



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0017209  
(43) 공개일자 2025년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61K 47/68037 (2023.08)  
(21) 출원번호 10-2024-7037990  
(22) 출원일자(국제) 2023년05월24일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2024년11월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/063912  
(87) 국제공개번호 WO 2023/227660  
국제공개일자 2023년11월30일  
(30) 우선권주장  
63/345,453 2022년05월25일 미국(US)

(71) 출원인  
이나뜨 파르마 에스.에이.  
프랑스 에프-13009 마르세유 아베뉴 드 루미니 117  
(72) 발명자  
크라임 마넬  
프랑스 13011 마르세유 볼르바르 드 라 프띠뜨 랑뜨 빌라 7에이  
상피 스테빠니  
프랑스 13009 마르세유 아브뉴 장 드 라뜨르 드 따시니 430 레지딩스 발몽 르동 바띠명 레 로리에 르  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인코리아나

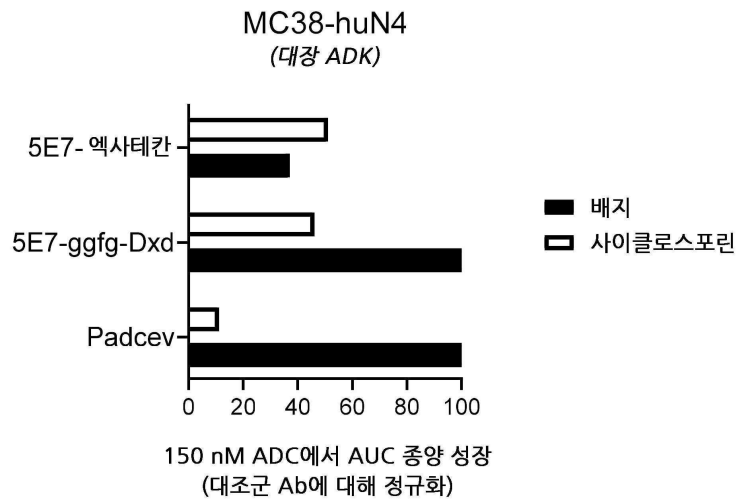
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **넥틴-4 결합체**

(57) 요약

본 발명은 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 항체 및 항체 단편에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항체-약물 접합체, 및 접합체를 제조하는 방법, 약학 조성물, 및 질환, 예를 들어 넥틴-4 발현 종양 세포를 특징으로 하는 암의 진단, 치료 또는 예방에서 그들을 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10b



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6849* (2017.08)  
*A61K 47/6851* (2017.08)  
*A61K 47/6889* (2017.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)  
*C07K 2317/567* (2013.01)  
*C07K 2317/77* (2013.01)  
*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**로시 벤자맹**

프랑스 13008 마르세유 아브뉴 다이파 70 레지딩스  
라 팔메레 바띠멍 씨

**고띠에 로랑**

프랑스 13008 마르세유 슈맹 뒤 랑시에 30 레지딩  
스 라 사레뜨 바띠멍 8

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편으로서, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 47, 49, 51, 37, 39, 41, 43, 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 SEQ ID NO: 65, 63, 61, 59로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 21, 22 및 23으로 표시되는 각각의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, CDR2, CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 SEQ ID NO: 24, 25, 26으로 표시되는 각각의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR1, CDR2, CDR3을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 인간 유전자 IGKHV-46\*01로부터의 프레임워크 FR1, FR2 및 FR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 인간 유전자 IGKV-28\*01로부터의 프레임워크 FR1, FR2 및 FR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 인간 유전자 IGHJ4\*01의 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 FR4를 더 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 인간 유전자 IGKJ4\*01의 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 FR4를 더 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 중쇄 위치 71의 아미노산은 류신이고, 카바트 중쇄 위치 78의 아미노산은 트레오닌인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 중쇄 위치 73의 아미노산은 리신인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 중쇄 위치 28의 아미노산은 이소류신인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 8

제2항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 중쇄 위치 38의 아미노산은 리신인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 9

제2항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 중쇄 위치 40의 아미노산은 아르기닌인 항체 또는 항체 단편.

#### 청구항 10

제2항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카바트 경쇄 위치 2의 아미노산은 발린이고, 카바트 경쇄 위치 64의 아미노산은 세린인 항체 또는 항체 단편.

**청구항 11**

제2항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카뱃 경쇄 위치 11의 아미노산은 아스파라긴인 항체 또는 항체 단편.

**청구항 12**

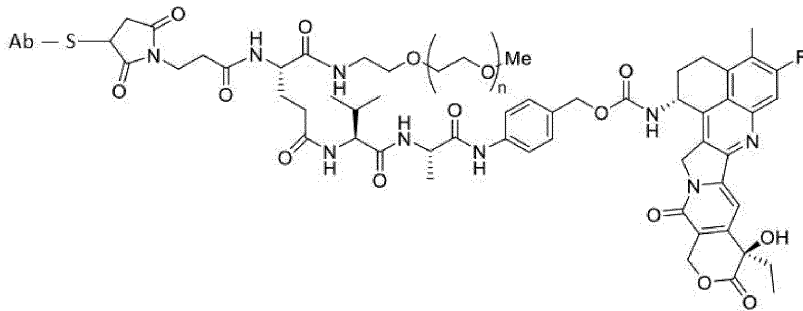
제2항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 카뱃 경쇄 위치 8의 아미노산은 알라닌인 항체 또는 항체 단편.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 링커-페이로드 모이어티 (X-Z)에 접합되고, 항체-링커-페이로드는 하기 구조를 갖는 것인 항체 또는 항체 단편:



(상기 식에서, n은 15임).

**청구항 15**

하기 식 (I)로 표시되는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체:



(상기 식에서,

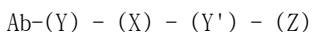
Ab는 제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항체 또는 항체 단편이고,

X는 Ab 및 Z를 연결하는 분자로서, X는 예를 들어, 생리학적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능한 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;

Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체, 임의로 5-고리 캄프토테신 유사체, 임의로 6-고리 캄프토테신 유사체, 임의로 엑사테칸, SN-38 또는 Dxd를 포함함).

**청구항 16**

제15항에 있어서, 면역접합체는 하기 식으로 표시되는 것인 면역접합체:



(상기 식에서,

Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드의 VC1 가교 도메인에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드, 항체이고;

Y는 임의로 부재하거나 또는 스페이서, 임의로 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, 임의로 하나 이상의 원자는 탄소 이외의 것, 예를 들어 산소, 황, 질소, 또는 다른 원자일 수 있고, 임의로 사슬의 임의

탄소는 알콕시, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 알킬-S-, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드, 또는 알킬 아마이드로 치환되고, Y는 2-100개 원자의 사슬 길이를 갖고, 임의로 또한 Y는 항체의 아미노산의 측쇄와 반응성기의 반응의 잔기를 포함하고;

X는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커이거나 또는 그를 포함하고;

Y'은 임의로 부재하거나 또는 임의로 자기-제거성 스페이서 또는 비-자기-제거성 스페이서를 포함한 스페이서이고;

Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체, 임의로 5-고리 캄프토테신 유사체, 임의로 6-고리 캄프토테신 유사체, 임의로 엑사테칸, SN-38 또는 Dxd를 포함함).

**청구항 17**

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 프로테아제 절단가능한 펩티드 또는 펩티딜 링커는 발린-알라닌을 포함하는 것인 면역접합체.

**청구항 18**

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 프로테아제 절단가능한 펩티드 또는 펩티딜 링커는 페닐알라닌-리신 또는 발린-시트룰린을 포함하는 것인 면역접합체.

**청구항 19**

제15항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 스페이서 (Y)는 직교성 연결기 모이어티 및 직교성 연결기 모이어티에 결합된 안정성-증강 모이어티를 포함하고, 임의로 안정성-증강 모이어티는 PEG 또는 PSAR 동중중합체인 면역접합체.

**청구항 20**

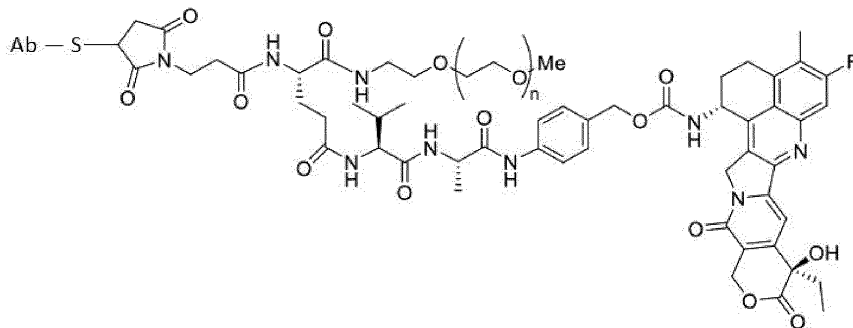
제19항에 있어서, PEG 또는 PSAR 동중중합체는 16개 이하의 PEG 또는 PSAR 단위, 임의로 8개와 16개 사이의 PEG 또는 PSAR 단위를 포함하는 것인 면역접합체.

**청구항 21**

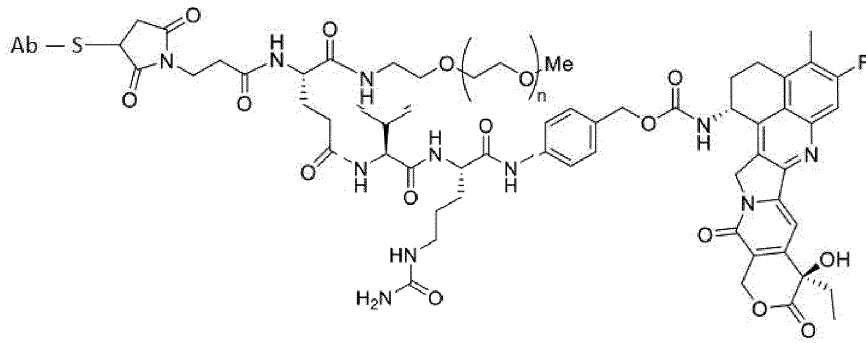
제18항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 직교성 연결기는 글루탐산으로부터 유래되는 것인 면역접합체.

**청구항 22**

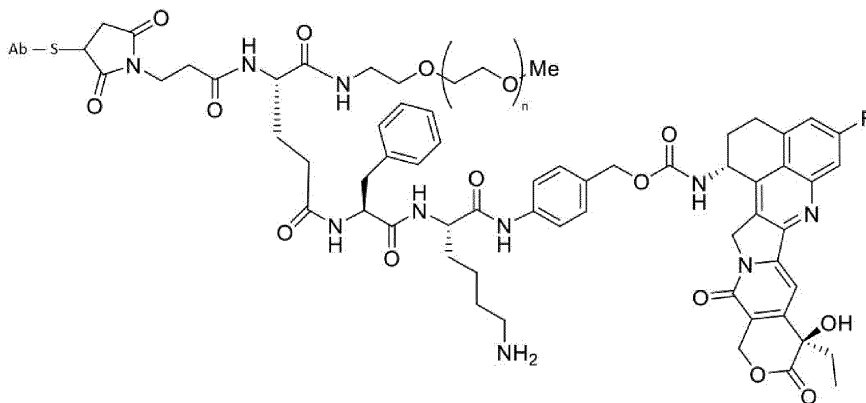
제15항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, 면역접합체는 하기 화학식 중 어느 하나로 표시되는 것인 면역접합체:



또는



또는



(상기 식에서, n은 5-23이고;

Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편임).

**청구항 23**

제15항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 면역접합체.

**청구항 24**

제15항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 면역접합체.

**청구항 25**

제15항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, n은 15이고, 면역접합체는 6과 8 사이의 DAR을 특징으로 하고, 임의로 DAR은 6이고, 임의로 DAR은 8인 면역접합체.

**청구항 26**

항체-약물-접합체 (ADC)를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 세포독성제 (Z)를 제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항-넥틴-4 항체에 접합시키는 단계로서, 링커 (X)가 항-넥틴-4 항체 (Ab) 및 세포독성제 (Z)를 연결하는 것인 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

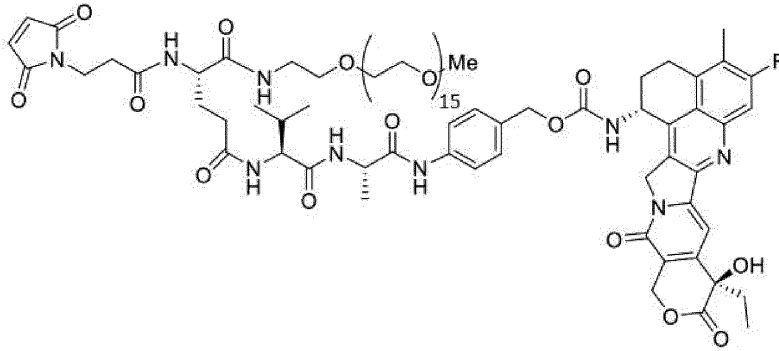
**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 방법은 제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항-넥틴-4 항체를 제공하는 단계, 항체 약물 접합체가 형성되기에 적합한 조건 하에서 상기 항-넥틴-4 항체를 세포독성제 (Z)와 접촉 및/또는 반

응시키는 단계, 및 항체 약물 접합체를 단리하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

**청구항 28**

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 방법은 제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항-넥틴-4 항체를 제공하는 단계, 상기 항-넥틴-4 항체를 하기 화학식을 갖는 링커 페이로드 모이어티 (X - Z)와 접촉 및/또는 반응시키는 단계를 포함하는 것인 제조 방법:



**청구항 29**

암의 치료, 종양 세포의 사멸 및/또는 종양으로 세포독성제의 전달을 필요로 하는 개체에서, 암을 치료하고/하거나, 종양 세포를 사멸시키고/시키거나 종양으로 세포독성제를 전달하는 방법으로서, 상기 개체에게 제14항 내지 제25항 중 어느 하나의 항에 따른 면역접합체, 또는 제26항 내지 제28항 중 어느 하나의 항의 방법에 따라 제조된 항체 약물 접합체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 개체는 임의로 면역화학으로 결정하여, 종양 세포 상에서 낮거나 또는 중간 정도의 넥틴-4 발현을 특징으로 하는 넥틴-4 발현 세포를 갖는 것인 방법.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 개체는 요로상피암, TNBC, 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 두경부 편평 세포 암종 또는 식도암을 갖는 것인 방법.

**청구항 32**

제29항 내지 제31항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 개체는 화학요법제, 임의로 P-당단백질 (Pgp)에 의해 수송되는 화학요법제, 백금제 또는 탁산을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있는 것인 방법.

**청구항 33**

제29항 내지 제32항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 개체는 아우리스타틴에 접합된 넥틴-4 결합체, 임의로 엔포투맵 베도틴을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있는 것인 방법.

**청구항 34**

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항체, 제14항 내지 제25항 중 어느 하나의 항에 따른 면역접합체, 또는 제26항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 따른 방법에 따라 제조된 항체 약물 접합체, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 35**

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 항체 또는 항체 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 핵산 또는 핵산 세트.

**청구항 36**

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항의 항체 또는 항체 단편을 생산하는 하이브리도마 또는 재조합 숙주 세포.

**청구항 37**

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항의 항체 또는 항체 단편을 제조하는 방법으로서, 제36항의 세포를 배양하는 단계, 및 항체 또는 항체 단편을 회수하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원에 대한 교차-참조
- [0002] 본 출원은 2022년 5월 25일 출원된 미국 가출원 제63/345,453호의 이득을 청구하고, 임의의 도면을 포함하여 이의 전문이 참조로 본 명세서에 편입된다.
- [0003] 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 97 KB 크기로 2023년 5월 22일에 생성된, 파일명 "Nectin-4-3 PCT"로서 제공된다. 전자 형식의 서열 목록 정보는 그 전문을 참조로 본 명세서에 편입된다.
- [0005] 본 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 항체 및 이의 단편에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 생산하는 세포, 이러한 화합물을 제조하는 방법, 접합체 및 접합체를 제조하는 방법, 이를 포함하는 약학 조성물, 질환, 예를 들어, 넥틴-4 발현 종양 세포를 특징으로 하는 암의 진단, 치료 또는 예방을 위한 이러한 화합물의 사용 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0007] 넥틴-4는 발달 및 성인 생활 동안 상피 세포, 내피 세포, 면역 세포, 및 뉴런 세포에 대한 극성, 증식, 분화 및 이동과 같은 다양한 생물학적 과정에서 핵심 역할을 하는 넥틴 단백질 패밀리의 표면 분자이다. 넥틴-4는 2001년 Lopez 그룹에 의해서 인간 기관에서 처음 클로닝되었다 (참조: Reymond et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(46):43205-15). 넥틴은 소아마비, 단순포진 및 홍역 바이러스에 대한 주요 수용체이고, 또한 인간에서 몇몇 병리학적 과정에 관여된다. 넥틴-4는 몇몇 종양에서 유의하게 높은 수준으로 발현되고, 삼중 음성 유방암 (TNBC) (참조: M-Rabet et al. Ann Oncol. 2017 Apr 1;28(4):769-776)을 포함한 유방암, 췌장암 및 요로 상피암에서 특히 과발현된다. 또한, 넥틴-4는 또한 비-소세포 폐암, 난소암, 두경부 편평 세포 암종 및 식도암 종양 표본에서 발현된다. [Challita-Eid et al. (2016) Cancer Res. 76(10): 3003-3013]은 방광 (60%) 및 유방 (53%) 종양 조직에서 면역조직화학에 의한 중간 내지 강력한 염색 (H-점수 ≥100)을 보고하였다. [Zeindler et al. 2019 Front. Med. 6:200]은 148건의 TNBC 사례 중에서 86건 (58%)에서 넥틴-4의 높은 발현이 존재하였다고 보고하였다. 이들 암을 갖는 환자의 혈청에서, 넥틴-4의 가용성 형태의 검출은 불량한 예후와 연관된다. 혈청 넥틴-4의 수준은 전이성 진행 동안 증가되고, 치료 후에 감소된다. 이들 결과는 넥틴-4가 암의 치료에서 신뢰할만한 표적일 수 있음을 시사한다.
- [0008] 따라서, 몇몇 항-넥틴-4 항체가 선행 기술에서 기술된 적이 있다. 특히, 엔포투맵 베도틴 (ASG-22ME)은 넥틴-4를 표적화하는 항체-약물 접합체 (ADC)이고, 고형 종양을 앓고 있는 환자의 치료에 대해 현재 임상 연구 중에 있다. [Challita-Eid et al. (2016), 상동]은 항체 AGS-22를 기반으로 하는 고도로 강력한 마이크로튜블-파괴제 MMAE에 접합된 항-넥틴-4 항체를 개발하였다. 이 작업으로 ADC 약물 후보 엔포투맵 베도틴 (참조: 미국 특허 제8,637,642호 및 PCT 공개 번호 W02012/047724, Agensys Inc.)을 생성시켰는데, 이것은 신생보강제/보강제, 국소 진행성 또는 전이성 상황에서 플라티늄-함유 화학요법 및 PD-1/PD-L1 체크포인트 억제제를 이전에 받은 적이 있는 국소 진행성 또는 전이성 요로상피암을 갖는 환자 치료의 인간 임상 시험에서 유망한 결과를 산출하였다. 몇몇 다른 그룹들이 또한 다양한 독성제에 결합된 항-넥틴-4 작용제를 제안하였다. PCT 공개 번호 W02018/158398 (INSERM)은 몇몇 항-넥틴-4 항체를 보고하고 다양한 세포독성제와의 잠재적 커플링을 제안한다. 유사하게, 미국 특허 제8,637,642호 (Agensys Inc.)는 또한 항-넥틴-4 항체를 제공하고, 다양한 세포독성제와의 잠재적 커플링을 제안한다. 역시 또한, Bicycle Therapeutics는 발린-시트룰린 (val-cit)의 절단가능 링커를 통해 세포독성 아우리스타틴 (MMAE) 페이로드에 접합된 넥틴-4 결합 단백질을 포함하는

항-넥틴-4 표적화제의 개발을 보고하였다. 지금까지, 화학요법제에 접합되었을 때 활성인 것으로 보고된 모든 항-넥틴-4 항체는 넥틴-4의 Ig-유사 V형 도메인을 표적화하였고, 결과적으로, Ig-유사 V형 도메인은 항-넥틴-4 ADC의 가장 강력한 내재화를 제공하는 것으로 여겨진다.

[0009] 엔포투맵 베도틴 (항-넥틴-4 ADC)은 고도의 내재화 항-넥틴-4 항체와 연관된 넥틴-4의 Ig-유사 V형 도메인에 결합한다. 엔포투맵 베도틴은 EV-201 제2상 연구 (2019)에서 UC에서 44%의 ORR (객관적 반응률) 및 12%의 CR (완전 반응률)로서 인상적인 치료 반응을 보였고, 환자의 약 절반은 치료를 중단하였다. 대부분의 중단은 RECIST (48%) 또는 임상 증상 (5%)으로 평가된 진행성 질환에 기인하였다. 또한, 중단한 환자의 18%는 유해 사례, 특히 신경병증을 경험하였다. 그러므로, 넥틴-4-표적화된 ADC는 한계가 존재하고, UC 및 다른 암이 발병된 환자에 대한 개선된 이득을 위한 당업계의 요구가 존재한다.

**발명의 내용**

[0010] 본 명세서는 넥틴-4 결합 단백질에서 사용을 위한 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 도메인을 제공한다. 본 개시의 한 목적은 SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 또는 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 59, 61, 63 또는 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-넥틴-4 항체, 또는 항체 단편을 제공하는 것이다.

[0011] 일 구현예에서, SEQ ID NO: 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

[0012] 일 구현예에서, 각각 SEQ ID NO: 21, 22 및 23의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 인간 IGHV1-46\*01 유전자 유래의 프레임워크 FR1, FR2 및 FR3 아미노산 서열 (및 임의로 인간 IGHJ4\*01 유전자 유래의 추가의 프레임워크 FR4 아미노산 서열)을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 각각 SEQ ID NO: 24, 25 및 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 인간 IGKV2-28\*01 유전자 유래의 프레임워크 FR1, FR2 및 FR3 아미노산 서열 (및 임의로 인간 IGKJ4\*01 유전자 유래의 추가의 프레임워크 FR4 아미노산 서열)을 포함하는 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 특정한 인간 IGHV, IGHJ, IGKV 및 IGKJ 유전자 유래의 프레임워크 서열은 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수도 있다.

[0013] 일 구현예에서, 28, 38, 40, 48, 69, 71, 73, 78로부터 선택되는 카바트 (Kabat) 위치에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 임의로, 위치 28의 트레오닌 잔기는 이소류신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 38의 아르기닌 잔기는 리신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 40의 알라닌 잔기는 아르기닌 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 48의 메티오닌 잔기는 이소류신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 69의 메티오닌 잔기는 류신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 71의 아르기닌 잔기는 류신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 73의 트레오닌 잔기는 리신 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 78의 발린 잔기는 트레오닌 잔기로 치환된다.

[0014] 일 구현예에서, 2, 8, 11, 64로부터 선택되는 카바트 위치에 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 임의로, 위치 2의 이소류신 잔기는 발린 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 8의 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환된다. 임의로, 위치 11의 류신 잔기는 아스파라긴으로 치환된다. 임의로, 위치 64의 글리신 잔기는 세린 잔기로 치환된다.

[0015] 일 구현예에서, SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 70%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 70%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄를 포함하는 항-넥틴-4 항체를 제공한다.

[0016] 일 구현예에서, SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%

동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

- [0017] 일 구현예에서, 본 개시의 항체 또는 항체 단편, 및 임의로 추가의 추가적인 항원-결합 도메인을 포함하는 넥틴-4 결합 단백질을 제공한다.
- [0018] 임의 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 임의로 단일클론, 인간화 및/또는 단리된 형태인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 넥틴-4 폴리펩티드의 VC1 가교 도메인에 결합한다.
- [0020] 임의 양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 단편은 항체 약물 접합체 (ADC)의 제조에서 사용을 위한 것이다. 임의 양태에서, 본 개시의 항체는 넥틴-4 발현 종양 세포 간 세포-세포 부착의 감소, 넥틴-4:넥틴-1 상호작용의 억제, 넥틴-4:넥틴-4 상호작용의 억제, 넥틴-4 발현 종양 세포 성장의 감소 및/또는 넥틴-4 발현 종양 세포의 클러스터 형성의 감소에서 사용을 위한 것이다 (예를 들어, 이러한 방법에서 사용을 위한 것임).
- [0021] 본 발명 중 하나에 따라서, 세포독성제에 접합된 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항체 약물 접합체를 제공하고, 임의로 세포독성제는 링커를 통해서 항체 또는 항체 단편에 접합되고, 임의로 추가로 링커 또는 링커-독소는 화학식 III 내지 XIV 중 어느 하나를 포함한다.
- [0022] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체 (ADC)는 적어도 하나의 세포독성 약물 모이어티에 연결된 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 포함하고, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 69의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0023] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체 (ADC)는 (a) 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인으로서, 상기 항원 결합 도메인은 (i) SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 또는 57의 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 (ii) SEQ ID NO: 59, 61, 63 또는 65의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항원 결합 도메인; 및 (b) 적어도 하나의 세포독성 약물 모이어티를 포함한다.
- [0024] 바람직한 구현예에서, 항체 약물 접합체 (ADC)는 (a) (i) SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 (ii) SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-넥틴-4 인간화된 항체를 포함한다.
- [0025] 일부 양태에서, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 항체 (예를 들어, 전체 길이 항체, 항체 단편)는 넥틴-4 발현 종양 세포 간 세포-세포 부착을 감소시킬 수 있고/있거나, 넥틴-4 발현 종양 세포의 성장 및/또는 클러스터 형성을 감소시킬 수 있고 (예를 들어, 3-차원 또는 비-부착 종양 세포 배양; 종양 회전단원체 어세이를 사용해 평가시), 항체 약물 접합체의 제조에서 사용을 위한 것이다.
- [0026] 일부 양태에서, 항체 (예를 들어, 전체 길이 항체, 항체 단편)는 넥틴-4:넥틴-1 상호작용 및/또는 넥틴-4:넥틴-4 상호작용을 억제할 수 있다 (예를 들어, 항체는 제1 세포의 넥틴-4와 제2 세포의 넥틴-1 및/또는 넥틴-4의 상호작용을 감소시킬 수 있고, 여기서 세포(들)는 종양 세포(들)임).
- [0027] 본 명세서의 임의의 양태에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편, 또는 이러한 항체 또는 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는 종양 세포의 표면 상의 넥틴-4에 결합 시, 세포내 내재화를 겪을 수 있다.
- [0028] 일부 양태에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 본 개시에 따른 항체 또는 항체 단편)을 세포독성제 (예를 들어, 본 발명에 따른 링커 또는 링커-독소)에 접합시키는 단계를 포함하는 항체 약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0029] 일부 양태에서, 항체 약물 접합체의 제조는 항체를 세포독성제에 (예를 들어, 링커 모이어티로서, 세포내 절단 가능한 모이어티를 더 포함하는 링커 모이어티를 통해) 접합시키는 단계를 포함한다.
- [0030] 일 양태에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 세포내-절단가능 (예를 들어, 프로테아제 절단가능) 올리고-펩티드 (예를 들어, 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드)를 통해 세포독성제에 접합된다. 일 양태에서, 항

-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 세포내-절단가능 (예를 들어, 프로테아제-절단가능) 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드 및 자기-제거성 스페이서를 통해서 세포독성제 (예를 들어, 캄프토테신 유도체)에 접합된다. 일 양태에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 세포내-절단가능 (예를 들어, 프로테아제 절단가능) 테트라- 또는 펜타-펩티드 및 자기- 또는 비-자기-제거성 스페이서를 통해서 세포독성제 (예를 들어, 캄프토테신 유도체)에 접합된다.

