttaccagctattggattcattgggtgcccagccg  
 ccgggcaaaggcctggaatggattggcgggtgtatccgggcaacagcgtatagcaactat  
 aaccagaaatttaagcgcgcgtgaccattaccgcggtgaccagcaccagcaccgcgtat  
 atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcaccaaactggtg  
 ggcaccttgattattggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcgcgagcaccaaa  
 ggcccagcgtgtttccgctggcggcagcagcaaaagcaccagcggcggcaccgcggcg  
 ctgggctgcctggtgaaagattattttccggaaccgggtgaccgtgagctggaacagcggc  
 gcgctgaccagcggcgtgcataacctttccggcggtgctgcagagcagcggcctgtatagc  
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcccagcagcagcctgggcacccagacctatatttgcaac  
 gtgaaccataaacggagcaaacaccaaagtggataaacgcgtggaaccgaaaagctgcgat  
 aaaaccataacctgcccgcctgcccggcgccggaactgctggcgggcccagcgtgttt  
 ctgtttccgcccgaaccgaaagataacctgatgattagccgcaccccggaagtgacctgc  
 gtggtggtggatgtgagccatgaagatccggaagtgaaatttaactggtatgtggatggc  
 gtggaagtgcataacgcgaaaaccaaacccgcgcgaagaacagtataacagcacctatcgc  
 gtggtgagcgtgctgaccgtgctgcatacaggattggctgaacggcaagaatataaatgc  
 aaagtgagcaacaaagcgtgcccggcggcgtattgaaaaaaccttagcaaaagcgaaggc  
 cagccgcgcgaaccgcaggtgtatacctgcccgcgagccgcgaagaatgaccaaaaaac  
 caggtgagcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgtatattgcggtggaatgg  
 gaaagcaacggccagccggaaaacaactataaaaccacccccgcgggtgctggatagcgt  
 ggcagctttttctgtatagcaaacctgacctggataaaaagccgtggcagcagggcaac  
 gtgtttagctgcagcgtgatgcatgaagcgtgcataaacctataaccagaaaagcctg  
 agcctgagcccgggcaaa

[0252]

[0253]

서열 번호 49 - Vk3 전장 카파 경쇄의 아미노산 서열

DIQMTQSPSTLSASVGDVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPTLIYSASRYSG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFYFGQGTKLEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST  
 YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0254]

[0255]

서열 번호 50 - DNA 서열 Vk3 전장 카파

gatattcagatgaccagagcccagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgagc  
 gtgacctgcaaagcagcagccagaacgtgggcattaacgtggtgtggtatcagcagaaaccg  
 ggccagccgcccgaaaacctgatttatagcgcgagctatcgctatagcggcgtgcccgat  
 cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttacctgaccattagcagcctgcaggcg  
 gaagatctggcggaaatatttttgccagcagatataacaccaaccgctttacctttggccag

[0256]

ggcaccaaactggaaattaaacgcaccgtggcggcgccgagcgtgtttattttccgccc  
 agcgtgaaacagctgaaaagcggcaccgcgagcgtggtgtgctgctgaacaacttttat  
 ccgcgcaagcgaagtgcagtggaaagtggataacgcgctgcagagcggcaaacagccag  
 gaaagcgtgaccgaacaggatagcaaaagatagcacctatagcctgagcagcaccctgacc  
 ctgagcaaaagcggattatgaaaaacataaaagtgtatgcgtgcgaagtgacctatcagggc  
 ctgagcagcccgggtgaccaaaagctttaaccgcgcgcaatgc

[0257]

[0258]

서열 번호 51 - VH3 핵산

[0259]

서열 번호 52 - VH1 핵산

[0260]

서열 번호 53 - VH2 핵산

[0261]

서열 번호 54 - VH4 핵산

[0262]

서열 번호 55 - VH5 핵산

[0263]

서열 번호 56 - Vk3 핵산

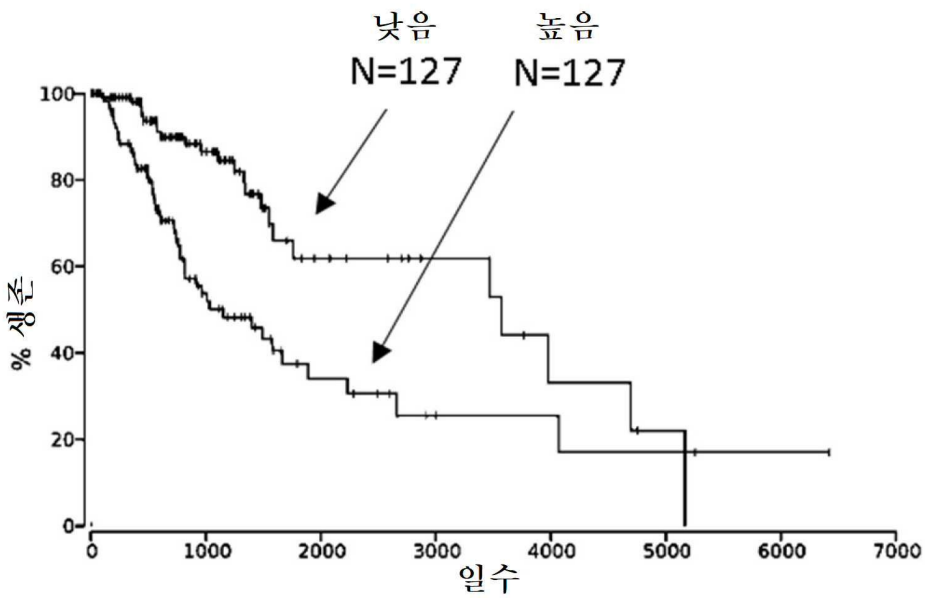
[0264]

