



(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/003367

(22) 국제출원일:

2024년 3월 18일 (18.03.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0038802 2023년 3월 24일 (24.03.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 인하대학교 산학협력단 (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 22212 인천광역시 미추홀구 인하로 100, Incheon (KR). 아주대학교 산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자:

정상택 (JUNG, Sang-Taek); 06217 서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112-702, Seoul (KR). 이지선 (LEE, Ji-Sun); 03472 서울특별시 은평구 은평로 220, 106-1505, Seoul (KR). 한가람 (HAN, Ga-Ram); 51736 경상남도 창원시 마산합포구 중앙북1길 19, 101-1807, Gyeongsangnam-do (KR). 차종호 (CHA, Jong-Ho); 22000 인천광역시 연수구 해송로 70, 403호, Incheon (KR). 신지수 (SHIN, Ji-Soo); 14734 경기도 부천시 소사구 경인로150번길 68, 101-208, Gyeonggi-do (KR). 김민지 (KIM, Min-Ji); 22188 인천광역시 미추홀구 용정공원로83번길 49, 1601호, Incheon (KR). 유태현 (YOO, Tae-Hyeon); 17003 경기도 용인시 기흥구 동백 7로107번길 10, 117-2, Gyeonggi-do (KR). 이상우 (LEE, Sang-Woo); 63067 제주특별자치도 제주시 애월읍 유수암평화5길 57, Jeju-do (KR). 이수현 (LEE, Su-Hyeon); 16509 경기도 수원시 영통구 도청로 95, 1307호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인:

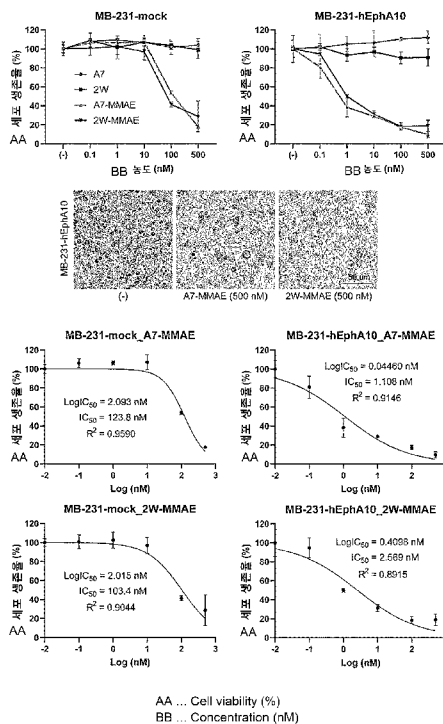
위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국

(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

(54) Title: HUMANIZED ANTIBODIES TARGETING EPHA10

(54) 발명의 명칭: EPHA10 표적 인간화 항체들



(57) Abstract: The present invention relates to humanized antibodies targeting human EphA10 and use thereof. The antibody specific to EphA10 or an immunologically active fragment thereof according to the present invention specifically bind to EphA10, a highly promising target for overcoming resistance and non-responsiveness to existing immune checkpoint inhibitor therapies. When created with the antibody, an ADC was found to specifically kill cancer cells. Therefore, it can be used as a therapeutic antibody for cancer treatment leveraging cancer cell death mechanisms via immune cell activation or for treating EphA10-expressing cancers, or as a cell therapeutic for treating EphA10-expressing cancers, and can also be used for cancer diagnosis.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 EphA10 표적 인간화 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 기존 면역관문 억제인자 표적 치료제의 불응성과 내성 극복을 위해 매우 유력한 타겟인 EphA10에 특이적으로 결합하며, 이를 이용하여 ADC를 제작한 경우 암세포를 특이적으로 사멸시키는 것으로 나타났으므로, 면역세포 활성화에 의한 암세포 사멸 기작을 이용하는 암 치료용 항체 치료제, EphA10 발현 암 치료를 위한 항체 치료제 또는 EphA10 발현 암 치료를 위한 세포 치료제로 이용할 수 있는 효과가 있다.

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

발명의 설명

발명의 명칭: EPHA10 표적 인간화 항체들

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 EphA10 표적 인간화 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암(cancer)은 유전자 발현의 다양한 변화에 의하여 세포의 증식과 사멸이 정상적으로 조절되지 않고 세포의 비정상적인 성장이 야기된 상태로, 인접한 조직에 침투하여 파괴하고 다른 부위로 전이하여 결국 사람이 사망에 이르게 한다. 암을 유발하는 원인, 즉 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암 세포로 형질전환 되는지에 대해서는 정확히 규명되지는 않았으나, 현재까지 알려진 바에 따르면 암은 환경요인, 화학물질, 방사선, 바이러스 등 외적 요인 및 유전 인자, 면역학적 요인 등의 내적 요인 등이 복잡하게 얽혀 결과적으로 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 암은 혈액 세포 수에 이상을 보이는 혈액암과 신체 내에서 일정한 정도와 형태를 갖는 세포 덩어리 형태의 고형암으로 크게 분류된다. 암은 혈액, 조직 신체의 거의 전 부위에서 발생할 수 있으며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등을 예로 들 수 있다. 암의 치료에는 대부분 수술이나 방사선 요법 및 세포 증식을 억제하는 화학 요법제를 이용한 항암제 치료가 주된 방법이다. 암 치료를 위한 의약품은 크게 저분자 의약품과 고분자 의약품으로 나뉘며 특이성이 없어 부작용이 상대적으로 큰 저분자 의약품에 비해 특이성이 있는 고분자 의약품이 치료제로서 각광을 받고 있다.
- [3] 단백질 치료제들은 질병 타깃들에 아주 높은 특이성과 낮은 부작용과 독성을 보이기 때문에 비특이적인 저분자 화합물 치료제들을 아주 빠른 속도로 대체하여 임상에서 널리 이용되고 있으며, 현재 임상에 이용되고 있는 단백질 치료제들 중 항체 치료제들과 항체 Fc영역을 융합된 Fc-융합 단백질 치료제들이 주종을 이루고 있다. 치료용 항체는 기존의 저분자 약물에 비해 타깃에 매우 높은 특이성을 보이며, 생체 독성이 낮고 부작용이 적을 뿐만 아니라, 약 3주의 우수한 혈중 반감기를 가지기 때문에 가장 효과적인 암 치료방법 중의 하나로 여겨지고 있다. 실제로 전 세계의 거대 제약회사들과 연구소들에서 암 발병 원인인자를 비롯한 암세포에 특이적으로 결합하여 효과적으로 제거하는 치료용 항체의 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 치료용 항체 의약품 개발 기업으로는 로슈, 암젠, 존슨앤존슨, 애보트, 비엠에스 등의 제약 기업이 주를 이루고 있으며, 특히 로슈는 항암 치료 목적의 허셉틴 (Herceptin), 아바스틴 (Avastin), 리투산 (Rituxan) 등이 대표적 상품으로 이 세 가지 치료용 항체로 2012년 세계시장에서 약 195억 달러의 매출을 달성하는 등 큰 이윤을 창출하고 있을 뿐 아니라, 세계의 항체 의약품 시장을 이끌고 있다. 레미케이드(Remicade)를 개발한 존슨앤존슨

역시 매출의 증가로 세계 항체 시장에서 빠르게 성장해나가고 있으며, 애보트와 비엠에스 등의 제약 기업 역시 개발 막바지 단계의 치료용 항체를 다수 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따른 결과로 저분자 의약품이 주도권을 가지고 있던 세계 제약 시장에서 질병 타겟에 특이적이고 부작용이 낮은 치료용 항체를 포함한 바이오 의약품이 빠르게 그 자리를 대체해 나가고 있다.

- [4] 암세포들은 면역세포들에 의한 살상 작용기작을 회피하기 위해 정상세포들이 면역세포 활성화를 억제할 때 이용되는 면역관문(immune checkpoint) 단백질을 세포 표면에 발현하고 있어, 최근 암을 치료하기 위한 방법으로써 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Immunity. 2018 Mar 20;48(3):434-452.). 면역관문 억제제는 T 세포 억제에 관여하는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)의 활성을 차단하여 T 세포를 활성화시킴으로써 암세포를 공격하는 약제로서 대표적으로 CTLA 4, PD-1, PD-L1 등을 인식하는 항체를 사용한다. 그러나, 면역관문 억제제 (immune checkpoint inhibitor), 면역세포치료제 (immune cell therapy), 치료용 항체(therapeutic antibody) 및 항암 백신 (anticancer vaccine)을 포함하는 면역 항암제에 대한 암 환자의 반응률은 아직까지 15 내지 45% 수준에 머무르고 있고, 대부분의 고형암종은 면역항암제에 불응성과 내성을 획득하는 문제가 있다. 이에, anti-PD-1 항체 치료제를 반복적으로 적용함으로써 anti-PD-1 치료제에 저항성을 획득하도록 유도한 마우스 모델과 인간 암세포주 등을 활용한 종래의 연구들에서 면역관문 억제인자를 표적하는 치료제에 불응성을 유발하는 인자로서 세포막 단백질인 EphA10이 동정되었다. EphA10은 RTKs(receptor tyrosine kinases)의 가장 큰 패밀리인 Ephrin 수용체의 한 종류로써 다른 Ephrin 수용체들과 달리 EphA10은 그 기능 연구가 거의 이루어지지 않은 매우 신규한 수용체이며, 적절한 치료제가 없고 예후가 매우 좋지 않은 유방암인 TNBC (Triple Negative Breast Cancer)을 포함한 모든 유방암에서 발현량이 크게 증가하며, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암, 갑상선암 등에서도 정상조직에 비해 유의하게 발현량이 증가되는 것으로 보고되었다.

발명의 내용

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 EphA10에 특이적인 항체-약물 접합체를 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR)를 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 키메라 항원 수용체 발현 세포를 제공하는 것이다.

- [10] 또한, 본 발명의 목적은 T 세포 관여자(T-cell engager)를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 목적은 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명의 목적은 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 아울러, 본 발명의 목적은 암 진단 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 EphA10에 특이적인 항체-약물 접합체를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 키메라 항원 수용체 발현 세포를 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 T 세포 관여자를 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [26] 아울러, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자의 암 진단 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [27] 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 기존 면역관문 억제인자 표적 치료제의 불응성과 내성 극복을 위해 매우 유력한 타겟인 EphA10에 특이적으로 결합하며, 이를 이용하여 ADC를 제작한 경우 암세포를 특이적으로 사멸시키는 것으로 나타났으므로, 면역세포 활성화에 의한 암세포 사멸 기작을 이용하는 암 치료용 항체 치료제, EphA10 발현 암

치료를 위한 항체 치료제 또는 EphA10 발현 암 치료를 위한 세포 치료제로 이용할 수 있는 효과가 있고, 암의 진단에도 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 EphA10 10종 항원 단백질의 동물세포에서 발현 및 정제한 후 SDS-PAGE 젤로 크기와 순도를 분석한 도이다.
- [29] 도 2는 EphA10 표적 마우스 항체의 아미노산 서열을 분석한 결과 및 이를 바탕으로 제작한 chimeric #2 항체의 EphA10에 대한 결합력을 분석한 결과이다.
- [30] 도 3은 EphA10 표적 인간화 항체의 아미노산 서열 및 항체 정보를 나타낸 도이다.
- [31] 도 4는 EphA10 표적 인간화 항체들을 동물세포에서 발현 및 정제한 후 이의 발현량을 분석한 결과와 정제한 인간화 항체들의 크기와 순도를 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [32] 도 5는 EphA10 표적 인간화 항체 5종의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과이다.
- [33] 도 6은 EphA10 표적 인간화 항체 5종의 인간 및 마우스 세포에서 발현되는 EphA10에 대한 결합력을 확인한 도이다.
- [34] 도 7은 EphA10 표적 인간화 항체들의 EphA10에 대한 정량적인 결합 상수 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 8은 결합력이 높아 선발된 EphA10 특이적 항체 (1-1 및 1-2)로 제조한 ADC의 항체-약물 결합을 분석한 결과이다.
- [36] 도 9는 EphA10 특이적 항체 (1-1 및 1-2)로 제작된 ADC의 암세포 사멸 효능을 확인한 도이다.
- [37] 도 10은 EphA10 특이적 인간화 항체의 서열을 분석하여 경쇄에 존재하는 자유 시스테인 잔기를 확인한 도이다.
- [38] 도 11은 EphA10 특이적 인간화 항체 (1-1) 및 이를 이용하여 제작한 EphA10 표적 ADC 항체 (1-1 (ADC))의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [39] 1-1: EphA10 특이적 인간화 항체; 및
- [40] 1-1 (ADC): EphA10 표적 ADC 항체.
- [41] 도 12는 EphA10 특이적 항체 1-1 및 1-2의 경쇄에 존재하는 자유 시스테인 잔기를 각각 알라닌(alanine, A) 또는 세린(serine, S)으로 치환한 ADC 효능 개선된 EphA10 특이적 인간화 항체들을 동물세포에서 발현 및 정제한 후 이의 크기와 순도를 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [42] 도 13은 ADC 효능 개선된 EphA10 특이적 인간화 항체들의 EphA10에 대한 결합력을 분석한 결과이다.
- [43] 도 14는 EphA10 표적 인간화 항체들의 결합력 증가를 위한 효모 라이브러리 구축 및 스크리닝 전략을 나타낸 도이다.

- [44] 도 15는 EphA10 표적 인간화 항체들의 결합력 증가를 위해 유세포 분리기를 이용한 반복적인 스크리닝 과정을 나타낸 도이다.
- [45] 도 16은 유세포 분리기를 이용한 탐색을 통해 발굴된 10종의 항체 (A.3, A.7, A.8, B.1, B.3, B.7, 2.1, 2.3, 1-N 및 2-W) 및 추가로 자유 시스테인을 치환한 6종 (1-R, 1-W, 1-Y, 2-N, 2-R 및 2-Y)의 인간화 항체의 아미노산 서열 분석결과이다.
- [46] 도 17은 EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 16종을 동물세포에서 발현 및 정제한 후 이의 크기와 순도를 SDS-PAGE 젤로 확인한 도이다.
- [47] 도 18은 EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 16종의 EphA10에 대한 결합력을 분석한 결과이다.
- [48] 도 19는 EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 16종 중 2종 (A7 및 2W)으로 제작한 ADC의 항체-약물 결합을 분석한 결과이다.
- [49] 도 20은 EphA10 특이적 항체 1-1과 이로 제조한 ADC (1-1_ADC), EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 A7 및 2W와 이를 이용하여 제작한 EphA10 표적 ADC 항체 (A7_ADC 및 2W_ADC)의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [50] 도 21은 A7_ADC 및 2W_ADC의 암세포 사멸 효능을 확인한 도이다.
- [51] 도 22는 EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 A7 및 2W의 EphA10에 대한 정량적인 결합 상수 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [52] 도 23은 4종의 마우스 EphA10 항원을 포함하는 융합 단백질을 동물세포에서 발현 및 정제한 후 이의 크기와 순도를 SDS-PAGE 젤로 확인하고, 이의 활성을 ELISA로 분석한 도이다.
- [53] 도 24는 EphA10에 대한 결합력이 증가한 인간화 항체 A7 및 2W의 마우스 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [54] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [55] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때,

이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [56] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.
- [57] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [58] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.
- [59]
- [60] 일 측면에서, 본 발명은 EphA10(Eph receptor A10)에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [61] 일 구현예에서, EphA10는 인간 EphA10 또는 마우스 EphA10일 수 있다.
- [62] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 EphA10의 세포 외부 영역(Extra Cellular Domain, ECD) 또는 세포 외부 영역의 FNIII 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [63] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH2, 및 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.
- [64] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 9 내지 14의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL1, 서열번호 15 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열번호 17 내지 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL3를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [65] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 20 내지 25의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.

- [66] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 26 내지 45의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [67] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-1는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [68] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-2는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [69] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 A.3는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [70] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 A.7는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [71] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 A.8는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [72] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 B.1는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [73] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 B.3는 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [74] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 B.7는 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [75] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2.1는 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [76] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2.3는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [77] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-A는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.

- [78] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-N는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [79] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-R는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [80] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-W는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [81] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 1-Y는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [82] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2-A는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [83] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2-W는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [84] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2-N는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [85] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2-R는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [86] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 2-Y는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [87] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 인간 기원의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는 이의 임의의 부분을 함께 포함할 수 있다.
- [88] 일 구현예에서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 인간화 항체, Fab 또는 scFv인 것이 더욱 바람직하다.
- [89] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 단일클론항체일 수 있다.
- [90] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의

중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) WO94/13804) 등을 포함한다.

- [91] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 면역학적 활성을 가진 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.
- [92] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.
- [93] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.

- [94] 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.
- [95] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [96] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [97] 본 발명에서 용어, "가변 영역(variable region) 또는 가변 부위 (variable domain)"는 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역 (framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다. 상기 "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [98] 본 발명에서 용어, "scFv(single chain fragment variable)"는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 V_H 영역과 V_L 영역을 짧은 펩티드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.
- [99] 본 발명에서 용어, "상보성결정영역(complementarity determining region, CDR)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역 (hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다

(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.

[100] 본 발명에서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[101] 본 발명에서 용어, "항원결합단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv) 2, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab') 2 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab') 2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다имер와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab') 2 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[102] 본 발명에서 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)을 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.

[103] 본 발명에서 용어, "아미노산 변형/변이"는 폴리펩타이드 서열의 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 결실, 바람직하게는 치환을 의미한다. 본 발명에서 사용된, 용어 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 항체의 폴리펩타이드 서열의 특정 위치에서의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다.

[104] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 폴리펩타이드 서열을 코딩한 후, 원하는 경우, 숙주세포 내로 클로닝되고, 발현 및 검정되는 핵산 형성에 이용된다. 이를 위한 다양한

방법이 문헌 (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)에 기재되어 있다.