[0031] 일 양태에서, 세포독성제는 고도로 강력한 화학요법제, 임의로 탁산, 안트라사이클린, 캄프토테신, 에포틸론, 미토마이신, 콤프레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 마이탄시노이드, 두오카마이신, 튜블리신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴, 엔다이인 (예를 들어, 칼리케아미신, 에스퍼라미신, 시시지미신 및 나메나미신), 피롤로벤조디아제핀 (예를 들어, 피롤로벤조디아제핀 이량체 및 인돌리노-피롤로벤조디아제핀 이량체), 아마톡신 및 에틸렌이민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포독성제이다. 일 구현예에서, 세포독성제는 DNA 손상제이고, 예를 들어 DNA 인터칼레이팅제, 예를 들어, 그 자체로 세포의 DNA 구조에 삽입되어서 DNA에 결합하고, 이어서 DNA 손상을 초래하는 작용제 (예를 들어, 다우노루비신)를 포함한다. 화합물은 토포이소머라제 억제제로서, 토포이소머라제 (토포이소머라제 I 및 II)의 작용을 차단하는 화학 화합물을 포함한다. 이러한 화합물은 광범위의 고형 종양 및 혈액학적 악성종, 특히 림프종에 사용된다. 토포이소머라제 I 억제제는 캄프토테신, 예를 들어, 이리노테칸 (결장암 치료용으로 승인), 토포테칸 (난소암 및 폐암 치료용으로 승인), 캄프토테신, 라멜라린 D, 인데노이소퀴놀린, 인디미테칸을 포함한다. 추가 캄프토테신은 실라테칸, 코시테칸, 엑사테칸, 루토테칸, 지마테칸, 벨로테칸, 및 루비테칸을 포함한다. 토포이소머라제 II 억제제는 예를 들어 에토포시드 (VP-16), 테니포시드, 독소루비신, 다우노루비신, 미톡산트론, 암사크린, 엘립티신, 아우린트리카르복실산, 및 HU-331, 칸나비디올로부터 합성된 퀴놀론을 포함한다.

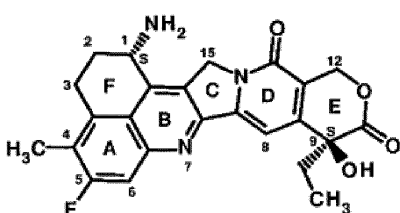
[0032] 임의로 항체 또는 항체 단편은 화학식 III 내지 XIV 중 어느 하나의 링커-독소에 의해 작용화 (예를 들어, 접합, 공유 결합)된다.

[0033] 일 양태에서, 세포독성제는 캄프토테신 유사체, 예를 들어, 엑사테칸, Dxd 또는 SN-38 분자이다.

[0034] 일 양태에서, 본 발명은 캄프토테신, 예를 들어 캄프토테신 유사체, 엑사테칸 또는 엑사테칸 유도체, Dxd 분자 또는 SN-38 분자에 접합 (예를 들어, 공유 결합)된 본 개시의 넥틴-4 결합 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

[0035] 본 명세서의 임의 구현예에서, 캄프토테신 유사체, 예를 들어, 엑사테칸 또는 SN-38 분자에 접합 (예를 들어, 공유 결합)된 본 개시의 넥틴-4 결합 항체 또는 항체 단편은 화합물 1 또는 2의 구조를 포함하는 분자에 의해서, 링커를 통해, 작용화된 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인, 리신, 글루타민 잔기, 비천연 아미노산 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 명세서의 임의 구현예에서, 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 화학식 III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, 또는 XIV의 구조를 갖는 링커-캄프토테신 분자에 의해서, 또는 임의의 화합물 3 내지 16에 의해서 작용화되는 것을 특징으로 할 수 있다.

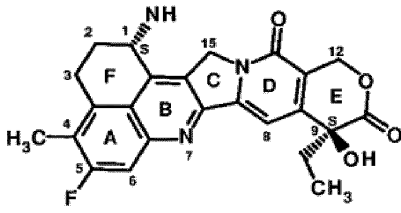
[0036] 일 구현예에서, 캄프토테신 유도체에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 엑사테칸 분자, 예를 들어, 화합물 1 (1a 또는 1b)의 구조를 갖는 분자에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편이다. 임의 구현예에서, 절단가능한 링커 또는 링커를 포함하는 면역접합체 또는 ADC는 예를 들어, 링커의 효소적 절단 시에, 엑사테칸 분자, 예를 들어, 화합물 1 (1a 또는 1b)의 구조를 갖는 분자를 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 구현예에서, 캄프토테신 유도체에 접합된 인간화된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편 접합체는 SN-38 분자, 예를 들어, 화합물 2의 구조를 갖는 분자에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편 접합체이다. 일 구현예에서, 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 구조를 갖는 분자에 의해서, 링커 (예를 들어, 추가적인 스페이서, 예를 들어 본 명세서에 기술된 스페이서 (Y'))가 존재 또는 부재하는 절단가능 링커 분자)를 통해서, 작용화된 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인, 리신, 글루타민 또는 비천연 아미노산 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:



[0037]

[0038] 화합물 1a

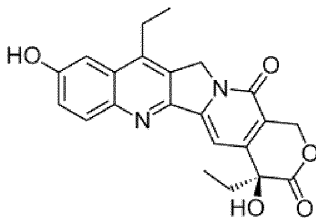
[0039] 또는



[0040]

[0041] 화합물 1b

[0042] 또는



[0043]

[0044] 화합물 2.

[0045] 일 구현예에서, 세포독성제에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 화학식 (I)으로 표시되는 면역접합체로서 명시될 수 있다:

[0046] Ab-X-Z 화학식 (I)

[0047] 상기 식에서,

[0048] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 본 개시의 임의의 항체 또는 항체 단편, 임의로 항체는 인간 넥틴-4의 VC1 가교 도메인에 결합하고/하거나, 야생형 인간 넥틴-4 폴리펩티드와 비교하여, 잔기 K197 및/또는 S199 (SEQ ID NO: 1에 대함)에 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이체 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 대한 감소된 결합을 나타냄)이고;

[0049] X는 Ab 및 Z를 연결 (예를 들어, Ab 및 Z의 각각에 공유 결합)하는 링커 분자이고, X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능한 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고, 임의로 X는 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치한 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이스 시스템 (Y')을 더 포함하고, 임의로 X는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치한 스페이스 (Y)를 더 포함하고;

[0050] Z는 세포독성제이고, 임의로 Z는 캄프토테신 유사체이고, 임의로 Z는 엑사테칸이고, 임의로 Z는 엑사테칸이고, 링커의 절단은 화합물 1의 구조를 갖는 화합물 (엑사테칸)의 방출을 야기한다.

[0051] 일 구현예에서, 세포독성제에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 화학식 (I)으로 표시되는 면역접합체인 것으로 명시될 수 있다:

[0052] Ab-X-Z 화학식 (I)

[0053] 상기 식에서,

[0054] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 본 개시에 따른 항체 또는 항체 단편이고;

[0055] X는 Ab 및 Z를 연결 (예를 들어, Ab 및 Z의 각각에 공유 결합)하는 링커 분자이고, X는 발린-시트룰린, 발린-알라닌 또는 페닐알라닌-리신 디펩티드를 포함하고, X는 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치한 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이스 시스템 (Y')을 더 포함하고, X는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치한 스페이스 (Y)를 더 포함하고;

[0056] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체, 임의로 엑사테칸 분자 또는 SN-38 분자이다.

- [0057] 일 구현예에서, 세포독성제 (임의로 캄프토테신 유사체)를 종양에 전달하거나 또는 표적화하는 방법, 세포독성제 (임의로 캄프토테신 유사체, Dxd, 엑사테칸)를 종양 (예를 들어, 암을 갖는 대상체)에서 방출하는 방법, 또는 세포독성제 (임의로 캄프토테신 유사체)에 대해 감각시키는 방법을 제공하고, 방법은 암을 갖는 대상체에게 하기 화학식 (I)으로 표시되는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다:
- [0058]  $Ab-X-Z$  화학식 (I)
- [0059] 상기 식에서,
- [0060] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편이고;
- [0061] X는 Ab 및 Z를 연결 (예를 들어, Ab 및 Z의 각각에 공유 결합)하는 링커 분자이고, X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고, 임의로 X는 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치한 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이스 시스템 (Y')을 더 포함하고, 임의로 X는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치한 스페이스 (Y)를 더 포함하고;
- [0062] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체, 임의로 엑사테칸 분자 또는 SN-38 분자이고, 임의로 Z는 엑사테칸이고, 링커의 절단은 화합물 1의 구조를 갖는 화합물 (엑사테칸)의 방출을 야기한다.
- [0063] 일 구현예에서, 세포독성제 (임의로 캄프토테신 유사체)에 접합된 항체 또는 항체 단편은 하기 화학식 (II)로 표시되는 면역접합체인 것으로 명시될 수 있다:
- [0064]  $Ab-(X-(Z)_n)_m$  화학식 (II)
- [0065] 상기 식에서,
- [0066] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 본 개시에 따른 항체 또는 항체 단편이고;
- [0067] X는 Ab 및 Z를 연결하는 링커 분자이고, X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고, 임의로 X는 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치한 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이스 시스템 (Y')을 더 포함하고, 임의로 X는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치한 스페이스 (Y)를 더 포함하고;
- [0068] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체이고, 임의로 Z는 엑사테칸 분자 또는 SN-38 분자를 포함하는 분자, 예를 들어, 화합물 1 또는 2의 구조를 갖는 분자이고;
- [0069] n은 1이고;
- [0070] m은 4 내지 8이거나, 또는 임의로 m은 4, 5, 6, 7 또는 8 중에서 선택되는 정수이다.
- [0071] 일 구현예에서, 세포독성제 (임의로 캄프토테신 유사체)에 접합된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 화학식 (II)로 표시되는 면역접합체의 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다:
- [0072]  $Ab-(X-(Z)_n)_m$  화학식 (II)
- [0073] 상기 식에서,
- [0074] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 본 개시에 따른 항체 또는 항체 단편이고;
- [0075] X는 Ab 및 Z를 연결하는 분자이고, X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고, 임의로 X는 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치한 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이스 시스템 (Y')을 더 포함하고, 임의로 X는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치한 스페이스 (Y)를 더 포함하고;
- [0076] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체이고, 임의로 Z는 엑사테칸 분자 또는 SN-38 분자를 포함하는 분자이고;
- [0077] n은 1이고, 조성물 중 면역접합체의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 2와 4 사이, 4와 8 사이, 임의로 6과 8 사이인 m (X-Z 모이어티의 개수)을 갖는다. 임의로 조성물 중 면역접합체의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 4, 6, 7 또는 8이거나, 또는 적어도 4, 6, 7 또는 8인 m을 갖

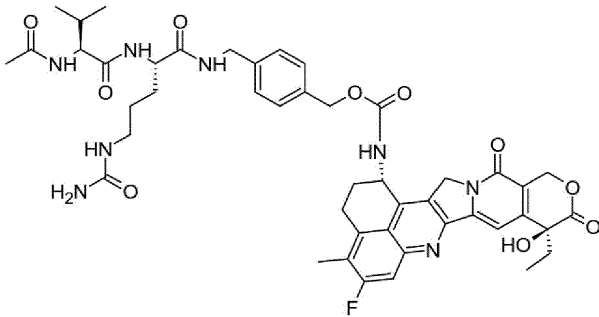
는다.

[0078] 화학식 I 또는 II에서, (X-Z) 모이어티는 임의로 임의의 화학식 III 내지 XI 또는 임의의 화합물 3-12의 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

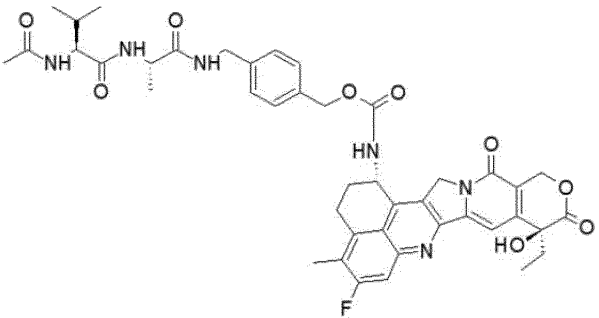
[0079] 화학식 I 또는 II에서, 분자 X 또는 스페이서 Y는 임의로 반응성 기 (R) 또는 반응성 기 (R)와 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체)의 아미노산 또는 항체 또는 항체 단편의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')의 반응의 잔기를 포함하는 것으로서 명시될 수 있다.

[0080] 본 명세서의 임의 구현예에서, 엑사테칸 분자는 엑사테칸의 위치 1에서 아민을 통해 링커 (X)에 결합되는 것으로 명시될 수 있다 (NH는 엑사테칸 분자가 링커의 일부일 때 위치 1의 NH<sub>2</sub>를 대체함). 일 구현예에서, 엑사테칸은 링커 (X), 예를 들어, X의 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB) 자기-제거성 스페이서 모이어티의 카르보닐에 결합된다. 본 명세서의 임의 구현예에서, SN-38 분자는 위치 9에서 OH를 통해 링커 (X)에 결합되는 것으로 명시될 수 있다 (O는 화합물 2로 표시된 SN-38 분자가 링커의 일부일 때 위치 9의 OH를 대체함).

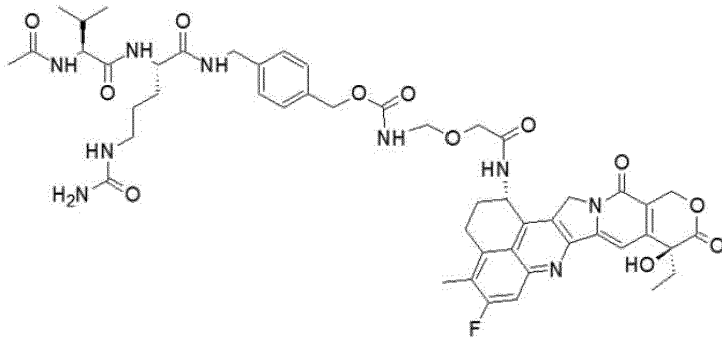
[0081] 일 구현예에서, 엑사테칸에 접합된 넥틴-4 결합체는 하기 구조를 포함하는 링커-엑사테칸 분자에 의해서, 스페이서 (Y)를 통해, 작용화된, 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인 잔기, 글루타민 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:



[0082] 일 구현예에서, 엑사테칸에 접합된 인간화된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 구조를 갖는 링커-엑사테칸에 의해서, 스페이서 (Y)를 통해, 작용화된 하나 이상의 잔기 (예를 들어, 시스테인 잔기, 글루타민 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:



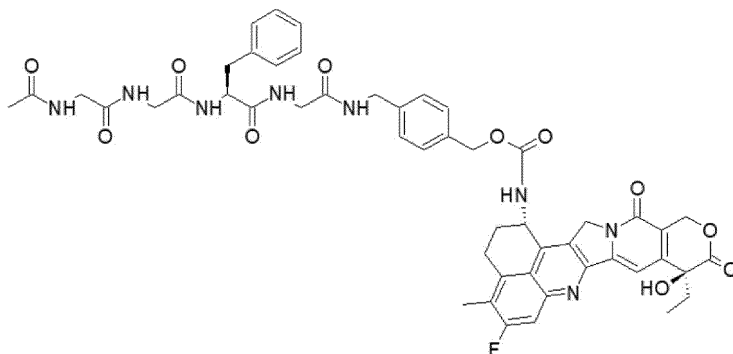
[0084] 일 구현예에서, 엑사테칸에 접합된 인간화된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 구조를 포함하는 링커-엑사테칸 분자에 의해서, 스페이서 (Y)를 통해, 작용화된, 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인 잔기, 글루타민 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:



[0086]

[0087]

일 구현예에서, 엑사테칸에 접합된 인간화된 넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 하기 구조를 포함하는 링커-엑사테칸 분자에 의해서, 스페이서 (Y)를 통해, 작용화된 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인 잔기, 글루타민 잔기)를 갖는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:



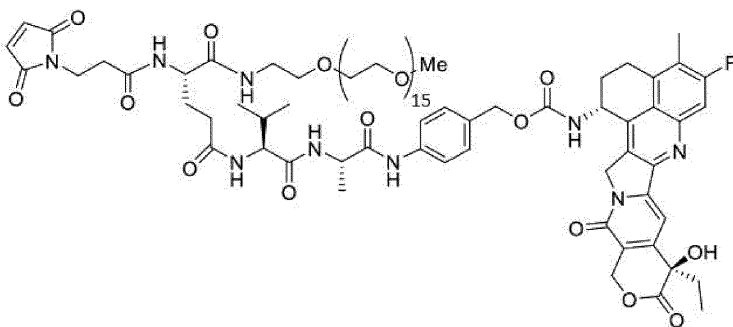
[0088]

[0089]

스페이서 (Y)는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이거나 또는 그를 포함하는 것으로 명시될 수 있고, 임의로 Y는 2-100개 원자, 2-40개 원자, 임의로 2-30개, 2-20개, 4-40개, 4-30개 또는 4-20개 원자의 사슬 길이를 갖고, 임의로 하나 이상의 원자는 탄소 이외의 원자, 예를 들어 산소, 황, 질소, 또는 다른 원자일 수 있고, 임의로 사슬의 임의 탄소는 알콕시, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 알킬-S-, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드, 또는 알킬아미드로 치환된다. 예를 들어, Y는 하나 이상의 에틸렌 옥시드 단량체를 포함할 수도 있고, 임의로 Y는 폴리에틸렌 옥시드 모이어티를 포함하고, 임의로 Y는 구조  $-(CH_2CH_2O)_x-$ 를 포함하고, 여기서 x는 1 내지 24, 임의로 1 내지 12, 임의로 1 내지 8, 임의로 1 내지 6이다.

[0090]

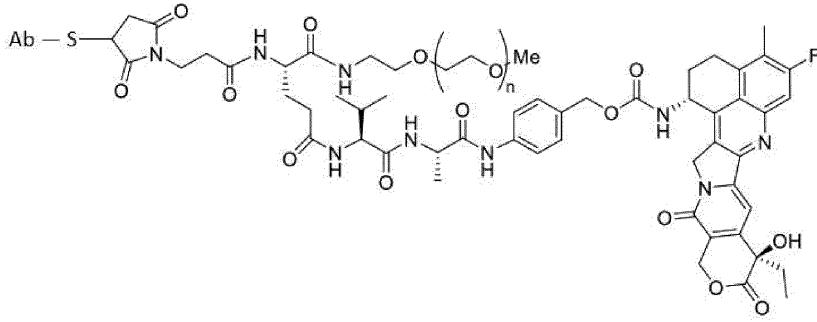
일부 양태에서, 하기 구조를 갖는 링커-엑사테칸 분자가 제공된다:



[0091]

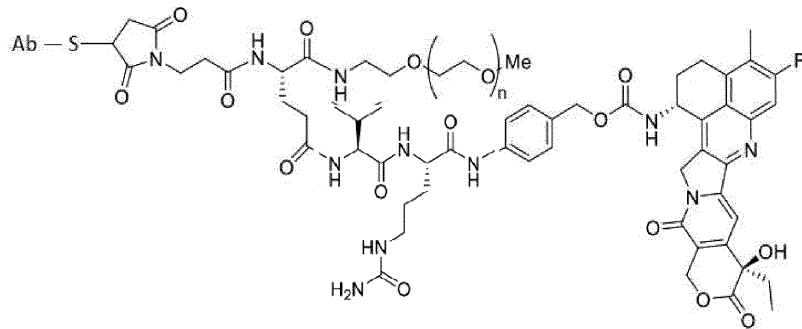
[0092]

일정 구현예에서, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체가 제공되고, 면역접합체는 하기 화학식 중 어느 하나로 표시된다:



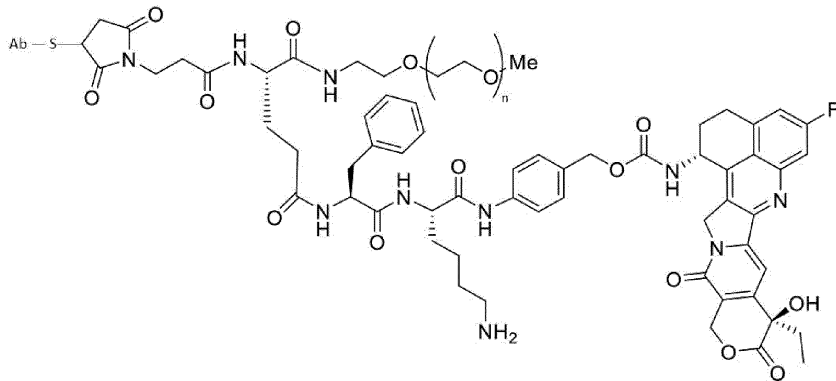
[0093]

[0094] 또는



[0095]

[0096] 또는

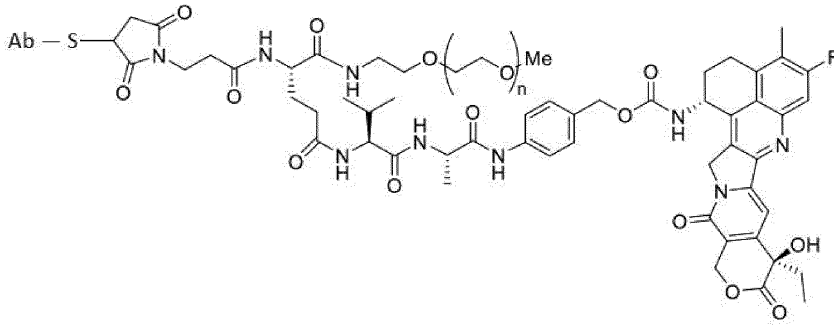


[0097]

[0098] 상기 식에서, n은 1-15, 5-15, 5-23 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23)이고;

[0099] Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편이고, 임의로 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 19, 47, 69 또는 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 임의로 적어도 70%, 임의로 80% 또는 임의로 90% 동일한 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 20, 65, 70 또는 78로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 임의로 적어도 70%, 임의로 80% 또는 임의로 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. S는 항체 (Ab)의 시스테인 잔기의 원자인 것으로 명시될 수 있다.

[0100] 일 구현예에서, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 면역접합체는 하기 식으로 표시된다:



[0101]

[0102]

상기 식에서, Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편이다. 일 구현예에서, n은 15이고, 면역접합체는 6과 8 사이의 DAR을 특징으로 하고, 임의로 DAR은 6이고, 임의로 DAR은 8이고; S는 항체 (Ab)의 시스테인 잔기의 원자이다. 일 구현예에서, Ab는 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 임의로 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0103]

일 양태에서, 치료는 기존의 항-넥틴-4 ADC 요법 (예를 들어, 아우리스타틴에 접합된 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편; 엔포투맙 베도틴)과 비교하여 개선된 효능 및/또는 개선된 (낮아진) 약물 내성을 보인다. 일 양태에서, 이를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 종양 세포를 사멸하는 방법을 제공하고, 치료는 1개월 당 1 내지 2회 (예를 들어, 2주 1회, 3주 1회, 또는 4주 1회)의 빈도로 캄프토테신 유도체 (예를 들어, 액사테칸 또는 SN-38 분자)에 접합된 넥틴-4 결합체의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 이상의 투여를 포함한다.