서열 번호 57 - Vk1 핵산

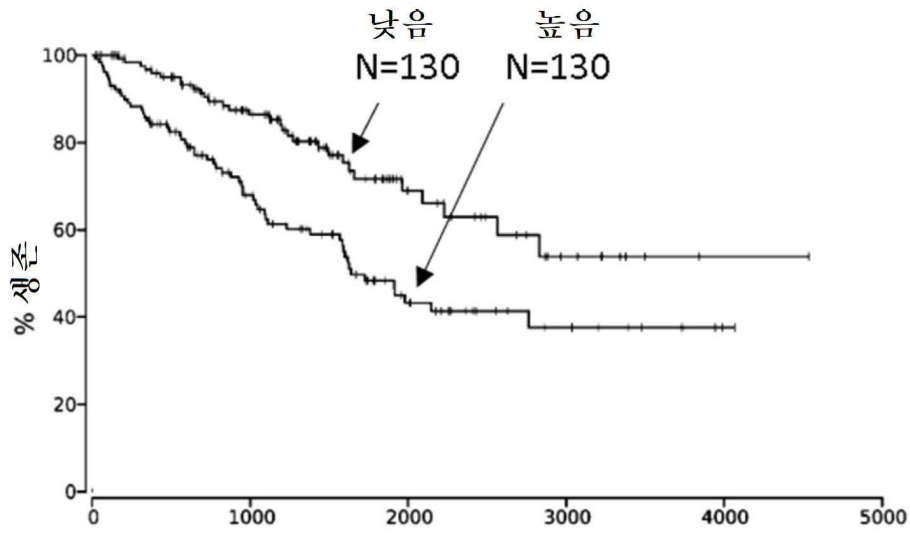
- [0265] 서열 번호 58 - Vk2 핵산
- [0266] 서열 번호 59 - Vk4 핵산
- [0267] 서열 번호 60 - Vk5 핵산
- [0268] 서열 번호 61 - 인간 IgG1 (L235S) (VH3 포함)
- [0269] 서열 번호 62 - 인간 IgG1 (L235S / E272K) (VH3 포함)
- [0270] 서열 번호 63 - 인간 IgG1 (G237I) (VH3 포함)
- [0271] 서열 번호 64 - 인간 IgG1 (G237I / E272I) (VH3 포함)
- [0272] 서열 번호 65 - 인간 IgG1 (G237I / V264R) (VH3 포함)
- [0273] 서열 번호 66 - 인간 IgG1 (V215A / E269R / K322A) (VH3 포함)
- [0274] 서열 번호 67 - 인간 IgG1 (L234A/ L235A / P329G) (VH3 포함)
- [0275] 서열 번호 68 - 인간 IgG4 (S228P / L235P / V264R) (VH3 포함)
- [0276] 서열 번호 69 - 인간 IgG2 (P238H) (VH3 포함)
- [0277] 서열 번호 70 - 인간 IgG2 (P238H / V264R) (VH3 포함)
- [0278] 서열 번호 71 - 선도 펩티드 서열.