- [105] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산은 단백질을 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어(regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산 함유 발현벡터를 배양하여 단백질을 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명에 따른 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 하여 본 발명에 따른 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 생산한다.
- [106] 따라서, 본 발명의 범위에는 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산이 도입된 숙주세포를 단백질 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및 숙주세포로부터 발현된 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 정제 또는 분리하는 단계를 포함하는 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 제조방법이 포함된다.
- [107] 항체는 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제방법은 크로마토그래피 기술, 전기영동, 면역, 침강, 투석, 여과, 농축, 및 크로마토포커싱 (chromatofocusing) 기술을 포함한다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 박테리아 단백질 A, G, 및 L과 같은 다양한 천연 단백질이 항체와 결합하며, 상기 단백질은 정제에 이용될 수 있다. 종종, 특정 융합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.
- [108] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 약물을 포함하는, 항체-약물 접합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)에 관한 것이다.
- [109] 일 구현예에서, 약물은 약물은 면역원성 세포사멸 유도제, 전세포사멸성 (pro-apoptotic) 펩타이드, 이크로튜불린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, 토포아이소머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), 독소(toxin), 방사선 핵종 또는 항암제일 수 있다.
- [110] 일 구현예에서, 상기 전세포사멸성 펩타이드는 KLA, 알파-디펜신-1(alpha-defensin-1), BMAP-28, Brevenin-2R, 부포린 IIb(Buforin IIb), 세크로핀 A-마가이닌 2(cecropin A-Magainin 2, CA-MA-2), 세크로핀 A(Cecropin A), 세크로핀

B(Cecropin B), 크리소피신-1(chrysopsin-1), D-K6L9, 고메신(Gomesin), 락토페리신 B(Lactoferricin B), LLL27, LTX-315, 마가이닌 2(Magainin 2), 마가이닌 II-봄페신 결합체(Magainin II-bombesin conjugate, MG2B), 파르다신(Pardaxin) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [111] 일 구현예에서, 상기 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 타산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조밐(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스마이드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [112] 일 구현예에서, 상기 항암제는 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin), 발루비신(valrubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 이리도테칸(iridotecan), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 벤다무스틴(bendamustine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide), 미토잔트론(mitoxantrone), 이자베필론(izabepilone), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E, MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [113] 일 구현예에서, 상기 항암제는 면역항암제일 수 있으며, 면역항암제는 면역관문 억제제(Immune checkpoint inhibitors), 면역억제인자 제어 약물, 암 백신, 면역아주변트(immunoadjuvant), 암 치료용 면역세포, 면역세포 활성화 보조인자, 암 치료용 항체 또는 암 치료용 면역세포의 활성화 유지에 필요한 사이토카인일 수 있다.
- [114] 일 구현예에서, 상기 면역억제인자 제어 약물은 조절 T 세포(regulatory T cells, Treg)의 수준을 감소시키는 약물일 수 있으며, 조절 T 세포를 감소시킴으로써 T 작동 세포(T effector cells)의 면역 반응을 활성화시킬 수 있다.
- [115] 일 구현예에서, 상기 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR, TIGIT, CD47, VISTA 또는 A2aR의 억제제일 수 있으며, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 이의 변이체일 수 있다.
- [116] 일 구현예에서, 약물은 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin), 발루비신(valrubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 테니포사이드(teniposide), 토폠테칸(topotecan), 이리도테칸(iridotecan), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 벤다무스틴(bendamustine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide), 미토산트론(mitoxantrone), 이자베필론(izabepilone), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E, MMAE), 모노메틸 아우리스타틴

F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[117] 일 구현예에서, 상기 항체-약물 접합체는 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 약물이 링커를 매개로 연결/결합될 수 있으며, 링커는 펩타이드나 리간드, 항체, 항체 단편 등의 단백질의 아민기(amine group), 카르복시기(carboxyl group) 또는 설프히드릴기(sulfhydryl group)나 압타머 등의 핵산의 인산기(phosphate group, 히드록시기(hydroxyl group)를 통해 결합할 수 있는 작용기를 가진 임의의 링커를 사용할 수 있다. 이러한 링커의 작용기는 아이소티오시아네이트(isothiocyanate), 아이소시아네이트(isocyanates), 아실 아자이드(acyl azide), NHS 에스터(NHS ester), 설폰일 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데하이드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭사이드(epoxide), 옥시레인(oxirane), 칼보네이트(carbonate), 아릴 할라이드(arylhalide), 이미도에스터(imidoester), 카보이미드(carbodiimide), 안하이드라이드(anhydride), 플루오로페닐 에스터(fluorophenyl ester), 히드록시메틸포스핀(hydroxymethyl phosphine), 말레이미드(maleimide), 할로아세틸(haloacetyl), 피리딜디설파이드(pyridyldisulfide), 티오술포네이트(thiosulfonate), 또는 비닐술포(vinylsulfone) 등일 수 있다. 링커는 프로테아제에 의해서 절단 가능하거나, 산이나 염기 조건에서 절단 가능하거나, 고온이나 광조사에 의해서 절단 가능하거나 또는 환원 또는 산화 조건에서 절단 가능한 링커일 수 있고, 또는 이러한 조건들에서 절단 가능하지 않은 링커일 수도 있다. 절단 가능한 링커로서는 예컨대 산성 조건에서 절단되는 히드라존(hydrazone) 링커, 프로테아제에 의해 절단되는 펩타이드 링커, 환원 조건에서 절단되는 디설파이드(disulfide) 작용기를 갖는 링커 등을 들 수 있고, 절단 가능하지 않은 링커로서는 MCC(Maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylate) 링커, MC(maleimidocaproyl) 링커, 또는 그 유도체로서 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC) 링커나 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트(sulfo-sMCC)를 들 수 있다.

[118] 또한 링커는 자가 희생 링커(self-immolative linker) 또는 절단 후 흔적을 남기지 않는 링커(traceless linker)일 수 있다. 자가 희생 링커는 예컨대 발명의 명칭이 "Hydrophilic self-immolative linkers and conjugates thereof"인 미국 특허 제9,089,614호에 개시된 링커, 명칭이 "SELF-IMMOLATIVE LINKERS CONTAINING MANDELIC ACID DERIVATIVES, DRUG-LIGAND CONJUGATES FOR TARGETED THERAPIES AND USES THEREOF"인 국제공개 제WO2015038426호에 개시된 링커를 들 수 있으며, 절단 후 흔적을 남기지 않는 링커로서는 페닐하이드라지드 링커, 아릴-트리아젠 링커, 문헌 [Blaney, et al., "Traceless solid-phase organic synthesis," Chem Rev. 102: 2607-2024 (2002)]에 개시된 링커 등일 수 있다.

- [119] 본 발명의 항체-약물 접합체의 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 약물은 생체 적합성 고분자를 매개로 또는 캐리어로 하여 결합될 수도 있다. 생체적합성 고분자는 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성(tissue compatibility) 및 항응혈성(blood compatibility)을 가지고 있는 고분자를 의미한다. 상기 생체적합성 고분자로서의 합성 중합체는 폴리에스테르, 폴리하이드록시알카노에이트(PHAs), 폴리(α -하이드록시엑시드), 폴리(β -하이드록시엑시드), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-발러레이트; PHBV), 폴리(3-하이드록시프로피오네이트; PHP), 폴리(3-하이드록시헥사노에이트; PHH), 폴리(4-하이드록시엑시드), 폴리(4-하이드록시부티레이트), 폴리(4-하이드록시발러레이트), 폴리(4-하이드록시헥사노에이트), 폴리(에스테르아마이드), 폴리카프로락톤, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-co-글리콜라이드; PLGA), 폴리디옥사논, 폴리오르토에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리(글리콜산-co-트리메틸렌카보네이트), 폴리포스포에스테르, 폴리포스포에스테르 우레탄, 폴리(아미노산), 폴리사이아노아크릴레이트, 폴리(트리메틸렌 카보네이트), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(타이로신 카보네이트), 폴리카보네이트, 폴리(타이로신 아릴레이트), 폴리알킬렌 옥살레이트, 폴리포스파젠스, PHA-PEG, 에틸렌 비닐 알코올 코폴리머(EVOH), 폴리우레탄, 실리콘, 폴리에스테르, 폴리올레핀, 폴리이소부틸렌과 에틸렌-알파올레핀 공중합체, 스티렌-이소부틸렌-스티렌 트리블록 공중합체, 아크릴 중합체 및 공중합체, 비닐 할라이드 중합체 및 공중합체, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 메틸에테르, 폴리비닐리덴 할라이드, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리비닐리덴 클로라이드, 폴리플루오로알켄, 폴리퍼플루오로알켄, 폴리아크릴로니트릴, 폴리비닐 케톤, 폴리비닐 아로마틱스, 폴리스티렌, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 아세테이트, 에틸렌-메틸 메타크릴레이트 공중합체, 아크릴로니트릴-스티렌 공중합체, ABS 수지와 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체, 폴리아마이드, 알키드 수지, 폴리옥시메틸렌, 폴리이미드, 폴리에테르, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴산-co-말레산 또는 폴리아미노아민이며, 천연 중합체는 키토산, 덱스트란, 셀룰로오스, 헤파린, 히알루론산, 알기네이트, 이눌린, 녹말 또는 글리코젠이다.
- [120] 일 구현예에서, 상기 항체-약물 접합체는 ADC 링커를 추가로 포함할 수 있으며, ADC 링커는 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로파노일(MP), 발린-시트룰린(val-cit), 알라닌-페닐알라닌(ala-phe), p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트(SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트(SMCC), 발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(val-cit-PAB) 또는 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트(SIAB)일 수 있다.

- [121] 일 구현예에서, 상기 항체-약물 접합체는 ADC 링커를 통해 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 약물과 복합체를 형성할 수 있다.
- [122] 일 구현예에서, 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 RNA, DNA, 항체, 이펙터, 약물, 전구약물, 독소, 펩타이드 또는 전달 분자가 추가로 접합(conjugate)될 수 있다 (Shoari et al., *Pharmaceutics* 13:1391, pp. 1-32 (2021) 참조).
- [123] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 EphA10 이외의 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [124] 일 구현예에서, 표적 항원에 결합하는 부분이 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함할 수 있다.
- [125] 일 구현예에서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSI-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, SIOO, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [126] 일 구현예에서, 상기 아폽토시스 관련 유전자는 ABL1, AKT1, AKT2, BARD1, BAX, BCL11B, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L12, BCL3, BCL6, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BRAF, CARD11, CAV1, CBL, CDC25A, CDKN1A, CFLAR, CNR2, CTNNB1, CUL4A, DAXX, DDIT3, E2F1, E2F3, E2F5, ESPL1, FOXO1, HDAC1, HSPA5, IGF1R, IGF2, JUN, JUNB, JUND, MALT1, MAP3K7, MCL1, MDM2, MDM4, MYB, MYC, NFKB2, NPM1, NTRK1, PAK1, PAX3, PML, PRKCA,

PRKCE, PTK2B, RAF1, RHOA, TGFB1, TNFRSF1B, TP73, TRAF6, YWHAG, YWHAQ 또는 YWHAZ일 수 있으며; 상기 전사인자 유전자는 AR, ARID3A, ASCL1, ATF1, ATF3, BCL11A, BCL11B, BCL3, BCL6, CDC5L, CDX2, CREB1, CUX1, DDIT3, DLX5, E2F1, E2F3, E2F5, ELF4, ELK1, ELK3, EN2, ERG, ETS1, ETS2, ETV1, ETV3, ETV4, ETV6, FEV, FEZF1, FLI1, FOS, FOSL1, FOXA1, FOXG1, FOXM1, FOXO1, FOXP1, FOXQ1, GATA1, GATA6, GFI1, GFI1B, GLI1, GLI2, GLI3, HES6, HHEX, HLF, HMGA1, HMGA2, HOXA1, HOXA9, HOXD13, HOXD9, ID1, ID2, IKZF1, IRF2, IRF4, JUN, JUNB, JUND, KAT6A, KDM2A, KDM5B, KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KMT2A, LEF1, LHX1, LMX1B, MAF, MAFA, MAFB, MBD1, MECOM, MEF2C, MEIS1, MITF, MYB, MYC, MYCL, MYCN, NANOG, NCOA3, NFIB, NFKB2, NKX2-1, OTX2, PATZ1, PAX2, PAX3, PAX4, PAX8, PBX1, PBX2, PITX2, PLAG1, PLAGL2, PPARG, PPP1R13L, PRDM10, PRDM13, PRDM14, PRDM15, PRDM16, PRDM6, PRDM8, PRDM9, RARA, REL, RERE, RUNX1, RUNX3, SALL4, SATB1, SFPQ, SIX1, SNAI1, SOX2, SOX4, SPI1, SREBF1, STAT3, TAF1, TAL1, TAL2, TBX2, TBX3, TCF3, TFCP2, TFE3, THRA, TLX1, TP63, TP73, TWIST1, WT1, YBX1, YY1, ZBTB16, ZBTB7A, ZIC2, ZNF217 또는 ZNF268일 수 있고; 상기 전이 관련 유전자는 AKT1, AKT2, AR, CBL, CDH1, CRK, CSF1, CTNNB1, CTTN, CXCR4, EGFR, FGFR1, FLT3, FYN, GLI1, ILK, ITGA3, JAK2, MET, PDGFRB, PLXNB1, PRKCI, PTCH1, PTPN11, RAC1, RHOA, RHOC, ROCK1, SMO, SNAI1, SRC, TCF3 또는 WT1일 수 있으며; 상기 혈관신생 관련 유전자는 BRAF, CAV1, CTGF, EGFR, ERBB2, ETS1, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR3, FGFR4, ID1, NRAS, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB 또는 SPARC일 수 있고; 상기 티로신-카이네이즈 유전자는 ABL1, ABL2, ALK, AXL, BLK, EGFR, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FES, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGR, FLT3, FYN, ITK, JAK1, JAK2, KIT, LCK, MERTK, MET, MST1R, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PTK2B, PTK7, RET, ROS1, SRC, SYK, TEC 또는 YES1일 수 있다.

- [127] 일 구현예에서, 상기 종양유전자는 SEPTIN9, ACOD1, ACTN4, ADAM28, ADAM9, ADGRF1, ADRBK2, AFF1, AFF3, AGAP2, AGFG1, AGRN, AHCYL1, AHI1, AIMP2, AKAP13, AKAP9, AKIRIN2, AKTIP, ALDH1A1, ALL1, ANIB1, ANP32C, ANP32D, AQP1, ARAF, ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF5, ASPSCR1, AURKA, BAALC, BAIAP2L1, BANP, BCAR4, BCKDHB, BCL9, BCL9L, BCR, BMI1, BMP7, BOC, BRD4, BRF2, CABIN1, CAMK1D, CAPG, CBFB, CBLB, CBLL1, CBX7, CBX8, CCDC28A, CCDC6, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCNE1, CCNL1, CD24, CDC25C, CDC6, CDH17, CDK1, CDK14, CDK4, CDK5R2, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN3, CDON, CEACAM6, CENPW, CHD1L, CHIC1, CHL1, CKS1B, CMC4, CNTN2, COPS3, COPS5, CRKL, CRLF2, CROT, CRTIC1, CRYAB, CSF1R, CSF3, CSF3R, CSNK2A1, CSNK2A2, CT45A1, CTBP2, CTNND2, CTSZ,

CUL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CYGB, CYP24A1, DCD, DCUN1D1DDB2, DDHD2, DDX6, DEK, DIS3, DNPH1, DPPA2, DPPA4, DSG3, DUSP12, DUSP26, ECHS1, ECT2, EEF1A1, EEF1A2, EEF1D, EIF3E, EIF3I, EIF4E, EIF5A2, ELAVL1, ELL, EML4, EMSY, ENTPD5, EPCAM, EPS8, ERAS, ERGIC1, ERVW-1, EVI2A, EVI5, EWSR1, EZH2, FAM189B, FAM72A, FAM83D, FASN, FDPS, FGF10, FGF3, FGF5, FGF8, FR1OP, FHL2, FIP1L1, FNDC3B, FRAT1, FUBP1, FUS, FZD2, GAB2, GAEC1, GALNT10, GALR2, GLO1, GMNN, GNA12, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GOLPH3, GOPC, GPAT4, GPM6A, GPM6B, GPR132, GREM1, GRM1, GSK3A, GSM1, H19, HAS1, HAX1, HDGFRP2, HMGN5, HNRNPA1, HOTAIR, HOTTIP, HOXA-AS2, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPB1, HULC, IDH1, IFNG, IGF2BP1, IKBKE, IL7R, INPPL1, INTS1, INTS2, INTS3, INTS4, INTS5, INTS7, INTS8, IRS2, IST1, JUP, KDM4C, KIAA0101, KIAA1524, KIF14, KRAS, KSR2, LAMTOR5, LAPTM4B, LCN2, LDHB, LETMD1, LIN28A, LIN28B, LMO1, LMO2, LMO3, LMO4, LSM1, LUADT1, MACC1, MACROD1, MAGEA11, MALAT1, MAML2, MAP3K8, MAPRE1, MAS1, MCC, MCF2, MCF2L, MCTS1, MEFV, MFHAS1, MFNG, MIEN1, MINA, MKL2, MLANA, MLLT1, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MMP12, MMS22L, MN1, MNAT1, MOS, MPL, MPST, MRAS, MRE11A, MSI1, MTCP1, MTDH, MTOR, MUC1, MUC4, MUM1, MYD88, NAAA, NANOGP8, NBPFF12, NCOA4, NEAT1, NECTIN4, NEDD4, NEDD9, NET1, NINL, NME1, NOTCH1, NOTCH4, NOV, NSD1, NUAKE2, NUP214, NUP98, NUTM1, OLR1, PA2G4, PADI2, PAK7, PARK7, PARM1, PBK, PCAT1, PCAT5, PDGFA, PDZK1IP1, PELP1, PFN1P3, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PIM2, PIM3, PIR, PIWIL1, PLAC8, PLK1, PPM1D, PPP1R10, PPP1R14A, PPP2R1A, PRAME, PRDM12, PRMT5, PSIP1, PSMD10, PTCH2, PTMA, PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3, PTTG1, PTTG1IP, PTTG2, PVT1, RAB11A, RAB18, RAB22A, RAB23, RAB8A, RALGDS, RAP1A, RASSF1, RBM14, RBM15, RBM3, RBMY1A1, RFC3, RGL4, RGR, RHO, RING1, RINT1, RIT1, RNF43, RPL23, RRAS, RRAS2, RSF1, RUNX1T1, S100A4, S100A7, S100A8, SAG, SART3, SBSN, SEA, SEC62, SERTAD1, SERTAD2, SERTAD3, SET, SETBP1, SETDB1, SGK1, SIRT1, SIRT6, SKI, SKIL, SKP2, SLC12A5, SLC3A2, SMR3B, SMURF1, SNCG, SNORA59A, SNORA80E, SPAG9, SPATA4, SPRY2, SQSTM1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6, SS18, SSX1, SSX2, SSX2B, STIL, STMN1, STRA6, STYK1, SUZ12, SWAP70, SYT1, TAC1, TACSTD2, TAF15, TALDO1, TAZ, TBC1D1, TBC1D15, TBC1D3, TBC1D3C, TBC1D7, TCL1A, TCL1B, TCL6, TCP1, TFG, TGM3, TINCR, TKTL1, TLE1, TMEM140, TMPOP2, TMPRSS2, TNS4, TPD52, TPR, TRE17, TREH, TRIB1, TRIB2, TRIM28, TRIM32, TRIM8, TRIO, TRIP6, TSPAN1, TSPY1, TXN, TYMS, TYRP1, UBE2C, UBE3C, UCA1, UCHL1, UHRF1, URI1, USP22, USP4, USP6, VAV1, VAV2, VAV3, VIM, WAPL, WHSC1, WHSC1L1, WISP1, WNT1,

WNT10A, WNT10B, WNT2, WNT3, WNT5A, WWTR1, XCL1, XIAP, YAP1, YEATS4, YY1AP1, ZEB1-AS1, ZFAND4, ZFAS1, ZMYM2, ZNF703 및 ZNHIT6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[128] 일 구현예에서, 표적 항원은 세포 표면 항원 또는 자가항원일 수 있다.

[129] 일 구현예에서, 상기 세포 표면 항원은 CEA, ED-B 피브로넥틴, CD20, CD22, CD19, EGFR, IGFIR, VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, VEGFR3/Flt-4, HER2/neu, CD30, CD33, CD3, CD16, CD64, CD89, CD2, 아데노바이러스 섬유 노브, PfMSP-1, HN/NDV, EpCAM/17-1A, hTR, IL-2R/Tac, CA19-9, MUC1, HLA 클래스 II, GD2, G250, TAG-72, PSMA, CEACAM6, HMWMAA, CD40, M13 외피 단백질 및 GPIIb/IIIa로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[130] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[131] 본 발명의 핵산 분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결된 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[132] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위

내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 핵산 분자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

- [133] 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 단백질을 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어 (regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자 함유 발현벡터를 배양하여 단백질을 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 생산할 수 있다.
- [134] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에셰리키아속 (*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [135] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이중 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지

않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning , A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology , John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

- [136] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 항체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.
- [137] 본 발명에서 용어, "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.
- [138] 본 발명에서 용어, "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.
- [139] 일 구현예에서, 상기 숙주 세포는 박테리아 또는 동물세포일 수 있으며, 동물 세포주는 CHO 세포, HEK 세포 또는 NSO 세포일 수 있고, 박테리아는 대장균일 수 있다.
- [140] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 또는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병, 대사 질환(metabolic disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [141] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 항원 결합 도메인으로 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR)에 관한 것이다.
- [142] 일 측면에서, 본 발명은 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [143] 일 측면에서, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 키메라 항원 수용체 발현 세포에 관한 것이다.
- [144] 일 구현예에서, 키메라 항원 수용체 발현 세포는 키메라 항원 수용체 발현 대식세포(CAR-macrophage), 키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포, 키메라

항원 수용체 발현-감마-델타 T(CAR-Gamma-delta T) 세포 또는 자연살해(CAR-NK) 세포일 수 있다.