[0104]

또한 이를 필요로 하는 개체에서, 질환, 예를 들어, 암의 치료 또는 예방에서, 임의로 세포독성 약물 모이어티에 접합된, 항체, 이의 단편을 사용하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 임의로 세포독성 약물 모이어티에 접합된, 항체 또는 단편은 넥틴-4 발현 종양 세포를 사멸시키는데 충분한 양 및 빈도로 암을 갖는 개체에게 투여된다. 일 구현예에서, 상기 개체는 넥틴-4 발현 종양을 갖고, 임의로 종양은 HER-2 발현 종양 또는 HER2-음성 종양, 예를 들어, 요로상피암, 두경부 편평 세포 암종 또는 식도암이다. 일 구현예에서, 암 또는 종양은 진행성 재발성 또는 전이성 암, 임의로 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암이다. 일 구현예에서, 암 또는 종양은 삼중-음성 유방암 (TNBC)이다.

[0105]

일 양태에서, 본 명세서의 치료 방법은 종양 세포에서 넥틴-4 발현 수준과 무관하게 넥틴-4-발현 암을 갖는 개체에서 사용될 수 있다.

[0106]

일 양태에서, 본 명세서의 치료 방법은 그의 종양 세포가 P-당단백질 (Pgp)을 발현하는 개체에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0107]

일 양태에서, 본 개시의 치료 방법은 유리하게 화학요법제 (예를 들어, P-당단백질 (Pgp)에 의해 수송되는 화학요법제, 백금제 (예를 들어, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 펜안트리플라틴, 피코플라틴, 사트라플라틴), 타산 (예를 들어, 파클리탁셀 (Taxol™) 및 도세탁셀 (Taxotere™))을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있는 개체에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0108]

본 개시의 항-넥틴-4 항체 (예를 들어, 특히 캄프토테신 유도체에 접합되었을 때)에 의해 제공되는 증가된 항종양 역가 및 보다 큰 치료창은 항-HER2 작용제 (예를 들어, 트라스투주맙; 트라스투주맙을 포함하는 ADC)를 포함하는 조성물, 또는 다른 항-넥틴-4 작용제 (예를 들어, 엔포투맙을 포함하는 ADC; 엔포투맙 베도틴)를 포함하는 조성물을 사용한 치료 이후에 진행되었거나 또는 그에 반응성이 아닌, 그에 저항성을 갖는 종양을 갖는 개체에서 개선된 치료 결과의 가능성을 제공한다. 개선된 치료창은 다른 작용제, 특히 화학요법제 및/또는 항-HER2 작용제를 사용한 병용 치료에 대한 가능성을 제공한다.

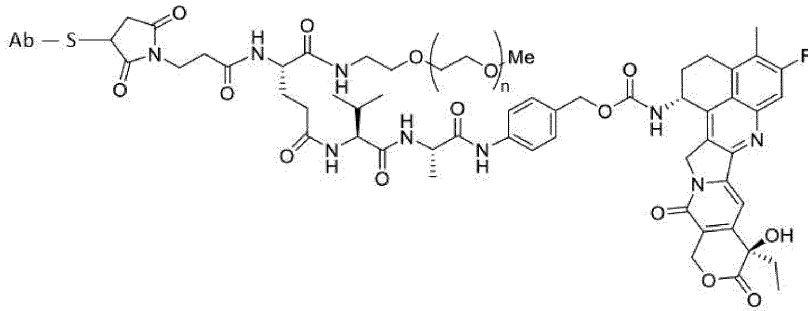
[0109]

일 양태에서, 본 명세서의 치료 방법은 그의 종양 또는 암이 항-HER2 항체 (예를 들어, 트라스투주맙; 트라스투주맙을 포함하는 ADC)를 포함하는 조성물 또는 다른 항-넥틴-4 작용제 (예를 들어, 엔포투맙을 포함하는 ADC; 엔포투맙 베도틴)를 포함하는 조성물을 사용한 치료 후에 진행되었거나 또는 그에 반응성이 아닌, 저항성을 갖는 개체에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0110] 본 명세서의 구현예의 일 양태에서, 개체는 방사선요법, 수술, 화학요법, 및/또는 생물학제 요법을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있다.

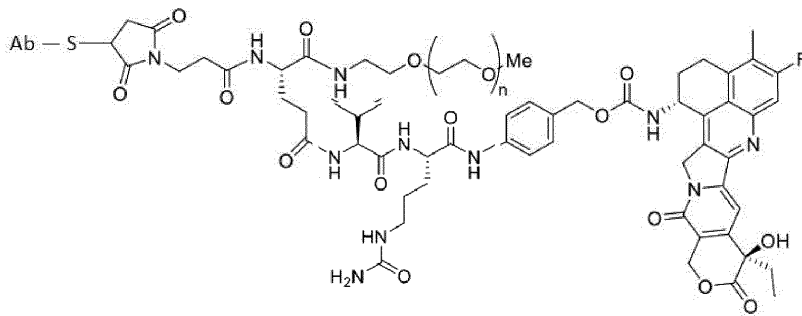
[0111] 본 명세서의 구현예의 일 양태에서, 개체는 항-넥틴-4 작용제, 임의로 토포이소머라제 억제제 이외의 세포독성 모이어티를 포함하는 항-넥틴-4 작용제, 예를 들어 엔포투맙 베도틴을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있다.

[0112] 본 명세서의 구현예의 일 양태에서, 이를 필요로 하는 개체에서, 암을 치료하고/하거나, 종양 세포를 사멸시키고/시키거나, 세포독성제를 종양에 전달하는 방법을 제공하고, 방법은 아우리스타틴에 결합된 넥틴-4 결합제, 임의로 엔포투맙 베도틴을 사용한 사전 치료를 받은 적이 있는 개체에게 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체의 치료적 유효량을 부여하는 단계를 포함하고, 면역접합체는 하기 화학식 중 어느 하나로 표시된다:



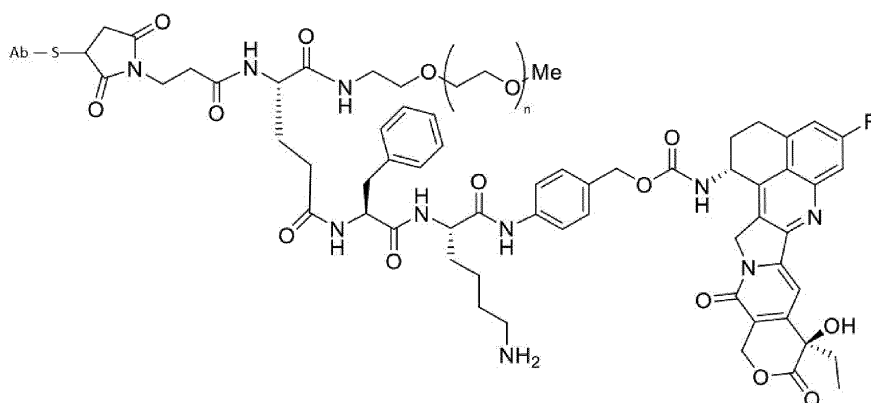
[0113]

[0114] 또는



[0115]

[0116] 또는



[0117]

[0118] 상기 식에서, n은 5-23이고, 임의로 n은 7-15이고, 임의로 n은 15이고, Ab는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편이다. 임의로, 면역접합체는 6과 8사이의 DAR을 특징으로 하고, 임의로 DAR은 6이고, 임의로 DAR은 8이다.

[0119] 일 양태에서, 본 발명은 통상의 항-넥틴-4 ADC에 적용되는 것에 비해 낮거나 또는 더 낮은, 예를 들어 3 mg/kg 체중 미만, 1.25 mg/kg 체중 미만, 1 mg/kg 체중 미만, 125 mg 미만의 균일 용량인 용량으로 개체에서 항-종양 효과를 매개하는데 사용될 수 있는 치료 방법을 제공한다.

- [0120] 일 양태에서, 본 개시의 치료 방법은 기존 신경병증, 당뇨병 또는 고혈당증, 심부전증, 안구 병상을 갖는 개체에서 사용될 수 있다.
- [0121] 일 양태에서, 본 개시의 치료 방법은 넥틴-4 폴리펩티드의 종양 세포 발현 (예를 들어, 종양 세포막에서 넥틴-4 폴리펩티드의 발현)의 낮은 수준 또는 중간 수준을 특징으로 하는 넥틴-4 발현 암을 갖는 개체에서 사용될 수 있다.
- [0122] 본 명세서의 임의 구현예에서, 세포독성제에 접합된 항-넥틴-4 항체는 추가의 세포독성제 (예를 들어, 화학요법제, P-당단백질 (Pgp, 인간 MDR1 유전자 산물)에 의해 수송되는 화학요법제, 백금제, 탁산)와 병용하여 사용되고, 추가의 세포독성제는 세포독성제에 접합된 항-넥틴-4 항체와 별도로 투여된다.
- [0123] 본 발명의 다른 양태에서, 임의로 세포독성 약물 모이어티에 접합된, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편, 및 전형적으로 조성물의 제제화, 전달, 안정성, 또는 다른 특징을 촉진하는 활성 성분 또는 불활성 성분일 수 있는 하나 이상의 추가적인 성분 (예를 들어, 다양한 담체)을 포함하는 약학 조성물 및 키트를 제공한다.
- [0124] 이들 양태는 보다 상세히 기술되며, 추가 양태, 특성, 및 장점은 본 명세서에 제공되는 본 발명의 설명으로부터 자명해질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0125] 도 1은 FACS (MFI:형광 강도의 평균)로 결정된, SUM190 인간 유방암 종양 세포의 표면에서 HER2 및 넥틴-4 폴리펩티드의 발현 수준을 도시한다. SUM190 종양 세포는 낮은 수준 내지 중간 수준 (중양값 형광 단위 1777)의 HER2를 비롯하여 낮은 수준 (중양값 991 형광 단위)의 넥틴-4를 발현하였다.
- 도 2는 FACS (MFI: 형광 강도의 평균)로 결정된 SUM185 인간 유방암 종양 세포의 표면에서 HER2 및 넥틴-4 폴리펩티드의 발현 수준을 도시한다. SUM185 세포는 중간 내지 높은 수준 (중양값 형광 단위 2880)으로 HER2를 비롯하여 더 높은 수준 (중양값 4326 형광 단위)으로 넥틴-4를 발현하였다.
- 도 3A는 모두 동등한 약물 대 항체 비 (DAR=8)에서 이소스타입 대조군 항체 (IC)와 함께, 캄프토테신 유사체 Dxd (실시예 9에 표시된 GGFG-Dxd 링커를 포함) 또는 엑사테칸 (실시예 9에 표시된 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸) 링커를 포함)과 접합된 5E7의 인간 유방암 세포의 사멸을 도시하며, V-도메인 결합 Enhertu™ (트라스투주맙 테루스테칸 (항-HER2))와 비교하였다. 도 3B는 HER-2 및 넥틴-4 발현 SUM185, SUM190, MDA-MB-468 (TNBC) 인간 종양 세포 및 MC38 (결장암) 및 B16F10 (흑색종) 쥐 종양 세포의 사멸을 초래하는 "5E7-엑사테칸" (엑사테칸 링커 (실시예 9에 표시된 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸)에 접합된 5E7)의 효능을 비롯하여 세포 사멸을 초래하는 5E7-엑사테칸의 능력에 대한 EC<sub>50</sub> 값을 도시한다.
- 도 4는 인간 유방암의 마우스 모델에서 엔포투맙, N41 및 이소스타입 대조군 항체 (IC)의 동일 용량과 비교된, 캄프토테신 ADC로서 5E7 항체의 3 mg/kg의 단일 용량의 효능을 도시한다. 각 항체는 동등한 약물 대 항체 비 (DAR=8)로 동일한 캄프토테신 유사체 (Dxd) 및 테트라펩티드-함유 링커 (GGFG)와 접합되었다. 오직 5E7만이 종양 성장을 효과적으로 제어할 수 있었다.
- 도 5는 Padcev™ (엔포투맙 베도틴) (DAR=4로 아우리스타틴 화합물 MMAE에 접합된 엔포투맙) 및 Enhertu™와 비교된, 5E7 항체에 의한 비교적 높은 수준으로 넥틴-4를 발현하는 SUM185 인간 유방암 세포의 사멸을 도시한다. 이러한 설정은 항-HER2 저항성 모델로서 사용된다.
- 도 6A 및 6B는 유세포측정으로 결정된, 각각 래트 및 사이노몰거스 넥틴-4 발현 CHO 세포주에 대한 항-넥틴-4 항체 5E7의 결합을 도시한다.
- 도 7A 및 7B는 인간 넥틴-4 단백질의 구조를 도시하는 것으로서, 치환은 음영으로 표시되고; 돌연변이체 7 (7A) 및 7bis (7B)에서 치환된 C1 도메인 잔기에 상응하는 흰색 영역이 표시되어 있다.
- 도 8A 및 8B는 인간 넥틴-4 단백질의 구조의 몇개 도면을 도시하는 것으로서, 치환은 음영으로 표시되고, 돌연변이체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9의 치환된 잔기에 상응하는 흰색 영역이 표시되어 있다.
- 도 9B 및 9C는 ADC로 처리된 마우스에서 시간 경과 (종양 생착 후 일수)에 따른 종양 성장의 변화를 도시한다. 도 9A 및 9B는 동일한 DAR로 동일한 링커-페이로드에 접합된 상이한 항-넥틴-4 항체 (5E7 또는 6A7)의 i.v.에 의한 3 mg/kg 체중 용량의 치료를 도시한다. 도 9C는 링커의 절단 시에 DxD 또는 엑사테칸을 방출하도록 디자인된 링커에 접합된 항체 5E7의 i.v.에 의한 10 mg/kg 체중 용량의 치료를 도시한다.

도 10A는 Padcev™ (엔포투맵 베도틴), Dxd에 접합된 항체 5E7 또는 엑사테칸에 접합된 5E7이 처리된 세포의 발광도 (세포 생존능을 의미)를 도시한다. 세포는 MDR1 p-당단백질을 내생적으로 발현하고 넥틴-4를 발현하도록 조작된 MC-38 세포이다. 페이로드로서 엑사테칸을 사용한 ADC는 이러한 약물 저항성의 설정에서 세포 생존능을 감소시키는데 매우 강력하였다. 도 10B는 Pgp 억제제 사이클로스포린의 존재 또는 부재 하에서, 150 nM ADC로서, Padcev™ (엔포투맵 베도틴), Dxd에 접합된 항체 5E7 또는 엑사테칸에 접합된 5E7로 처리되고, 대조군 항체에 대해 정규화된 MC38 세포의 종양 성장 (곡선하 면적)을 도시하는 것으로서, Padcev™ 및 Dxd에 접합된 항체 5E7의 항-종양 활성이 Pgp에 의해 음성적으로 영향받는다 것을 시사한다.

도 11 및 12는 3 mg/kg 용량의 ADC 및 유리 독소의 마우스에서의 생체내 평가 결과를 도시한다. IC (유리 독소)의 결과는 도 11에 도시된다. ADC의 결과는 도 12에 도시된다.

도 13은 항-넥틴-4 ADC의 마우스에서 생체내 항-종양 효능 및 시간 경과에 따른 ADC의 혈장 농도의 결과를 도시한다. 상단 좌측 패널은 PBS가 종양 부피의 증가를 방지하지 못한 것을 보여준다. 상단 우측 패널은 1 mg/kg 용량의 ADC가 강력한 항-종양 효능을 보였음을 보여준다. 하단 패널은 시간 경과에 따른 혈장 중 ADC의 농도를 도시한다.

도 14는 래트에서 ADC의 생체내 혈장 농도를 도시한다. 도 14A는 3 mg/kg 용량 (상단 패널) 및 10 mg/kg 용량 (하단 패널)을 도시하고, 도 14B는 30 mg/kg 용량의 결과를 도시한다.

도 15는 비-인간 영장류에서 ADC의 생체내 혈장 농도를 도시한다. 도 15A는 3 mg/kg 용량 (상단 패널) 및 10 mg/kg 용량 (하단 패널)을 도시하고, 도 15B는 30 mg/kg 용량의 결과를 도시한다.

표 15는 본 출원에서 개시하는 핵산 및 아미노산 서열을 표시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**정의**

명세서에서 사용되는 바와 같은, "일" 또는 "한"은 하나 이상을 의미할 수도 있다. 단어 "포함하는"과 함께 사용할 때, 청구항(들)에서 사용되는, 단어 "한" 또는 "하나"는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

"포함하는"이 사용되는 경우에, 이것은 임의로 "본질적으로 이루어지는" 또는 "이루어지는"으로 대체될 수 있다.

"넥틴-4" 및 "넥틴-4 폴리펩티드"는 넥틴-4 유전자 (Uniprot 등록 번호 Q96NY8 참조) 또는 이러한 유전자로부터 제조된 cDNA에 의해 코딩되는 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. 임의의 천연 발생 이소폼, 대립유전자 또는 변이체는 용어 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, SEQ ID NO: 1, 또는 이의 적어도 100개, 200개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산 잔기의 인접한 서열과 95%, 98% 또는 99% 동일한 넥틴-4 폴리펩티드)에 포괄된다.

31개 아미노산 신호 펩티드를 포함하는, 정규 인간 넥틴-4 (이소폼 1)의 510개 아미노산 잔기 서열이 하기에 표시된다:

```
MPLSLGAEMW GPEAWLLLLL LLASFTGRCP AGELETSDVV TVVLGQDAKL
PCFYRGDSGE QVQVAVARV DAGEGAQELA LLHSKYGLHV SPAYEGRVEQ
PPPPRNPLDG SVLLRNAVQA DEGEYECRVS TFPAGSFQAR LRLRVLVPLP
PSLNPGPALE EGQGLTLAAS CTAEGSPAPS VTWDTEVKGT TSSRSFKHSR
SAAVTSEFHL VPSRSMNGQP LTCVVSHPLG LQDQRITHIL HVSFLAEASV
RGLEDQNLWH IGREGAMLKC LSEQQPPPSY NWTRLDGPLP SGVRVDGDTL
GFPPLTTEHS GIYVCHVSNE FSSRDSQVTV DVLDPQEDSG KQVDLVSASV
VVVGVIAALL FCLLVVVVVL MSRYHRRKAQ QMTQKYEEEL TLTRENSIRR
LHSHHTDPRS QPEESVGLRA EGHPSLKDND SCSVMSEEP EGRSYSTLTT
VREIETQTEL LSPGSGRAEE EEDQDEGIKQ AMNHVQENG TLRAKPTGNG
IYINGRGLHV (SEQ ID NO: 1).
```

[0130]

[0131] SEQ ID NO: 1은 UniProt KB 식별자 Q96NY8-1에 상응하고, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0132] 본 개시의 일정 양태는 인간 넥틴-4, 또는 제한없이 포유동물 넥틴-4 단백질을 포함한 이의 동족체, 및 다른

중, 예를 들어, 비-인간 영장류, 마카카 파시쿨라리스 (*macaca fascicularis*) 유래의 넥틴-4 오솔로그에 결합하는 항-넥틴-4 항체를 제공한다.

- [0133] 용어 "HER2" (HER2/neu 및 ErbB-2로도 알려짐)는 "인간 상피 성장 인자 수용체 2"를 의미한다. 이것은 HER2의 변이체 및 이소폼을 포함한다.
- [0134] 용어 "면역접합체" 및 "항체 접합체"는 상호교환적으로 사용되고, 항원 결합체, 예를 들어, 다른 분자 (예를 들어, 캄프토테신 유도체, 엑사테칸 분자, SN-38 분자)에 접합된 항체 결합 폴리펩티드 또는 항체를 의미한다. 면역접합체가 치료제, 예를 들어, 세포독성제 또는 항암제에 접합된 항원 결합체를 포함할 때, 면역접합체는 또한 "항체 약물 접합체" 또는 "ADC"라고 할 수 있다. 세포독성제의 예는 캄프토테신, 탁산, 안트라사이클린, 캄프토테신, 에포틸론, 미토마이신, 콤프레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 마이탄시노이드, 갈리케아마이신, 두오카마이신, 튜블리신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴, 엔다이인, 피롤로벤조디아제핀, 및 에틸렌이민을 포함한다.
- [0135] 본 명세서에서 사용되는, "치료" 및 "치료하는" 등은 일반적으로 바람직한 약리학적 및 생리학적 효과를 수득하는 것을 의미한다. 이러한 효과는 질환, 이의 증상 또는 병태를 예방하거나 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방적일 수도 있고/있거나, 질환, 질환에 기인하는 병태, 증상 또는 부작용의 부분 또는 완전 치유의 관점에서 치료적일 수도 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 포유동물, 특히 인간에서 질환의 임의 치료를 포괄하고, (a) 예방적 조기 무증상적 중재같이 질환이 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 그것을 갖는다고 진단된 적이 없는 대상체에서 질환의 발생의 예방; (b) 예를 들어 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체에서, 질환의 억제, 예를 들어, 이의 발생의 저지; 또는 질환의 경감, 예를 들어 질환 및/또는 이의 증상 또는 병태의 퇴행 유발 예컨대 손상의 개선 또는 교정을 포함한다. 임의로, 치료는 중앙 부담의 감소, 병변 크기 및/또는 수의 감소, 암 진행의 감소 또는 지연 (예를 들어, 무진행 생존의 증가), 암 전이의 지연 또는 예방 및/또는 생존의 증가를 유발시킬 수도 있다 (예를 들어, 유발시키는 방법을 특징으로 할 수도 있음). 임의로, 치료는 예를 들어, 표준 기준, 임의로 RECIST 기준에 따라서, 대상체에서 안정한 질환, 부분 반응 또는 완전 반응을 유발할 수도 있거나 또는 제공할 수도 있다 (예를 들어, 유발 또는 제공 방법을 특징으로 할 수도 있음).
- [0136] "암의 치료" 등이 넥틴-4 결합체 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)에 대해서 언급될 때마다, 다음을 포함한다:
- [0137] (a) (a) 암의 치료 방법으로서, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는, 개체, 포유동물, 특히 인간에게 (적어도 하나의 치료를 위해서) 넥틴-4 결합체를, 암의 치료를 허용하는 용량 (치료적 용량)으로, 임의로 본 명세서에 명시된 바와 같은 용량 (양)으로 투여하는 단계를 포함하는 것인 치료 방법;
- [0138] (b) 암의 치료를 위한 넥틴-4 결합체의 용도;
- [0139] (c) (특히 인간에서) 암의 치료에서 사용을 위한 넥틴-4 결합체;
- [0140] (d) 암의 치료를 위한 약학 조제물의 제조를 위한 넥틴-4 결합체의 용도;
- [0141] (e) 넥틴-4 결합체를 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 암의 치료를 위한 약학 조제물의 제조를 위한 넥틴-4 결합체의 사용 방법;
- [0142] (f) 암의 치료에 적절한 넥틴-4 결합체의 유효 용량을 포함하는 약학 조제물;
- [0143] (g) 이 출원이 출원되는 국가에서 특허가 허용되는 대상 주제에 따라서, (a), (b), (c), (d), (e) 및 (f)의 임의 조합.
- [0144] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생검"은 예컨대 진단을 확인하기 위해서, 검사 목적의 조직 제거로서 정의된다. 생검 유형의 예는 예컨대 시린지에 부착된 바늘을 통한 흡인 적용; 조직 단편의 도구적 제거; 내시경을 통해 적절한 도구로 제거; 예컨대 전체 병변의 외과적 절제 등을 포함한다.
- [0145] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 다클론 및 단일클론 항체를 의미한다. 중쇄의 불변 도메인의 유형에 따라서, 항체는 다음의 5개 주요 부류 중 하나로 지정된다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM. 이들 중 몇몇은 하위부류 또는 이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등으로 더 분류된다. 예시적인 면역글로불린 (항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍을 포함하고, 각각의 쌍은 하나의 "경"쇄 (약 25 kDa) 및 하나의 "중"쇄 (약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄 ( $V_L$ ) 및 가변 중쇄 ( $V_H$ )는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응

하는 중쇄 불변 도메인은 각각 "알파", "델타", "엡실론", "감마" 및 "뮤"라고 한다. 면역글로불린의 상이한 부류의 하위단위 구조 및 3차원 입체배열은 충분히 공지되어 있다. IgG는 그들이 생리적 상황에서 가장 일반적인 항체이기 때문에, 그리고 실험실 상황에서 가장 쉽게 제조되기 때문에 본 명세서에서 적용되는 항체의 예시적인 부류이다. 임의로 항체는 단일클론 항체이다. 항체의 특정 예는 인간화, 키메라, 인간, 또는 달리-인간-적합한 항체이다. "항체"는 또한 임의의 본 명세서에 기술된 항체의 임의의 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0146] 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기는 또한 초가변 영역이라고 한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR" 유래의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al. 1991) 및/또는 "초가변 루프" 유래의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917), 또는 항원 결합을 담당하는 필수 아미노산을 결정하기 위한 유사한 체계를 포함한다. 전형적으로, 이 영역에서 아미노산 잔기의 번호매김은 [Kabat et al., 상동]에 기술된 방법으로 수행된다. 본 명세서에서 "카밧 (Kabat) 위치", "카밧에서와 같이 번호매김된 가변 도메인 잔기" 및 "카밧에 따른"과 같은 어구는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 이러한 번호매김 체계를 의미한다. 카밧 번호매김 체계를 사용하여서, 펩티드의 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 그로의 삽입에 상응하는 보다 소수의 또는 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 CDR H2의 잔기 52 이후에 단일 아미노산 삽입 (카밧에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 이후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카밧에 따라서, 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수도 있다. 잔기의 카밧 번호매김은 "표준" 카밧 번호매김된 서열과 항체 서열의 상동성 영역에서 정렬을 통해 소정 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0147] 용어 "특이적으로 결합하다"는 항체가 단백질의 재조합 형태, 그 안의 에피토프, 또는 단리된 표적 세포의 표면에 존재하는 천연 단백질을 사용하여 평가하는, 결합 파트너, 예를 들어, 넥틴-4에 대한 경쟁적 결합 어세이에서 바람직하게 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 경쟁적 결합 어세이 및 특이적 결합을 결정하는 다른 방법은 당분야에 충분히 공지되어 있다. 예를 들어, 결합은 방사선표지, 물리적 방법 예컨대 질량 분광법, 또는 예를 들어, 세포형광측정 분석 (예를 들어, FACScan)을 사용해 검출되는 직접 또는 간접 형광 표지를 통해서 검출될 수 있다. 대조군, 비특이적 작용제에서 보이는 양 이상의 결합은 그 작용제가 표적에 결합한다는 것을 의미한다.