**도면**

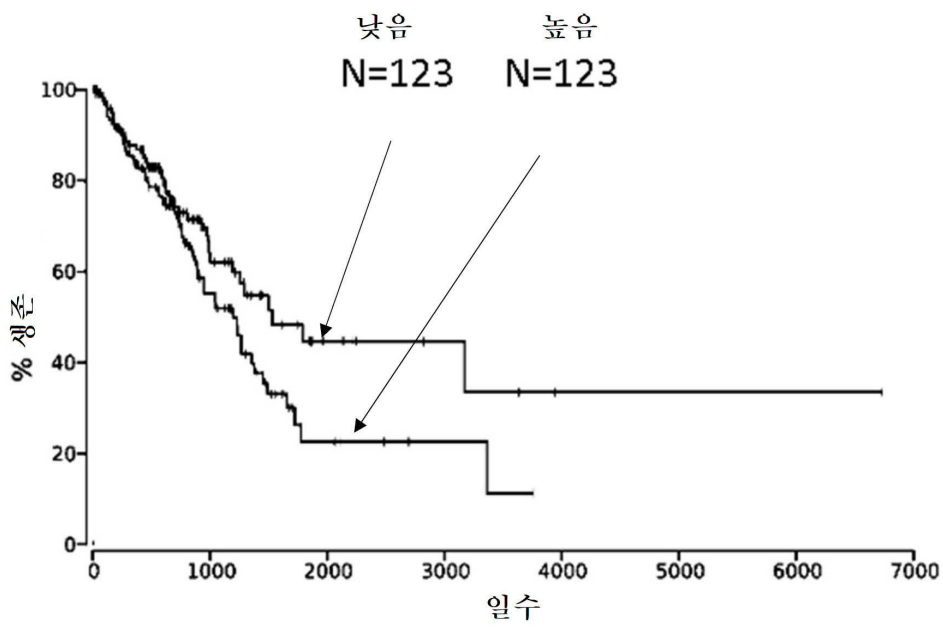
**도면1a**



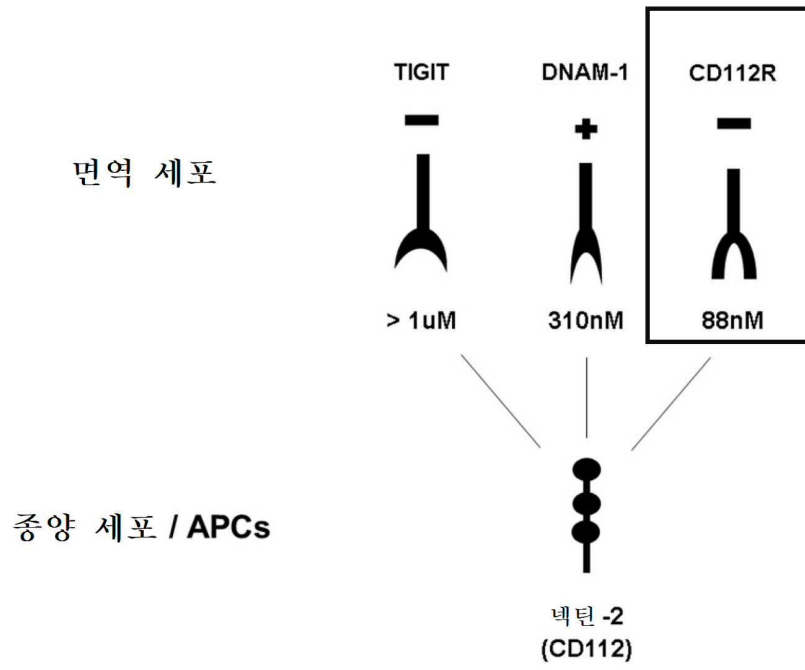
도면1b



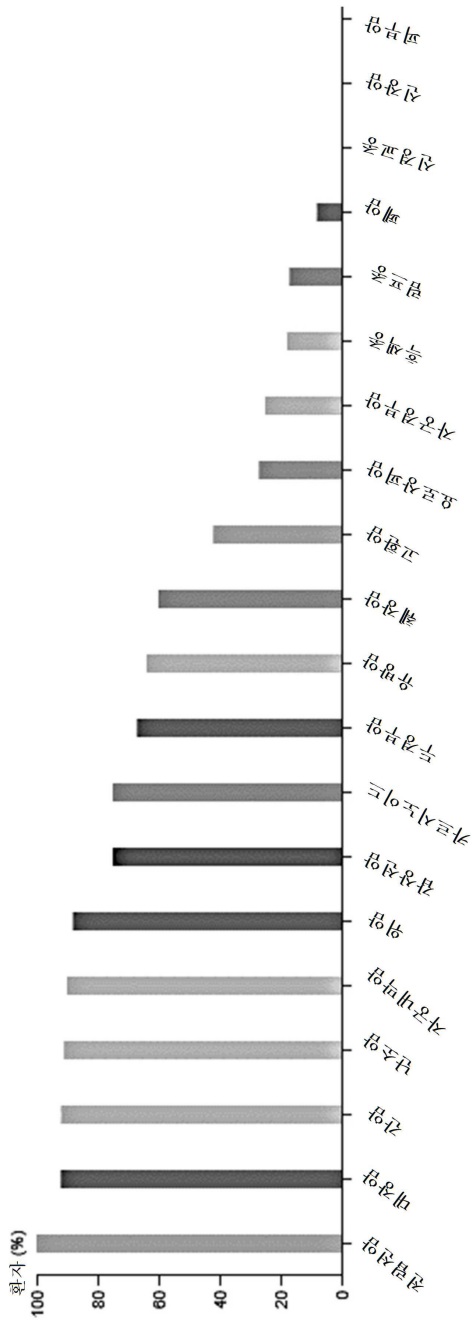
도면1c