- [145] 본 발명에서 용어, "CAR(chimeric antigen receptor)"는, 면역 효과기 세포에 특정 항원에 대한 특이성을 부여할 수 있는, 자연적으로 존재하지 않는 수용체를 의미한다. 보통, 상기 CAR은 T 세포에 단일클론항체의 특이성을 이식하기 위하여 사용되는 수용체를 말한다. CAR은 대개 세포 외 도메인(Ectodomain), 막투과성 도메인(transmembrane domain) 및 세포 내 도메인(Ectodomain)으로 구성된다.
- [146] 상기 세포 외 도메인은 항원 결합 부위(antigen recognition region)를 포함하며, CAR의 막통과 도메인은 세포 외 도메인과 연결된 형태로, 자연적 또는 합성된 것에서 유래한 것일 수 있다. 자연적으로 존재하는 것에 유래한 경우, 막 결합 또는 막투과성 단백질에서 유래한 것일 수 있으며, T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 체인, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD 154 또는 CD8 등 다양한 단백질의 막 투과성 영역에서 유래한 부분일 수 있다. 이러한 막통과 도메인의 서열은 막투과성 단백질의 막투과성 영역 부분을 공지하고 있는 통상의 기술분야에 공지된 문헌 등으로부터 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [147] 또한, 상기 막통과 도메인이 합성된 것일 경우, 이는 류신 및 발린과 같은 소수성 아미노산 잔기를 주로 포함할 수 있으며, 그 예로 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성된 막통과 도메인에 존재할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 막통과 도메인에 대한 서열정보는 합성된 막통과 도메인에 대한 통상의 기술분야에 공지된 문헌으로부터 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [148] 본 발명의 CAR에서 상기 세포 내 도메인은 세포 내에 존재하는 CAR의 도메인 일부로서, 막통과 도메인과 연결된 형태이다. 본 발명의 상기 세포 내 도메인은 CAR의 항원 결합 부위에 항원이 결합하면 T 세포 활성화, 바람직하게는 T 세포 증식을 가져오는 것이 특징인, 세포 내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 상기 세포 내 신호전달 도메인은 세포 외에 존재하는 항원 결합 부위에 항체가 결합하면, T 세포 활성화를 가져올 수 있는 신호를 전달하는 부분이라면 특별히 그 종류에 제한되지 않으며, 다양한 종류의 세포 내 신호전달 도메인이 사용될 수 있으며, 그 예로 면역수용체 티로신-기초한 활성화 모티프(tyrosine-based activation motif) 또는 ITAM일 수 있으며, 상기 ITAM은 CD3 제타(ξ , zeta), FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d 또는 FcεRIγ에서 유래한 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [149] CAR는 T-세포 신호화 분자의 세포질 도메인에 경첩 및 막관통 영역을 통해 커플링되는 중앙 연계 항원 (TAA)에 특이적인 항체의 단쇄 단편 가변부 (scFv)를 포함한다. 대부분의 통상적인 림프구 활성화 모이어티는 T-세포 촉발 (예를 들어

CD3 ζ) 모이어티를 갖는 탠덤(tandem)에서 T-세포 공자극 (예를 들어 CD28, CD137, OX40, ICOS, 및 CD27) 도메인을 포함한다. CAR-매개 입양 면역요법은 CAR-이식된 세포가 비-HLA-제한 방식으로 표적 종양 세포 상의 TAA를 직접 인식하게 한다.

- [150] 본 발명에서 용어, "키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포"는 CAR을 발현하는 T 세포를 의미한다. 상기 키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포는 i) HLA(human leukocyte antigen)에 비의존적인 방식으로 암 항원을 인지하므로, 세포 표면에 HLA 발현을 감소시켜 항암제의 작용을 회피하는 암들을 치료할 수 있는 이점을 지니며, ii) HLA 타입과 무관하므로, 환자의 HLA 타입과 관계없이 치료에 이용할 수 있으며, iii) 짧은 시간 내에 많은 양의 암 특이적 T 세포를 만들어 낼 수 있으므로, 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있는 이점을 지닌다.
- [151] 상기 T 세포는 CD4⁺ T세포(도움 T 세포, TH 세포), CD8⁺ T세포(세포독성 T 세포, CTL), 기억 T 세포, 조절 T 세포(Treg 세포) 자연살해 T 세포 등 있으며, 본 발명에서 CAR이 도입되는 T 세포는 바람직하게는 CD8⁺ T세포 이나, 이에 제한되지 않는다.
- [152] 일 구현예에서, 본 발명은 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 T 세포 관여자(T-cell engager)에 관한 것이다.
- [153] 일 구현예에서, 상기 T 세포 관여자는 예를 들어, 이중-특이적 T-세포 관여자(bispecific T-cell engager, BiTE)일 수 있다. 상기 BiTE는 인공 이중특이적 모노클로날 항체의 부류로, 약 55 킬로달톤의 단일 펩티드 사슬 상에 4 개의 상이한 유전자로부터 아미노산 서열 또는 상이한 항체의 2 개의 단쇄 가변부 단편(scFv) 으로 구성되는 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해 T 세포에 결합하고, 다른 하나는 종양 특이적인 분자를 통해 종양 세포에 결합한다. 다른 이중특이적 항체와 유사하게, 그리고 보통의 모노클로날 항체와는 달리, BiTE는 T 세포와 종양 세포 사이에서 연결을 형성한다. 이는 퍼포린 및 그랜자임과 같은 단백질을 생산함으로써 MHC I 또는 공자극 분자의 존재와는 독립적으로 T 세포가 종양 세포 상에서 세포독성 활성을 발휘하게 한다. 이들 단백질은 종양 세포로 진입하고 세포의 세포사멸을 개시한다.
- [154] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체 발현 세포 또는 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [155] 일 구현예에서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 삼중음성유방암(Triple Negative Breast Cancer, TNBC), 폐암, 췌장암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암,

내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 면역관문 억제제에 대해 불응성 암일 수 있다.

[156] 본 발명의 약학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 생물학적 요법, 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암을 치료할 수 있다.

본 발명을 암의 예방 및 치료에 이용하는 경우 상기 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술허(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토크렉세이트(methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.

[157] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역원성 세포사멸 유도제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역원성 세포사멸 유도제는 안트라사이클린계열 항암제, 탁산 계열 항암제, 항-EGFR 항체, BK 채널 작용제, 보르테조미브(Bortezomib), 강심성 배당체(cardiac glycoside), 사이클로포스파미드 계열 항암제, GADD34/PP1 저해제, LV-tSMAC, Measles 바이러스, 블레오마이신(bleomycin), 미토잔트론(mitoxantrone) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 안트라사이클린 계열 항암제는 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin) 또는 발루비신(valrubicin)일 수 있고, 탁산계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)일 수 있다.

[158] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 화학적 항암 약물(항암제) 등과 함께 투여함으로써, 암세포의 사멸 효과를 통해 종래의 항암제의 암치료 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 상기 항암제와 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 상기 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로레타민(mechloethamine), 클로라부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine:

CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부숴판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin) 및 마이토마이신 C(mitomycin C); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [159] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [160] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [161] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어 있다.
- [162] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [163] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [164] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [165] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [166] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.
- [167] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합제, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.
- [168] 일 구현예에서, 본 발명의 항암 보조제는 면역항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.

- [169] 일 구현예에서, 본 발명의 항암 보조제는 면역항암제에 대한 불응성을 개선시킬 수 있다.
- [170] 일 구현예에서, 면역항암제는 면역관문 억제제(Immune checkpoint inhibitors), 면역억제인자 제어 약물, 암 백신, 면역아주번트(immunoadjuvant), 암 치료용 면역세포, 면역세포 활성화 보조인자, 암 치료용 항체 또는 암 치료용 면역세포의 활성화 유지에 필요한 사이토카인일 수 있다.
- [171] 일 구현예에서, 면역억제인자 제어 약물은 조절 T 세포(regulatory T cells, Treg)의 수준을 감소시키는 약물일 수 있다.
- [172] 일 구현예에서, 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR, TIGIT, CD47, VISTA 또는 A2aR의 억제제일 수 있다.
- [173] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체 발현 세포 또는 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [174] 일 구현예에서, 표지는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질, 형광물질, 프로브 또는 태그(tag)일 수 있으며, 형광물질은 Cy(cyanine) 계열, 로다민(Rhodamine) 계열, 알렉사(Alexa) 계열, BODIPY 계열 또는 ROX 계열의 형광물질일 수 있고, 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene), 시아닌 (cyanine), 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 또는 알렉사 (Alexa)일 수 있다.
- [175] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [176] 일 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 b) 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [177] 일 구현예에서, 항체의 정제는 여과, HPLC, 음이온 교환 또는 양이온 교환, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화도 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 하는 것이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 Protein A를 사용하는 친화 크로마토그래피를 이용할 수 있다.
- [178] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자의 암의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

[179] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.

[180] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 항체-약물 접합체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 T 세포 관여자의 암 진단 용도에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[181] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[182]

[183] 실시예 1. EphA10 항원 단백질의 발현 및 정제

[184] 면역관문 억제인자를 표적하는 치료제에 대한 불응성 유발 인자인 세포막 단백질인 EphA10(Eph receptor A10)을 표적하는 항체 제작용 항원을 제작하기 위해, EphA10의 세포 외부 영역(Extra Cellular Domain, ECD) 또는 세포 외부 영역의 FNIII 도메인 발현용 벡터를 제작하고 이를 동물세포에서 발현 및 정제하였다. 이를 위해, EphA10의 ECD 또는 FNIII 도메인 동물세포 발현용 벡터를 제작하고, 결합활성(Avidity)에 의한 보다 효과적인 항체 스크리닝을 위해, GST(Glutathione-S-transferase) 또는 human Fc가 각각 융합(fusion)된 이합체(dimeric) 형태의 EphA10 단백질 동물세포 발현용 벡터와, 스트렙타비딘(Streptavidin)이 융합된 사합체(tetrameric) 형태의 EphA10 단백질 발현용 동물세포 발현용 벡터도 제작하였다. 구체적으로, Expi293F 세포를 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양하고 하루 뒤에, PEI(Polyethylenimine, Polyscience, 23966)를 이용하여 상기에서 제작한 벡터들을 각각 트랜스펙션(transfection)하였다. CO₂ 인큐베이터에서 37 °C, 125 rpm 및 8%의 CO₂ 조건으로 7일간 진탕 배양한 뒤, 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액 부피의 1/25의 25× PBS를 첨가한 뒤 0.2 μm 바틀탑 필터 (Merck Millipore)를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액에 GSH 레진, Protein A 레진 또는 Ni-NTA 레진 1 ml에 각각 첨가하고, 4 °C에서 16 시간 동안 교반한 뒤, 컬럼에 흘려주어 각 레진을 회수하였다. 5 ml 1× PBS로 세척한 후 4 ml의 10 mM 환원된 글루타치온(reduced glutathione)을 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM 글라이신 (pH 2.7) 또는 250 mM 이미다졸(imidazole)로 각각 용출(elution)하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS로 버퍼 교체한 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 10종의 항원 단백질들의 크기와 순도를 분석하였다 (도 1).

[185]

[186] 실시예 2. EphA10 결합 마우스 항체 확보 및 인간화

[187] 실시예 1에서 제작한 10종의 항원을 이용하여 마우스 면역화 및 하이브리도마 기술 Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256:495-497)로 EphA10 특이적 마우스 항체 m#2를 확보하였고 이를 바탕으로 인간 불변 영역 (constant region)이 도입된 Chimeric #2 항체를 동물세포 발현 및 항체 정제를 통해 확보하였다 (도 2). 제작한 EphA10 특이적 마우스 항체의 프레임워크 영역 (framework region)의 서열을 인간화하여 면역원성 (immunogenicity) 유발 가능성을 최소화하기 위해, EphA10 특이적 마우스 항체의 생식세포계열 (germline) 서열 분석을 진행하였으며, 이를 통해, EphA10 특이적 마우스 항체와 유사도가 가장 높은 각각 2가지의 인간 중쇄 (IGHV2-5*09, IGHV4-38-2*02) 및 경쇄 (IGKV2-30*02, IGKV2-29*02)의 프레임워크들을 각각 도입한 EphA10 특이적 인간화 항체 4종 (1-1, 1-2, 2-1 및 2-2)을 확보하였다. 또한 현재 임상에 널리 사용되고 있는 치료용 항체들 중, 물성이 매우 우수한 인간화 항체인 트라스트주맙 (trastuzumab)의 프레임워크를 도입한 1종의 인간화 항체 (TRA #2)도 추가로 제조하였다 (도 3).

[188]

[189] 실시예 3. EphA10 결합 인간화 항체의 발현 및 정제

[190] 상기 실시예 2에서 확보한 5종의 EphA10 특이적 인간화 항체들을 IgG 형태로 발현하고 EphA10과의 결합력이 유지되는지 분석하기 위해, 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 3종씩 제작하였다. Expi293F 세포를 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양하고 하루 뒤에, PEI (Polyethylenimine, Polyscience, 23966)에 상기에서 제작한 중쇄 발현 벡터 및 경쇄 발현 벡터를 첨가하여 트랜스펙션한 후, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C, 125 rpm 및 8%의 CO₂ 조건으로 7일간 진탕 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액 부피의 1/25의 25× PBS를 첨가한 뒤 0.2 µm 바틀탑 필터 (Merck Millipore)를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액에 500 µl의 Protein A resin을 첨가하여 4 °C에서 16 시간 동안 교반한 뒤, 컬럼에 흘려주어 레진을 회수하였다. 5 ml 1× PBS로 세척한 후 3 ml의 100 mM 글라이신 (pH 2.7)로 용출하고 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화시켰다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS로 버퍼 교체한 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 5종 항체의 크기와 순도를 분석하였다 (도 4).

[191]

[192] 실시예 4. EphA10 특이적 인간화 항체 선별

[193] 4-1. EphA10에 대한 결합력 분석

[194] 상기 실시예 3에서 정제한 5종의 EphA10 결합 인간화 항체의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석하였다. 구체적으로, human Fc를 융합한 EphA10 4 µg/ml를 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6) 용액으로 희석하여 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 웰 마이크로플레이트 (costar)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 µl의 4% 스킵밀크 (GenomicBase)로 상온에서 2 시간 동안

블로킹하였다. 0.05% Tween20가 포함된 1× PBS (PBST) 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤, 1% 스킵밀크가 포함된 PBS로 연속 희석된 5종의 항체 (IMGT 1-1, IMGT 1-2, IMGT 2-1, IMGT 2-2 및 TRA #2)를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 goat 항-human kappa chain HRP conjugate (Millipore) 50 µl씩을 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 인큐베이션하고, 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 µl씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M의 H₂SO₄를 50 µl씩 넣어 반응을 종료시킨 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 인간화 항체들은 인간화 과정 전의 마우스 항체 (ch#2)에 비해 EphA10에 대한 결합력이 크게 감소하지 않고 성공적으로 인간화가 진행된 것을 확인하였다 (도 5).

[195]

[196] 4-2. 세포-발현-EphA10 대한 결합력 분석 및 항체 선별

[197] 상기 실시예 3에서 정제한 5종의 EphA10 결합 인간화 항체의 세포-발현-EphA10 대한 결합력을 분석하고, 강한 결합력을 가지는 항체를 선별하였다. 구체적으로, MDA-MB-231 인간 EphA10 과발현 세포주 및 마우스 EphA10 과발현 세포주를 DPBS (Corning)로 현탁하고 세포수가 9×10^4 개가 되도록 각 e-tube에 100 µl씩 분주하였다. 1st 항체로, 상기 실시예 3에서 정제한 5종의 EphA10 결합 인간화 항체 5종과 대조군으로 인간화 과정 전의 마우스 항체 (Chimeric #2) 및 IgG를 500 ng씩 처리하여 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였으며, 2nd 항체로 Alexa Fluor 488 anti-human IgG (Invitrogen)을 1:100의 비율로 처리한 뒤 차광하여 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. DPBS로 2회 세척한 후 CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter)로 분석하였다. 그 결과, 인간화 과정 전의 마우스 항체 (Chimeric #2)와 5개의 인간화 항체 모두 인간과 마우스 EphA10에 특이적으로 결합했으며, 모든 인간화 항체가 마우스 EphA10에 비해 인간 EphA10에 더 강하게 결합하는 것으로 나타났다. 또한, 5개의 인간화 항체 중 1-1 및 1-2가 EphA10에 가장 강력한 결합력을 보여 최종 후보 대상으로 선정하였다 (도 6).

[198]

[199] 실시예 5. EphA10 특이적 인간화 항체의 EphA10에 대한 정량적 결합 상수 분석

[200] BLI(Bio-Layer Interferometry) 장비인 Octet® BLI system R8 (Satorius)을 이용하여 선별된 2종의 EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 1-2의 정량적 결합 상수를 분석하였다. 구체적으로, 고정화(Immobilization)를 위해, Octet® Protein A bio-sensor (Satorius)에 5 µg/ml로 200 µl의 1× PBS 에 희석된 2종의 EphA10 특이적 인간화 항체들 (1-1 및 1-2)을 300초 동안 인큐베이션하였다. 1× PBS 를 이용하여 150초 동안 기준선 안정화(baseline stabilization)를 진행한 후에 1,000 nM부터 200 µl의 부피로 1× PBS에 연속 희석(serially dilution)된 EphA10-His 모노머

(monomeric) 항원 단백질을 EphA10 특이적 인간화 항체가 코팅된 바이오센서(biosensor)에 300초간 결합(association)시켰다. 그 후, 200 μ l의 1× PBS를 300초 동안 인큐베이션하여 해리(dissociation)를 진행하였으며 정량적인 결합 상수들은 Octet BLI Analysis 12.2 software (Satorius)를 이용하여 분석하였다 (도 7).

[201]

[202] 실시예 6. EphA10 표적 ADC 항체 제작

[203] 상기 실시예 4에서 선별한 EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 1-2를 이용하여 ADC(Antibody drug conjugate)를 제작하기 위해, 일반적으로 ADC를 제조하는데 사용되고 있는 부분적인 환원에 이은 시스테인 컨쥬게이션(cysteine conjugation) 방식으로 ADC를 제작하였다. 구체적으로, PD MidiTrap G-25 (Cytiva, 28918008)를 사용하여 1× PBS에 보관되었던 EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 1-2의 버퍼를 환원 버퍼 (5 mM DTPA, pH 8.0 PBS)로 교환한 뒤, Centrifugal filter units 10K (Merck Millipore)을 이용하여 4 mg/ml로 농축하였다. 농축된 항체 2 mg/ml 및 Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, sigma) 68.7 μ M가 되도록 환원 버퍼와 혼합하여 2시간 동안 37 °C에서 환원 반응을 수행하였다. 그 후 TCEP를 제거하여 추가적인 환원을 막고 컨쥬게이션(conjugation)을 위해, 1× PBS 버퍼 (pH 7.4)로 상기의 버퍼 교환과 동일하게 PD MidiTrap G-25 column, Centrifugal filter units 10k를 이용하여 교환 및 농축을 진행하였다. 2 mg/ml 농도의 환원된 항체를 시스테인(cysteine)과 반응하는 링커-약물인 MC-Val-Cit-PAB-MMAE (HY-15575, medchemexpress) 63.2 μ M와 1× PBS에서 혼합하여 4 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 추가 반응을 막기 위해 시스테인을 1× PBS에 녹여, 처리한 링커-약물의 2배 농도인 126.4 μ M로 처리하여 10분간 상온에서 쿼칭(quenching)하였다. 반응이 종결된 용액으로 SEC(size exclusion chromatography) 정제를 진행한 뒤, FPLC (Biorad) system에서 Superdex 200 increase 10/300 (28990944, Cytiva) 컬럼에 반응 용액을 주입하고, 0.4 ml/min으로 1× PBS를 이용해 SEC 크로마토그래피를 수행한 후, SDS-PAGE를 통해 분석하였다 (도 8). 용출된 ADC는 Centrifugal filter units 10K로 농축하여 분석과 사용 전까지 -20 °C에서 보관하였으며, 정제된 ADC는 hydrophobic interaction chromatography 방법으로 분석하였으며, ADC는 DAR에 따라서 발생하는 hydrophobicity 차이에 의해 peak가 분리되었다 (도 8).