[0148] 항체가 특정 단일클론 항체와 경쟁한다"고 말할 때, 항체는 재조합 분자 (예를 들어, 넥틴-4) 또는 표면 발현 분자 (예를 들어, 넥틴-4)를 사용하는 결합 어세이에서 단일클론 항체와 경쟁한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 시험 항체가 결합 어세이에서 넥틴-4 폴리펩티드 또는 넥틴-4-발현 세포에 대한 임의의 SEQ ID NO: 19의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 20의 각각의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체의 결합을 감소시키면, 그 항체는 이러한 항체와 각각 "경쟁한다"고 한다.

[0149] "세포내 내재화"와 상호교환적으로 사용되는, 용어 "내재화"는 세포의 세포외 표면에서 세포의 세포내 표면으로 분자를 전좌시키는 과정과 연관된 분자, 생화학 및 세포 사건을 의미한다. 분자의 세포내 내재화를 담당하는 과정은 충분히 공지되어 있고, 특히, 세포의 분자 (예컨대 호르몬, 항체, 및 소형 유기 분자)의 내재화; 막-회합 분자 (예컨대 세포-표면 수용체); 및 세포외 분자 (예를 들어, 경막 수용체에 결합된 리간드 또는 막-회합 분자에 결합된 항체)에 결합된 막-회합 분자의 복합체를 포함할 수 있다. 따라서, 내재화의 유도 및/또는 증가"는 세포내 내재화가 개시되고/되거나 세포내 내재화의 속도 및/또는 정도가 증가되는 사건을 포함한다.

[0150] 본 명세서에서 사용되는 용어 "친화성"은 에피토프에 대한 항체의 결합 강도를 의미한다. 항체의 친화성은  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ 로서 정의되는 해리 상수  $K_d$ 로 제공되고, 여기서  $[Ab-Ag]$ 는 항체-항원 복합체의 몰 농도이고,  $[Ab]$ 는 미결합된 항체의 몰 농도이고,  $[Ag]$ 는 미결합된 항원의 몰 농도이다. 친화성 상수  $K_a$ 는  $1/K_d$ 로 정의된다. 단일클론 항체의 친화성을 결정하는 방법은 다음의 문헌에서 확인할 수 있고, 이들은 참조하여 본 명세서에 전체로 편입된다: Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), 및 Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). 단일클론 항체의 친화성을 결정하기 위한 당분야에 충분히 공지된 한가지 표준 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 스크리닝의 사용이다 (예컨대, BIAcore™ SPR 분석 장비를 사용한 분석에 의함).

- [0151] 본 명세서의 상황 내에서, "결정부"는 폴리펩티드 상에서 상호작용 또는 결합의 부위를 의미한다.
- [0152] 용어 "에피토프"는 항원성 결정부를 의미하고 항체가 결합하는 항원 상의 면적 또는 영역이다. 단백질 에피토프는 결합에 직접적으로 관여되는 아미노산 잔기뿐만 아니라, 특이적 항원 결합 항체 또는 펩티드에 의해서 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기, 즉 항체의 "포트린트" 내 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 항체 또는 수용체와 조합될 수 있는 복합 항원 분자 상의 가장 작은 구조적 면적 또는 가장 단순한 형태이다. 에피토프는 선형일 수 있거나 또는 입체형태적/구조적일 수 있다. 용어 "선형 에피토프"는 아미노산의 선형 서열 (1차 구조) 상에서 인접하는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다. 용어 "입체형태적 또는 구조적 에피토프"는 모두 인접하는 것은 아니고 따라서 분자의 폴딩 (2차, 3차 및/또는 4차 구조)에 의해서 서로 인접하게 되는 아미노산의 선형 서열의 분리된 부분에 상응하는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다. 입체형태적 에피토프는 3-차 구조에 의존한다. 입체형태적 에피토프는 3-차 구조에 의존한다.
- [0153] 용어 "작용제"는 화학 화합물, 화학 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 재료로 만든 추출물을 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 용어 "치료제"는 생물학적 활성을 갖는 작용제를 의미한다.
- [0154] 용어 "Fc 도메인", "Fc 부분", 및 "Fc 영역"은 항체 중쇄의 C-말단 단편, 예를 들어, 인간  $\gamma$  (감마) 중쇄의 약 아미노산 (aa) 230 내지 약 aa 450 또는 다른 유형의 항체 중쇄 (예를 들어, 인간 항체 경우  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  및  $\mu$ ), 또는 이의 천연 발생 알로타입에서 이의 대응 서열을 의미한다. 달리 명시하지 않으면, 번역글로불린에 대해 공통적으로 허용되는 카바트 아미노산 번호매김이 본 개시 전반에서 사용된다 (참조: Kabat *et al.* (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).
- [0155] 본 명세서에서 사용되는 "프레임워크" 또는 "FR" 잔기란 CDR로서 정의되는 영역을 제외한 항체 가변 도메인의 영역을 의미한다. 각각의 항체 가변 도메인 프레임워크는 CDR에 의해 분리된 연속적인 영역으로 더 세분될 수 있다 (FR1, FR2, FR3 및 FR4).
- [0156] 용어 "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"은 이의 천연 상태에서 발견되는 대로 정상적으로 그것을 동반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 재료를 의미한다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석적 화학 기술 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액상 크로마토그래피를 사용해 결정된다. 조제물에 존재하는 미세한 중의 단백질이 실질적으로 정제된다.
- [0157] 용어 "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하고자 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비-천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.
- [0158] 예를 들어, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터에 대해서 사용될 때 용어 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래되는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연 (비재조합) 형태 내에 존재하지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 달리 비정상적으로 발현되거나, 과소 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.
- [0159] 본 명세서의 상황 내에서, 용어 폴리펩티드 또는 에피토프에 "결합하는" 항체는 특이성 및/또는 친화성을 갖는 상기 결합부에 결합하는 항체를 의미한다.
- [0160] 둘 이상의 폴리펩티드의 서열 간 관계에서 사용될 때 용어 "동일성" 또는 "동일한"은 둘 이상의 아미노산 잔기의 스트링 간에 일치부의 개수로 결정되는, 폴리펩티드 간 서열 관련 정도를 의미한다. "동일성"은 특정 수학 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")으로 처리되는 겹 정렬 (존재하는 경우)을 사용하는 둘 이상의 서열 중 더 작은 것 간에 동일한 일치부의 백분율을 측정한다. 관련 폴리펩티드의 동일성은 공지 방법을 통해서 쉽게 계산될 수 있다. 이러한 방법은 하기 문헌에 기술된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 및 Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

- [0161] 동일성을 결정하기 위한 방법은 시험된 서열들 간에 최대 일치율을 제공하도록 디자인된다. 동일성을 결정하는 방법은 공공으로 입수가 가능한 컴퓨터 프로그램에서 설명된다. 2개 서열 간 동일성을 결정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법은 GAP을 포함한, GCG 프로그램 패키지 (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))를 포함한다. BLASTX 프로그램은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 및 다른 출처 (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, *supra*)에서 공공으로 입수가 가능하다. 충분히 공지된 Smith Waterman 알고리즘이 또한 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0162] 본 명세서에서 사용되는, "알킬"은 완전 포화된 (이중 또는 삼중 결합 없음) 탄화수소 기를 포함하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬을 의미한다. 알킬 기는 예를 들어, 1 내지 20개 탄소 원자를 가질 수 있다 (이것이 본 명세서에서 보일 때마다, 수치 범위 예컨대 "1 내지 20"은 소정 범위의 각 정수를 의미하고; 예를 들어, "1 내지 20개 탄소 원자"는 알킬 기가 1개 탄소 원자, 2개 탄소 원자, 3개 탄소 원자 등으로 이루어질 수도 있고, 20개 탄소 원자까지를 포함하는 것을 의미할 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 명시되지 않은 용어 "알킬"의 존재를 포괄함). 화합물의 알킬 기는 "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬" 또는 유사한 명칭으로서 표시될 수도 있다. 단지 예로서, "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬"은 알킬 사슬에 1개 내지 4개 탄소 원자가 존재한다는 것을 의미하고, 다시 말해, 알킬 사슬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 및 t-부틸로부터 선택된다. 전형적인 알킬 기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 3차 부틸, 펜틸 및 헥실을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 알킬 기는 치환될 수도 있거나 또는 비치환될 수도 있다.
- [0163] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헤테로알킬"은 하나 이상의 탄소 원자의 위치에 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 탄소 이외의 원소 (산소, 황, 질소, 인을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 알킬 기를 의미한다.
- [0164] 기가 "치환된" 것으로 설명될 때마다 그 기는 표시된 치환기 중 하나 이상으로 치환된다. 치환기가 표시되지 않은 경우에, 표시된 "치환된" 기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 헤테로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로알리시클릴, 아르알킬, 헤테로아르알킬, (헤테로알리시클릴)알킬, 히드록시, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 머캡토, 알킬티오, 아릴티오, 시아노, 할로젠, 티오카르보닐, 카바미, 티오카바미, 아미도, 술폰아미도, 술폰아미도, 카르복시, 이소시아네이트, 티오시아네이트, 이소티오시아네이트, 니트로, 실릴, 술페닐, 술페닐, 술폰, 할로알킬, 할로알콕시, 트리할로메탄술폰, 트리할로메탄술폰아미도, 아미노, 모노-치환된 아미노 기 및 디-치환된 아미노 기, 및 이의 보호된 유도체로부터 독립적으로 그리고 개별적으로 선택된 하나 이상의 기(들)로 치환될 수도 있다는 것을 의미한다.
- [0165] 치환기의 개수가 명시되지 않은 경우 (예를 들어, 할로알킬), 하나 이상의 치환기가 존재할 수도 있다. 예를 들어, "할로알킬"은 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 할로젠을 포함할 수도 있다. 다른 예로서, "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시페닐"은 1개, 2개 또는 3개 원자를 함유하는 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 알콕시 기를 포함할 수도 있다.
- [0166] 문맥에서 달리 명확하게 표시하지 않으면, 특정 번호를 갖는 "화합물" 또는 "화합식"에 대한 언급 (예를 들어, "화합물 1", "화합물 2", "화합식 I" 또는 "화합식 II")은 특정 번호를 갖는 화합물 또는 화합식으로부터 유래되는 모든 화합물을 의미한다. 예를 들어, 화합물 1은 화합물 1a 및 1b에 대한 언급을 포함한다.
- [0167] **항체 및 항체 단편의 생산**
- [0168] 초가변 영역, 중쇄 및 경쇄 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 및 단백질, 예를 들어 그들을 포함하는, 전체 길이 항체 또는 항체 단편, 다중특이적 항원-결합 단백질, 키메라 항원 수용체는 세포, 예를 들어 종양 세포 표면 상에서 발현되는 인간 넥틴-4에 결합하게 된다. 일 구현예에서, 항체에 의한 넥틴-4-결합은 단일 항원 결합 도메인에 의해서 또는 2개의 동일한 항원 결합 도메인에 의해 매개되고, 임의로 각각의 항원 결합 도메인은 VH 및 VL 도메인 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 VH 또는 VL 가변 도메인이 제공되고; 이러한 도메인은 예를 들어 별도로 발현되고 생산된 폴리펩티드로 통합된 다음에, 조합되어서 넥틴-4 결합 도메인을 형성할 수 있다.
- [0169] 면역접합체 또는 비-접합 ("나형") 항체 (예를 들어, 임의로 별도로 투여되는 세포독성제와 병용)로서, 넥틴-4-발현 종양 세포의 제거를 위한 요법에서 사용될 때, 넥틴-4 결합 항체 (예를 들어, 전체-길이 항체, 항체 단편)

또는 이러한 항체를 포함하는 단백질, 접합체 또는 복합체는 예를 들어, 세포 클러스터 형성 (예를 들어, 3-차원 세포 배양 시스템에서, 중앙 회전 타원체 형성 또는 성장의 평가에 의함) 및/또는 넥틴-4 발현 세포의 앵커리지-독립적 성장을 평가하여 결정되는, 넥틴-4에 의해 매개되는 세포-세포 상호작용을 유리하게 억제할 수도 있다. 세포독성제와 면역접합체로서 또는 별도로 투여되는 세포독성제와 병용하여 비접합 ("나형") 항체로서 넥틴-4-발현 중앙 세포의 제거를 위한 요법에서 사용될 때, 넥틴-4 결합 항체는 세포독성제에 대해서 중앙을 유리하게 감작시킬 수도 있고, 예를 들어, 항체는 중앙 세포의 증식을 억제하거나 또는 사멸을 유발시키는, 예를 들어, 클러스터 (예를 들어, 회전 타원체)로 존재하는 중앙 세포의 증식을 억제하거나 또는 사멸을 유발하거나, 또는 중앙 세포 클러스터 (예를 들어, 회전 타원체)의 형성 또는 성장을 억제하는 세포독성제의 능력을 증강시킬 수도 있다. 면역접합체로서 넥틴-4-발현 중앙 세포의 제거를 위한 요법에서 사용될 때, 항-넥틴-4 면역접합체는 본 명세서에 개시된 세포독성 분자에 접합될 때 넥틴-4-발현 중앙 세포의 사멸을 유리하게 유발시킬 수도 있다.

[0170] Pgp를 발현하는 중앙 세포는 일정 세포독성제에 대해 감소된 민감도를 가질 수 있다. 항체 및 세포독성제 (세포독성제가 항체에 접합되는지 여부와 무관)는 임의로 Pgp를 발현하는 세포 (예를 들어, 중앙 세포)를 사용하여 시험될 수 있다.

[0171] 중앙 회전 타원체는 부분적으로 그들 구조에 의해 제공되는 보호뿐만 아니라, 또한 그들의 느린 증식률때문에, 일반적으로 화학요법에 덜 민감하고, 결론적으로 항체 또는 면역접합체의 항-중앙 효과를 평가하는데 유용할 수 있다. 항체 또는 면역접합체는 농도-의존적 방식으로 회전 타원체 형성을 억제하거나, 또는 암 세포 회전 타원체 형성을 파괴하는 능력에 대해서 시험될 수 있다. 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 실시간 디지털 사진술을 사용하여 상이한 암 세포주에서 회전 타원체 형성을 변경시키는 그들 능력에 대해서 시험될 수 있다.

[0172] 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 단일 세포로서 암 세포를 유지 (또는 이의 유지를 증가)시킬 수 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 그리하여 이러한 세포는 세포독성제 (예를 들어, 화학요법제)에 더 민감성이게 될 수도 있다. 화학요법제에 대한 민감도를 증가시키기 위해서 단일 세포로서 암 세포의 유지의 촉진은 상이한 화학요법제 (예를 들어, 독소루비신, 시스플라틴, 파클리탁셀, 캄프토테신 또는 캄프토테신 유사체)를 별도로 또는 항체 또는 면역접합체의 존재 하에서 상이한 농도로 병용하여 첨가하여서 시험관내에서 시험할 수 있고, 임의로 또한 오로지 Ig-유사 V 도메인 또는 Ig-유사 C2-1형 또는 2형 도메인에 결합하는 항체 또는 면역접합체와 비교된다. 화학요법제에 대한 민감도를 증가시키기 위해서 단일 세포로서 암 세포의 유지는 예를 들어, 또한 상이한 독소를 갖는 넥틴-4의 상이한 도메인을 표적화하는 상이한 면역접합체를 첨가하여서 시험관내에서 또한 시험할 수 있고, 여기서 화학요법제 또는 ADC의 IC50 은 항체가 넥틴-4의 VC1 도메인에 결합하는 경우에 더 낮아질 것이거나, 또는 중앙 성장을 제어하는데 사용되는 용량은 항체가 넥틴-4의 VC1 도메인에 결합하는 경우에 ADC에 대해 더 낮을 것이다. 화학요법제에 대한 민감도는 세포 생존능, 세포 증식 또는 세포독성으로서 평가될 수 있고, 예를 들어, 상이한 관독, 예컨대 발광에 의한 CTG, Incucyte 또는 캐스파제 3/7 또는 아넥신 V를 사용한 합류를 사용해 모니터링될 수 있다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 야생형 인간 넥틴-4 폴리펩티드, 예를 들어, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 비롯하여, SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 갖는 변형된 인간 넥틴-4 폴리펩티드 (Ig-유사 C2 1형 및 2형 도메인을 함유하지만 Ig-유사 V형 도메인은 결여된 넥틴-4 단백질)에 결합한다. 임의로, 항체는 Ig-유사 V형 도메인이 결여된 폴리펩티드에 대한 부분 결합을 보유하고, 임의로 항체는 야생형 넥틴-4 단백질에 대한 결합과 비교하여 감소된 수준으로 Ig-유사 V형 도메인이 결여된 넥틴-4 단백질에 대한 결합을 유지하며, 예를 들어, 감소된 수준은 야생형 넥틴-4의 결합의 5-50% 사이, 임의로 5-30% 사이, 임의로 5-25% 사이, 임의로 5-15% 사이이다. 임의로 또한 항-넥틴-4 항체는 Ig-유사 V형 및 Ig-유사 C2 1형 도메인 둘 모두가 결여된 넥틴-4 폴리펩티드, 예를 들어, SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 결합하지 않는다. 임의로, 결합은 넥틴-4 폴리펩티드를 발현하도록 만든 세포를 사용하는 유세포측정을 통해서 평가되고 형광 강도 수준 (예를 들어, MFI)이 결정된다.

[0173] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 인간 넥틴 1 단백질, 인간 넥틴 2 단백질, 인간 넥틴 3 단백질 및 인간 PVR 단백질 중 어느 것에도 결합하지 않는다. 각각의 넥틴 또는 PVR 단백질은 세포의 표면에서 발현되는 것으로 명시될 수 있다.

[0174] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은

[0175] SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 넥틴-4 폴리펩티드, 및

[0176] SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 갖는 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하고 (임의로 감소된 수준으로, 임의로 SEQ ID NO: 1에 대한 결합과 비교하여 5-50% 사이의 수준), 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은

- [0177] SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드,
- [0178] SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드,
- [0179] SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및
- [0180] SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드
- [0181] 중 어느 것에도 결합하지 않는다.
- [0182] 임의로 또한, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 결합하지 않는다.
- [0183] 임의로 또한, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 래트 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열)에 결합한다.
- [0184] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 넥틴-4의 VC1 가교 도메인, 에피토프 또는 결정부에 결합한다.
- [0185] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 A72, G73, S195, K197, S199, L150, S152, Q234 및 I236 (SEQ ID NO: 1에 포함)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 잔기에서 인간 넥틴-4에 결합한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항원 결합 단백질 또는 항체는 K197, S199 및 Q234로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개 잔기, 임의로 잔기 K197 및/또는 S199에서 인간 넥틴-4에 결합한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 인간 넥틴-4의 잔기 K197에 결합한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 인간 넥틴-4의 잔기 S199에 결합한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 인간 넥틴-4의 잔기 Q234에 결합한다. 결합은 예를 들어, 항체 또는 항체 단편이 상기 잔기가 상이한 잔기로 치환된 돌연변이체 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 세포 표면에서 발현)에 대한 결합이 감소 또는 상실되었는지 여부를 평가하여서 결정될 수 있다.
- [0186] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 Ig-유사 V형 도메인 및 Ig-유사 C2 1형 도메인 둘 모두, 예를 들어, Ig-유사 V형 도메인 상의 결정부 또는 에피토프 및 Ig-유사 C2 1형 도메인 상의 결정부 또는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0187] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 Ig-유사 C2 1형 도메인은 포함하지만 Ig-유사 V형 도메인은 결여된 변형된 넥틴-4 폴리펩티드, 예를 들어, SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열의 전부 또는 일부가 결여된 넥틴-4 폴리펩티드에 대한 적어도 부분 결합을 보유한다. 부분 결합은 SEQ ID NO: 1의 잔기의 아미노산 서열을 갖는 야생형 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 대한 결합과 비교하여 (예를 들어, 유세포측정으로 평가하여) 낮은 수준으로, 결합을 보유하는 것을 특징으로 할 수 있다. 넥틴-4 폴리펩티드는 세포 (예를 들어, 폴리펩티드(들)를 발현하도록 만든 숙주 세포)의 표면에서 발현되는 것으로 명시될 수 있다.
- [0188] 항체는 당분야에 공지된 다양한 기술을 통해서 생산될 수 있다. 전형적으로, 그들은 넥틴-4 폴리펩티드, 바람직하게 인간 넥틴-4 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로, 비-인간 동물, 바람직하게 마우스의 면역화를 통해서 생산된다. 넥틴-4 폴리펩티드는 인간 넥틴-4 폴리펩티드의 전체 길이 서열, 또는 이의 단편 또는 유도체, 전형적으로 면역원성 단편, 즉 넥틴-4 폴리펩티드를 발현하는 세포의 표면 상에 노출된 에피토프, 예를 들어 5E7 항체가 인식하는 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 일부분을 포함할 수도 있다. 넥틴-4 폴리펩티드는 VC1 가교 도메인 또는 이의 단편 또는 하위서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것으로서 명시될 수 있다. 이러한 단편은 전형적으로 성숙한 폴리펩티드 서열의 적어도 약 7개 연속 아미노산, 보다 더 바람직하게 이의 적어도 약 10개 연속 아미노산을 함유한다. 전형적으로 단편은 수용체의 세포의 도메인으로부터 본질적으로 유래된다. 일 구현예에서, 면역원은 지질막에, 전형적으로 세포의 표면에서 야생형 인간 넥틴-4 폴리펩티드를 포함한다. 특별한 구현예에서, 면역원은 임의로 처리되거나 또는 용해된, 온전한 세포, 특히 온전한 인간 세포를 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 폴리펩티드는 재조합 넥틴-4 폴리펩티드이다. 특별한 구현예에서, 면역원은 온전한 넥틴-4-발현 세포를 포함한다.
- [0189] 비-인간 포유동물을 항원으로 면역화하는 단계는 마우스에서 항체의 생산을 자극하기 위한 당분야에 충분히 공지된 임의 방식으로 수행될 수도 있다 (참조: 예를 들어, E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), 이의 전체 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨).

- [0190] 항체는 또한 예를 들어, 다음의 문헌에 개시된 바와 같이, 면역글로불린의 조합 라이브러리의 선택을 통해서 생산될 수도 있다 (Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544, 이의 전체 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨).
- [0191] 본 명세서는 최종 항-넥틴-4 가변 영역이 넥틴-4 발현 세포에서 결합 및 내재화에 높은 역가를 갖도록 항체 CDR이 통합될 수 있는 변형된 인간 엑셉터 프레임워크 서열을 제공한다. 이 항체는 인간에서 낮거나 또는 감소된 면역원성을 갖고, 예를 들어 인간에게 투여 시에 원치않는 항-넥틴-4 항체 유도된 면역 반응을 야기하는 낮은 능력 또는 가능성을 갖는다는 장점을 갖는다. 본 개시의 이러한 항체의 예는 L0, L1, L2 또는 L3 VL 도메인과 조합된 H0, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 또는 H10 VH 도메인을 포함하는 항체를 포함한다. 본 개시의 항체의 예는 항체 H0+L0, H1+L0, H2+L0, H3+L0, H3+L1, H3+L2, H3+L3, H4+L1, H4+L2, H4+L3, H5+L1, H5+L2, H5+L3, H6+L1, H6+L2, H6+L3, H7+L1, H7+L2, H7+L3, H8+L1, H9+L1 및 H10+L1 중 어느 하나의 VH 및 VL 도메인 쌍을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0192] 일 양태에서, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 인간 기원 (예를 들어, 인간 아미노산 서열로부터 유래)의 VH 및 VL 프레임워크 (예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 FR4)를 포함한다. 일 양태에서, 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 21로 기재되는 아미노산 서열 SYWMH를 포함하는 HCDR1 (중쇄 CDR1); SEQ ID NO: 22로 기재되는 아미노산 서열 EIDPSDSYTNYNQKFKG를 포함하는 HCDR2 (중쇄 CDR2); SEQ ID NO: 23으로 기재되는 아미노산 서열 GYGNVGDY를 포함하는 HCDR3 (중쇄 CDR3); SEQ ID NO: 24로 기재되는 아미노산 서열 RSSKSLLSNGITYLY를 포함하는 LCDR1; SEQ ID NO: 25로 기재되는 아미노산 서열 QMSNLAS를 포함하는 LCDR2; SEQ ID NO: 26으로 기재되는 아미노산 서열 AQNLELPWT를 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0193] 일 구현예에서, 항체는 인간 하위그룹 IGHV1-46 (임의로 IGHJ4, 바람직하게 IGHJ4\*01과 함께)으로부터 유래되는 중쇄 프레임워크를 포함하고, 임의로 IGHV1-46은 IGHV1-46\*01이다. 일 구현예에서, 항체는 인간 하위그룹 IGKV2-28 (임의로 IGKJ, 바람직하게 IGKJ4\*01과 함께)로부터 유래되는 경쇄 프레임워크를 포함하고, 임의로 IGKV2-28은 IGKV2-28\*01이다.
- [0194] 항체는 예를 들어, 항체의 친화성, 안정성 또는 다른 성질을 증강시키기 위해서, 인간 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크에 걸쳐서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 아미노산 치환을 더 포함할 수도 있다.
- [0195] 임의로, 임의 구현예에서, 항체는 쥐 부모 항체, 예를 들어 각각 SEQ ID NO: 19 및 20의 VH 및 VL을 갖는 쥐 부모 항체 이외의 항체로서 명시될 수 있다.
- [0196] 임의로, 인간 프레임워크는 비-인간 포유동물 (예를 들어, 마우스)의 특정 위치에 존재하는 잔기를 도입시키기 위한 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 역돌연변이를 포함한다. 임의로, 항체의 중쇄 가변 영역의 인간 프레임워크는 28, 38, 40, 48, 69, 71, 73 또는 78로부터 선택되는 카뮈 위치에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 돌연변이를 포함한다.
- [0197] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 28의 트레오닌 잔기는 트레오닌 잔기로 치환된다.
- [0198] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 38의 아르기닌 잔기는 리신 잔기로 치환된다.
- [0199] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 40의 알라닌 잔기는 아르기닌 잔기로 치환된다.
- [0200] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 48의 메티오닌 잔기는 이소류신 잔기로 치환된다.
- [0201] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 69의 메티오닌 잔기는 류신 잔기로 치환된다.
- [0202] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 71의 아르기닌 잔기는 류신 잔기로 치환된다.
- [0203] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 73의 트레오닌 잔기는 리신 잔기로 치환된다.
- [0204] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 중쇄 위치 78의 발린 잔기는 트레오닌 잔기로 치환된다.
- [0205] 임의로, 항체의 경쇄 가변 영역의 인간 프레임워크는 2, 8, 11 또는 64로부터 선택되는 카뮈 위치에 1개, 2개, 3개 또는 4개 돌연변이를 포함한다.
- [0206] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 경쇄 위치 2의 이소류신 잔기는 발린 잔기로 치환된다.
- [0207] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 경쇄 위치 8의 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환된다.
- [0208] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뮈 경쇄 위치 11의 류신 잔기는 아스파라긴으로 치환된다.