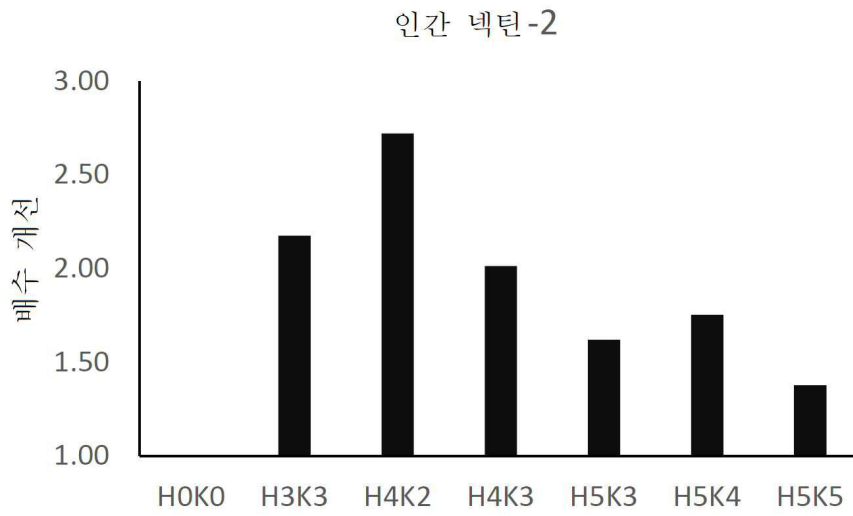
도면2



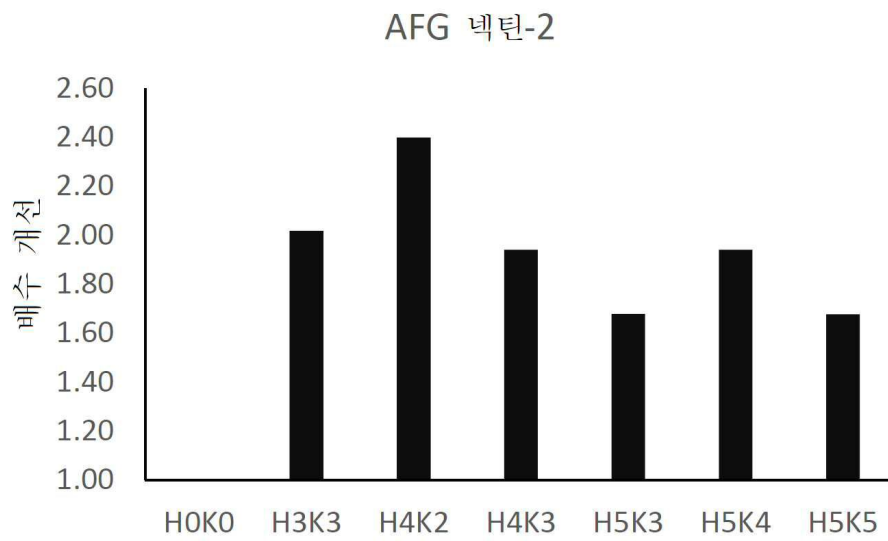
도면3



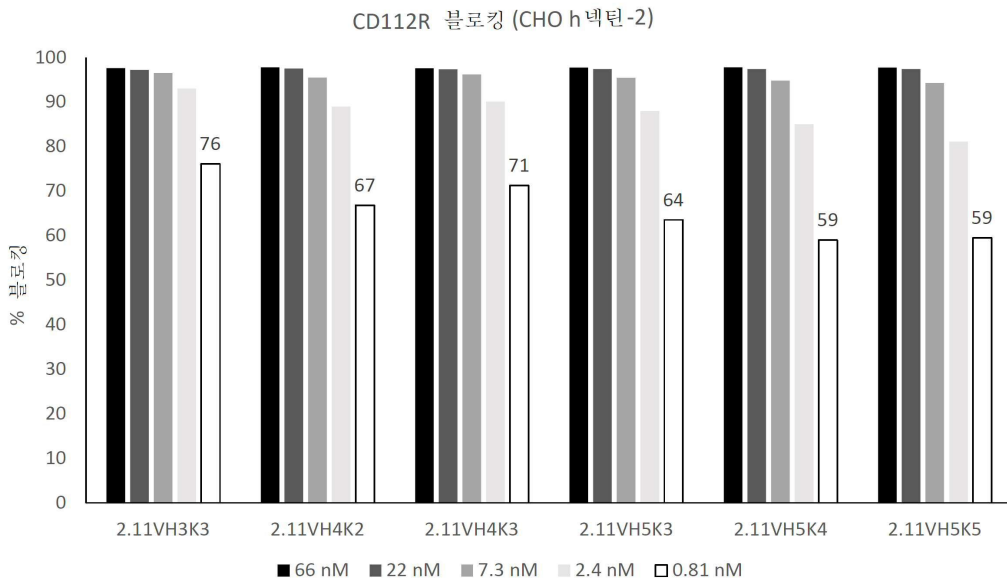
도면4a



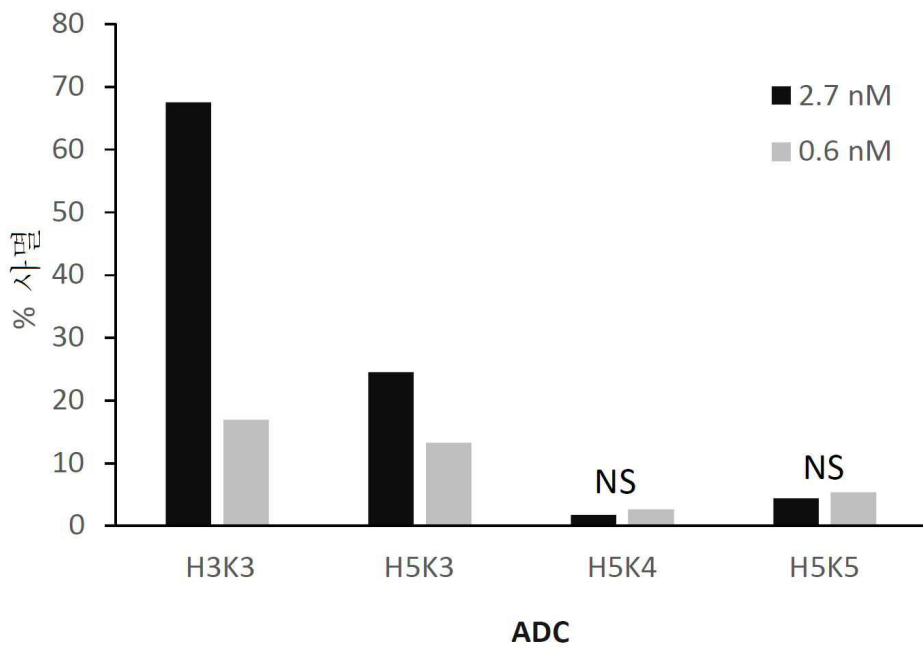