[204]

[205] 실시예 7. EphA10 표적 ADC 항체의 효능 분석 및 서열 분석

[206] 7-1. ADC의 암세포 사멸 효과 확인

[207] ADC의 효능을 *in vitro*로 확인하기 위해, ATP 측정을 통한 세포 생존 분석으로 암세포 사멸 효과를 확인하였다. 구체적으로, MDA-MB-231 naive cell (대조군), mock 세포주 (음성 대조군) 및 hEphA10 과발현 세포주를 각각 96웰 화이트 플레이트 (SPL)에 웰 당 2×10^4 씩 분주하고, 다음 날 상기 실시예 6에서 제작한 ADC를 RPMI (Capricorn)에 농도별로 희석하여 각 웰에 100 μ l씩 처리한 후,

37 °C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. ADC를 처리한 플레이트를 배양기 밖 상온에서 5분간 인큐베이션하고, 각 웰에 CellTiter-Glo 용액을 50 µl씩 첨가한 뒤, 500 rpm에서 2분 동안 shaking하였다. 상온의 실험대에서 10분 동안 차광하여 반응시킨 후 Synergy HTX multimode reader (Biotek)를 이용하여 ATP를 측정하였다.

[208] 그 결과, ADC에서 명확한 세포사멸 효과가 관찰되지 않았다 (도 9).

[209]

[210] 7-2. 서열 분석

[211] 상기 실시예 7-1에서 EphA10 특이적 인간화 항체를 이용한 ADC 항체가 *in vitro* ADC 효능을 나타내지 않은 이유를 분석하기 위해, EphA10 특이적 인간화 항체의 서열을 다시 분석하였다. 서열 분석 결과, EphA10 특이적 인간화 항체의 경쇄의 CDR 영역에 이황화(disulfide) 결합에 관여하지 않는 자유 시스테인(free cysteine) 아미노산이 존재함을 확인하였다 (도 10). EphA10 표적 ADC 항체는 링커(linker)를 통한 payload의 저분자 물질을 연결하여 생성하였기 때문에 이 과정에서 CDR 영역의 자유 시스테인에 payload가 컨쥬게이션됨으로써 EphA10 표적 인간화 항체의 항원 에피토프(epitope)와 결합하는 부위를 블로킹하여 항원 결합력을 소실하는 것으로 가정하였다. 이를 검증하기 위해 EphA10 특이적 인간화 항체 (1-1)과 ADC 제조후의 EphA10 표적 ADC 항체 (1-1 (ADC))의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석하여 비교한 결과, 예상대로 항체 경쇄의 CDR에 존재하는 자유 시스테인으로 인하여 ADC 항체의 EphA10 결합력이 매우 크게 감소하였음을 확인하였고, 이로 인해 *in vitro* ADC 효능 또한 크게 감소된다는 사실을 확인하였다 (도 11).

[212]

[213] 실시예 8. ADC 효능 개선된 EphA10 특이적 인간화 항체 제작

[214] 상기 실시예 7에서 확인한 결과에 따라 실시예 4에서 선별한 EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 1-2의 경쇄에 존재하는 자유 시스테인을 시스테인과 특성이 유사한 세린(serine) (1-1-S 및 1-2-S) 또는 항체의 전체 구조변화의 영향을 최소화시키기 위한 알라닌(alanine) (1-1-A 및 1-2-A)으로 선택하여 각각 치환하였고, 경쇄 동물세포 발현용 벡터에 각각 클로닝하고, 상기 실시예 3에서와 같이 동물세포에서 각 항체를 발현 및 정제한 뒤, SDS-PAGE를 통해 정제된 항체들 (1-1-A, 1-1-S, 1-2-A 및 1-2-S)의 크기와 순도를 분석하였다 (도 12).

[215]

[216] 실시예 9. ADC 효능 개선된 EphA10 특이적 인간화 항체의 EphA10에 대한 결합력 분석

[217] 상기 실시예 8에서 2종의 EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 1-2의 경쇄에 존재하는 자유 시스테인을 각각 세린 및 알라닌으로 치환한 항체들 (1-1-A, 1-1-S, 1-2-A 및 1-2-S)의 EphA10에 대한 결합력을 ELISA로 분석하였다.

[218] 그 결과, EphA10 특이적 인간화 항체 1-1 및 항체 1-2의 자유 시스테인을 세린으로 치환한 경우 EphA10에 대한 결합력을 거의 완전히 잃어버리는 반면, 알라닌으로 치환한 경우 EphA10에 대한 결합력이 회복되는 것으로 나타났다 (도 13).

[219]

[220] 실시예 10. EphA10 결합력 향상을 위한 효모 디스플레이 라이브러리 구축

[221] 상기 실시예에서 발굴한 EphA10 특이적 인간화 항체들 1-1 및 1-2로부터 EphA10에 대한 결합력이 추가로 향상된 항체들을 발굴하기 위해, 1-1 및 1-2 항체의 가변영역들 (VH 및 VL)에 Error-prone PCR을 통해 0.2%로 무작위적인 돌연변이가 들어가도록 유도하여 증폭한 항체 라이브러리를 구축하였다. 제작된 DNA 라이브러리는 MicroPulser Electroporator (Bio-Rad)를 이용한 전기천공법을 통해 효모종 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 컴피턴트(Competent) 세포 400 μ l에 형질전환(transformation)한 뒤, SD 배지 [Difco Yeast nitrogen base (BD Biosciences) 6.7 g/l, Bacto casamino acid (BD Biosciences) 5.0 g/l, Na_2HPO_4 (Junsei) 5.4 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Samchun) 8.56 g/l, Glucose (Duksan) 20 g/l] 500 ml에서 배양하여 형질전환된 효모종만 선택적으로 생존하게하여 1-1 및 1-2 각각 7.5×10^7 및 1.0×10^8 의 라이브러리 크기를 갖는 효모 디스플레이 라이브러리를 제작하였다 (도 14).

[222]

[223] 실시예 11. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체 스크리닝

[224] 우선, 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 이용하기 위해 human Fc가 융합된 항원 단백질 EphA10-Fc에 Alexa488 형광분자를 표지화하였다. 또한, 상기 실시예 10에서 제작한 효모 라이브러리의 5.5×10^8 개 세포를 트립토판 (tryptophan)이 결핍된 SD 배지 100 ml에서 30 °C 조건으로 16시간 동안 배양한 후, 7×10^8 개 세포를 SG 배지 [Difco Yeast nitrogen base (BD Biosciences) 6.7 g/l, Bacto casamino acid(BD) 5.0 g/l, Na_2HPO_4 (Junsei) 5.4 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SAMCHUN) 8.56 g/l, Galactose (Sigma-Aldrich) 20 g/l] 100 ml에서 20 °C 조건으로 48 시간 동안 배양하였다. 배양 세포 중 1×10^8 개 세포를 4 °C에서 14,000 $\times$ g로 30초간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 ml PBSB (1 $\times$ PBS, 0.1% bovine serum albumin (Gibco)(pH 7.4)로 세척한 뒤 200 nM의 Alexa488 컨쥬게이트된 EphA10-Fc 및, 1:1,000의 비율로 PBSB (pH 7.4) 1 ml에 희석된 anti-FLAG-iFlour (GenScript)를 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 1 ml PBSB (pH 7.4)로 세척한 후에, 1 ml PBSB (pH 7.4)로 재현탁하고, Alexa488 컨쥬게이트된 EphA10-Fc와의 결합을 유도하여 높은 형광 신호를 보이는 세포들을 유세포 분리기 (Bio-Rad S3 sorter, Bio-Rad)를 통해 회수하였다. 회수된 서브-라이브러리(sub-library)는 동일한 방법으로 Alexa488 컨쥬게이트된 EphA10-Fc의 농도를 줄이며 총 5 라운드의 선별 과정을 거쳐 EphA10에 대한

결합력이 우수한 Fab 변이체들을 디스플레이하고 있는 세포들을 농축시켰다 (도 15).

[225]

[226] 실시예 12. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 유전자 서열 확인
[227] 상기 실시예 11에서 EphA10에 대한 결합 신호가 우수한 Fab 변이체 클론들의 유전자 서열을 생어 시퀀싱(Sanger sequencing)으로 확인하였다.

[228] 분석 결과, 특정 항체 서열을 갖는 항체가 성공적으로 농축(enrich)되었음을 확인하였으며, 상기 EphA10 결합력 향상을 위한 스크리닝을 통해 10종의 항체 (A.3, A.7, A.8, B.1, B.3, B.7, 2.1, 2.3, 1-N 및 2-W)를 확보하였다 (도 16). 또한, 발굴된 항체들의 대부분 클론들은 1-1 항체와 1-2 항체의 경쇄 CDR에 존재하는 자유 시스테인이 아스파라긴(asparagine, N), 아르기닌(arginine, R), 트립토판(tryptophan, W) 또는 티로신(tyrosine, Y) 중의 하나로 치환된 것으로 확인되어, 1-1 항체 및 1-2 항체 각각의 경쇄 CDR에 존재하는 자유 시스테인을 아스파라긴(asparagine), 아르기닌(arginine), 트립토판(tryptophan) 또는 티로신(tyrosine)으로 각각 단일 아미노산 치환 돌연변이 유도한 변이체 6종 (1-R, 1-W, 1-Y, 2-N, 2-R 및 2-Y)을 추가로 제조하였다 (도 16).

[229]

[230] 실시예 13. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 발현 및 정제
[231] 상기 실시예 12에서 선별된 16종의 Fab 항체 변이체들이 IgG 형태로도 EphA10과의 결합력을 가지는지를 확인하기 위하여, Fab 항체 변이체들의 중쇄 및 경쇄 발현 벡터들을 각각 제작하고, 실시예 3에서와 같이 동물세포에서 각 항체를 발현 및 정제한 뒤, SDS-PAGE를 통해 각각 정제된 16종 항체들의 크기와 순도를 분석하였다 (도 17).

[232]

[233] 실시예 14. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 EphA10 결합력 분석

[234] 상기 실시예 13에서 정제한 16종의 항체들의 EphA10에 대한 결합력이 증가하였는지 확인하기 위하여 ELISA 분석을 수행한 결과, 실시예 10에서 추가 엔지니어링을 통해 선별한 인간화 항체들의 EphA10에 대한 결합력이 향상된 것을 확인하였다 (도 18).

[235]

[236] 실시예 15. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 ADC 제작

[237] CDR 영역의 시스테인이 치환되고 추가 엔지니어링을 거쳐 선별된 EphA10 특이적 인간화 항체들 중 2종 (A.7 및 2-W)을 이용하여 실시예 6의 시스테인 컨쥬레이션 방식으로 ADC를 제작하고, SDS-PAGE를 통해 분석하였다 (도 19). 또한, 정제된 ADC는 hydrophobic interaction chromatography 방법으로 분석하였다 (도 19). 제작된 ADC는 DAR에 따라서 발생하는 hydrophobicity

차이에 의해 peak가 분리되었으며, HIC 분석을 통해서 ADC의 DAR(Drug to Antibody ratio) 분포와 그 비율을 확인하였다.

[238]

[239] 실시예 16. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체 기반 ADC에 대한 EphA10 항원 결합력 분석

[240] 실시예 4에서 선별한 인간화 항체 1-1를 이용하여 제작한 EphA10 표적 ADC (1-1_ADC), 실시예 4에서 선별한 인간화 항체 1-2의 경쇄 CDR에 존재하는 자유 시스테인을 트립토판으로 치환한 항체 (2-W)를 이용하여 제작한 EphA10 표적 ADC (2W_ADC), 및 효모 디스플레이 라이브러리를 통해 선별한 항체 A7 (A.7)를 이용하여 제작한 EphA10 표적 ADC (A7_ADC) 항체들의 EphA10 결합력이 ADC 전과 같이 유지되는지 ELISA로 분석하였다.

[241] 그 결과, 실시예 4에서 선별한 인간화 항체 1-1 및 1-2 항체를 ADC로 제조하였을 때 EphA10 결합력이 현저히 감소되었던 것과 달리, 추가적인 엔지니어링 (아미노산 치환, 효모 디스플레이 라이브러리)을 적용하여 선별된 항체로부터 ADC를 제조하였을 때에는 EphA10에 대한 결합력이 매우 잘 유지되는 것으로 확인되었다 (도 20).

[242]

[243] 실시예 17. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체 기반 ADC의 암세포 사멸 효과 확인

[244] A7 및 2W 항체를 이용하여 제작한 2종의 EphA10 표적 ADC (A7-MMAE 및 2W_MMAE)의 효과를 검증하기 위해 상기 실시예 7-1과 같이 ATP를 측정하여 암세포의 세포 생존을 분석을 수행하였다.

[245] 그 결과, 대조군 항체 (A7 및 W2)는 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않은 반면, 이를 이용한 EphA10 표적 ADC들은 모두 뚜렷하게 암세포 사멸 효과를 나타냈으며, ADC의 암세포 사멸 효과는 EphA10의 발현에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다 (도 21).

[246]

[247] 실시예 18. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 EphA10에 대한 정량적 결합 상수 분석

[248] 선별된 EphA10 특이적 인간화 항체 2종 (A.7 및 2-W)의 EphA10에 대한 정량적 결합 상수를 분석하기 위해 BLI(Bio-Layer Interferometry) 장비인 Octet® BLI system R8 (Satorius)을 이용하여 실험을 수행하였다. 구체적으로, 고정화 (Immobilization)를 위해, Octet® Protein A bio-sensor (Satorius)에 5 µg/ml로 200 µl의 1× PBS 에 희석된 2종의 EphA10 특이적 인간화 항체들 (A.7 및 2-W)을 300초 동안 인큐베이션하였다. 1× PBS 를 이용하여 150초 동안 기준선 안정화를 진행한 후에 1,000 nM부터 200 µl의 부피로 1× PBS에 연속 희석된 EphA10-His 모노머 항원 단백질을 EphA10 특이적 인간화 항체 (A.7 및 2-W)가 각각

코팅된 바이오 센서에 300초간 결합시켰다. 그 후, 200 μ l의 1× PBS를 300초 동안 인큐베이션하여 해리를 진행하였으며 정량적인 결합 상수들은 Octet BLI Analysis 12.2 software (Satorius)를 이용하여 분석하였다

[249] 그 결과, 두 항체 모두 #2 항체보다 인간 EphA10에 높은 결합 상수를 가지는 것을 확인하였다 (도 22).

[250]

[251] 실시예 19. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 마우스 EphA10 결합력 분석

[252] 19-1. 마우스 EphA10의 발현 및 정제

[253] 인간 EphA10과 마우스 EphA10은 95%의 유사도를 가지므로, 항체가 마우스 EphA10에 결합한다면 EphA10 표적 항체의 *in vivo* 실험 전, 마우스 모델 선정에 좋은 지표로 활용 가능하다. 따라서, 마우스 EphA10의 세포 외부 영역 (extracellular domain, ECD)을 다양한 융합 단백질과 함께 발현 가능한 동물세포 발현용 벡터를 준비하고, Expi293F 세포에 트랜스펙션하여 7일 동안 배양한 뒤, 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액의 1/25 부피의 25× PBS를 첨가한 후 0.2 μ m bottle top filter (Merck Millipore)를 이용하여 여과하고, 여과된 상등액에 GSH 레진, Protein A 레진 또는 Ni-NTA 레진 1 ml을 첨가한 뒤, 4 °C에서 16 시간 교반하였다. 이 후 컬럼에 흘려주어 각 레진을 회수하였다. 5 ml 1× PBS로 세척한 후 4 ml의 10 mM 환원된 글루타치온을 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM 글라이신 (pH 2.7) 또는 250 mM 이미다졸로 각각 용출하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 1× PBS로 버퍼 교체한 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 4종의 항원 단백질들의 크기와 순도를 분석한 결과, 4종의 항원 단백질 중 mEphA10-Fc (human Fc를 fusion한 마우스 EphA10)만이 정제되었으며, 이의 항원으로서의 활성을 인간화 과정 전의 EphA10 특이적 마우스 항체 (m#2)를 이용한 ELISA 분석으로 확인하였다 (도 23).

[254]

[255] 19-2. EphA10에 대한 결합력이 향상된 인간화 항체의 마우스 EphA10에 대한 결합력 분석

[256] 선발된 EphA10 특이적 인간화 항체 2종 (A.7 및 2-W)이 상기 실시예 19-1에서 발현 및 정제한 마우스 EphA10에도 결합하는지 확인하기 위해 ELISA를 진행하였다. 구체적으로, mEphA10-Fc 4 μ g/ml를 0.05 M Na₂CO₃ (pH 9.6) 용액으로 희석하여 50 μ l씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 웰 마이크로플레이트 (costar)에 4°C에서 16시간 동안 고정화한 후, 100 μ l의 4% 스킴밀크 (GenomicBase)가 포함된 PBS로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 180 μ l의 PBST로 4 회씩 세척한 뒤, 1% 스킴밀크에 연속 희석된 EPHA10 결합 항체들 (A.7 및 2-W)을 각각 50 μ l씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 goat 항-human kappa chain HRP conjugate (Millipore) 50 μ l씩을 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 인큐베이션하고, 세척하였다. 1-Step

Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μ l씩 첨가하여 발색한 뒤 2 M의 H_2SO_4 를 50 μ l씩 넣어 반응을 종료시킨 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, A7 항체 (A.7) 및 2W 항체 (2-W) 모두 마우스 EphA10에도 결합하는 것을 확인하였다 (도 24).

청구범위

- [청구항 1] EphA10(Eph receptor A10)에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH2, 및 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 VH 도메인을 포함하는, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 서열번호 9 내지 14의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL1, 서열번호 15 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열번호 17 내지 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL3를 포함하는 VL 도메인을 포함하는, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 서열번호 20 내지 25의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VH 도메인을 포함하는, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 서열번호 26 내지 45의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VL 도메인을 포함하는, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 인간화 항체인, EphA10에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
- [청구항 8] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 약물을 포함하는, 항체-약물 접합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC).
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 약물은 면역원성 세포사멸 유도제, 전세포사멸성(pro-apoptotic) 펩타이드, 이크로튜블린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, 토포아이스오머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), 독소(toxin), 방사선 핵종 또는 항암제인, 항체-약물 접합체.

- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 약물은 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin), 발루비신(valrubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 이리도테칸(iridotecan), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 벤다무스틴(bendamustine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide), 미토산트론(mitoxantrone), 이자베필론(izabepilone), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E, MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.
- [청구항 11] 제 8항에 있어서, ADC 링커를 추가로 포함하는, 항체-약물 접합체.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, ADC 링커는 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로파노일(MP), 발린-시트룰린(val-cit), 알라닌-페닐알라닌(ala-phe), p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트(SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트(SMCC), 발린-시트룰린-p-

아미노벤질옥시카르보닐(val-cit-PAB) 또는 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트(SIAB)인, 항체-약물 접합체.