- [0209] 본 명세서의 임의 구현예의 일 양태에서, 카뭇 경쇄 위치 64의 글리신 잔기는 세린 잔기로 치환된다.
- [0210] 본 명세서에서 VH 및 VL 도메인의 위치는 카뭇 번호매김 체계를 사용하여 설명된다 (Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).
- [0211] 일 양태에서, 단리된 항-넥틴-4 인간화 단일클론 항체, 또는 이의 단편은 SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 또는 57 중 어느 것의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 59, 61, 63 또는 65 중 어느 것의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0212] 일 양태에서, 단리된 항-넥틴-4 인간화 단일클론 항체, 또는 이의 단편은 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄 가변 영역 (H5) 및 SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (L3)을 포함한다.
- [0213] 일 구현예에서, SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성, 또는 100% 동일성)을 갖는 경쇄를 포함하는, 항-넥틴-4 항체를 제공한다.
- [0214] 항체를 코딩하는 DNA를 제조하여 적절한 숙주로 형질감염을 위한 적절한 발현 벡터에 배치된다. 이어서, 숙주는 항체, 또는 이의 변이체, 예컨대 단일클론 항체의 인간화된 형태, 항체의 활성 단편, 항체의 항원 인식 부분을 포함하는 키메라 항체, 또는 검출가능한 모이어티를 포함하는 형태의 재조합 생산에 사용된다.
- [0215] 본 개시의 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적 절차 (예를 들어, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 사용에 의함)를 사용해 쉽게 단리 및 시퀀싱할 수 있다. 일 양태에서, 본 명세서의 임의의 구현예의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 핵산을 제공한다. 단리되면, DNA는 발현 벡터에 배치될 수 있고, 이어서 달리 번역글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포로 형질감염되어서, 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체의 합성을 수득한다. 이러한 DNA 서열은 임의의 다수의 목적을 위해서, 예를 들어, 항체를 인간화하기 위해서, 단편 또는 유도체를 생산하기 위해서, 또는 예를 들어, 항체의 결합 특이성을 최적화하기 위해 항원 결합 부위에서, 항체의 서열을 변형시키기 위해서, 변형될 수 있다. 일 구현예에서, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 단리된 핵산 서열을 비롯하여, 이러한 핵산을 (예를 들어, 이의 게놈에) 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현은 당분야에서 충분히 공지되어 있다 (참조: 예를 들어, Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); 및 Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992)).
- [0216] 항체의 단편 및 유도체 (달리 명시하지 않거나 또는 문맥에서 명백하게 모순되지 않으면, 본 출원에서 사용되는 용어 "항체" 또는 "항체들"에 포괄됨)는 당분야에 공지된 기술을 통해 생산될 수 있다. "단편"은 온전한 항체의 일부분, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 연속적인 아미노산 잔기 중 하나의 연속적 서열로 이루어진 1차 구조를 갖는 폴리펩티드인 임의의 항체 단편 (본 명세서에서 "단쇄 항체 단편" 또는 "단쇄 폴리펩티드"라고 함); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 포함한다. 예를 들어, 다중특이적 단백질은 본 명세서의 임의의 구현예의 항체의 추가변 영역 (예를 들어, VH 및 VL) 및 상이한 항체, 예를 들어 넥틴-4 이외의 관심 항원에 결합하는 항체의 추가변 영역 (예를 들어, VH 및 VL)을 포함할 수 있다.
- [0217] 전형적으로, 본 명세서에 제공되는 항-넥틴-4 항체는 약  $10^4$  내지 약  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  (예를 들어, 약  $10^7$  내지 약  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) 범위의 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 본 명세서의 실시예에서 생산되는 넥틴-4 폴리펩티드)에 대한 친화성을 갖는다. 예를 들어, 특정한 양태에서, 본 개시는 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 스크린 (예컨대 BIAcore™ SPR 분석 장치를 사용한 분석)으로 결정하여, 넥틴-4에 대해서  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  미만의 평균 해리 상수 ( $K_D$ )를 갖는 항-넥틴-4 항체를 제공한다. 보다 특정한 예시적인 양태에서, 본 개시는 넥틴-4에 대한 약  $1 \times$

$10^{-7}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-10}$  M의  $K_D$ 를 갖는 항-넥틴-4 항체를 제공한다.

[0218] 항체는 예를 들어, 약 200, 150, 100, 80, 70, 60, 40, 30, 또는 25 나노몰 이하의 평균 KD (즉, 이에 비해 더 나은 친화성)를 특징으로 할 수 있다. KD는 예를 들어, 칩 표면 상에 재조합적으로 생산된 인간 넥틴-4 단백질을 고정시키고, 이어서 용액 중에 시험하려는 항체의 적용을 통해서 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 방법은 단계 (d), 대조군 항체와 넥틴-4에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있는 항체를 (b)에서 선택하는 단계를 더 포함한다.

[0219] 항-넥틴-4 항체는 인간 Fc $\gamma$  수용체에 대한 실질적인 결합을 가질 수도 있거나 또는 갖지 않을 수도 있다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 인간 Fc $\gamma$  수용체에 대한 결합을 유지하는 인간 IgG1 이소타입의 Fc 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 인간 Fc $\gamma$  수용체, 예를 들어 CD16A에 대한 결합을 증가시키기 위해서 (예를 들어, 치환의 도입을 통해) 변형된 인간 IgG1 이소타입의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 인간 Fc $\gamma$  수용체, 예를 들어, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및/또는 CD64 중 어느 하나 이상에 대한 실질적인 결합을 갖지 않도록 제조될 수 있다. 이러한 항체는 Fc $\gamma$  수용체에 대해 낮은 결합을 갖거나 또는 결여된 것으로 알려진 다양한 중쇄의 불변 영역을 포함할 수도 있다. 대안적으로, 불변 영역을 포함하지 않는 (또는 그의 일부를 포함하는) 항체 단편, 예컨대 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 Fc 수용체 결합을 피하는데 사용될 수 있다. Fc 수용체 결합은 예를 들어 BIACORE 어세이에서 Fc 수용체 단백질에 대한 항체의 결합을 시험하는 단계를 포함하는, 당분야에 공지된 방법에 따라서 평가될 수 있다. 또한, 일반적으로 임의의 항체 IgG 이소타입은 Fc 부분이 Fc 수용체에 대한 결합을 최소화하거나 또는 제거하기 위해 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 아미노산 치환을 도입시켜서) 변형되는데 사용될 수 있다 (참조: 예를 들어, WO 03/101485, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨). Fc 수용체 결합을 평가하기 위한 이러한 어세이는 당분야에 충분히 공지되어 있고, 예를 들어 WO 03/101485에 기술된다. 칩목 Fc IgG1 항체의 예는 IgG1 Fc 아미노산 서열에 L234A 및 L235A 돌연변이를 포함하는 LALA 돌연변이체이다. Fc 칩목 돌연변이의 다른 예는 예를 들어 DAPA (D265A, P329A) 돌연변이 (US 6,737,056)처럼 IgG1 항체에서 사용되는 바와 같은 잔기 D265, 또는 D265 및 P329에서의 돌연변이이다. 다른 칩목 IgG1 항체는 잔기 N297에 돌연변이 (예를 들어, N297A, N297S 돌연변이)를 포함하고, 이것은 무글리코실화/비글리코실화 항체가 생성된다. 다른 칩목 돌연변이는 잔기 L234 및 G237에서 치환 (L234A/G237A); 잔기 S228, L235 및 R409에서 치환 (S228P/L235E/R409K,T,M,L); 잔기 H268, V309, A330 및 A331에서 치환 (H268Q/V309L/A330S/A331S); 잔기 C220, C226, C229 및 P238에서 치환 (C220S/C226S/C229S/P238S); 잔기 C226, C229, E233, L234 및 L235에서 치환 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A); 잔기 K322, L235 및 L235에서 치환 (K322A/L234A/L235A); 잔기 L234, L235 및 P331에서 치환 (L234F/L235E/P331S); 잔기 234, 235 및 297에서 치환; 잔기 E318, K320 및 K322에서 치환 (L235E/E318A/K320A/K322A); 잔기에서 치환 (V234A, G237A, P238S); 잔기 243 및 264에서 치환; 잔기 297 및 299에서 치환; EU 번호매김 체계에 의해 정의된 잔기 233, 234, 235, 237, 및 238가 PAAAP, PAAAS 및 SAAAS로부터 선택되는 서열을 포함하게 하는 치환 (참조: WO2011/066501)을 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330, 331 및 409로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 어느 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상에서 중쇄 불변 영역에 치환을 갖는다 (중쇄 불변 영역의 잔기의 번호매김은 카밧에 따른 EU 번호매김에 따름).

[0220] 본 명세서에서 사용되는 단축 표기법에서, 형식은 다음과 같다: 야생형 잔기: 폴리펩티드 내 위치: 돌연변이체 잔기, 여기서 잔기 위치는 카밧에 따른 EU 번호매김에 따라 표시된다.

[0221] 특별한 구현예에서, 단일클론 항체 5E7과 본질적으로 동일한 에피토프 또는 결정부에 결합하는 항체가 제공되고; 임의로 항체는 항체 5E7의 초가변 영역을 포함한다. 본 명세서의 임의의 구현예에서, 항체 5E7은 아미노산 서열 및/또는 이를 코딩하는 핵산 서열을 특징으로 할 수 있다. 일 구현예에서, 단일클론 항체는 5E7의 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 부분을 포함한다. 또한, 5E7의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 일 구현예에 따라서, 항체 또는 항체 단편은 5E7의 중쇄 가변 영역의 3개 CDR을 포함한다. 또한 5E7의 가변 경쇄 가변 영역, 또는 5E7의 경쇄 가변 영역의 CDR의 1, 2, 또는 3개를 더 포함하는 항체 또는 항체 단편이 제공된다. HCDR1, 2, 3 및 LCDR1, 2, 3 서열은 임의로 모두가 (또는 각각, 독립적으로) 카밧 번호매김 체계의 것, 초티아 번호매김 체계의 것, IMGT 번호매김의 것, 또는 임의의 다른 적합한 번호매김 체계에 의한 것으로 명시될 수 있다. 임의로 상기 경쇄 또는 중쇄 CDR의 어느 하나 이상은 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 아미노산 변형 (예를 들어, 치환, 삽입 또는 결실)을 함유할 수 있다.

[0222] 일 양태에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO: 19의 VH 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서

열 동일성, 임의로 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V<sub>H</sub> 도메인을 포함한다. 다른 양태에서, 항-넥틴-4 항체는 SEQ ID NO: 20의 VL 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서열 동일성, 임의로 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 V<sub>L</sub> 도메인을 포함한다.

[0223]

VH 및 VL은 인간 억셉터 프레임워크를 포함한다 (예를 들어, 그를 도입하도록 변형됨). 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카바트 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카바트 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 카바트 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 카바트 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 VL을 포함한다.

**5E7 VH:**

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDPSDSTNYNQKFKGKA  
TLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 19)

**5E7 VL:**

DVVMTQAAAFSNPVTTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAG  
VPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

**5E7 CDR:**

카바트:	CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H2	EIDPSDSTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 22)
	CDR-H3	GYGNYGDY (SEQ ID NO: 23)
	CDR-L1	RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 24)
	CDR-L2	QMSNLS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 26)

[0224]

IMGT:	CDR-H1	GYIFTSYW (SEQ ID NO: 27)
	CDR-H2	IDPSDSTY (SEQ ID NO: 28)
	CDR-H3	VRGYGNYGDY (SEQ ID NO: 29)
	CDR-L1	KSLLSNGITY (SEQ ID NO: 30)
	CDR-L2	QMS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 26)

초티아 :	CDR-H1	GYIFTSY (SEQ ID NO: 32)
	CDR-H2	PSDS (SEQ ID NO: 33)
	CDR-H3	YGNYG (SEQ ID NO: 34)
	CDR-L1	SKSLLSNGITY (SEQ ID NO: 35)
	CDR-L2	QMS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	NLELPW (SEQ ID NO: 36)

[0225]

[0226]

일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체는 예를 들어 SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 또는 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 59, 61, 63 또는 65의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수도 있다. 항-넥틴-4 항체는 예를 들어 아미노산 서열: SYWMH (SEQ ID NO: 21), 또는 적어도 4개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 HCDR1로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: EIDPSDSTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 22), 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 HCDR2로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: GYGNYGDY (SEQ ID NO:

23), 또는 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 HCDR3으로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: RSSKSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 24), 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 LCDR1로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: QMSNLAS (SEQ ID NO: 25) 또는 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 LCDR2 영역으로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: AQNLELPWT (SEQ ID NO: 26), 또는 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 이의 아미노산의 서열을 포함하는 LCDR3 영역으로서, 임의로 이들 아미노산 중 하나 이상은 결실될 수도 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수도 있는 것인 LCDR3 영역을 포함할 수도 있다. CDR 위치는 카뱃 번호매김에 따를 수도 있다.

[0227] 유리하게, 본 개시의 항체는 항체-접합체를 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 항체-접합체를 제조하기 위한 방법은 세포독성제 (Z)를 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편에 접합시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 세포독성제 (Z)는 링커 (X)를 통해서 항체 또는 단편에 접합되는 것으로 명시될 수 있다. X는 항체 또는 단편 (Ab) 및 세포독성제 (Z)를 연결하는 링커인데, 예를 들어, 접합 시, X는 Ab 및 Z 중 하나 또는 양쪽에 공유 연결 이후 링커의 잔기이다.

[0228] 본 명세서의 구현예에서, 항체-약물 접합체를 제조하기 위한 방법은 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편 (Ab)을 세포독성제 (Z)와 접촉 및/또는 반응시키는 단계를 포함한다. 접촉은 본 개시의 양태의 항체 약물 접합체가 형성되거나 또는 획득되도록 하는 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, Z는 세포독성제 (Z) 및 링커 (X) 또는 링커 (X)의 일부를 포함하는 화합물에 포함될 수도 있어서, 이 단계는 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 세포독성제 (Z) 및 링커 (X) 또는 링커 (X)의 일부를 포함하는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 방법은 임의로 형성된 항체 약물 접합체를 단리 또는 회수하는 단계, 및 임의로, 약물로서 사용을 위해 조성물을 추가로 처리하는 단계, 임의로 인간 대상체에게 투여를 위해 상기 항체를 (예를 들어, 약학 부형제와 함께) 제제화하는 단계를 명시할 수 있다.

[0229] 임의로, ADC를 제조하는 방법은 항체 또는 항체 단편을 세포독성제의 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 분자에 접합시키는 단계를 포함한다. 임의로, 획득된 조성물은 2와 4 사이, 4와 6 사이, 6과 8 사이의 DAR을 특징으로 한다. 일 구현예에서, 방법은 항체를 세포독성제의 4개 분자에 접합시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 방법은 항체를 세포독성제의 8개 분자에 접합시키는 단계를 포함한다. 임의로 방법은 DAR을 평가하는 단계, 및 DAR이 사전 결정된 사양 (예를 들어, 본 명세서에 개시된 DAR 또는 DAR 범위, 약 2, 4, 6, 또는 8의 DAR 등)에 상응하면, 약물로서 사용을 위해 조성물을 추가로 처리하는 단계, 임의로 인간 대상체에게 투여를 위해 상기 항체를 (예를 들어, 약학 부형제와) 제제화하는 단계를 더 포함한다.

[0230] 일부 구현예에서, 링커 (X) - (Z) 구성요소는 (X) 및 (Z)를 포함하는 화합물을 (Ab)와 접촉 (및 반응)시키기 전에 제조 및 단리하여서, 항체 약물 접합체를 형성한다.

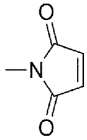
[0231] 일부 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0232] (a) 링커 (X) 또는 링커 (X)의 일부를 (Ab)와 접촉 및/또는 반응시켜서 Ab-X 접합체를 형성하는 단계, 및

[0233] (b) 단계 (a)의 Ab-X를 세포독성제 (Z) 또는 링커 (X)의 제2 부분 및 (Z)를 포함하는 화합물과 접촉 및/또는 반응시켜서, 항체 약물 접합체를 형성하는 단계.

[0234] X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티를 포함하는 분자를 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, X는 (i) 스페이서 (Y), (ii) 절단가능한 모이어티 및 (iii) 선택적 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이서 시스템 (Y')을 포함하는 분자를 나타낸다. 절단가능한 모이어티는 예를 들어 올리고펩티드 (예를 들어, 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드)일 수 있다. 스페이서 Y는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치될 수 있고, 스페이서 시스템 (Y')은 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치될 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 링커 X 또는 스페이서 Y는 임의로 항체의 아미노산 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')와 (예를 들어, 적합한 조건 하에서, 임의로 탈보호 이후에) 반응할 수 있는 반응성 기 (R)를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 임의로, R은 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기와 반응성인 기이다. 예를 들어 R은 항체 상의 티올 기 (또한 술폰히드릴 기라고도 함)와 반응성인, 하기 구조를 갖는 말레이미드-N-일 기일 수 있다:



- [0236]
- [0237] 일부 구현예에서, 링커 X 또는 스페이서 Y는 임의로 항체의 아미노산 또는 항체의 아미노산에 부착되는 상보적 반응성 기 (R')와 반응성 기 R의 반응의 잔기를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 임의로, R은 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 및 상기 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기와 반응성인 기의 반응의 잔기이다.
- [0238] 임의 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 화합물 (예를 들어, 링커 및/또는 세포독성제)과 접촉 및/또는 반응시키는 단계 이전에, 방법은 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제조, 선택, 또는 제공하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 단계는 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 제조, 선택 또는 제공하는 단계, 및 항체 또는 항체 단편이 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편의 특성(들)을 갖는지 여부를 결정 또는 시험하는 단계를 포함한다.
- [0239] 예를 들어, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 넥틴-4의 VC1 가교 도메인에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다. 넥틴-4의 VC1 가교 도메인에 결합하는 것으로 결정된 항체 또는 항체 단편은 화합물 (예를 들어, 링커 (X) 및/또는 세포독성제 (Z))과 접촉 및/또는 반응된다. 예를 들어, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 돌연변이체 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 잔기 K197 및/또는 S199에 치환을 포함하는 돌연변이체 넥틴-4 폴리펩티드)에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다. (예를 들어, 야생형 넥틴-4 폴리펩티드와 비교하여) 돌연변이체 넥틴-4 폴리펩티드에 대한 결합이 감소되거나 또는 결여된 것으로 결정된 항체 또는 항체 단편은 화합물 (예를 들어, 링커 (X) 및/또는 세포독성제 (Z))과 접촉 및/또는 반응된다.
- [0240] 다른 예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 넥틴-4 발현 종양 세포 (예를 들어, 부착성 종양 세포) 간 세포-세포 부착을 감소시키는 능력 및/또는 넥틴-4 발현 종양 세포의 성장을 감소시키는 능력의 성장을 감소시키는 능력에 대해 (예를 들어, 3-차원 세포 배양, 종양 회전 타원체 형성에서) 시험될 수 있다. 넥틴-4 발현 종양 세포 간 세포-세포 부착을 감소시키는 능력 및/또는 넥틴-4 발현 종양 세포 (예를 들어, 부착성 종양 세포)의 성장을 감소시키는 능력을 갖는 것으로 결정된 항체 또는 항체 단편은 그 다음에 화합물 (예를 들어, 링커 (X) 및/또는 세포독성제 (Z))과 접촉 및/또는 반응된다.
- [0241] 다른 예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 종양을 세포독성제 (예를 들어, 세포독성제 Z 또는 Z와 동일 부류의 약물, 예를 들어, 캄프토테신 작용제)에 대해 감작시키는 능력에 대해 시험될 수 있다. 종양을 세포독성제에 대해 감작시키는 능력을 갖는 것으로 결정된 항체 또는 항체 단편은 그 다음에 화합물 (예를 들어, 링커 (X) 및/또는 세포독성제 (Z))과 접촉 및/또는 반응된다.
- [0242] 임의로, 방법은 항체를 화합물 (예를 들어, 링커 (X) 및/또는 세포독성제 (Z))과 접촉시키기 전에 임의의 둘 이상의 항체 시험 단계를 포함할 수 있다.
- [0243] 본 명세서에서 더욱 설명되는 바와 같이, 세포독성제를 항체에 접합시키기 위한 일부 충분히 공지된 방법은 항체가 먼저 링커 또는 링커의 일부에 의해 변형되는 다수 반응 단계 이후에, 세포독성제를 항체-링커 조성물에 접합시키는 반응을 포함한다.
- [0244] 일 구현예에서, 항체-접합체를 제조하는 방법이 제공되고, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0245] (i) 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 항-넥틴-4 항체를 수득하는 단계; 선행 단계에서 수득된 배양으로부터 관심 항체를 수집하고 정제하는 단계;
- [0246] (ii) 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 (a) 항체의 아미노산과 반응할 수 있는 제1 반응성 기 (예를 들어, 아미노산의 측쇄 또는 글리칸, 또는 아미노산 또는 아미노산의 글리칸에 부착되는 기), 및 (b) 제2 반응성 기 (R')를 포함하는 화합물 (L)과 접촉시켜서, 화합물 (L)로 작용화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 변형된 항체를 수득하는 단계; 및
- [0247] (iii) 단계 (i)의 변형된 항체를 (a) 반응성 기 (R')에 상보적인 반응성 기 (R), (b) 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 아미노산 단위 (예를 들어, 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드), (c) 임의로 비-자기-제거성 또는 자기-제거성 스페이서 (Y'), 및 (d) 세포독성제 (Z)를 포함하는 화합물과 반응시키는

단계. 임의로, 단계 (ii)의 화합물은 R 및 아미노산 단위 사이에 위치한 스페이서 (Y)를 더 포함한다.