도면4b



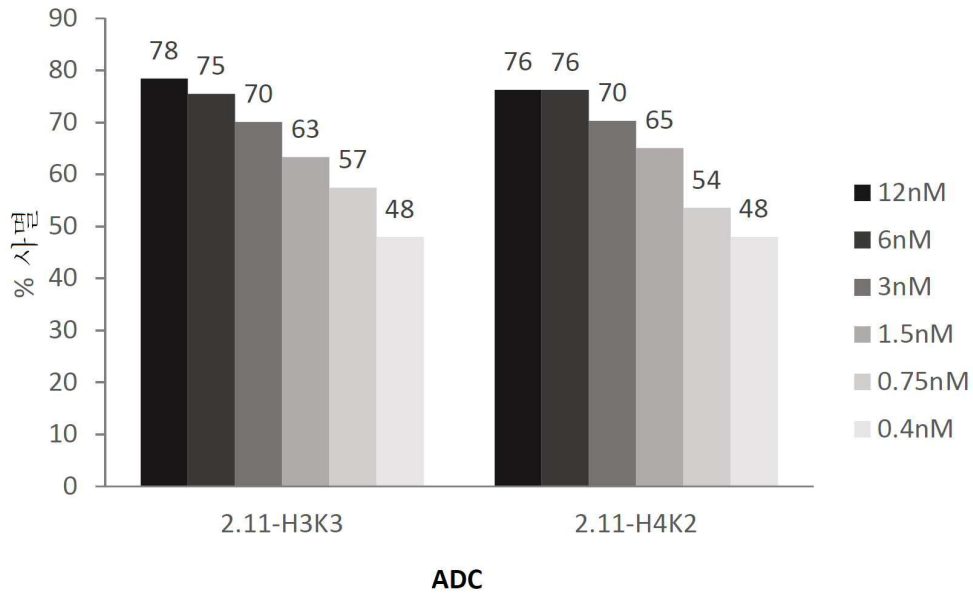
도면4c



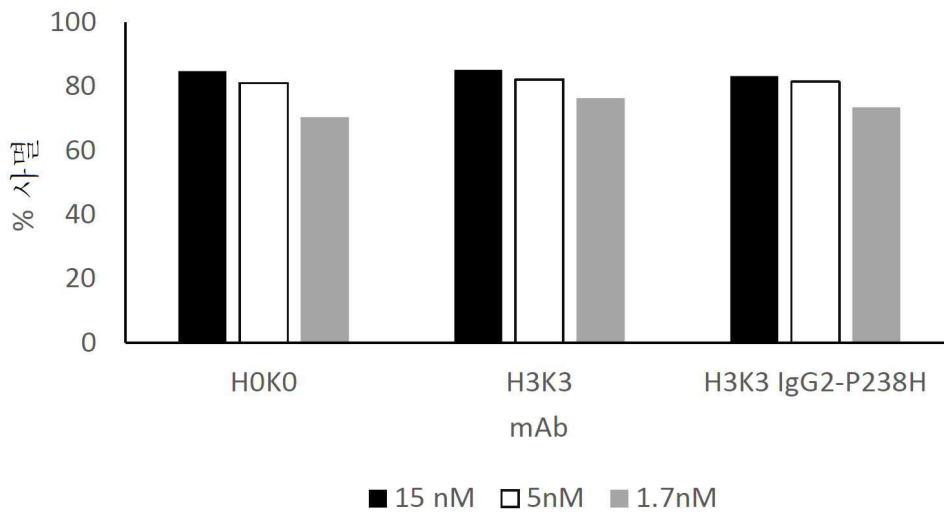
도면5a



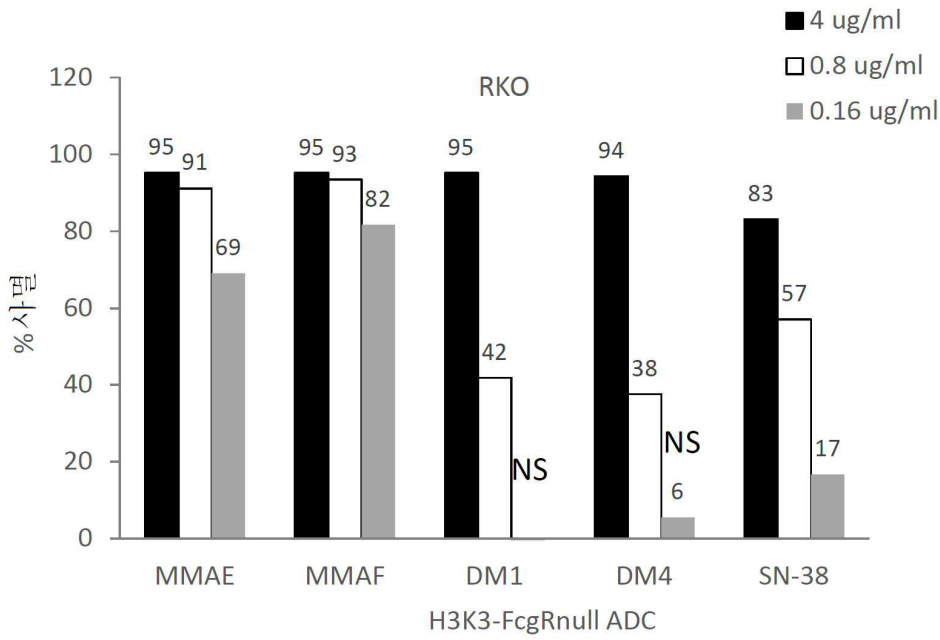
도면5b