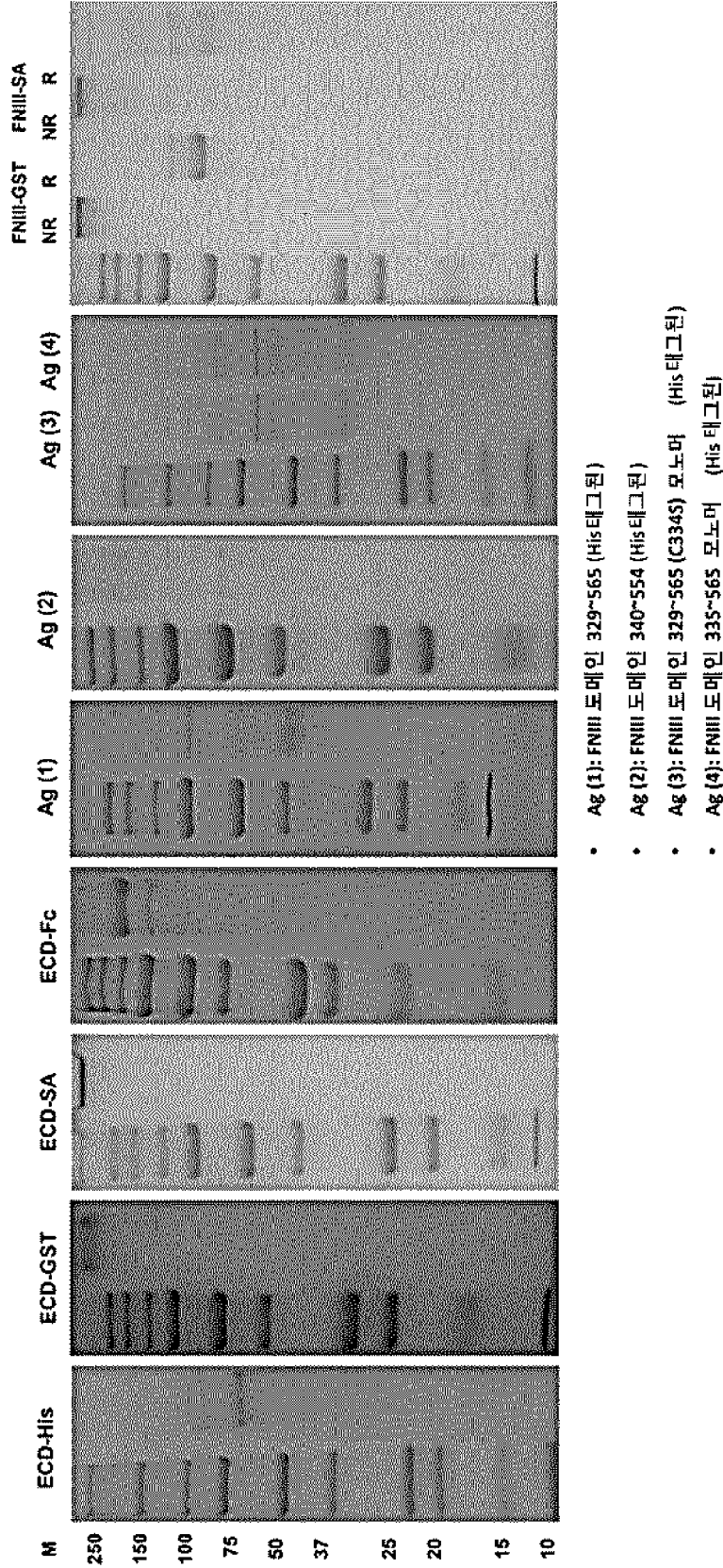
- [청구항 13] 제 11항에 있어서, ADC 링커를 통해 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 약물과 복합체를 형성하는, 항체-약물 접합체.
- [청구항 14] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 EphA10 이외의 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 표적 항원에 결합하는 부분이 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSMA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSI-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, SLOO, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 17] 제 14항에 있어서, 표적 항원은 세포 표면 항원 또는 자가항원인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.
- [청구항 18] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편 또는 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자.
- [청구항 19] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 또는 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환(neurodegenerative

disease), 알츠하이머병, 대사 질환(metabolic disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 20] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 항원 결합 도메인으로 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR).
- [청구항 21] 제 20항의 키메라 항원 수용체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 22] 제 21항의 재조합 벡터로 형질전환된 키메라 항원 수용체 발현 세포.
- [청구항 23] 제 22항에 있어서, 키메라 항원 수용체 발현 세포는 키메라 항원 수용체 발현 T(CAR-T) 세포 또는 자연살해(CAR-NK) 세포인, 키메라 항원 수용체 발현 세포.
- [청구항 24] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 T 세포 관여자(T-cell engager).
- [청구항 25] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 20항의 키메라 항원 수용체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포 또는 제 24항의 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 26] 제 25항에 있어서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 삼중음성유방암(Triple Negative Breast Cancer, TNBC), 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 27] 제 25항에 있어서, 암은 면역관문 억제제에 대해 불응성 암인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 28] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 20항의 키메라 항원 수용체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 제 24항의 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

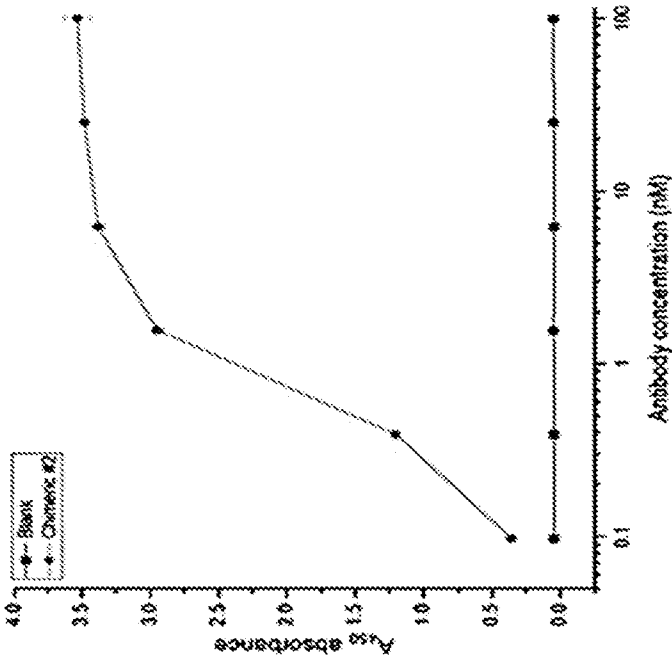
- [청구항 29] 제 28항에 있어서, 면역항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되는 항암 보조제.
- [청구항 30] 제 28항에 있어서, 면역항암제에 대한 불응성을 개선시키는 항암 보조제.
- [청구항 31] 제 28항에 있어서, 면역항암제는 면역관문 억제제(Immune checkpoint inhibitors), 면역억제인자 제어 약물, 암 백신, 면역아주번트 (immunoadjuvant), 암 치료용 면역세포, 면역세포 활성화 보조인자, 암 치료용 항체 또는 암 치료용 면역세포의 활성화 유지에 필요한 사이토카인인, 항암 보조제.
- [청구항 32] 제 31항에 있어서, 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR, TIGIT, CD47, VISTA 또는 A2aR의 억제제인, 항암 보조제.
- [청구항 33] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 20항의 키메라 항원 수용체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 제 24항의 T 세포 관여자를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 34] 제 33항에 있어서, 표지를 추가로 포함하는, 암 진단용 조성물.
- [청구항 35] 제 34항에 있어서, 표지는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어 (chromopore), 발광물질, 형광물질, 프로브 또는 태그(tag)인, 암 진단용 조성물.
- [청구항 36] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 제 24항의 T 세포 관여자의 암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 37] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 제 24항의 T 세포 관여자를 약학적으로 유효한 양으로 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.
- [청구항 38] 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 제 8항의 항체-약물 접합체, 제 14항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 제 20항의 키메라 항원 수용체, 제 22항의 키메라 항원 수용체 발현 세포, 또는 제 24항의 T 세포 관여자의 암 진단 용도.

[도 1]



[도2]

m#2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
	QVTLKESGPCILQPSQTLSTCSFCSLSLSTSCMGVGTQPSCKGLEWLAHIWDDVKAINPALKSLTISKDTSSQVFLKIASVDNADIATYFCARTSPFAGVYWGQTTITVSS										
m#2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLONSNGHTCLNWLQKPGQSPOLLIVRSNRFSGVLDKRFSGSGSDDTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPFTFGSGTKLEIKR										



[도3]

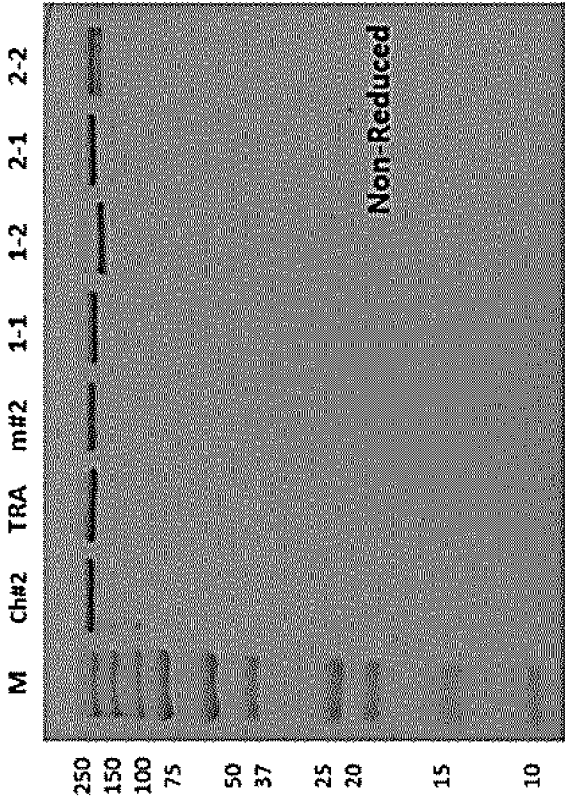
[종래]		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
m#2		QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVGNIRQPSGKGLEWLAHIWDDVGRVNPALKSRLLTISKDTSSQVFLKIASVDADTATYFCARTSPAGVDYWGQGTTLTVSS										
IGHV2-5*09		QVTLKESGPTLVKPTQTTLTCTFS-----NTRQPPGKALEWLA-----RLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYC-----WGQGTTLTVSS										
IGHV4-38-2*02		QVQLQESGPGILVKPSETLSLCTVS-----NIRQPPGKLEWIG-----RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC-----WGQGTTLTVSS										
TRA #2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS-----WVRQAPGKLEWVA-----RFTISADTSKNTAVYIQMNSLRADDTAVYYC-----WGQGTTLTVSS										

[경쟁]		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
m#2		DAVMTQPLSLPVSIGDQASISCRSSQSLQNSNGTCLNHWYLQKPGQSPOLLIVRVSNRFSGVLDKRFSGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYFCLQVTHVPFTFGSGTKLEIKR										
IGHV2-30*02		DVVMTQSPFLSLPVTIGQPASISC-----WFQRPQSPRLIY-----GVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGYYC-----FGQGTKLEIKR										
IGHV2-29*02		DIVMTQPLSLSVTPQPASISC-----WYLQKPGQSPOLLIV-----GVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGYYC-----FGQGTKLEIKR										
TRA #2		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC-----WYQQKPGKAPKLLIY-----GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC-----FGQGTKVEIKR										

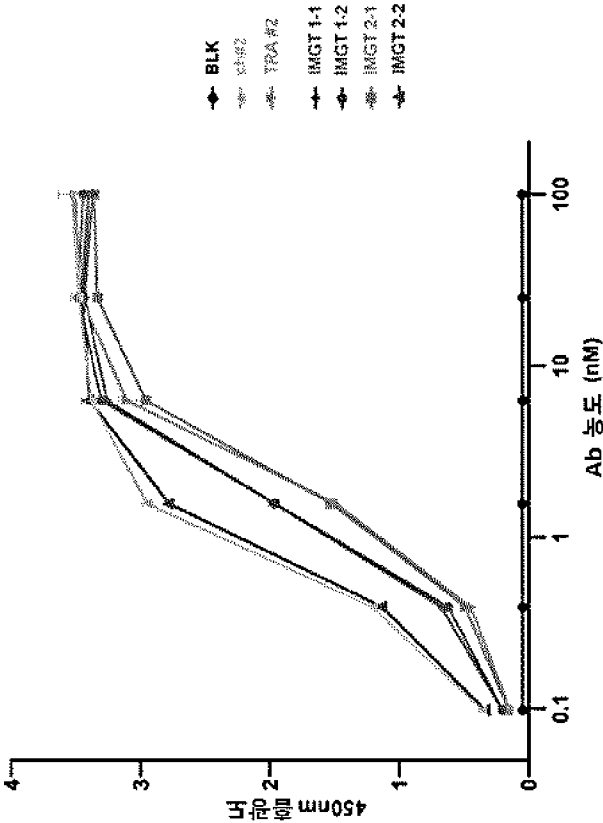
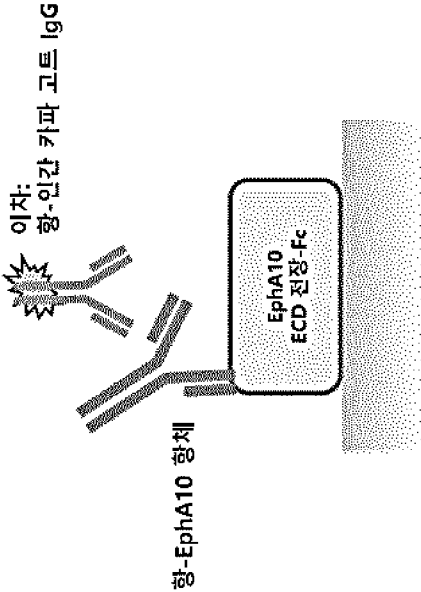
	1-1	1-2	2-1	2-2	TRA #2
VH	IGHV2-5*09 1	IGHV2-5*09 1	IGHV4-38-2*02 2	IGHV4-38-2*02 2	TRA #2 HC
Vk	IGHV2-30*02 1	IGHV2-29*02 2	IGHV2-30*02 1	IGHV2-29*02 2	TRA #2 LC

[도4]

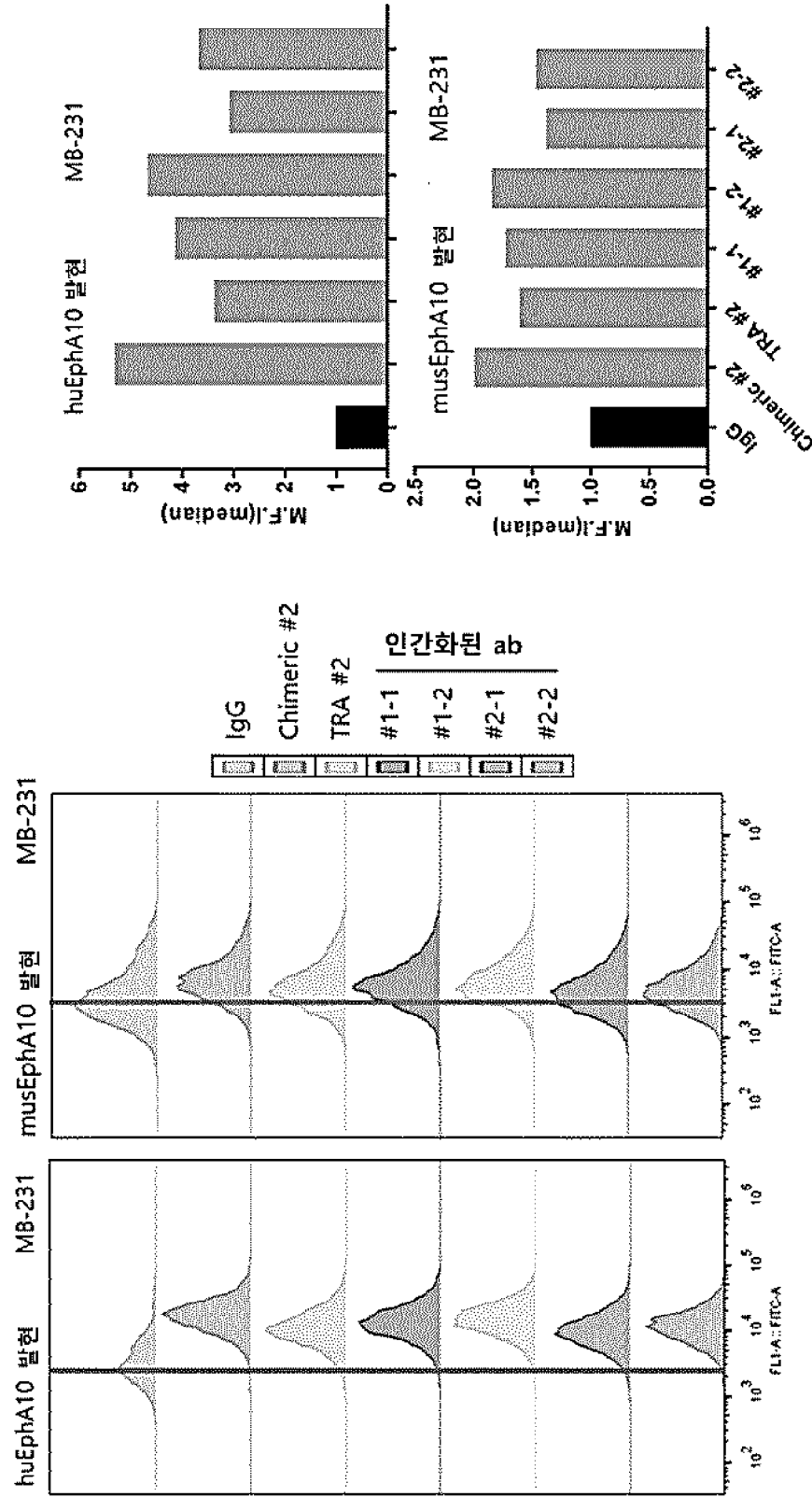
100 mL 배양	Chimeric #2	TRA #2	Mouse #2	1-1	1-2	2-1	2-2
Protein A							
농도 (mg/ml)	1.25	2.09	0.58	2.46	3.09	1.39	2.42
수율 (ug)	712	1254	302	1402	1699	709	1161



[도5]

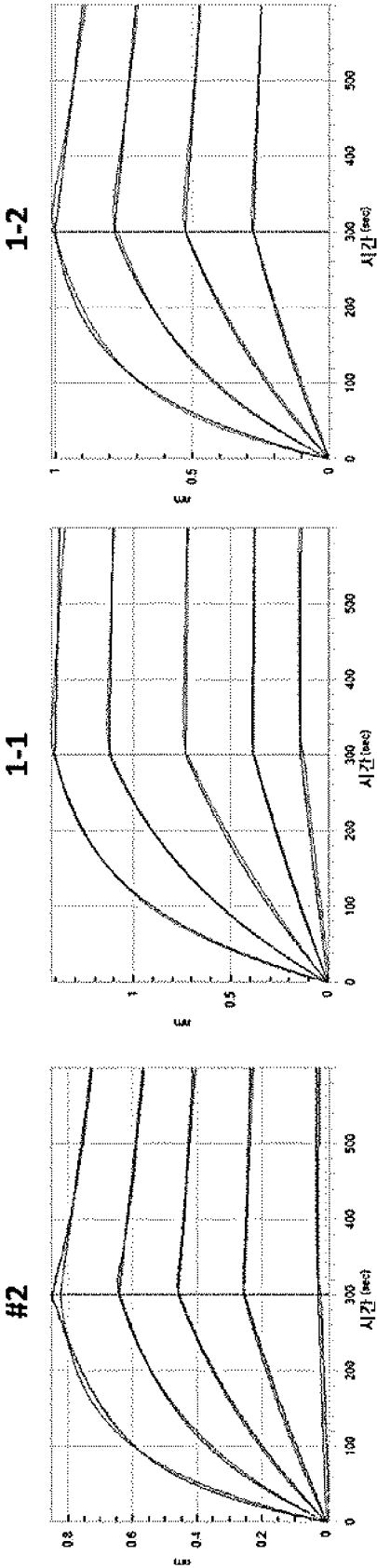


[도6]