- [0248] 임의로, 항-넥틴-4 항체를 수득하는 단계는 항원의 주입에 의해 동물을 면역화하여 항체-생산 세포를 제조하는 단계, 혈액을 수집하는 단계, 비장을 절제했을 때 결정하기 위한 이의 항체 적정가를 검정하는 단계; 골수종 세포를 제조하는 단계; 항체-생산 세포를 골수종과 융합시키는 단계; 바람직한 항체를 생산하는 하이브리도마의 그룹을 스크리닝하는 단계; 하이브리도마를 단일 세포 클론으로 나누는 단계 (클로닝); 하이브리도마를 배양하거나 또는 대량의 단일클론 항체를 생산하기 위해 하이브리도마가 이식된 동물을 사육하는 단계; 및/또는 생물학적 활성 및 결합 특이성에 대해 이렇게 생산된 단일클론 항체를 조사하는 단계, 또는 표지된 시약으로서 성질에 대해 어세이하는 단계 등을 더 포함할 수 있다.
- [0249] 임의로, 항-넥틴-4 항체를 수득하는 단계는 세포 라이브러리를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0250] 일 구현예에서, R 및 R'은 클릭 반응 또는 고리첨가를 겪을 수 있고, 임의로 R은 알킨 모이어티이거나 또는 그를 포함하고, R'은 아지드 모이어티이거나 또는 그를 포함하거나, 또는 R'은 알킨 모이어티이거나 또는 그를 포함하고, R은 아지드 모이어티이거나 또는 그를 포함하고, 단계 (ii)의 반응은 1,3-쌍극자 고리첨가이다.
- [0251] 일 구현예에서, 단계 (i)의 반응은 촉매제의 존재 하에서 수행되고, 임의로 촉매제는 효소 (예를 들어, 트랜스글루타미나제)이다.
- [0252] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 화합물 (L)과 접촉시키기 이전에, 단계 (i)은 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 변형시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편은 (예를 들어, 카바트 잔기 N297에서) 항체 글리코실화를 변형시킬 수 있는 효소와 반응 또는 접촉시켜서 변형될 수 있다. 일례에서, 변형은 코어 N-아세틸글루코사민 치환기를 포함하는 항체를 수득하기 위해서, 엔도글리코시다제의 존재 하에서, 코어 N-아세틸글루코사민을 갖는 항체 글리칸의 탈글리코실화를 포함하고, 상기 코어 N-아세틸글루코사민 및 상기 코어 N-아세틸글루코사민 치환기는 임의로 푸코실화된다. 엔도글리코시다제의 예는 EndoS, EndoA, EndoE, Endo18A, EndoF, EndoM, EndoD, EndoH, EndoT 및 EndoSH 및/또는 이의 조합을 포함한다.
- [0253] 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체) 분자 및 세포독성제 (예를 들어, 캄프토테신 유도체 분자)는 링커를 통해서 연결된다. 이러한 구현예에서, 면역접합체는 예를 들어 하기 화학식 (II)로 표시될 수 있다:
- [0254]  $Ab-(X-(Z)_n)_m$  화학식 (II)
- [0255] 상기 식에서,
- [0256] Ab는 항-넥틴4 항체 또는 항체 단편이고;
- [0257] X는 Ab 및 Z를 연결하는 링커이고, 예를 들어, Ab 및 Z 중 하나 또는 둘 모두에 공유 연결 후 링커의 잔기이고;
- [0258] Z는 세포독성제, 예를 들어, 캄프토테신 유사체이고, 임의로 Z는 화합물 1 또는 2 (엑사테칸 또는 SN-38 분자)의 구조를 포함하고;
- [0259] n은 1 또는 2이고;
- [0260] n은 1일 때, m은 1 내지 8이거나, 또는 임의로 m은 1 내지 8 또는 1 내지 6으로부터 선택되는 정수이고, 임의로 m은 1 내지 4로부터 선택되는 정수이고, 임의로 m은 2 또는 4이고; 임의로, m은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고; n이 2일 때, m은 1 내지 4이거나, 또는 임의로 m은 1 내지 4 또는 1 내지 3으로부터 선택되는 정수이고, 임의로 m은 1 내지 4로부터 선택되는 정수이고, 임의로 m은 2 또는 4이고; 임의로, m은 1, 2, 4 또는 4이다. 임의로, "n"은 분지 또는 중합 정도를 나타내는 것으로 명시될 수 있다. "n" 및 "m"은 다수 항체를 포함하는 조성물 중의 평균을 나타내는 것으로 명시될 수 있다.
- [0261] 일 구현예에서, X는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티를 포함하는 분자를 나타낸다. 일 구현예에서, X는 (i) 스페이서 (Y), (ii) 절단가능한 모이어티 및 (iii) 임의의 자기-제거성 또는 비-자기-제거성 스페이서 시스템 (Y')을 포함하는 분자를 나타낸다. 스페이서 Y는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치될 수 있고, 스페이서 시스템 (Y')은 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치될 수 있다. 분자 X 또는 스페이서 Y는 임의로 반응성 기 (R) 또는 반응성 기 R과 항체의 아미노산 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')의 반응의 잔기를 포함하는 것으로 명시될 수 있다.
- [0262] 변수 m은 면역접합체 중 항체 분자 당  $-X-(Z)_n$  모이어티의 개수를 나타낸다. 다수의 항-넥틴-4 ADC를 포함하는 조성물에서, 항체 분자 당  $-X-Z$  모이어티의 개수의 수치 "m"은 다양할 수도 있다. 따라서, 본 명세서

의 화학식의 다수의 면역접합체를 포함하는 예시적인 조성물에서,  $m$ 은 Ab 당  $-X-(Z)_n$  모이어티의 평균 개수이고, 이러한 경우에  $m$ 은 또한 평균 약물 로딩 또는 약물:항체 비 (DAR)를 의미할 수 있다. 평균 약물 로딩 또는 DAR은 유리하게 Ab 당 1 내지 약 8개 ( $-X-(Z)_n$ ) 모이어티 범위일 수도 있다. 모이어티 X에 부착된 Z 모이어티의 개수인, "n"은 예를 들어 1 또는 2일 수 있다. 전형적으로, n은 1이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, m은 평균 약물 로딩을 나타내고, m은 2와 8 사이이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, m은 평균 약물 로딩을 나타내고, m은 2와 6 사이이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, m은 평균 약물 로딩을 나타내고, m은 4와 8 사이이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, m은 평균 약물 로딩을 나타내고, m은 6과 8 사이이고, 임의로 약 6, 7 또는 8이다. 일부 구현예에서, n은 1이고, m은 평균 약물 로딩을 나타내고, m은 4와 6 사이이고, 임의로 약 4, 5 또는 6이다.

[0263] Ab 당 ( $-X-Z$ ) 모이어티의 개수는 통상의 수단 예컨대 질량 분광법, ELISA 어세이, 및 HPLC를 통해서 특징규명될 수도 있다.  $m$ 의 관점에서 면역접합체의 정량적 분포가 또한 결정될 수도 있다. 일부 예에서, 다른 약물 로딩을 갖는 면역접합체와 구별되는,  $m$ 이 일정 값을 갖는 균질한 면역접합체의 분리, 정제, 및 특징규명은 역상 HPLC 또는 전기영동같은 수단을 통해서 획득될 수도 있다.

[0264] 일 구현예에서, 본 개시의 치료 방법에서 사용되는 항-넥틴-4 조성물은 하기 화학식 (I)로 표시되는 다수의 면역접합체를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0265]  $Ab-(X-(Z)_n)_m$  화학식 (II)

[0266] 상기 식에서,

[0267] Ab는 항-넥틴-4 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)이고;

[0268] X는 Ab 및 Z를 연결하는 분자이고, 예를 들어, Ab 및 Z 중 하나 또는 둘 모두와 공유 연결 후 링커의 잔기이고;

[0269] Z는 세포독성제, 임의로 토포이소머라제 억제제, 임의로 캄프토테신 유사체이고, 임의로 엑사테칸 또는 SN-38 분자, 예를 들어, 화합물 1 또는 2의 구조를 갖는 분자를 포함하는 캄프토테신 유사체이고;

[0270] n은 1 또는 2이고;

[0271] 항체 샘플 중 면역접합체의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 2 또는 4, 적어도 2, 2와 4 사이, 적어도 4, 4와 6 사이 또는 4와 8 사이인  $m$  ( $X-Z$  모이어티의 개수)을 갖고, 임의로 n은 1이고, 항체 샘플 중 면역접합체의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 2 또는 4, 적어도 2, 2와 4 사이, 적어도 4, 4와 6 사이 또는 4와 8 사이인  $m$  ( $X-Z$  모이어티의 개수)을 갖는다.

[0272] 일 구현예에서, 본 개시의 치료 방법에서 사용되는 항-넥틴-4 조성물은 화학식 (I)로 표시되는 다수의 면역접합체를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0273]  $Ab-(X-(Z)_n)_m$  화학식 (II)

[0274] 상기 식에서,

[0275] Ab는 항-넥틴-4 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)이고;

[0276] X는 Ab 및 Z를 연결하는 분자이고, 예를 들어, Ab 및 Z 중 하나 또는 둘 모두와 공유 연결 후 링커의 잔기이고;

[0277] Z는 엑사테칸 또는 SN-38 분자, 예를 들어 화합물 1 또는 2의 구조를 포함하는 분자를 포함하는 캄프토테신 유사체이고;

[0278] n은 1이고;

[0279] 항체 샘플 중 면역접합체의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 6, 적어도 6, 6과 8 사이, 또는 8인  $m$  ( $X-Z$  모이어티의 개수)을 갖는다.

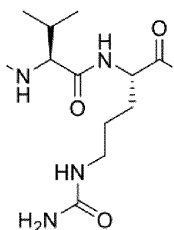
[0280] 특정 아미노산 잔기에 대해 비특이적으로 또는 특이적으로, 항체 또는 항원 결합 단백질에 세포독성제를 포함하는 링커를 공유적으로 연결시키는데 다양한 방법이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 링커 (X)는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 실시예에 표시된 바와 같이, 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티를 포함할 수 있어서, 링커의 절단 시 세포내 환경에서 세포독성제 (예를 들어, 화합물 1, 화합물 2, 화합물 13 등)를 방출한다. 링커는 항체 분자 상의 화학적 반응성 기, 예를 들어, 유리 아미노, 이미노, 히드록실, 티올

또는 카르복실 기 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 술폰히드릴 기), 탄수화물, 또는 항체에 도입 또는 조작된 임의 반응성 기에 결합될 수 있다. 링커가 결합되는 부위는 항체 분자의 아미노산 서열의 천연 잔기일 수 있거나 또는 예를 들어, DNA 재조합 기술 (예를 들어, 아미노산 서열에 시스테인 또는 프로테아제 절단 부위의 도입, 비-천연 아미노산 잔기의 도입)에 의해서 또는 단백질 생화학 (예를 들어, 환원, pH 조정 또는 단백질가수분해, 글리코조작, 아미노산-결합된 글리칸의 효소적 변형)을 통해서 항체 분자에 도입될 수 있다.

[0281] 일부 구현예에서, 링커 (X)는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 알라닌, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 및 아스파르트산으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 펩티드 잔기를 포함하고, 임의로 링커 (X)는 디펩티드, 트리펩티드, 또는 테트라펩티드 잔기를 포함한다.

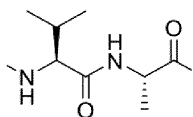
[0282] 일정 구현예에서, 링커 (X)의 전구체인, 중간체가 적절한 조건 하에서 세포독성제 (Z)와 반응한다. 일정 구현예에서, 반응성 기는 세포독성제 및/또는 중간체에서 사용된다. 일부 구현예에서, 세포독성제 및 중간체 간 반응의 생산물, 또는 유도체화된 세포독성제는 이후에 적절한 조건 하에서 항체 분자와 반응한다. 다른 구현예에서, 링커 (X)의 전구체는 먼저 적절한 조건 하에서 항체 분자와 반응되어서 링커 (X)의 전구체에 결합된 항체를 산출하고, 항체는 후속하여 세포독성제 (Z)를 포함하는 분자와 반응한다.

[0283] 일부 구현예에서, 링커 (X)는 세포내 환경 (예를 들어, 리소솜 또는 엔도솜 또는 카베올라 내)에 존재하는 절단제에 의해 절단가능하다. 링커는 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 예를 들어, 펩티딜 링커 또는 아미노산 단위를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티딜 링커 모이어티는 적어도 2개 아미노산 길이 또는 적어도 3개 아미노산 길이이다. 절단제는 카텡신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여서 표적 세포 내에서 활성 약물의 방출을 일으킨다고 알려져 있다. 가장 전형적으로 세포에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 펩티딜 링커이다. 특별한 구현예에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커이다 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,214,345호로서, 발린-시트룰린 링커를 사용한 독소루비신의 합성을 기술함). 발린-시트룰린 (Val-Cit) 구성요소는 하기 표시된 구조를 가질 수 있다:



[0284]

[0285] 다른 특별한 구현예에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 발린-알라닌 (Val-Ala) 링커이다. val-ala 구성요소는 하기 표시된 구조를 가질 수 있다:



[0286]

[0287] 다른 특별한 구현예에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 글리신-함유 올리고펩티드 링커, 예를 들어, 글리신- 및 페닐알라닌- 함유 올리고펩티드 링커, 임의로 GGF, DGGF, (D-)D-GGF, EGGF, SGGF, KGGF, DGGFG (SEQ ID NO: 71), DDGGFG (SEQ ID NO: 72), KDGGFG (SEQ ID NO: 73), GGFGGGF (SEQ ID NO: 74), GGFG, GFGGG (SEQ ID NO: 75) 또는 GGFGGG (SEQ ID NO: 76) 링커 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,835,807호, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨)이고, 여기서 "(D-)D"는 D-아스파르트산을 나타낸다.

[0288] 일부 구현예에서, 링커는 넥틴-4가 결합하고/하거나 넥틴-4에 의해 매개되는 세포-세포 상호작용을 억제하는 항체의 능력의 간섭을 피하기 위해서, Z로부터 항체를 거리두기 위해 스페이서 또는 스트레처로서 작용하도록 기능할 수 있다. 링커는 스페이서 단위 (Y) 및/또는 스페이서 또는 스페이서 시스템 (Y')을 포함할 수도 있다. 따라서, 스페이서 Y는 Ab 및 절단가능한 모이어티 사이에 위치될 수 있다. 스페이서 시스템 (Y')은 절단가능한 모이어티 및 Z 사이에 위치될 수 있다. 분자 X 또는 스페이서 Y는 임의로 반응성 기 (R)

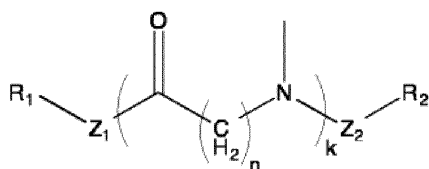
또는 항체의 아미노산 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')와 반응성 기 R의 반응의 잔기를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 스페이서 Y는 예를 들어, 항체의 아미노산, 예를 들어, 항체의 황 원자, 1차 또는 2차 아미노 기 또는 탄수화물 기와 (예를 들어, 이의 반응성 기 R을 통해) 결합을 형성하는 분자일 수 있고, 스페이서 또는 스트레처 (Y)는 항체를 세포독성제 (Z) 또는 절단가능한 아미노산 단위 (예를 들어, 펩티딜 링커, 절단가능한 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드)에 연결하고, 임의로 또한 이후에 Z에 연결되는 자기-제거성 및/또는 비-자기-제거성 스페이서 (Y')를 갖는다. 따라서, 스페이서 (Y)가 한 말단에서 아미노산 단위 (예를 들어, 절단가능한 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드)에 연결될 때, 절단가능한 아미노산 단위는 이후에 Z에 직접적으로 연결될 수 있거나 또는 추가 스페이서 (Y') 예컨대 아미노산 단위 및 Z를 연결하는 비-자기-제거성 또는 자기-제거성 스페이서를 포함할 수 있다.

[0289] 스페이서 (Y)는 임의로 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이거나 또는 그를 포함하는 것으로 명시될 수 있고, 임의로 여기서 Y는 2-100개 원자, 임의로 2-40, 2-30, 2-20, 4-40, 4-30 또는 4-20개 원자의 사슬 길이를 갖고, 임의로 하나 이상의 원자가 탄소 이외의 것, 예를 들어 산소, 황, 질소, 또는 다른 원자일 수 있고, 임의로 사슬의 임의 탄소는 알콕시, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 알킬-S-, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드, 또는 알킬아미드로 치환된다.

[0290] 스페이서 (Y)는 임의로 안정성-증강 모이어티를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 예를 들어, 스페이서 Y는 링커 디자인에 직교성 폴리-에틸렌글리콜 (PEG) 모이어티 또는 폴리사르코신 (폴리-N-메틸글리신 또는 PSAR) 모이어티일 수 있다 (참조: 예를 들어, W02019/081455, W02015/057699 및 W02016/059377, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨).

[0291] 일부 특별한 구현예에서, 스페이서 (Y)는 하나 이상의 에틸렌 옥시드 단량체를 포함할 수도 있고, 임의로 Y는 폴리에틸렌 옥시드 모이어티를 포함하고, 임의로 Y는 1과 24 사이, 임의로 1과 12 사이, 임의로 1과 8 사이, 임의로 6과 24 사이의 폴리에틸렌 옥시드 모이어티를 포함하고, 임의로 Y는 구조 - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub> - (여기서, x는 1 내지 24, 임의로 1 내지 12, 임의로 1 내지 6, 임의로 6 내지 24임)를 포함한다.

[0292] 적합한 안정성-증강 모이어티의 예로서, 스페이서 사슬 Y는 PCT 공개 번호 W02015/057699 또는 W02019/081455에 개시된 안정성-증강 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 스페이서 사슬 Y는 직교성 연결기 모이어티 및 안정성-증강 모이어티를 포함할 수 있다. 안정성-증강 모이어티는 PEG 동종중합체, 또는 일반적으로 직교성 연결기 모이어티에 결합된 임의의 단일 분자량 동종중합체 (예를 들어, PEG 또는 폴리사르코신 동종중합체)일 수 있다. 동종중합체는 예를 들어, 1-4, 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-12, 적어도 6, 8 또는 10, 또는 6-12, 6-24, 6-72, 또는 6, 7, 또는 8 이하의 PEG 또는 다른 단량체 단위를 가질 수 있다. 용어 직교성 연결기는 링커 모이어티 (예를 들어, 스페이서 Y의 사슬)를 동종중합체 단위에 연결하고 링커 (예를 들어, 절단가능 올리고 펩티드 (Pep) 및 스페이서 Y')를 통해서 세포독성제 (Z)에 연결하여 동종중합체 단위가 세포독성제에 대해서 병렬 입체형태 (직렬 입체형태와 반대) (동종중합체는 Pep-Y'-Z 모이어티에 병렬입)이도록 하는 분지형 링커 단위 성분을 의미한다. 직교성 연결기 모이어티는 예를 들어 임의로 글루탐산, 리신 및 글리신으로부터 선택되는 하나 이상의 천연 또는 비-천연 아미노산일 수 있다. 임의로, 아미노산 직교성 연결기 모이어티는 스페이서 사슬 Y의 말단에 위치되어서, 직교성 연결기 모이어티 아미노산 잔기가 한 아미노산의 α-카르복실 기와 다른 아미노산의 α-아미노 기 간 펩티드 결합을 통해서, 펩티딜 링커 (예를 들어, 화학식 V 또는 VI의 (Pep))의 아미노산 잔기에 연결된다. Y는 예를 들어, 하기 화학식 D의 모이어티와 직교성 연결기 모이어티의 반응 결과를 포함할 수 있다:



[0293] 화학식 D

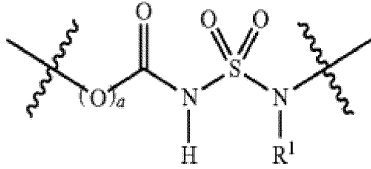
[0294] 상기 식에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 상이하고,

[0296] R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub> 중 하나는 H이거나 또는 불활성 기이고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub> 중 다른 하나는 작용화된 반응성 기이고, 상기 기는 직교성 연결기 모이어티의 결합가능한 기에 공유적 결합을 위해 반응성이고, 이러한 반응 조건에서 불활성 기는

비반응성이고,  $Z_1$  및  $Z_2$  는 동일하거나 또는 상이하게 선택적 스페이서이고,  $n$ 은 1 이상이고  $k$ 는 2 이상이다.

[0297] 임의로, 직교성 연결기는 글루탐산으로부터 유도된다.

[0298] 다른 예에서, 스페이서  $Y$ 는 미국 특허 출원 공개 번호 US2017/0072068A1 (이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨)에 개시된 기, 예를 들어 하기 화학식 (E)에 따른 기 또는 이의 염을 포함한다:



[0299]

[0300] 화학식 E

[0301] 상기 식에서,

[0302]  $a$ 는 0 또는 1이고;

[0303]  $R^1$  은 0, S 및  $NR^3$  (여기서  $R^3$  은 수소 및  $C_1$ - $C_4$  알킬 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨)으로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자가 임의로 개재되고 임의로 치환되는 수소,  $C_1$ - $C_{24}$  알킬 기,  $C_3$ - $C_{24}$  시클로알킬 기,  $C_2$ - $C_{24}$  (헤테로)아릴 기,  $C_3$ - $C_{24}$  알킬(헤테로)아릴 기 및  $C_3$ - $C_{24}$  (헤테로)아릴알킬 기,  $C_1$ - $C_{24}$  알킬 기,  $C_3$ - $C_{24}$  시클로알킬 기,  $C_2$ - $C_{24}$  (헤테로)아릴 기,  $C_3$ - $C_{24}$  알킬(헤테로)아릴 기 및  $C_3$ - $C_{24}$  (헤테로)아릴알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; 화학식 E, 또는 이의 염에 따른 기는 스페이서 사슬  $Y$ 의 상기 제1 말단 및 제2 말단 사이에 위치된다.

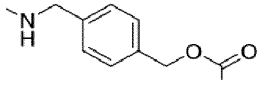
[0304] 이러한 양태에 따라서, 스페이서  $Y$ 는 -(숙신이미드-3-일-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -(숙신이미드-3-일-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -(숙신이미드-3-일-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -(숙신이미드-3-일-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-를 포함할 수 있다.

[0305] 임의로, 이러한 스페이서  $Y$ 는 하기 구조를 더 포함할 수 있다: -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, 여기서  $n$ 은 1 내지 6, 바람직하게 2 내지 4의 정수이다. 이러한 구조는 예를 들어, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-를 포함한다.

[0306] 아미노산 단위 (예를 들어, 절단가능한 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드) 및  $Z$  사이에 위치한 스페이서 또는 스페이서 시스템 ( $Y'$ )은 자기-제거 또는 비-자기-제거성일 수도 있다. 스페이서  $Y'$ 은 예를 들어, 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함할 수도 있고, 임의로  $Y$ 는 2-30 원자, 임의로 2-20, 4-20, 2-10 또는 4-20 원자의 사슬 길이를 갖고, 임의로 하나 이상의 원자는 탄소 이외의 것, 예를 들어 산소, 황, 질소, 또는 다른 원자일 수 있고, 임의로 사슬의 임의 탄소는 알콕시, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 알킬-S-, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드, 또는 알킬아미드로 치환된다. 일 구현예에서,  $Y'$ 은 p-아미노벤질옥시카르보닐 기를 포함한다. 일 구현예에서,  $Y'$ 은 비-자기-제거성 스페이서이고, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)- (여기서,  $n$ 은 0 내지 5의 정수임)의 구조를 포함하고, 상기 구조는 -O- 또는 단일 결합을 통해서 절단가능한 모이어티에 연결된다. 예를 들어,  $Y'$ 은 -C(=O)-, -O-C(=O)-, -O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, HO-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)- 또는 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)- 기일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다.

[0307] "자기-제거성" 스페이서 단위는 별도 가수분해 단계없이 약물 모이어티의 방출을 허용한다. 자기-제거성 스페이서가 사용될 때, 아미노산 단위의 절단 또는 전환 이후에, 아미노산 단위에 연결된 스페이서의 측면은 탈차단되어서, 하나 이상의 모이어티  $Z$ 의 최종 방출을 일으킨다. 자기-제거 스페이서 시스템은 예를 들어 W002/083180 및 W02004/043493 (이의 개시를 전체로 본 명세서에 편입시킴)에 기술된 것을 비롯하여, 당업자에 게 공지된 다른 자기-제거 스페이서일 수도 있다. 일정 구현예에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질

단위를 포함한다. 이러한 일 구현예에서, p-아미노벤질 알콜은 아마이드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되고, 카바메이트, 메틸카바메이트, 또는 카보네이트가 벤질 알콜 및 세포독성제 간에 만들어진다. 일 구현예에서, 스페이서 단위는 하기 구조를 갖는 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다:



[0308]

[0309]

자기-제거성 스페이서 단위의 예는 p-아미노벤질 알콜과 전자적으로 유사한 방향족 화합물 (참조: 예를 들어, US 2005/0256030 A1), 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 및 오르소- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 더 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 스페이서는 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아마이드 (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223) 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)와 같이, 아마이드 결합 가수분해 시에 가수분해를 겪는 것을 사용할 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)가 또한 자기-제거성 스페이서의 예이다. p-아미노벤질 자기-제거성 스페이서 (예를 들어, PAB)는 Phe-Lys, Val-Ala 또는 Val-Cit 절단가능한 디펩티드 단위와 함께 사용에 특히 적합하다 (PAB는 디펩티드 및 캄프토테신 유도체 (Z) 사이에 위치됨).

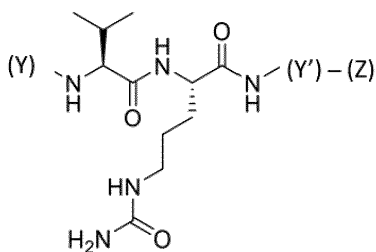
[0310]

"비-자기-제거성" 스페이서 단위는 스페이서 단위의 일부 또는 전부가 항체-모이어티-관심 접합체의 효소적 (예를 들어, 단백질 가수분해적) 절단 시 모이어티 Z에 결합된 채로 남는 것이다. Gly-Gly-Phe-Gly 아미노산 단위 및 엑사테칸 분자 사이에서 스페이서로서 사용을 위해 개조된 비-자기-제거성 스페이서 단위의 예는 -O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, HO-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)- 및 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)- (예를 들어, GGFG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-엑사테칸 단위를 형성하기 위함)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

GGFG 아미노산 단위 및 엑사테칸 사이에서 이러한 스페이서의 사용은 화합물 13의 구조를 갖는 분자의 방출을 야기한다. 비-자기-제거성 스페이서 단위의 다른 예는 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 서열-특이적 효소적 절단에 감수성인 펩티드 스페이서의 다른 가지 조합이 유사한 방식으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 중앙 세포 회합된 프로테아제에 의한 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 항체-모이어티-관심 접합체의 효소적 절단은 항체-모이어티-관심 접합체의 나머지에서부터 글리신-글리신-약물 모이어티의 방출을 야기하게 된다. 이러한 일 구현예에서, 글리신-글리신-약물 모이어티에 대해서 중앙 세포에서 별도의 가수분해 단계가 수행되고, 따라서 약물 모이어티로부터 글리신-글리신 스페이서 단위가 절단된다.