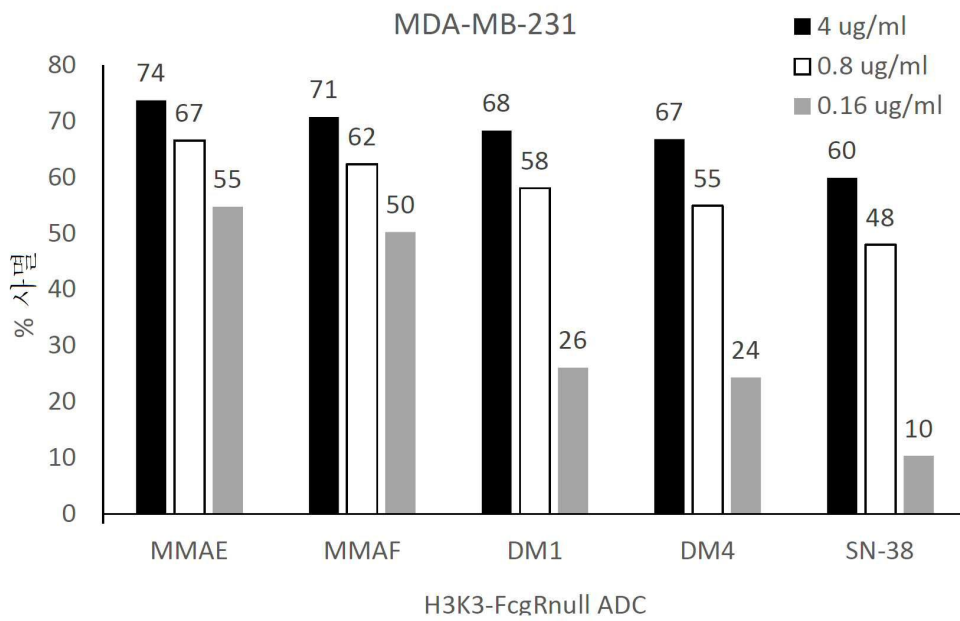
도면5c



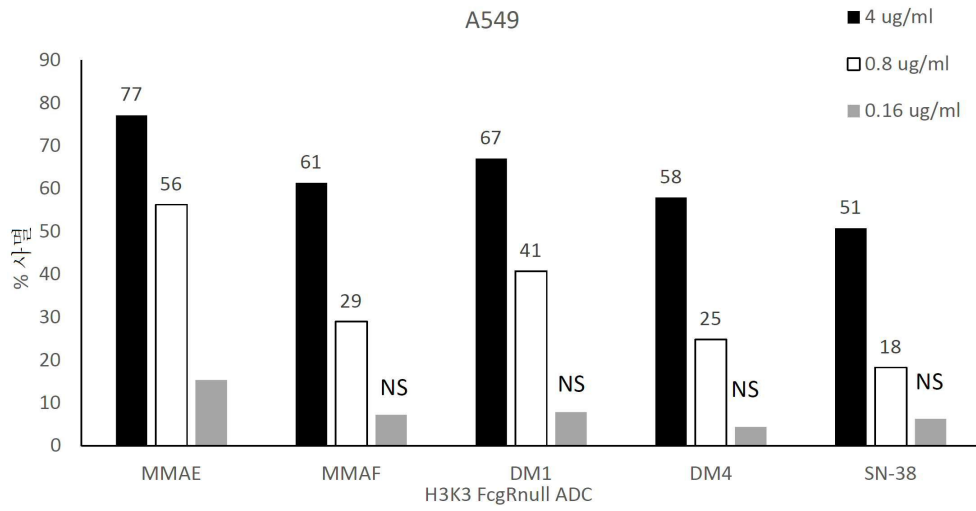
도면6a



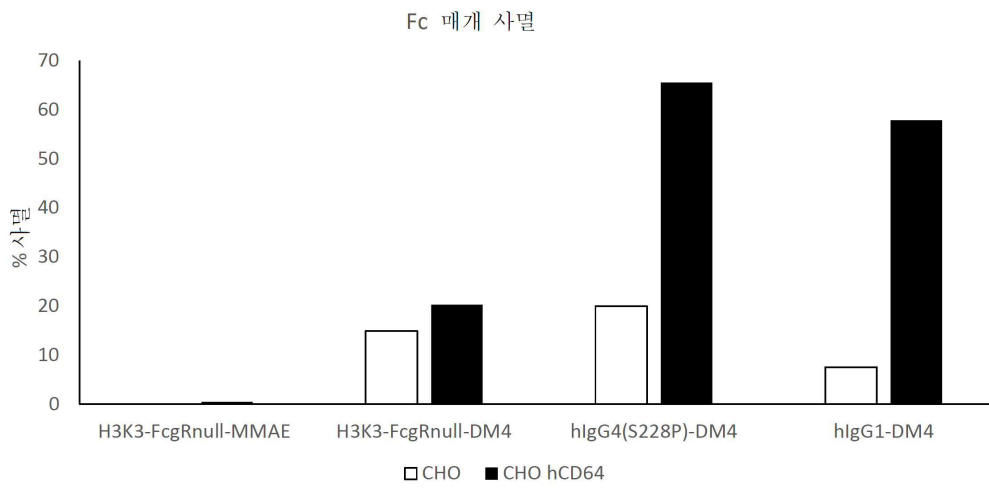
도면6b



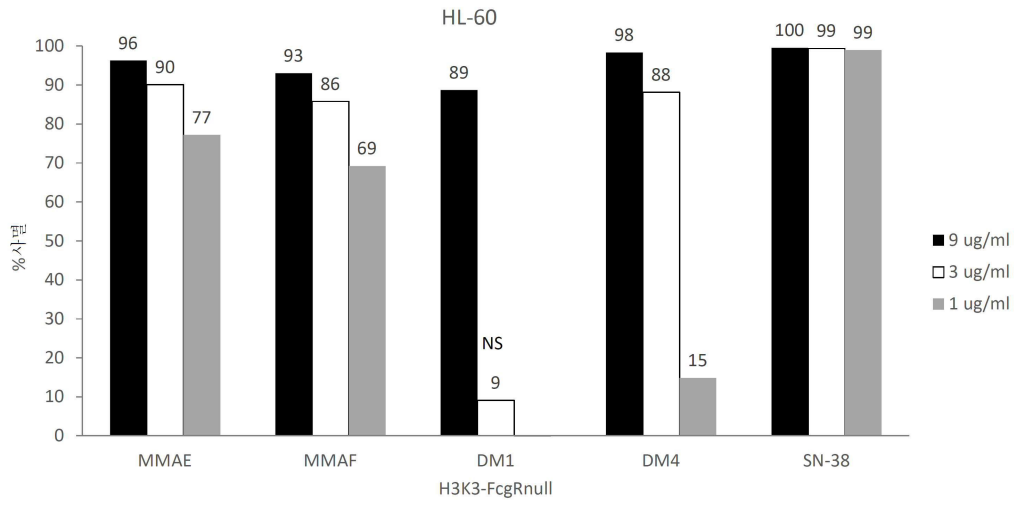