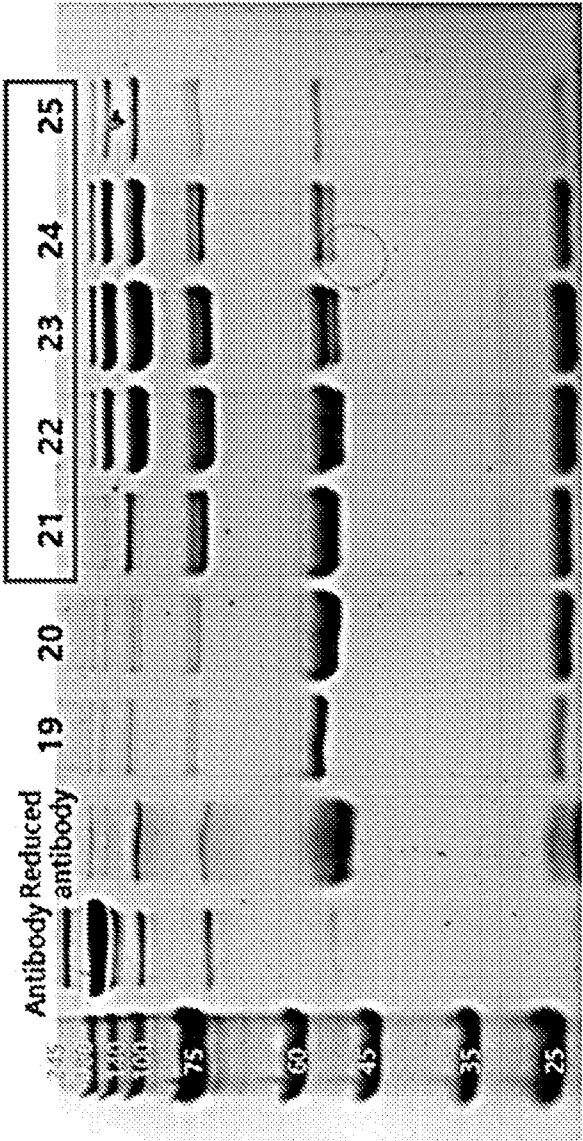
[도7]

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
#2	1.20×10^4	4.10×10^{-4}	3.42×10^{-8}
1-1	9.21×10^3	5.63×10^{-5}	6.12×10^{-9}
1-2	1.04×10^4	3.56×10^{-4}	3.44×10^{-8}

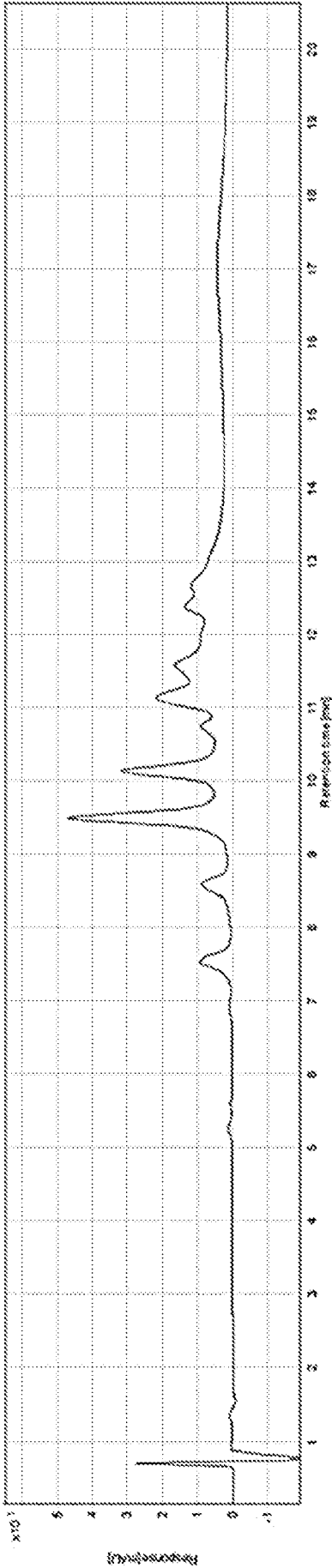


[도8]

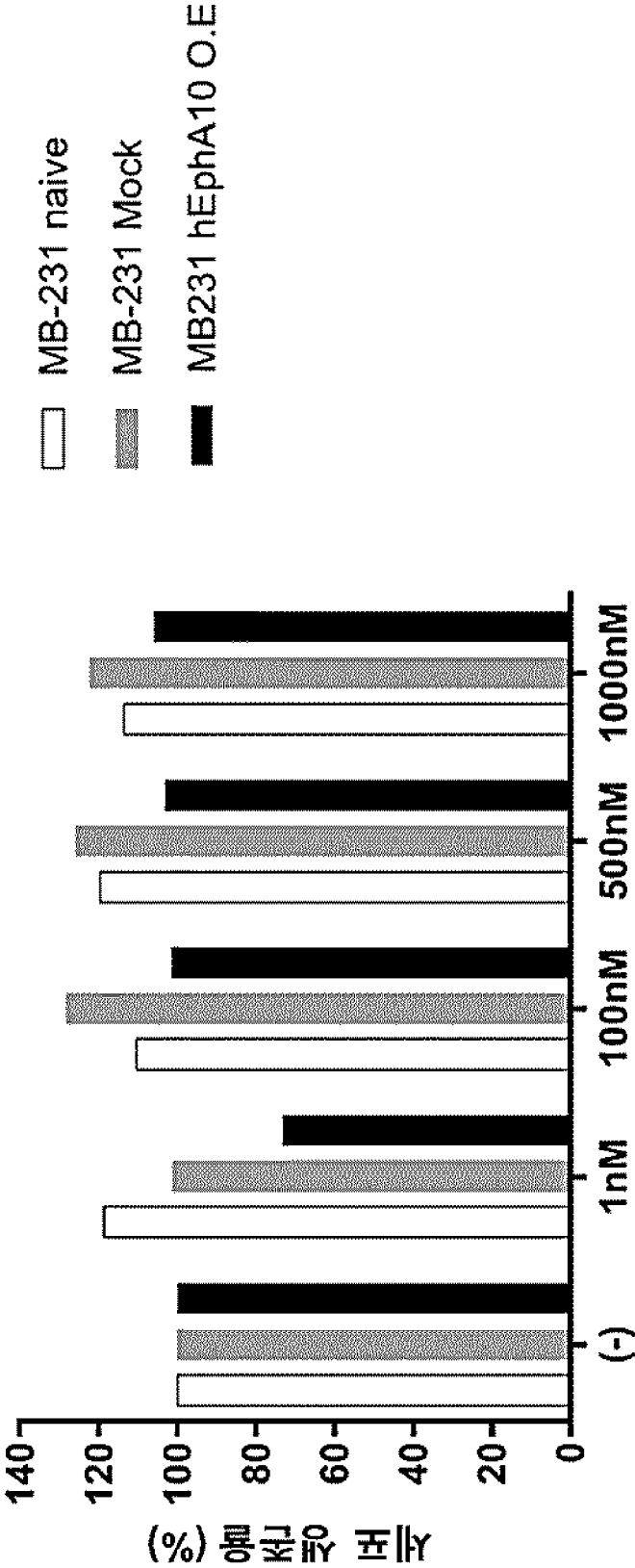
SDS-PAGE



Hydrophobic interaction chromatography



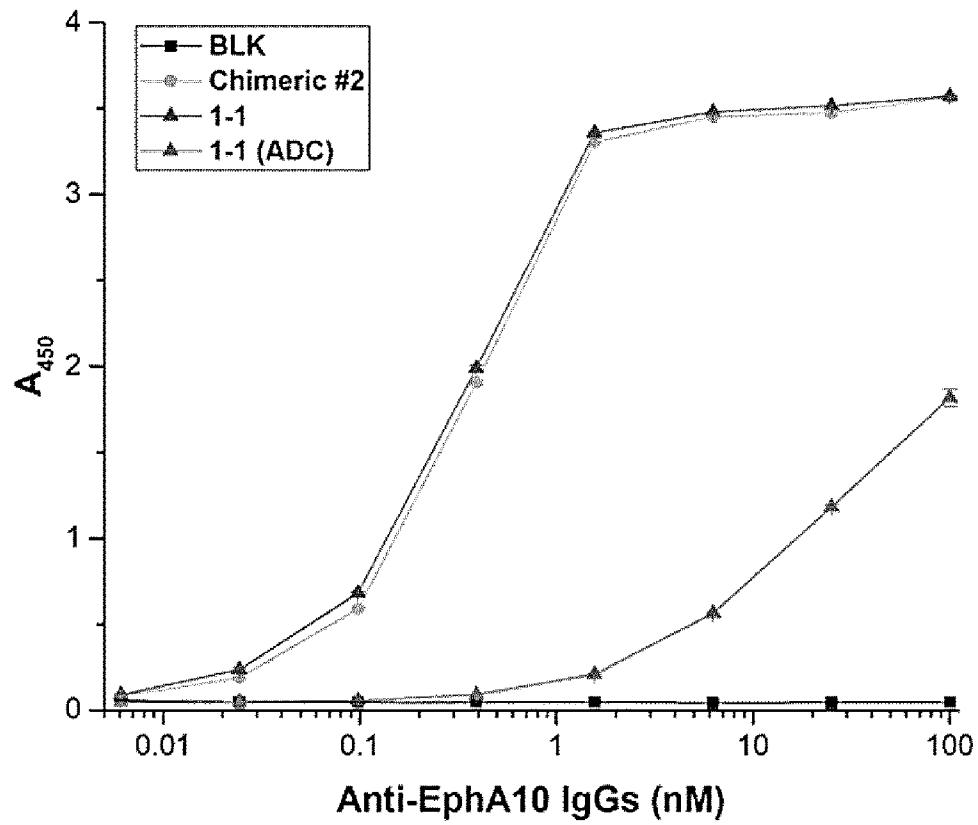
[도9]



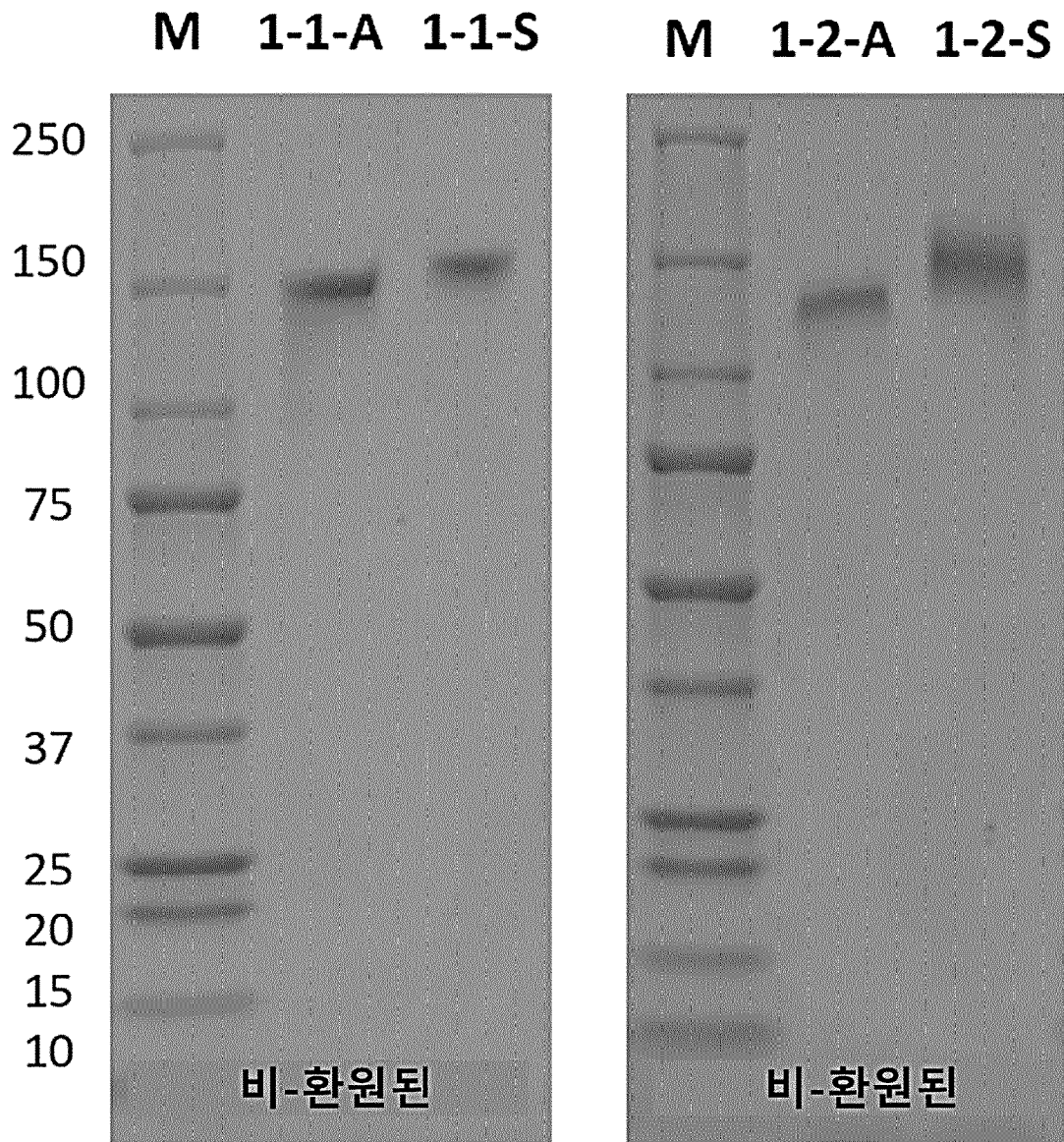
[도10]

[경사]		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
m#2		DAVMTQTPLSLPVS	LCDAQASISCRSSQSLQNS	GNCT	LNWYLOKPCQSPQLLIY	RVSNRFS	CVLDRFSSCS	CTDFTLIKISR	VEADLGUYF	CLQVTHV	PTFSGS	CTKLEIKR
IGKV2-30*02		DVVMTQSPLSL	PVTIGQPASISC		WFOQRPQSPRLIY		GVDRFSSGS	CTDFTLIKISR	VEADVGVIYC			FGQSTKLEIKR
IGKV2-29*02		DIVMTQTPLSL	SVTFQOPASISC		WYLOKPCQSPQLIY		GVDRFSSCS	CTDFTLIKISR	VEADVGVIYC			FGQSTKLEIKR
TRA #2		DIQMTQSPSSL	SASVGDRTITC		WYQOKPGKAPKLIY		GVDRFSSRS	CTDFTLIKISR	VEADVGVIYC			FGQSTKVEIKR

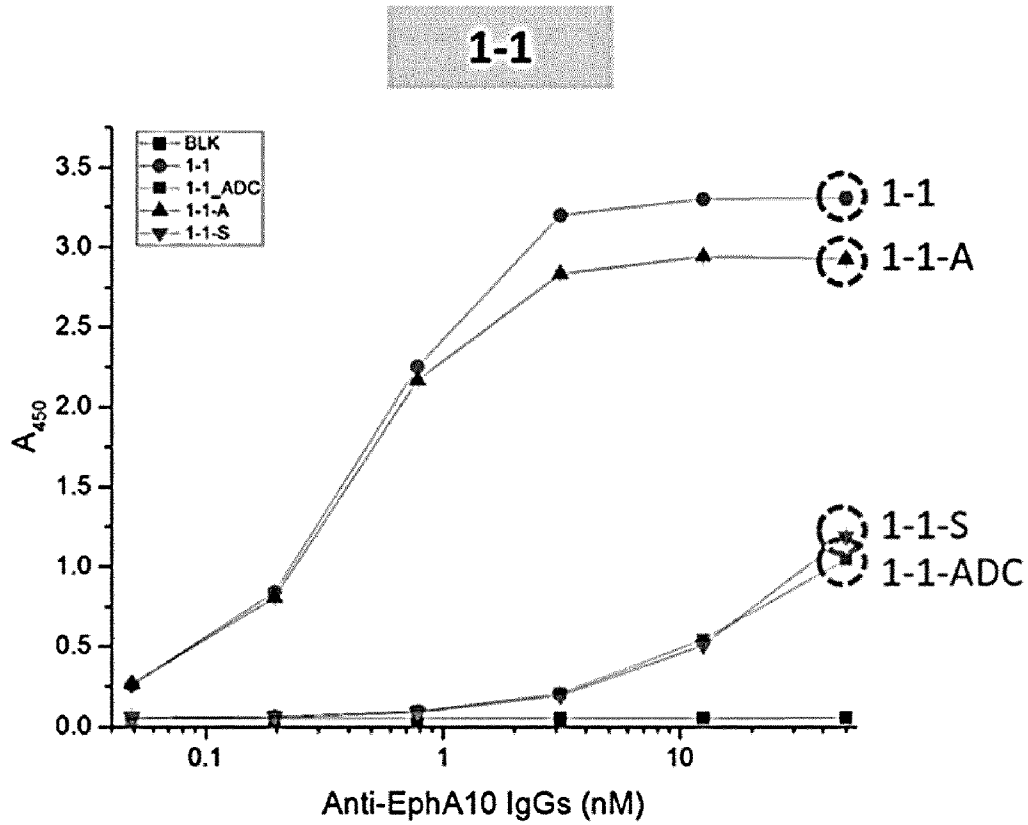
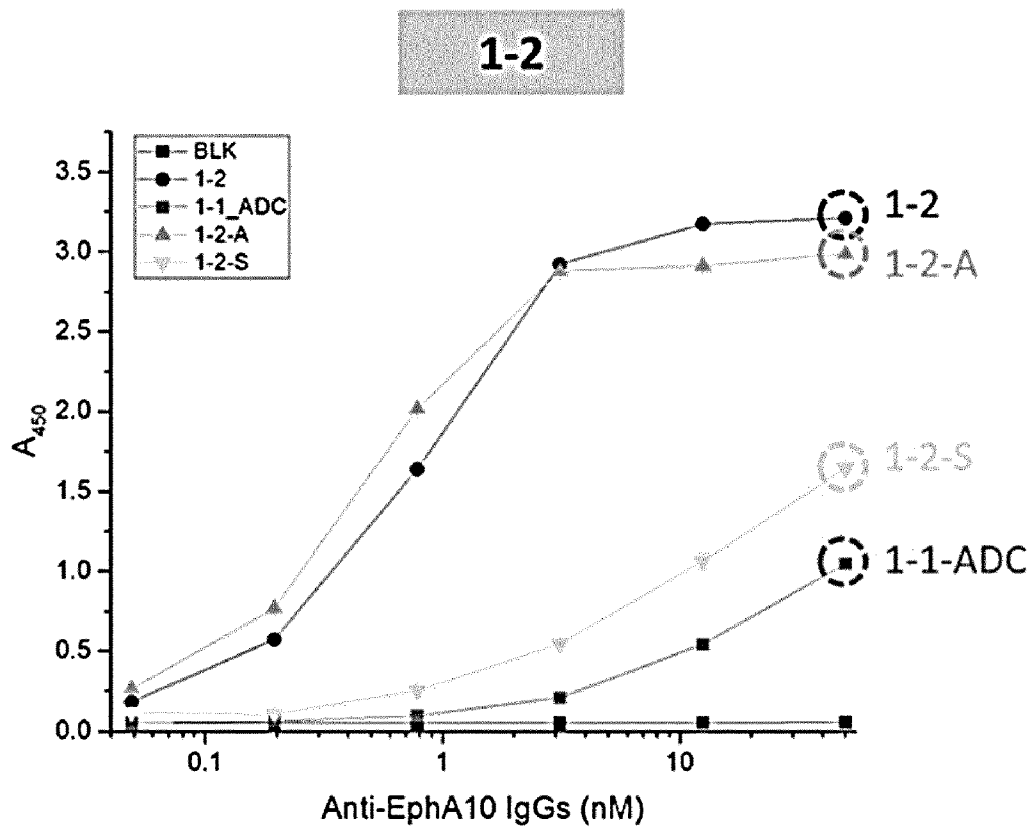
[도11]