[0311]

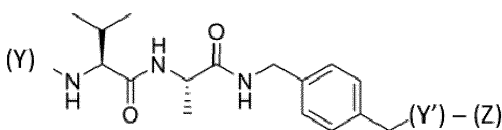
예시적인 링커-세포독성 약물 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 III 및 IV로 표시되는 임의의 구조를 포함할 수 있다:



[0312]

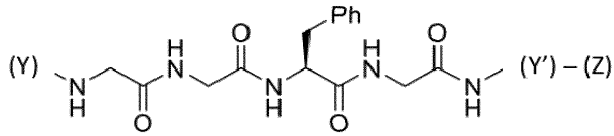
[0313]

화학식 IIIa



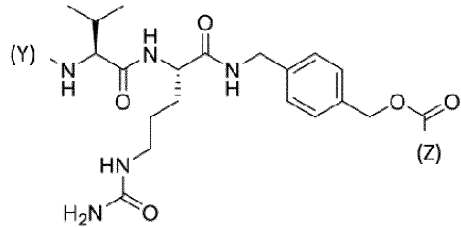
[0314]

[0315] 화학식 IIIb



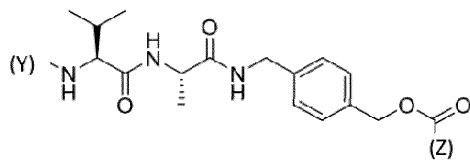
[0316]

[0317] 화학식 IIIc



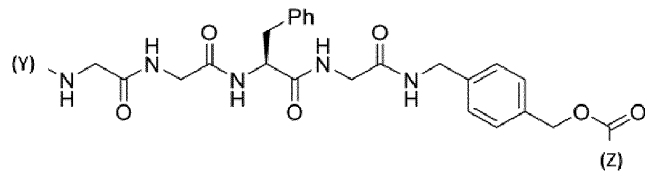
[0318]

[0319] 화학식 IVa



[0320]

[0321] 화학식 IVb



[0322]

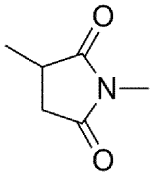
[0323] 화학식 IVc.

[0324] 스페이서 (Y) 및 (Y')는 임의로 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알킬렌 기, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 알케닐렌 기, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 알키닐렌 기, C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> 시클로알킬렌 기, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 시클로알케닐렌 기, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> 시클로알키닐렌 기, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub> 알킬아릴렌 기, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub> 아릴알킬렌 기, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> 아릴알케닐렌 기 및 C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub> 아릴알키닐렌 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것으로 명시될 수 있고, 알킬렌 기, 알케닐렌 기, 알키닐렌 기, 시클로알킬렌 기, 시클로알케닐렌 기, 시클로알키닐렌 기, 알킬아릴렌 기, 아릴알킬렌 기, 아릴알케닐렌 기 및 아릴알키닐렌 기는 O, S 및 NR<sup>1</sup> (여기서, R<sup>1</sup>은 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> 알킬 기, C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> 알케닐 기, C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> 알키닐 기 및 C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub> 시클로알킬 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기 및 시클로알킬 기는 임의로 치환됨)의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자가 임의로 개재되고 임의로 치환된다.

[0325] 스페이서 (Y) 및 (Y')는 임의로 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 헤테로알킬렌-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)-, -아릴렌-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-아릴렌-, -아릴렌-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 헤테로알킬렌-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로-C(=O)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)-C(=O)-, -아릴렌-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-아릴렌-C(=O)-, -아릴렌-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>헤테로시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 헤테로알킬렌-NH-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로-NH-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)-NH-, -아릴렌-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-아릴렌-

NH-, -아릴렌-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌- NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-NH-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌- NH-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-NH-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 헤테로알킬렌-S-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로-S-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)-S-, -아릴렌-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-아릴렌-S-, -아릴렌-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-S-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-S-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-S-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-O-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로-O-C(=O)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)-O-C(=O)-, -아릴렌-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-아릴렌-O-C(=O)-, -아릴렌-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-O-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-O-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-O-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬렌-O-C(=O)-이거나 또는 그를 포함하는 것으로 명시될 수 있고, 각 경우에 -X, -R', -O, -OR', =O, -SR', -S<sup>-</sup>, -NR'<sub>2</sub>, -NR'<sub>3</sub><sup>+</sup>, =NR', -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NR'C(=O)R', -C(=O)R', -C(=O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R', -OS(=O)<sub>2</sub>OR', -S(=O)<sub>2</sub>NR', -S(=O)R', -OP(=O)(OR')<sub>2</sub>, -P(=O)(OR')<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)X, -C(=S)R', -CO<sub>2</sub>R', -CO<sub>2</sub>, -C(=S)OR', C(=O)SR', C(=S)SR', C(=O)NR'<sub>2</sub>, C(=S)NR'<sub>2</sub>, 및 C(=NR')NR'<sub>2</sub>로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 임의 치환되고, 여기서 각각의 X는 독립적으로 할로젠: -F, -Cl, -Br, 또는 -I이고; 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알킬, -C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, 또는 -C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로시클이다.

[0326] 일 구현예에서, 스페이서 (Y)는 임의로 항체 상의, 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기, 또는 탄수화물과 반응성인, 반응성 기 (R)를 예를 들어, 사슬의 한 말단에 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 일부 양태에서, 스페이서 Y는 R 기 -(숙신이미드-3-일-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)를 포함하고, 여기서 n<sup>3</sup>은 2 내지 8의 정수이고, -(숙신이미드-3-일-N)-은 하기 화학식 F로 표시되는 구조를 갖는다:



[0327] 화학식 F

[0328] 상기 구조의 위치 3은 항체에 대한 연결 위치일 수 있다. 위치 3에서 항체에 대한 결합은 티오에테르 형성과 결합을 특징으로 한다.

[0329] 일 구현예에서, 스페이서 (Y)는 임의로 예를 들어, 아미노산 항체의 아미노산에 (예를 들어, 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기, 또는 탄수화물을 통해) 부착되는 상보적 반응성 기 (R')와 반응성인 반응성 기 (R), 또는 항-넥틴-4 항체에 접합 시, 반응성 기 (R)와 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')의 반응의 잔기를, 사슬의 한 말단에, 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 반응성 기 쌍 R 및 R'의 예를 들어 아지드 및 시클로옥탄 간 (구리-무함유 클릭 화학), 니트론 및 시클로옥탄 간, 이중 직교 반응, 바람직하게, 고리첨가, 예를 들어, 딜스-알더 반응 또는 1,3-쌍극자 고리첨가, 알데히드 및 케톤으로부터 옥심/히드라존 형성 및 테트라진 결합을 할 수 있는 광범위한 기를 포함한다 (또한 W02013/092983 또는 US2017/0072068A1을 참조하고, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입됨). 예를 들어 R은 알킬일 수 있고 R'은 아지드일 수 있거나, 또는 R은 아지드일 수 있고 R'은 알킨이다. 최종 링커 및 작용화된 항체, 또는 이의 Y 구성요소는 따라서 임의 구현예에서, R 및 R'의 반응으로 생성된 기 (RR')를 포함할 수 있고, 예를 들어 RR'은 알킨 및 아지드의 반응으로 생성된 트리아졸일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다.

[0330] 일 구현예에서, 반응성 기 R 및 R'은 "클릭" 반응을 함께 겪을 수 있는 상보적 시약 (즉, 클릭 화학 시약 또는 반응성 기)이다. 예를 들어 1,3-쌍극자-작용성 화합물은 바람직하게 첨가된 촉매제 (예를 들어, Cu(I))의 실질적인 부재 하에서, 고리화 반응에서 알킨과 반응하여 헤테로환형 화합물을 형성할 수 있다. 그에 부착된 적어도 하나의 1,3-쌍극자 기를 갖는 다양한 화합물 (3개 원자 상에서 비편제된 4개 전자를 함유하는 3-원자

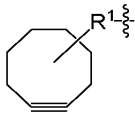
pi-전자계를 가짐)을 본 명세서에 개시된 알킨과 반응시키는데 사용할 수 있다. 예시적인 1,3-쌍극자 기는 아지드, 니트릴 옥시드, 니트론, 아족시 기, 및 아실 디아조 기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0332] 예에는 o-포스펜방향족 에스테르, 아지드, 폴리네이트, 알킨 (임의의 변형 시클로알킨), 시아니드, 안트라센, 1,2,4,5-테트라진, 또는 노르보르넨 (또는 다른 변형 시클로알켄)이 포함된다.

[0333] 일 구현예에서, R은 말단 알킨 또는 아지드를 갖는 모이어티이고; 이러한 모이어티는 예를 들어, 미국 특허 제 7,763,736호에 기술되어 있고, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입된다. 말단 알킨 및 아지드 간 클릭-반응의 촉매제로서 구리 (및 다른 금속 염)의 사용을 위한 적합한 반응 조건은 미국 특허 제7,763,736호에 제공된다.

[0334] 일 구현예에서, R은 치환 또는 비치환된 시클로알킨이다. 특별한 화합물을 포함하여, 시클로알킨은 예를 들어, 미국 특허 제7,807,619호에 기술되고, 이의 개시를 참조로 본 명세서에 편입시킨다.

[0335] 일부 구현예에서, 시클로알킨은 하기 화학식 A의 화합물일 수도 있다:



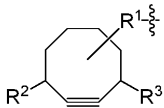
[0336]

[0337] 화학식 A

[0338] R<sup>1</sup>은 카르보닐, 알킬 에스테르, 아릴 에스테르, 치환된 아릴 에스테르, 알데히드, 아미드, 아릴 아미드, 알킬 할라이드, 티오에스테르, 술폰일 에스테르, 알킬 케톤, 아릴 케톤, 치환된 아릴 케톤, 및 할로술폰닐로부터 선택되고;

[0339] R<sup>1</sup>은 삼중 결합을 통해서 연결된 2개 탄소 이외의 시클로옥틴 기 상의 위치에 있을 수 있다.

[0340] 일부 구현예에서, 변형된 시클로알킨은 화학식 A이고, 여기서 삼중 결합에 의해 연결된 2개 탄소 원자 이외에, 시클로옥틴 고리의 하나 이상의 탄소 원자는 하나 이상의 전자-구인성 기, 예를 들어, 할로 (브로모, 클로로, 플루오로, 요오도), 니트로 기, 시아노 기, 술폰 기, 또는 술폰산 기로 치환된다. 따라서, 예를 들어, 일부 구현예에서, 대상의 변형된 시클로알킨은 하기 화학식 B이다:



[0341]

[0342] 화학식 B

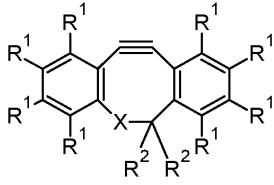
[0343] 상기 식에서,

[0344] R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>의 각각은 독립적으로: (a) H; (b) 할로젠 원자 (예를 들어, 브로모, 클로로, 플루오로, 요오도); (c) -W-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Z (여기서, n은 1-4의 정수 (예를 들어, n=1, 2, 3, 또는 4)이고; W는 존재하는 경우에 O, N, 또는 S 이고; Z는 니트로, 시아노, 술폰산, 또는 할로젠임); (d) -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>4</sup> (여기서, n 및 m은 각각 독립적으로 1 또는 2이고; W는 O, N, S, 또는 술폰일이고; W가 O, N, 또는 S이면, R<sup>4</sup>는 니트로, 시아노, 또는 할로젠 이고; W가 술폰일이면, R<sup>4</sup>는 H임); 또는 (e) -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>4</sup> (여기서, n은 1-4의 정수 (예를 들어, n=1, 2, 3, 또는 4)이고; R<sup>4</sup>는 니트로, 시아노, 술폰산, 또는 할로젠임)이고;

[0345] R<sup>1</sup>은 카르보닐, 알킬 에스테르, 아릴 에스테르, 치환된 아릴 에스테르, 알데히드, 아미드, 아릴 아미드, 알킬 할라이드, 티오에스테르, 술폰일 에스테르, 알킬 케톤, 아릴 케톤, 치환된 아릴 케톤 및 할로술폰닐로부터 선택된다. R<sup>1</sup>은 삼중 결합에 의해 연결된 2개 탄소이외에 시클로옥틴 기 상의 임의 위치일 수 있다.

[0346] 일 구현예에서, R은 치환 또는 비치환 헤테로환형 변형 알킨이다. 특별한 화합물을 포함한, 시클로알킨은 예를 들어, 미국 특허 제8,133,515호에 기술되고, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입된다. 일 구현예에

서, 알킨은 하기 화학식 C이다:



[0347]

[0348]

화학식 C

[0349]

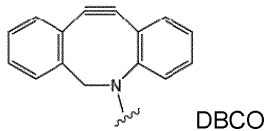
상기 식에서,

[0350]

각각의 R<sup>1</sup>은 수소, 할로젠, 히드록시, 알콕시, 니트레이트, 니트라이트, 술페이트, 및 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬 또는 헤테로 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0351]

각각의 R<sup>2</sup>는 수소, 할로젠, 히드록시, 알콕시, 니트레이트, 니트라이트, 술페이트, 및 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 유기 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; X는 N-R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, NH-R<sup>4</sup>, CH-N-OR<sup>4</sup>, C-N-NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, CHOR<sub>4</sub>, 또는 CHNHR<sub>4</sub>를 나타내고, 각각의 R<sup>3</sup>은 수소 또는 유기 기를 나타내고, R<sup>4</sup>는 링커의 연결 모이어티 C를 나타낸다. 일 구현예에서, R 또는 R'은 하기 DBCO (디벤지시클로옥틸) 기이다:



[0352]

[0353]

알킨 예컨대 상기 본 명세서에 기술된 것은 바람직하게 첨가된 촉매제 (예를 들어, Cu(I))의 실질적인 부재 하에서, 헤테로환형 화합물을 형성하도록 고리화 반응에서 적어도 하나의 1,3-쌍극자-작용성 화합물과 반응하여 할 수 있다. 그에 부착된 적어도 하나의 1,3-쌍극자 기를 갖는 다양한 화합물 (3개 원자 상에서 비편재하는 4개 전자를 함유하는 3-원자 pi-전자계를 가짐)이 본 명세서에 개시된 알킨과 반응하는데 사용될 수 있다. 예시적인 1,3-쌍극자 기는 아지드, 니트릴 옥시드, 니트론, 아족시 기, 및 아실 디아조 기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0354]

본 명세서의 화학식에서, Y'은 임의로 부재할 수 있거나 또는 스페이서, 임의로 예를 들어 p-아미노벤질 단위를 포함하는 자기-제거성 스페이서, 또는 비-자기-제거성 스페이서일 수 있다. 임의로, Y'은 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이거나 또는 그를 포함하고, 임의로 Y'은 2-40 원자, 임의로 2-30, 2-20, 4-40, 4-30 또는 4-20 원자의 사슬 길이를 갖고, 임의로 여기서 하나 이상의 원자는 탄소 이외의 것, 예를 들어 산소, 황, 질소, 또는 다른 원자일 수 있고, 임의로 사슬의 임의의 탄소는 알콕시, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 알킬-S-, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드, 또는 알킬아미드로 치환된다.

[0355]

항-넥틴-4 항체에 접합될 수 있는 예시적인 링커-세포독성제 분자 (예를 들어, 화학식 I 내지 XI의 X-Z 모이어티)는 임의로 하기 화학식 V로 표시될 수 있다:

[0356]



[0357]

상기 식에서,

[0358]

R은 항체의 유리 아미노, 히드록실, 술포히드릴 또는 카르복실 기와 반응성이거나, 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')와 반응성인 기이거나, 또는 항-넥틴-4 결합 단백질에 접합 시, R은 반응성 기 (R)와 항체의 유리 아미노, 히드록실, 술포히드릴 또는 카르복실 기 또는 항체의 아미노산에 부착된 상보적 반응성 기 (R')의 반응의 잔기이고;

[0359]

Y는 임의로 부재하거나 또는 스페이서이고;

[0360]

Pep은 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커, 예를 들어 발린-시트룰린, 발린-알라닌 또는 페닐알라닌-리신 디펩티드이거나 또는 그를 포함하고;

[0361] Y'은 임의로 부재하거나 또는 스페이서, 임의로 자기-제거성 스페이서 또는 비-자기-제거성 스페이서이고;

[0362] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유사체, 임의로 엑사테칸, Dxd 또는 SN-38 분자이다.

[0363] 본 발명에 따른 최종 넥틴-4 결합 면역접합체는 예를 들어, 하기 화학식 (VI)으로 표시될 수 있다:

[0364] Ab - (Y) - (Pep) - (Y') - (Z) 화학식 (VI)

[0365] 상기 식에서,

[0366] Ab는 항-넥틴-4 항체이고;

[0367] Y는 임의로 부재하거나 또는 스페이서이다. 임의로 화학식 VI은 (Ab) 및 (Y) 사이에, 반응성 기 (예를 들어, 말레이미드, 1차 아민)와 항-넥틴-4 항원 결합 단백질 (Ab)의 아미노산의 측쇄 또는 탄수화물과의 반응의 잔기를 포함한다. 대안적으로, 반응성 기 (예를 들어, 말레이미드, 1차 아민)와 항-넥틴-4 항원 결합 단백질 (Ab)의 아미노산의 측쇄의 반응의 잔기는 Y에 포함되는 것으로 명시될 수 있다;

[0368] Pep은 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 아미노산 단위 (예를 들어, 펩티딜 링커) (예를 들어, (Pep)은 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드, 예를 들어, 발린-시트룰린, 발린-알라닌 또는 페닐알라닌-리신 단위임)이거나 또는 그를 포함하고;

[0369] Y'은 임의로 부재하거나 또는 스페이서, 임의로 자기-제거성 스페이서 또는 비-자기-제거성 스페이서이고;

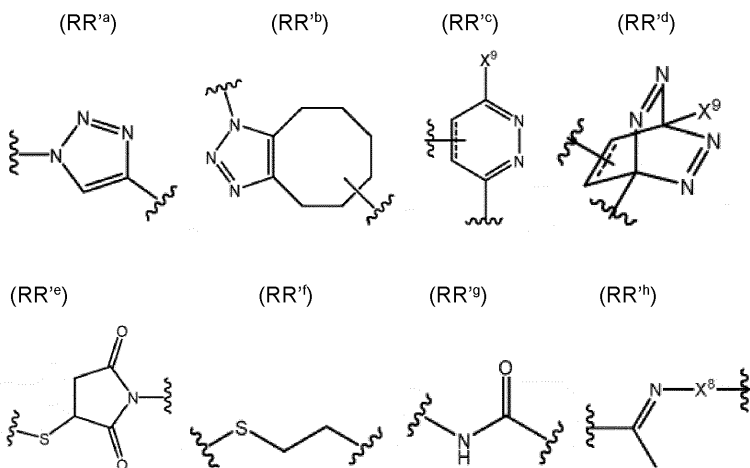
[0370] Z는 세포독성제, 임의로 캄프토테신 유도체, 임의로 엑사테칸, Dxd 또는 SN-38 분자이다.

[0371] 임의로, 화학식은 예를 들어, (Ab) 및 Y (또는 Y가 부재하면 (Pep 또는 X))의 말단 사이에 반응성 기 (R)와 항체의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 또는 항체의 아미노산에 부착되는 상보적 반응성 기 (R')의 반응의 잔기 (RR')를 포함하는 것으로 명시될 수 있다.

[0372] 일례에서, (RR')이 항체에 부착된 상보적 반응성 기 (R') (예를 들어, R'은 항체의 아미노산의 측쇄 또는 글리칸에 부착됨)와 반응성 기 (R)의 반응의 잔기인 경우에, 본 명세서에 따른 넥틴-4 결합 면역접합체는 예를 들어 화학식 (VI<sub>bis</sub>)으로 표시될 수 있다:

[0373] Ab - (RR') - (Y) - (Pep) - (Y') - (Z) 화학식 (VI<sub>bis</sub>)

[0374] 식에서, Ab, Y, Pep, Y' 및 Z는 화학식 VI에서 정의된 바와 같고, RR'은 이중 직교 반응, 바람직하게 고리첨가, 예를 들어 딜스-알더 반응 또는 1,3-쌍극자 고리첨가의 결과이다. 일 구현예에서, RR'은 하기 화학식으로 이루어진 군으로부터 선택되는 구조를 갖는다:



[0375]

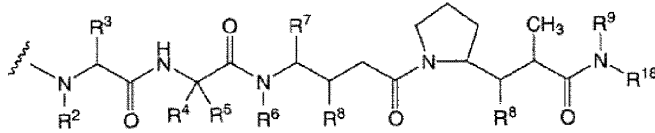
[0376] 식에서 X<sup>8</sup>은 O 또는 NH이고, X<sup>9</sup>는 H, 메틸 및 피리딜로부터 선택되고, 구조 (RR'<sup>c</sup>) 및 (RR'<sup>d</sup>)에서, ----- 결합은 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[0377] 임의 구현예에서, 엑사테칸 분자 (또는 다른 6-고리 캄프토테신)는 엑사테칸의 위치 1에서 아민을 통해 Y' (또는 Y'이 부재하는 경우 (Pep))에 결합되는 것으로 명시될 수 있다.

- [0378] 임의 구현예에서, SN-38 분자 (또는 다른 5-고리 캄프토테신)는 SN-38의 위치 9에서 아민을 통해 Y' (또는 Y'이 부재하는 경우 (Pep))에 결합되는 것으로 명시될 수 있다.
- [0379] (Z) 모이어티라고도 하는 세포독성제는 예를 들어, 항신생물제와 같은 세포독성제를 포함한다. 세포독성제의 예는 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Z는 알킬화제, 바람직하게 DNA 알킬화제일 수 있다. 알킬화제는 생리적 조건 (예를 들어, pH 7.4, 37°C, 수성 용액) 하에서 수소 원자를 알킬 기로 치환할 수 있는 화합물이다. 알킬화 반응은 전형적으로 친전자성 알킬화제를 사용한 N, O 및 S 헤테로원자 친핵체에 의한 치환 반응의 관점에서 기술되지만, 마이클 첨가 반응도 역시 중요하다. 알킬화제의 예는 질소 및 황 머스타드, 에틸렌이민, 메타노술포네이트, CC-1065 및 두오카르마이신, 니트로소우레아, 백금-함유제, DNA의 토포이소머라제 II-매개된 부위 의존적 알킬화를 유발하는 작용제 (예를 들어, 프소로스퍼민 및 관련 비스푸라독산톤), 액테이나시딘 및 다른 또는 관련 DNA 마이너 그루브 알킬화제를 포함한다.
- [0380] 일 구현예에서, Z는 킬레이트 금속, 예컨대 2 내지 8의 배위수를 갖는 2양성 또는 3양성 금속의 킬레이트이다. 이러한 금속의 특정 예는 테크네튬 (Tc), 레늄 (Re), 코발트 (Co), 구리 (Cu), 금 (Au), 은 (Ag), 납 (Pb), 비스무쓰 (Bi), 인듐 (In), 갈륨 (Ga), 이트륨 (Y), 터븀 (Tb), 가돌리늄 (Gd), 및 스칸듐 (Sc)을 포함한다. 일반적으로 금속은 바람직하게 방사성 핵종이다. 특정 방사성 핵종은 99mTc, 186Re, 188Re, 58Co, 60Co, 67Cu, 195Au, 199Au, 110Ag, 203Pb, 206Bi, 207Bi, 111In, 67Ga, 68Ga, 88Y, 90Y, 160Tb, 153Gd 및 47Sc를 포함한다. 킬레이트 금속은 예를 들어, 임의의 적합한 폴리테이트 킬레이트화제, 예를 들어 비환형 또는 환형 폴리아민, 폴리에테르 (예를 들어, 크라운 에테르 및 이의 유도체); 폴리아미드; 포피린; 및 탄소환 유도체로 킬레이트화된 상기 유형의 금속 중 하나일 수 있다.
- [0381] 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 또한 진단에서, 예를 들어, 넥틴-4 종양 세포를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 이펙터 분자 예컨대 예를 들어 진단에서 유용한 검출가능한 물질에 접합될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결분자단, 형광성 물질, 발광성 물질, 생발광성 물질, 방사성 핵종, 양전자 방출 금속 (양전자 방출 단층촬영에서 사용), 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 일반적으로 진단제로서 사용을 위한 항체에 접합될 수 있는 금속 이온은 일반적으로 미국 특허 제4,741,900호를 참조한다. 적합한 효소는 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함하고; 적합한 보결분자단은 스트렙타비딘, 아비딘 및 바이오틴을 포함하고; 적합한 형광성 물질은 엠벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 및 파이크오에리트브린을 포함하고; 적합한 발광성 물질은 루미놀을 포함하고; 적합한 생발광성 물질은 루시페라제, 루시페린, 및 애쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 125I, 131I, 111In 및 99Tc 를 포함한다.
- [0382] 일 구현예에서, 세포독성제 (Z)는 DNA 마이너 그루브 결합제 및/또는 알킬화제, 예를 들어, 피롤로벤조디아제핀, 두오카르마이신, 또는 이의 유도체이다.
- [0383] 추가 구현예에서, 세포독성제는 타산, 안트라사이클린, 캄프토테신, 에포틸론, 미토마이신, 콤브레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 마이탄시노이드, 칼리케아마이신, 두오카르마이신, 튜블리신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴, 엔다이인, 아마톡신, 피롤로벤조디아제핀, 에틸렌이민, 방사성 동위원소, 치료 단백질 및 펩티드, 및 독소 또는 이의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0384] 추가 구현예에서, 세포독성제는 시클로포스파미드, 이포스파미드, 클로람부실, 4-(비스(2-클로로에틸)아미노)페놀, 4-(비스(2-플루오로에틸)아미노)페놀, N,N-비스(2-클로로에틸)-p-페닐렌디아민, N,N-비스(2-플루오로-에틸)-p-페닐렌디아민, 카무스틴, 로무스틴, 트레오술판, 다카르바진, 시스플라틴, 카르보플라틴, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에토포시드, 테니포시드, 토포테칸, 이리노테칸, 9-아미노캄프토테신, 9-니트로캄프토테신, 10-히드록시캄프토테신, 루토테칸, 캄프토테신, 크리스나톨, 미토마이신 C, 미토마이신 A, 메토크세이트, 트리메트렉세이트, 마이코페놀산, 티아조퓨린, 리바비린, 히드록시우레아, 데페록사민, 5-플루오로우라실, 플록수리딘, 독시플루리딘, 말티트렉세드, 시타라빈, 시토신 아라비노시드, 플루다라빈, 6-머캅토퍼린, 티오구아닌, 알록시펜, 메게스트롤, 고세렐린, 류프롤리드 아세테이트, 플루타미드, 비칼루타미드, 베르토포르핀, 프탈로시아닌, 광감작제 Pc4, 데메톡시-히포크렐린 A, 인터페론-알파, 인터페론-감마, 중앙괴사 인자, 로바스타틴, 스타우로스포린, 약티노마이신 D, 블레오마이신 A2, 블레오마이신 B2, 페프로마이신, 다우노루비신, 독소루비신, N-(5,5-디아세톡시펜틸)독소루비신, 모르폴리노 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 피라루비신, 조루비신, 미톡산트론, 탐시가르긴, N<sup>8</sup>-아세틸스퍼미딘, 탈리소마이신, 에스페라마이신, 부티르산, 레티노산, 1,8-디히드록시비시클로[7.3.1]트리데카-4-엔-2,6-디인-13-온, 안구이딘, 포도필로톡신, 콤브레

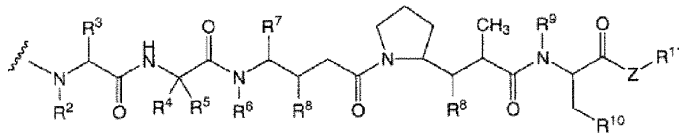
타스타틴 A-4, 판크라티스타틴, 투블리신 A, 투블리신 D, 카르미노마이신, 스트렙토니그린, 엘립트미움 아세트이트, 마이탄신, 마이탄시놀, 칼리케아마이신, 메르탄신 (DM1), N-아세틸- $\gamma_1^1$ -칼리케아마이신, 칼리케아마이신- $\gamma_1^1$ , 칼리케아마이신- $\alpha_2^1$ , 칼리케아마이신- $\alpha_3^1$ , 두오카마이신 SA, 두오카마이신 A, CC-1065, CBI-TMI, 두오카마이신 C2, 두오카마이신 B2, 센타나마이신, 둘라스타틴, 아우리스타틴 E, 모노메틸아우리스타틴 E (MMAE), 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF),  $\alpha$ -아마니틴,  $\beta$ -아마니틴,  $\gamma$ -아마니틴,  $\epsilon$ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린, 및 아마놀린산 및 이의 유도체로부터 선택된다.