도면6c



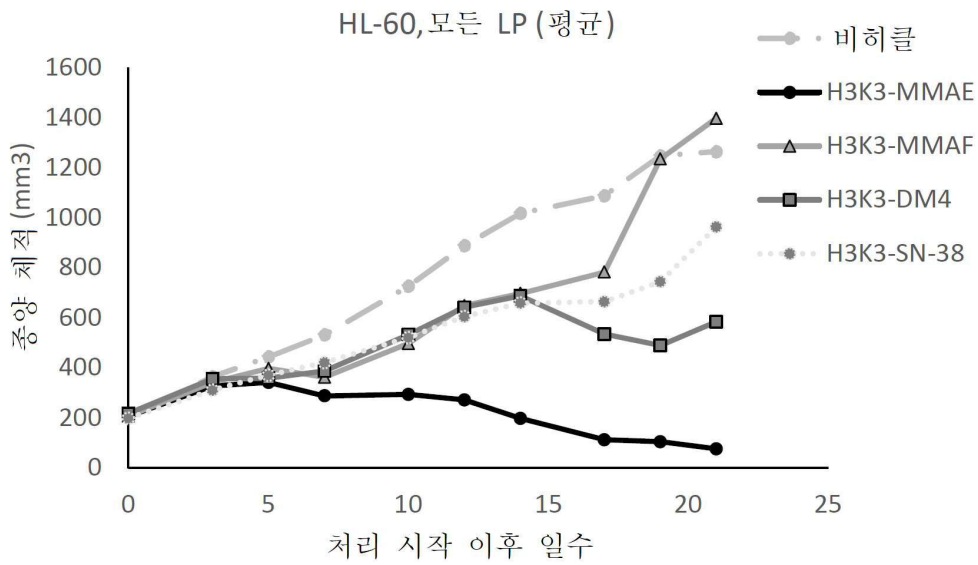
도면7



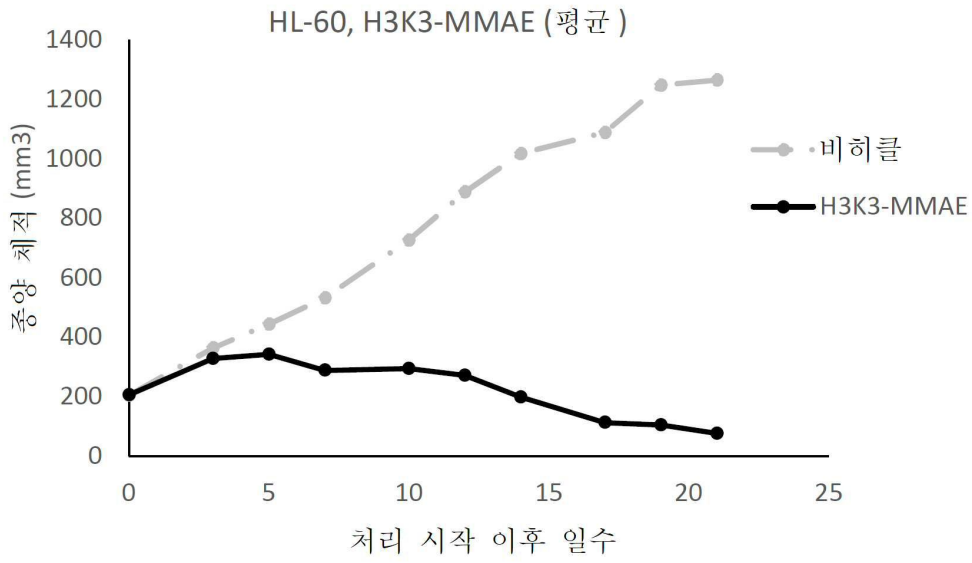
도면8



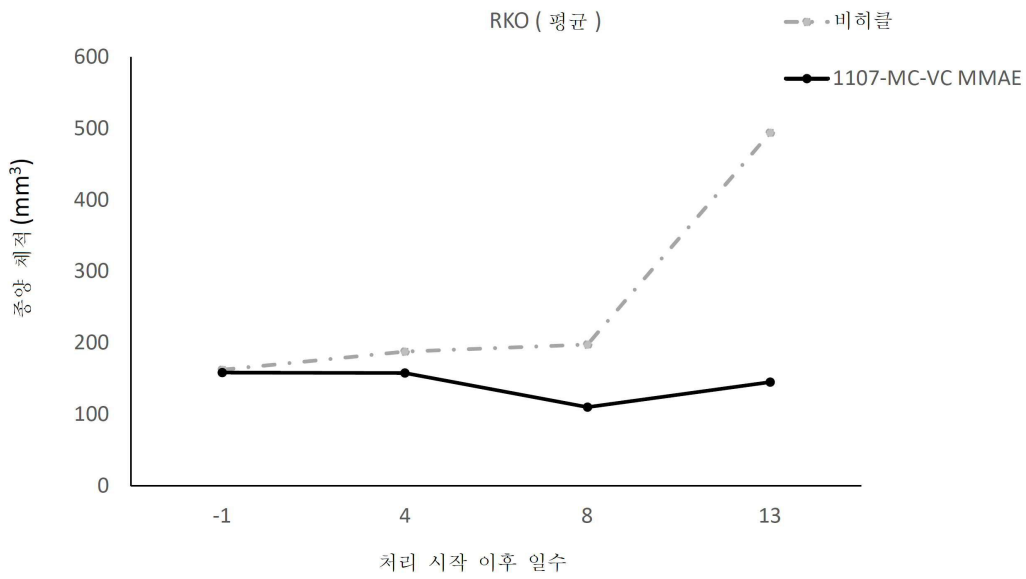
도면9a



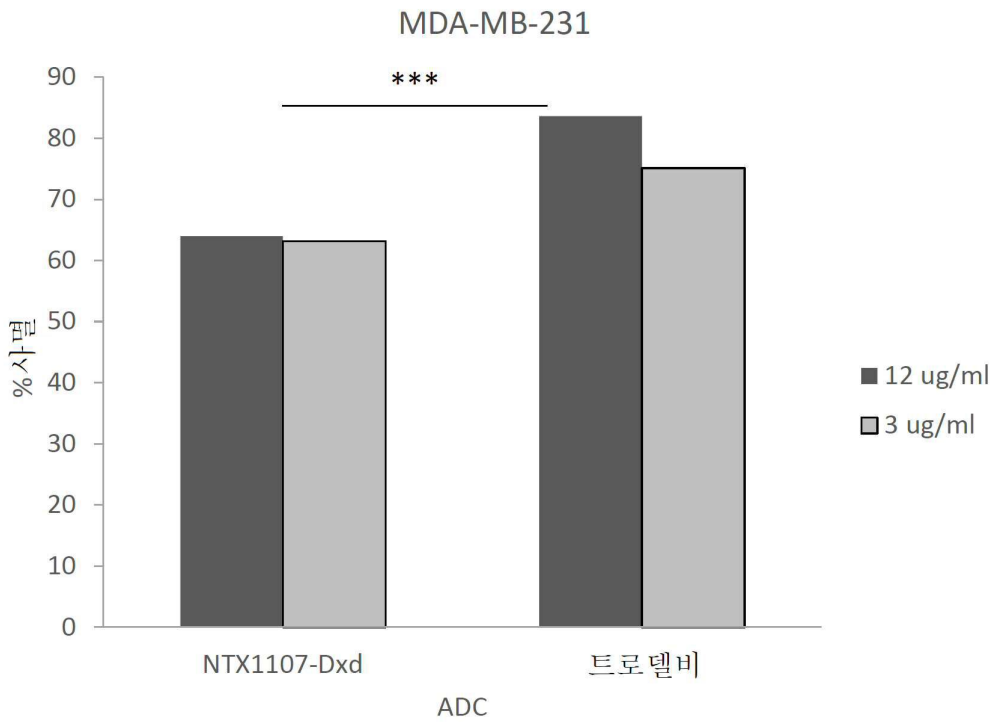