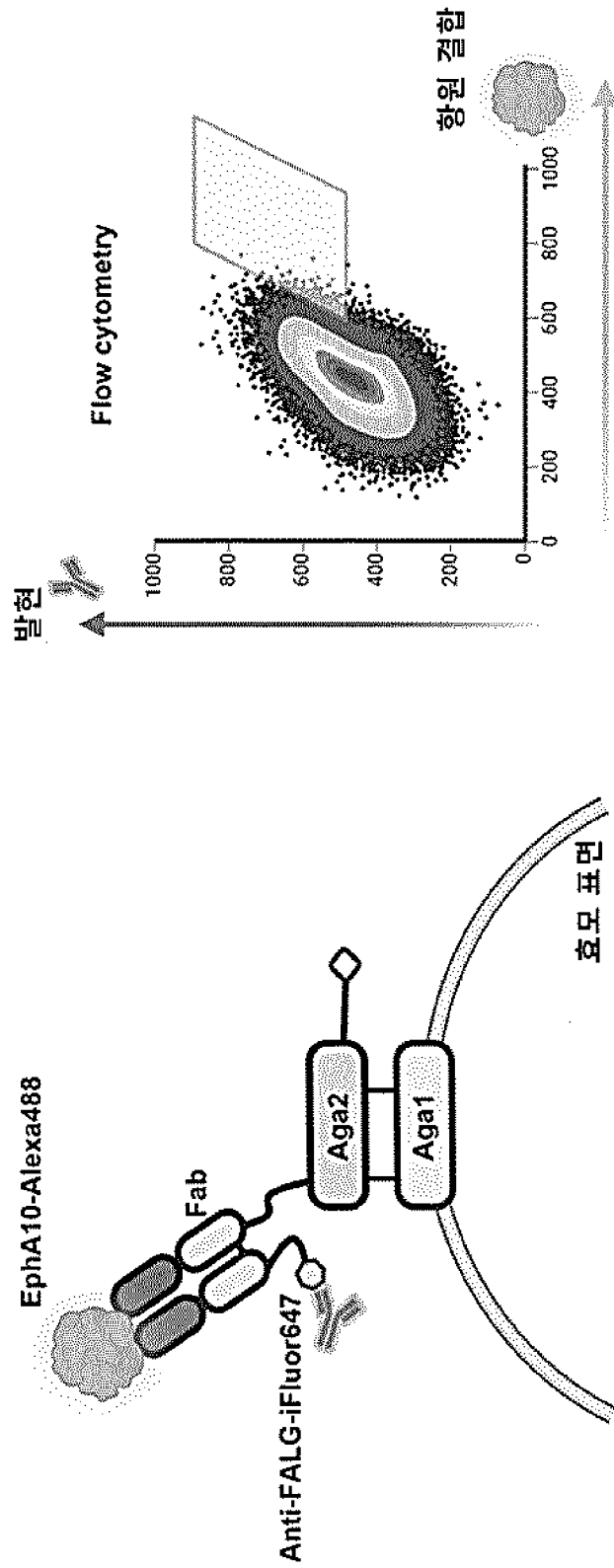
[도12]



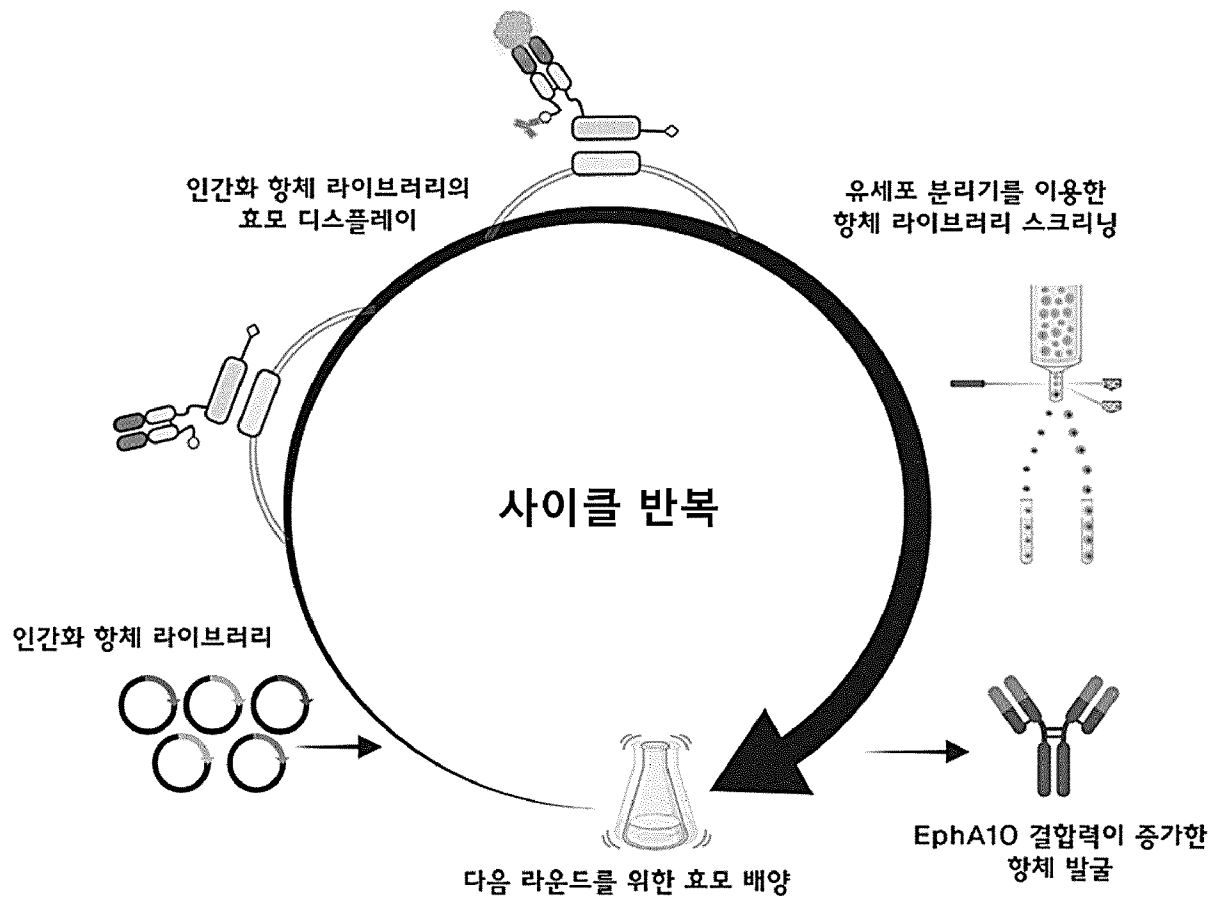
[도13]



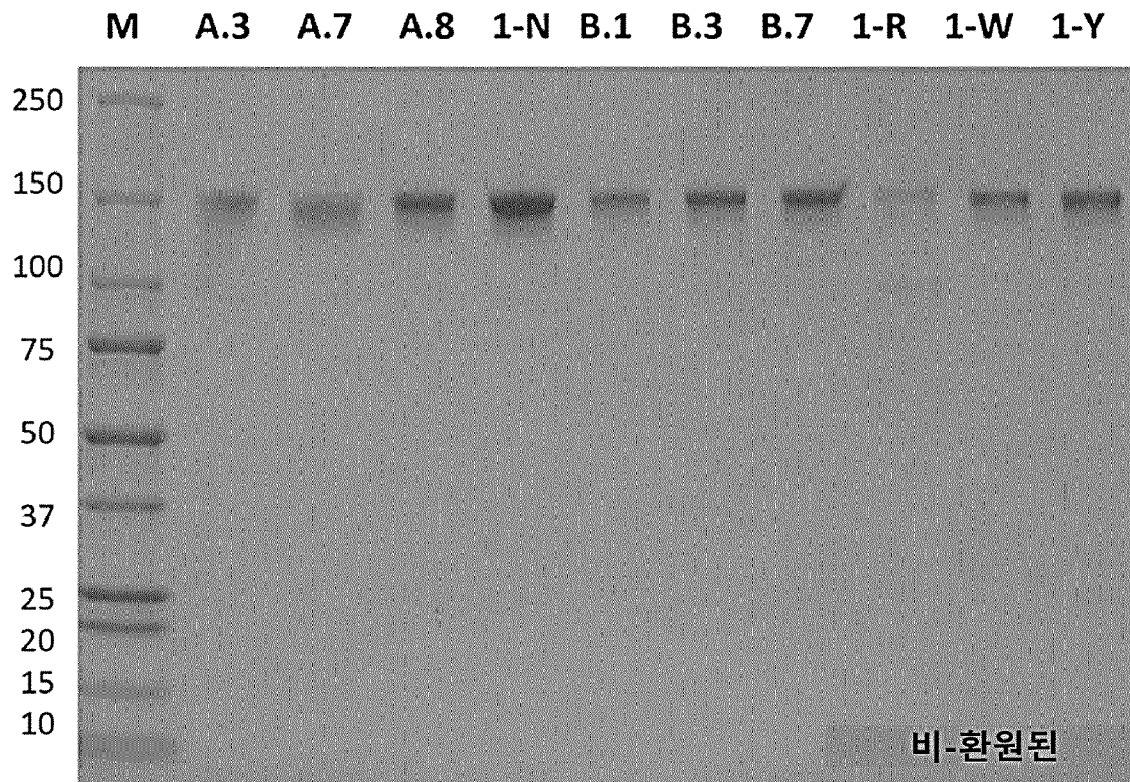
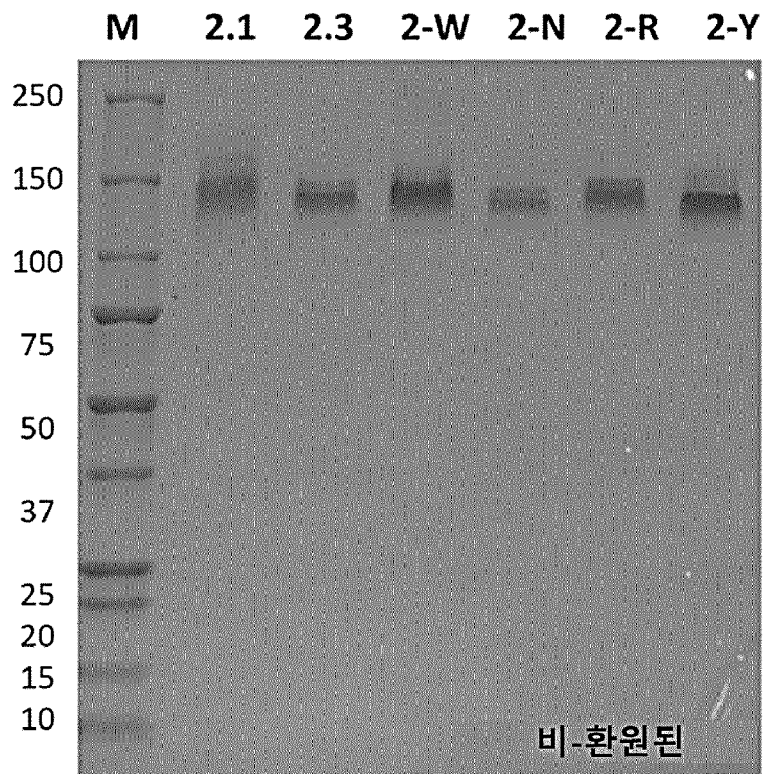
[도14]



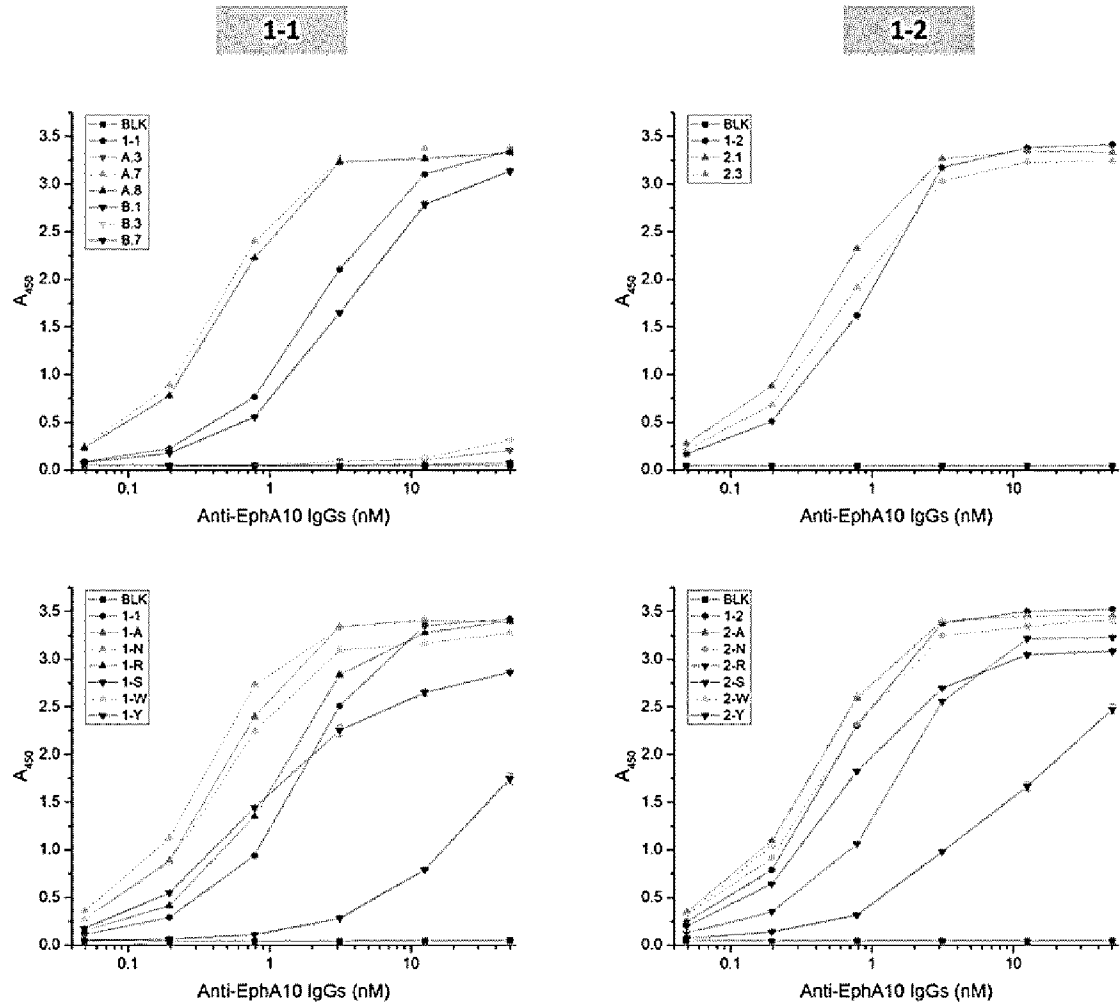
[도15]



[도17]



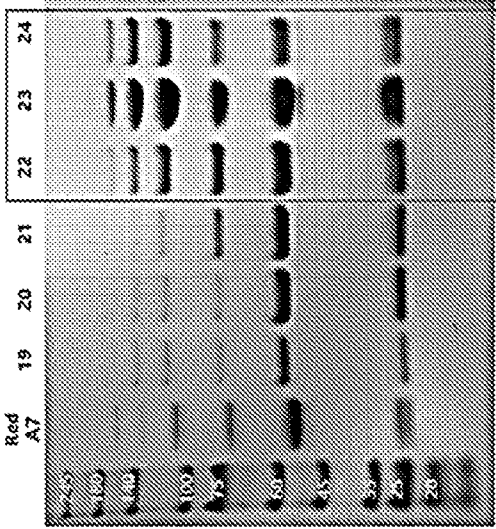
[도18]



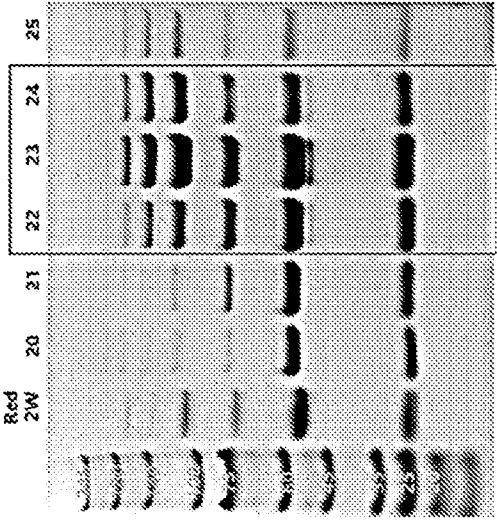
[도19]

SDS-PAGE

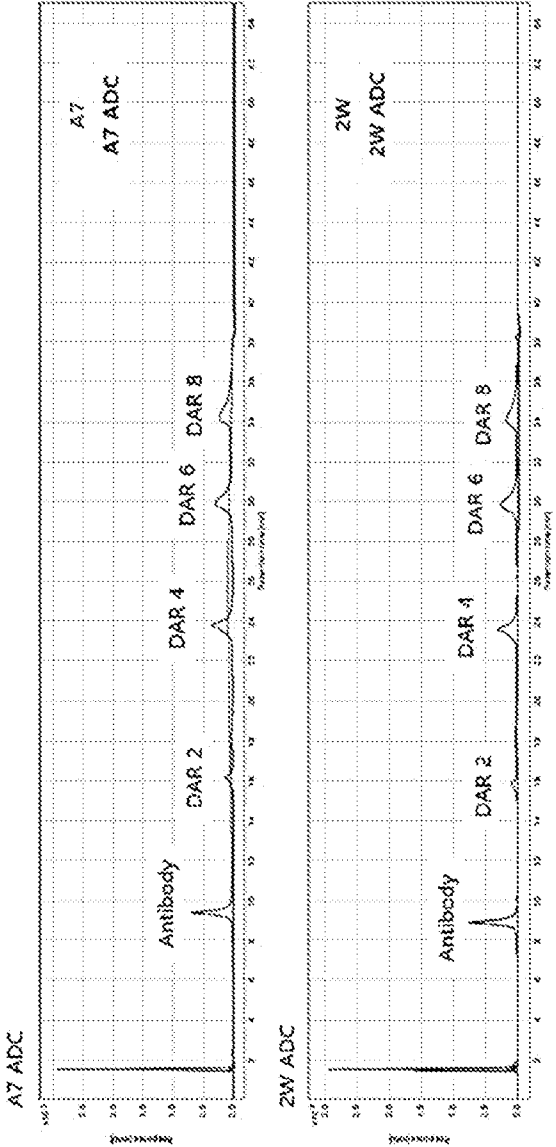
A7 ADC



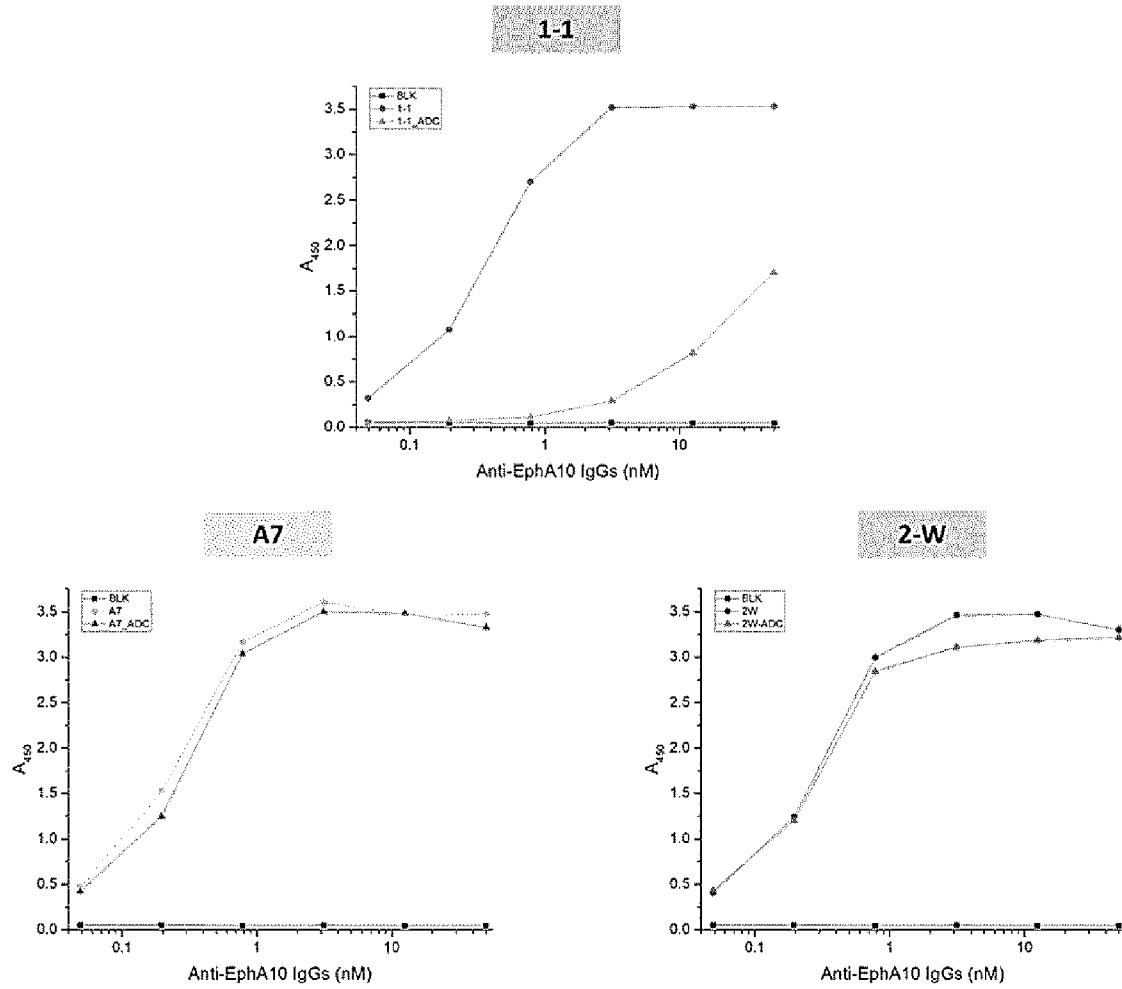
2W ADC



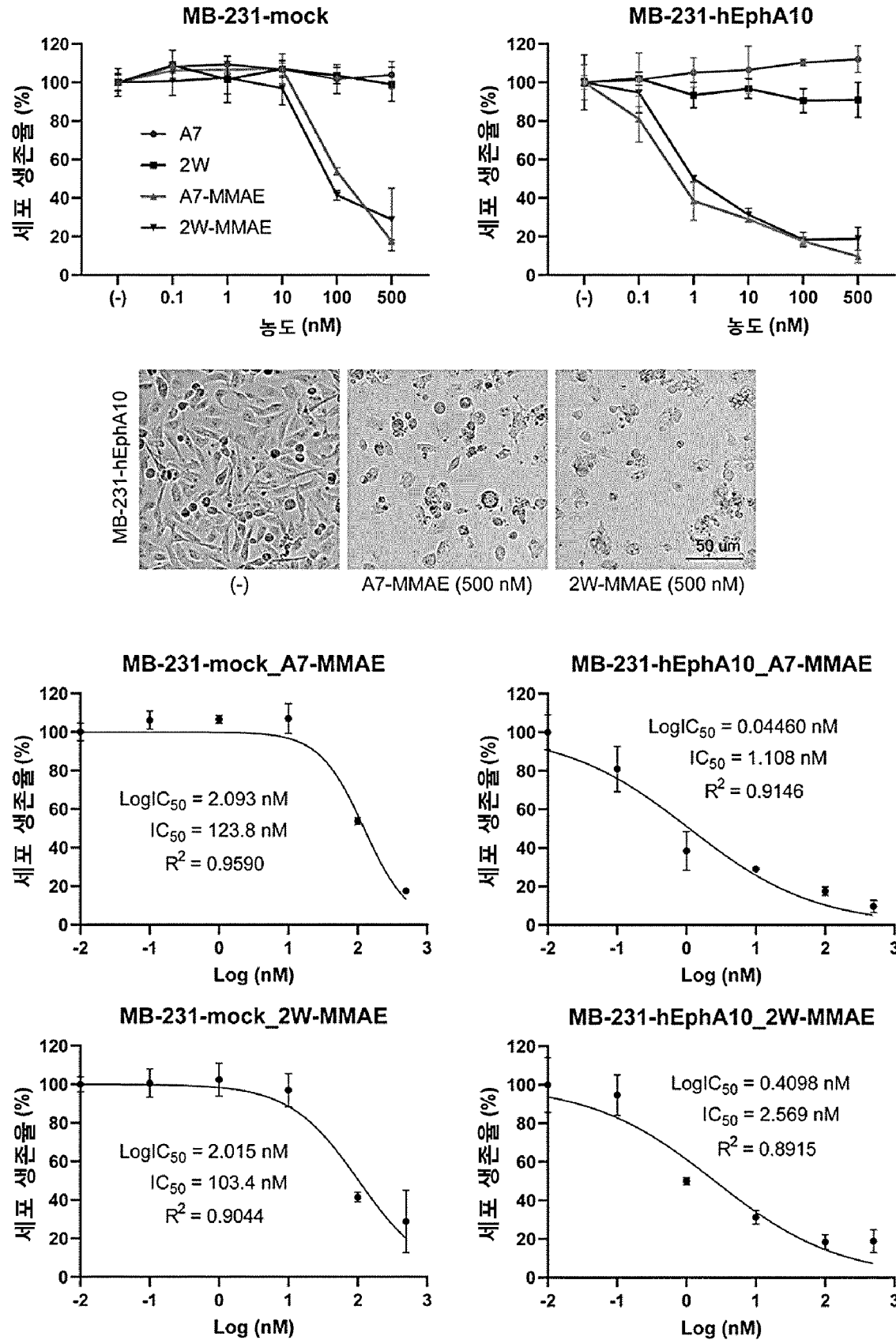
Hydrophobic interaction chromatography



[도20]

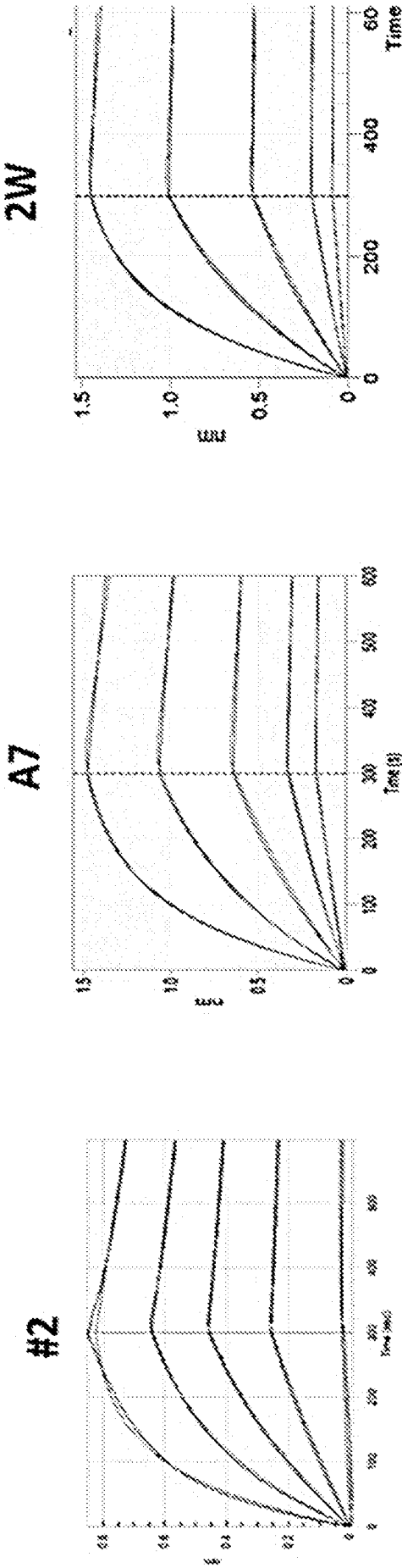


[도21]

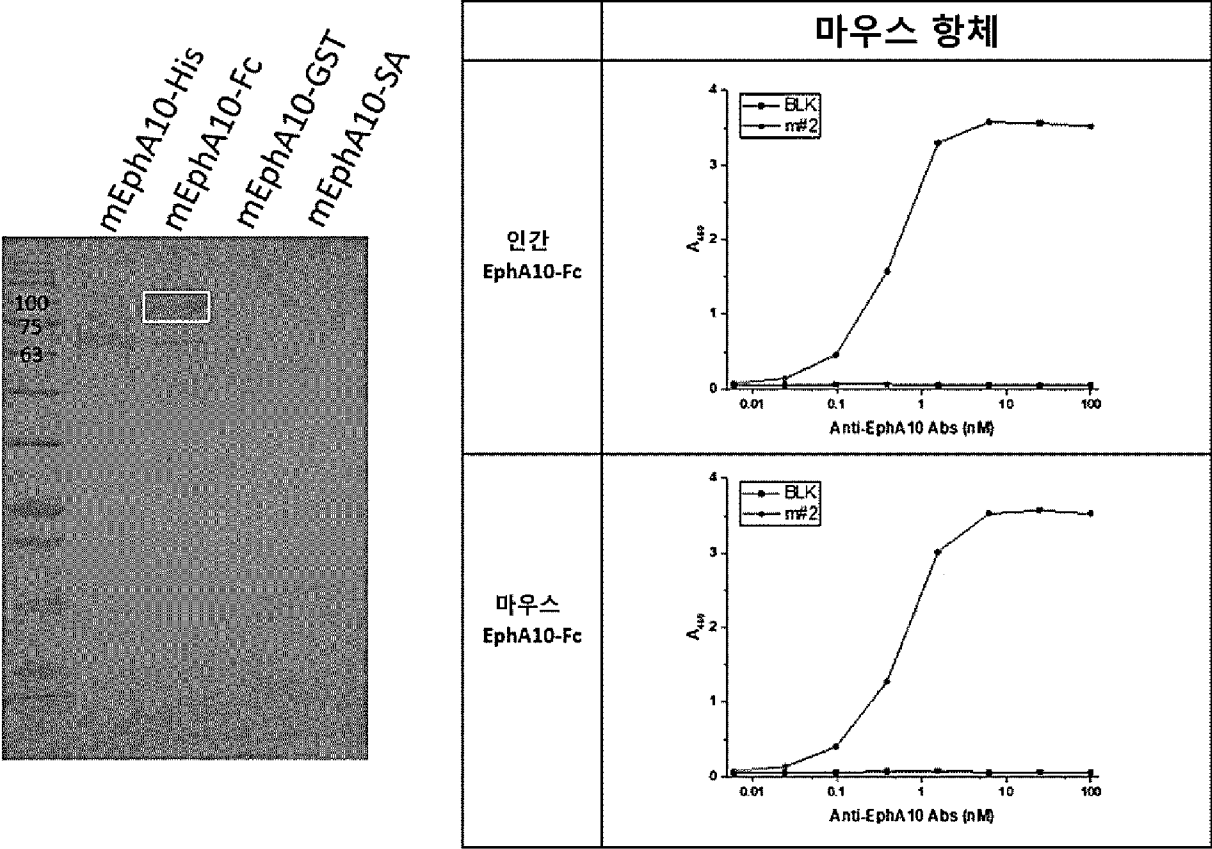


[도22]

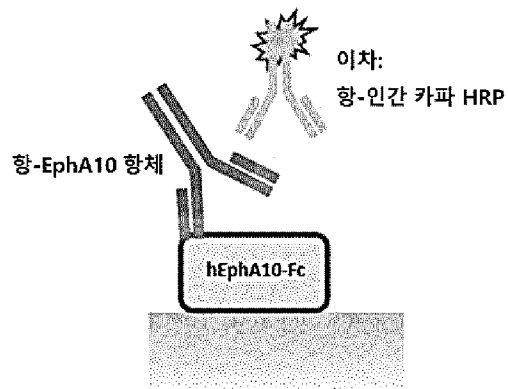
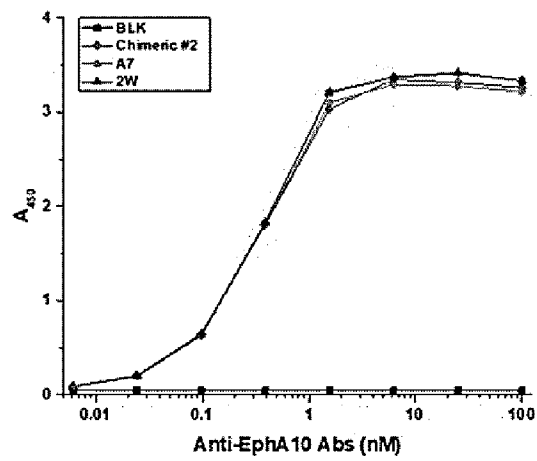
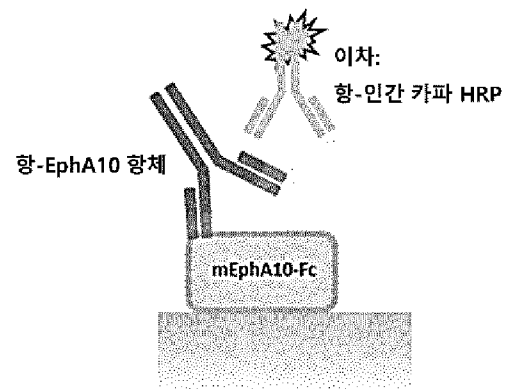
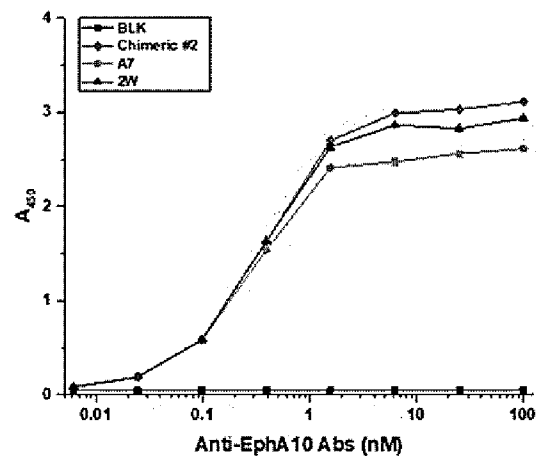
	k_s (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rank
Chimeric #2	1.20×10^4	4.10×10^{-4}	3.42×10^{-8}	3
A7	1.00×10^4	2.49×10^{-4}	2.49×10^{-8}	2
2W	8.90×10^3	8.65×10^{-5}	9.72×10^{-9}	1



[도23]



[도24]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; **A61K 47/68**(2017.01)i; **C07K 14/725**(2006.01)i; **C12N 5/0783**(2010.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **G01N 33/574**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: EphA10, 항체(antibody), 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor), 암(cancer), 치료(treatment)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2022-0389106 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 08 December 2022 (2022-12-08) See paragraphs [0020]-[0021], [0083], [0090]-[0091], [0104], [0108]-[0109], [0120], [0122], [0124], [0251], [0256]-[0257], [0268] and [0278]; example 2; and claims 20-21, 27-29, 32-33, 37, 54, 56-57, 59-60 and 92.	1,6-36,38
A		2-5
X	US 2012-0231004 A1 (ROHLFF, Christian et al.) 13 September 2012 (2012-09-13) See paragraphs [0029], [0162]-[0164], [0175], [0209], [0213]-[0215], [0297]-[0299], [0337], [0358] and [0365]; and claims 1-2, 18-20 and 22.	1,6-19,25-36,38
X	CHA, Jong-Ho et al. Ephrin receptor A10 monoclonal antibodies and the derived chimeric antigen receptor T cells exert an antitumor response in mouse models of triple-negative breast cancer. Journal of Biological Chemistry. 10 March 2022, vol. 298, no. 4, article no. 101817, pp. 1-16. See abstract; pages 1-3, 5, 8 and 10-11; and figure 2.	1,6-13,18-23,25-32,36



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2024

Date of mailing of the international search report

01 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003367

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2021-0123692 A (UIF (UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION), YONSEI UNIVERSITY et al.) 14 October 2021 (2021-10-14) See abstract; paragraph [0056]; and claims 1 and 4-9.	1,6-7,18-19,25-36,38
X	NAGANO, Kazuya et al. Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers. Journal of Controlled Release. 16 June 2014 (online publication date), vol. 189, pp. 72-79. See abstract; and pages 73-74 and 77-78.	1,6-7,18-19,25-32,36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003367

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003367

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **37**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 37 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/003367

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2022-0389106	A1	08 December 2022	WO	2021-056025	A2	25 March 2021
US	2012-0231004	A1	13 September 2012	EP	2470569	A1	04 July 2012
				WO	2011-047083	A1	21 April 2011
KR	10-2021-0123692	A	14 October 2021	WO	2021-201657	A1	07 October 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: EphA10, 항체(antibody), 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor), 암(cancer), 치료(treatment)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2022-0389106 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2022.12.08 단락 [0020]-[0021], [0083], [0090]-[0091], [0104], [0108]-[0109], [0120], [0122], [0124], [0251], [0256]-[0257], [0268], [0278]; 실시예 2; 청구항 20-21, 27-29, 32-33, 37, 54, 56-57, 59-60, 92 참조.	1,6-36,38
A		2-5
X	US 2012-0231004 A1 (ROHLFF, CHRISTIAN 등) 2012.09.13 단락 [0029], [0162]-[0164], [0175], [0209], [0213]-[0215], [0297]-[0299], [0337], [0358], [0365]; 청구항 1-2, 18-20, 22 참조.	1,6-19,25-36,38
X	CHA, JONG-HO 등, 'Ephrin receptor A10 monoclonal antibodies and the derived chimeric antigen receptor T cells exert an antitumor response in mouse models of triple-negative breast cancer', Journal of Biological Chemistry, 2022.03.10, 298권, 4호, article no. 101817, 페이지 1-16 요약; 페이지 1-3, 5, 8, 10-11; 도면 2 참조.	1,6-13,18-23,25-32,36
X	KR 10-2021-0123692 A (연세대학교 산학협력단 등) 2021.10.14 요약; 단락 [0056]; 청구항 1, 4-9 참조.	1,6-7,18-19,25-36,38

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을
정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일
이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의
공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여
인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과
상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기
위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의
신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른
문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우
청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년06월26일(26.06.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년07월01일(01.07.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NAGANO, KAZUYA 등, 'Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers', Journal of Controlled Release, 2014.06.16(온라인 공개일), 189권, 페이지 72-79 요약: 페이지 73-74, 77-78 참조.	1,6-7,18-19,25-32,36

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- ☒ 청구항: **37**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 37은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
- ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2022-0389106 A1	2022/12/08	WO 2021-056025 A2	2021/03/25
US 2012-0231004 A1	2012/09/13	EP 2470569 A1	2012/07/04
		WO 2011-047083 A1	2011/04/21
KR 10-2021-0123692 A	2021/10/14	WO 2021-201657 A1	2021/10/07