도면9b



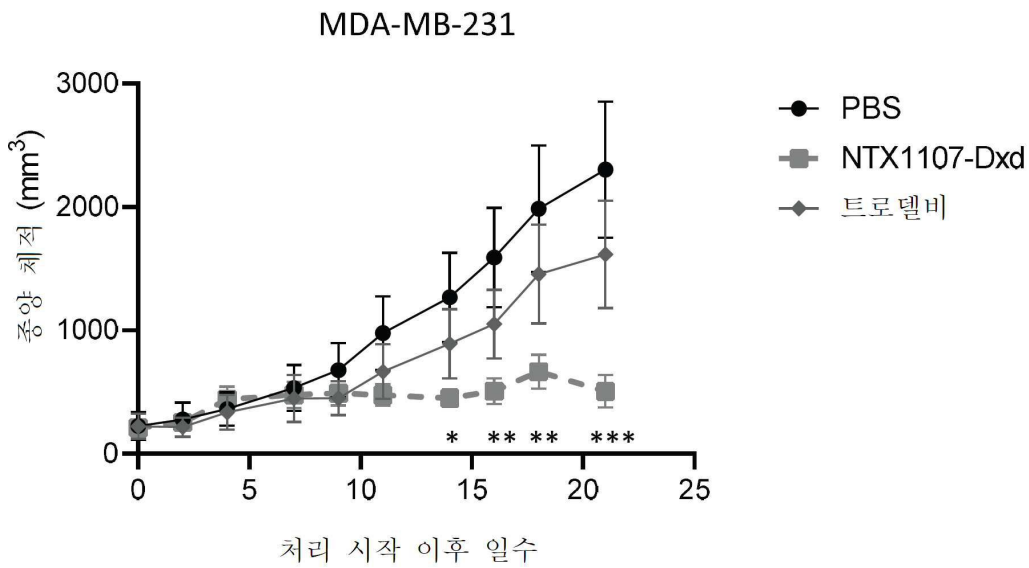
도면10



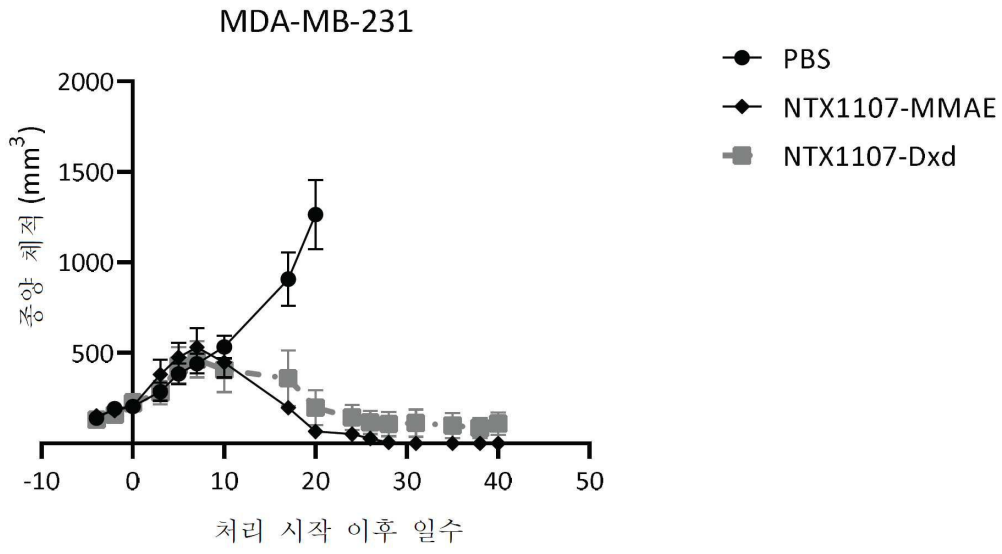
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.