[0385] 예시적인 아우리스타틴 구현예는 하기 임의의 화학식 (a1) 및 (a2)의 구조를 포함하는 N-말단 연결된 모노메틸 아우리스타틴 약물 모이어티를 포함한다:



[0386]

[0387] 화학식 a1



[0388]

[0389] 화학식 a2

[0390] 상기 식에서, (a1) 및 (a2)의 물결선은 링커 (예를 들어, 링커 X, 또는 모이어티 Y, Pep 또는 Y')에 대한 공유 부착 부위를 의미하고, 독립적으로 각 위치에서,

[0391] R<sup>2</sup>는 H 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬로부터 선택되고;

[0392] R<sup>3</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클, 아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클)로부터 선택되고;

[0393] R<sup>4</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클, 아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클)로부터 선택되고;

[0394] R<sup>5</sup>는 H 및 메틸로부터 선택되거나;

[0395] 또는 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 공동으로 탄소환 고리를 형성하고, 화학식 -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub> 을 갖고, 여기서 R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬 및 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클로부터 독립적으로 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택되고;

[0396] R<sup>6</sup>은 H 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬로부터 선택되고;

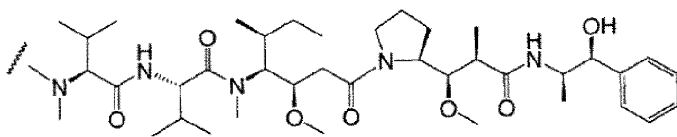
[0397] R<sup>7</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클, 아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-아릴, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클)로부터 선택되고;

[0398] 각각의 R<sup>8</sup>은 독립적으로 H, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 카르보시클 및 O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬)로부터 독립적으로 선택되고;

[0399] R<sup>9</sup>는 H 및 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬로부터 선택되고;

[0400] R<sup>10</sup>은 아릴 또는 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 헤테로시클로부터 선택되고;

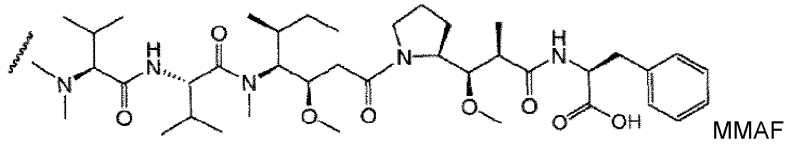
- [0401] Z는 O, S, NH, 또는  $NR^{12}$ 이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_8$  알킬이고;
- [0402]  $R^{11}$ 은 H,  $C_1-C_{20}$  알킬, 아릴, C3-C8 헤테로시클,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ , 또는  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 로부터 선택되고; m은 1-1000 범위의 정수이고;
- [0403]  $R^{13}$ 은  $C_2-C_8$  알킬이고;
- [0404]  $R^{14}$ 는 H 또는  $C_1-C_8$  알킬이고;
- [0405]  $R^{15}$ 의 각 존재는 독립적으로 H, COOH,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$  알킬이고;
- [0406]  $R^{16}$ 의 각 존재는 독립적으로 H,  $C_1-C_8$  알킬, 또는  $-(CH_2)_n-COOH$ 이고;
- [0407]  $R^{18}$ 은  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -아릴,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -( $C_3-C_8$  헤테로시클), 및  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -( $C_3-C_8$  카르보시클)로부터 선택되고;
- [0408] n은 0 내지 6 범위의 정수이다.
- [0409] 일 구현예에서,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^7$ 은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고  $R^5$ 는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 각각 이소프로필이고,  $R^5$ 는 -H이고,  $R^7$ 은 sec-부틸이다.
- [0410] 또 다른 구현예에서,  $R^2$  및  $R^6$ 은 각각 메틸이고,  $R^9$ 는 -H이다.
- [0411] 여전히 다른 구현예에서,  $R^8$ 의 각 존재는  $-OCH_3$ 이다.
- [0412] 예시적인 구현예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 각각 이소프로필이고,  $R^2$  및  $R^6$ 은 각각 메틸이고,  $R^5$ 는 -H이고,  $R^7$ 은 sec-부틸이고,  $R^8$ 의 각 존재는  $-OCH_3$ 이고,  $R^9$ 는 -H이다.
- [0413] 일 구현예에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.
- [0414] 일 구현예에서,  $R^{10}$ 은 아틸이다.
- [0415] 예시적인 구현예에서,  $R^{10}$ 은 -페닐이다.
- [0416] 예시적인 구현예에서, Z가 -O-일 때,  $R^{11}$ 은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.
- [0417] 일 구현예에서, Z가 -NH일 때,  $R^{11}$ 은  $-CH(R^{15})_2$ 이고, 여기서  $R^{15}$ 는  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 이고,  $R^{16}$ 은  $-C_1-C_8$  알킬 또는  $-(CH_2)_n-COOH$ 이다.
- [0418] 다른 구현예에서, Z가 -NH일 때,  $R^{11}$ 은  $-CH(R^{15})_2$  이고, 여기서  $R^{15}$ 는  $-(CH_2)_n-SO_3H$ 이다.
- [0419] 화학식 (a1)의 한 예시적인 아우리스타틴 구현예는 하기 MMAE이고, 여기서 물결선은 링커에 대한 공유 부착을 의미한다:



MMAE

- [0420]
- [0421] 화학식 (a2)의 예시적인 아우리스타틴 구현예는 하기 MMAF이고, 여기서 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 의미한다 (참조: US 2005/0238649 및 Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 1

14-124):



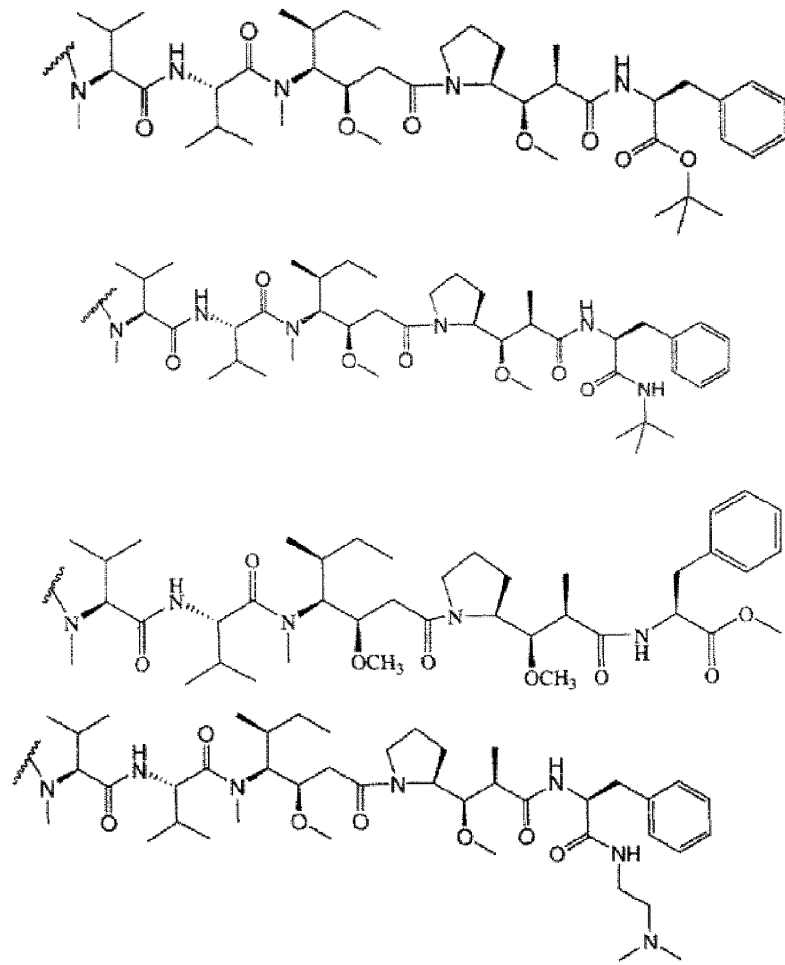
[0422]

[0423]

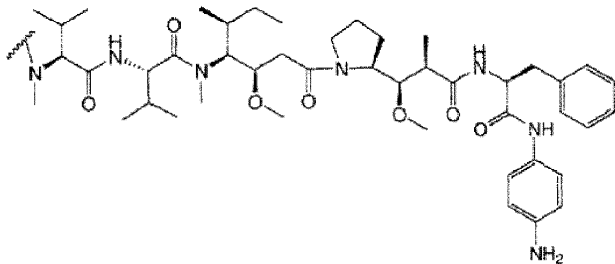
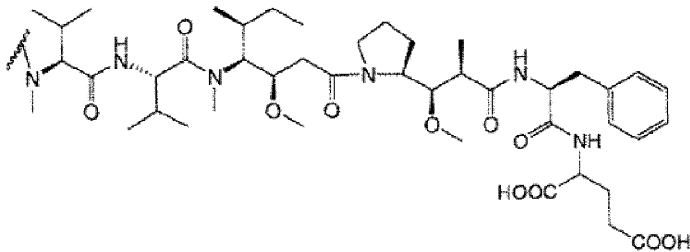
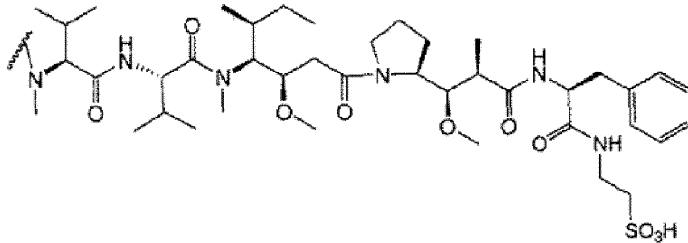
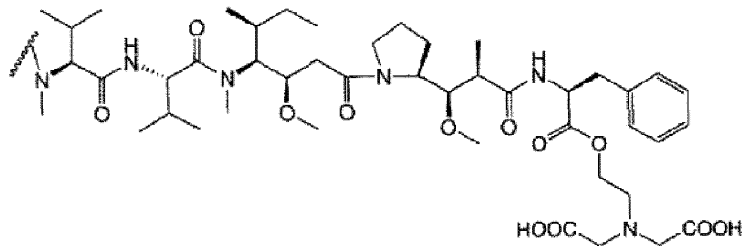
다른 예시적인 Z 구현에는 펜타펩티드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에 페닐알라닌 카르복시 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물 (WO 2007/008848) 및 펜타펩티드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에 페닐알라닌 측쇄 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물 (WO 2007/008603)을 포함한다.

[0424]

다른 약물 모이어티는 하기 MMAF 유도체를 포함하고, 여기서 물결선은 링커에 대한 공유 부착을 의미한다:



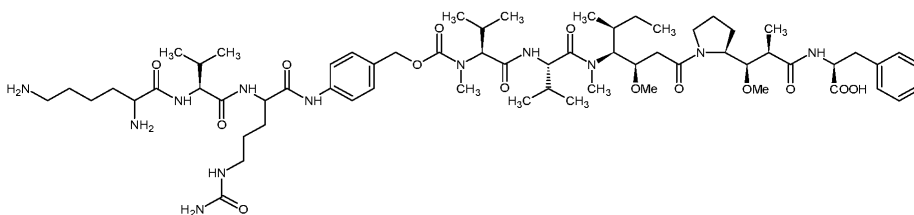
[0425]



[0426]

[0427]

(Z) 모이어티로서 MMAF와 함께 1차 아민을 포함하는 스페이서 (Y), (Pep) 모이어티로서 발린-시트룰린, (Y') 모이어티로서 PAB를 포함하는 링커의 예는 하기에 표시된다:



[0428]

[0429]

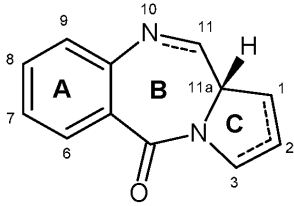
일 구현예에서, Z 모이어티 DNA 마이너 그루브 결합제이고, 임의로 Z는 피롤로벤조디아제핀 (PBD)을 포함한다. 일 구현예에서, Z는 피롤로벤조디아제핀 단량체이다. 일 구현예에서, Z는 2개 피롤로벤조디아제핀 단위를 포함하는 피롤로벤조디아제핀 이량체이다. 일 구현예에서, Z는 3개 피롤로벤조디아제핀 단위를 포함하는 피롤로벤조디아제핀 삼량체이다. 일 구현예에서, Z는 3개 초과 피롤로벤조디아제핀 단위를 포함하는 피롤로벤조디아제핀 다량체이다. PBD의 구조를 비롯하여, 이의 화학식 및 이를 제조 방법은 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2013/177481, WO 2011/130616, WO 2004/043880, WO 2005/085251, W02012/112687 및 WO 2011/023883에 기술되고, 이들 각각의 개시는 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0430]

피롤로[2,1-c][1,4] 벤조디아제핀은 구아닌 잔기에 공유적으로 부착되는 서열-선택적, 마이너-그루브 결합 DNA-상호작용제의 패밀리이다. PBD의 C11a-위치에서 (S)-키랄성은 DNA 마이너 그루브에 완벽하게 맞도록 적절한

3-차원 형태를 제공한다고 보고되었다. PBD는 상이한 효과 및 작용 방식을 가질 수 있다. PBD는 DNA의 가교결합을 유발하지 않는 DNA-결합체 또는 DNA-알킬화제일 수 있거나, 또는 PBD는 DNA 가교제일 수 있다.

[0431] 피롤로벤조디아제핀 단위 또는 단량체는 하기와 같은 일반 구조를 가질 수 있다:



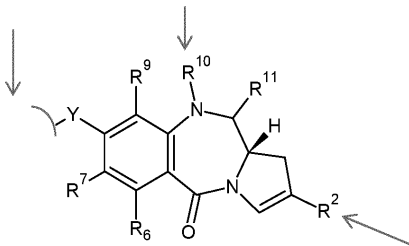
[0432]

[0433] 상기 식에서, PBD는 방향족 A 고리 및 피롤로 C 고리 둘 모두에서, 상이한 개수, 유형 및 위치의 치환기를 가질 수 있고, C 고리의 포화도가 다양할 수 있다. B-고리에는 이민 (N=C), 카르비놀아민 (NH-CH(OH)), 또는 카르비놀아민 메틸 에테르 (NH-CH(OMe))가 DNA 알킬화를 담당하는 친전자성 중심인 N<sup>10</sup>-C<sup>11</sup> 위치에 존재한다.

[0434] PBD의 생물학적 활성은 전형적으로 가요성 알킬렌 링커를 통해 그들 C8/C8'-히드록실 작용성을 통해서, 2개 PBD 단량체 또는 단위를 함께 연결하여서 강화될 수 있다.

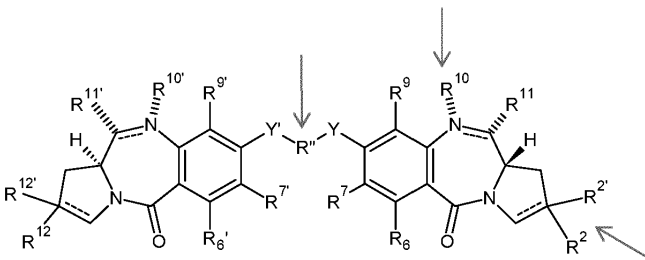
[0435] 본 명세서의 임의의 구현예의 일 양태에서, 피롤로벤조디아제핀 단량체 또는 단위는 피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀이다. 본 명세서의 임의의 구현예의 일 양태에서, 피롤로벤조디아제핀 이량체는 C8/C8'-연결된 피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀 이량체이다.

[0436] PBD는 임의의 적합한 위치를 통해 링커에 부착될 수 있다. 예를 들어, PBD는 하기 표시된 PBD 단위에서 임의의 위치를 통해, 링커에 연결될 수 있다.



[0437]

[0438] 일 구현예에서, PBD 이량체는 하기 일반 화학식의 구조를 포함하고, 화합물 내에 다른 치환기 또는 작용성에 대한 예시적인 부착점이 화살표로 표시되었다:



[0439]

[0440] 상기 식에서,

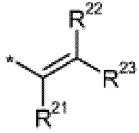
[0441] R<sup>12</sup> 및 R<sup>12'</sup>, 및/또는 R<sup>2</sup> 및 R<sup>2'</sup>은 함께 각각 이중 결합 =CH<sub>2</sub> 또는 =CH-CH<sub>3</sub>을 형성하거나; 또는

[0442] R<sup>2'</sup> 및 R<sup>12'</sup>은 부재하고, R<sup>2</sup> 및 R<sup>12</sup>는 독립적으로

[0443] (iia) C<sub>1-5</sub> 포화된 지방족 알킬;

[0444] (iib) C<sub>3-6</sub> 포화된 시클로알킬;

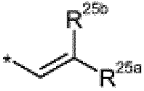
[0445] (iic)



[0446]

[0447] (식에서, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> 및 R<sup>23</sup>은 H, C<sub>1-3</sub> 포화된 알킬, C<sub>2-3</sub> 알케닐, C<sub>2-3</sub> 알키닐 및 시클로프로필로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R<sup>12</sup> 기의 탄소 원자의 총 개수는 5개 이하임);

[0448] (iid)

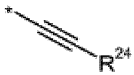


[0449]

[0450] (식에서, R<sup>25a</sup> 및 R<sup>25b</sup> 중 하나는 H이고, 다른 하나는

[0451] 페닐로서, 할로, 메틸, 메톡시로부터 선택되는 기에 의해 임의 치환되는 것인 페닐; 피리딜; 및 티오펜으로부터 선택됨); 및

[0452] (iie)



[0453]

[0454] (식에서, R<sup>24</sup>는 H; C<sub>1-3</sub> 포화된 알킬; C<sub>2-3</sub> 알케닐; C<sub>2-3</sub> 알키닐; 시클로프로필; 페닐로서, 할로, 메틸, 메톡시로부터 선택된 기로 임의 치환되는 것인 페닐; 피리딜; 및 티오펜으로부터 선택됨)

[0455] 로부터 선택되고;

[0456] R<sup>6</sup> 및 R<sup>9</sup>는 H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', 니트로, Me<sub>3</sub>Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 R 및 R'은 임의 치환된 C<sub>1-12</sub> 알킬, C<sub>3-20</sub> 헤테로시클릴 및 C<sub>5-20</sub> 아릴 기로부터 독립적으로 선택되고;

[0457] R<sup>7</sup>은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NHRR', 니트로, Me<sub>3</sub>Sn 및 할로로부터 선택되고;

[0458] (a) R<sup>10</sup>은 H이고, R<sup>11</sup>은 OH, OR<sup>A</sup> (여기서, R<sup>A</sup>는 알킬임)이거나;

[0459] (b) R<sup>10</sup> 및 R<sup>11</sup>은 그들이 결합되는 탄소 원자 및 질소 원자 간에 질소-탄소 이중 결합을 형성하거나; 또는

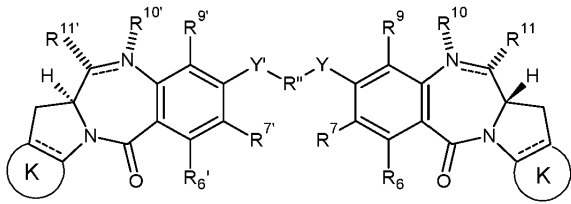
[0460] (c) R<sup>10</sup>은 H이고 R<sup>11</sup>은 SO<sub>2</sub>M (여기서, z는 2 또는 3이고 m은 1가 약학적으로 허용되는 양이온임)이고;

[0461] R''은 C<sub>3-12</sub> 알킬렌 기로서, 이의 사슬은 하나 이상의 헤테로원자, 예를 들어 O, S, NR<sup>N2</sup> (여기서, R<sup>N2</sup>는 H 또는 C<sub>1-4</sub> 알킬임), 및/또는 방향족 고리, 예를 들어, 벤젠 또는 피리딘이 개재될 수도 있고;

[0462] Y 및 Y'은 O, S, 또는 NH로부터 선택되고;

[0463] R<sup>6'</sup>, R<sup>7'</sup>, R<sup>9'</sup>은 각각 R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> 및 R<sup>9</sup>와 동일한 기로부터 선택되고, R<sup>10'</sup> 및 R<sup>11'</sup>은 R<sup>10</sup> 및 R<sup>11</sup>과 동일하고, R<sup>11</sup> 및 R<sup>11'</sup>이 SO<sub>2</sub>M이면, M은 2가의 약학적으로 허용가능한 양이온을 나타낼 수도 있다.

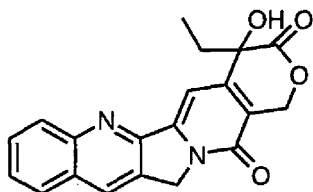
[0464] 다른 예에서, PBD 이량체는 하기 일반 화학식의 구조를 포함한다:



[0465]

[0466] 상기 식에서,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ ,  $R^{6'}$ ,  $R^{7'}$ ,  $R^{9'}$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{10'}$  및  $R^{11'}$ 은 상기 정의된 바와 같고, "K" 고리는 치환 또는 비치환된 방향족 또는 비-방향족 고리, 임의로 6-원 고리, 임의로 페닐이다.

[0467] 일 구현예에서, 세포독성제 (Z)는 캄프토테신이고, 예를 들어, 캄프토테신 또는 캄프토테신 유사체의 구조를 갖거나 또는 포함한다. 캄프토테신은 다양한 치환을 갖는 코어 고리계를 공유하지만, 바람직하게 하기 기본 캄프토테신의 고리 A 및/또는 B에 변형 또는 치환을 갖는 다양한 캄프토테신 유사체로서 충분히 알려져 있다:



고리 (A) (B) (C) (D) (E)

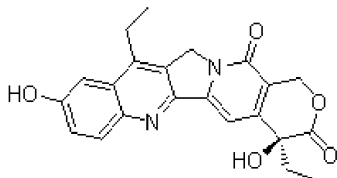
[0468]

[0469] 토포테칸, 이리노테칸, 액사테칸, DXd, 9-아미노캄프토테신, 9-니트로캄프토테신, 10-히드록시캄프토테신, 루토테칸, 캄프토테신, 지마테칸, 벨로테칸, 및 루비테칸을 포함하여, 많은 캄프토테신 유사체가 보고되어 있다.

추가 캄프토테신 유사체는 다음의 문헌에 개시되어 있고, 이의 개시를 참조로 본 명세서에 편입시킨다: Li et al., ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 10, 1386-1392, Jpn. J. Cancer Res. 86: 776-782 및 Takiguchi et al. 1997 Jpn. J. Cancer Res. 88: 760-769. 4개 유사체, 토포테칸, 이리노테칸, 벨로테칸, 및 DXd (트라스투주맙 데록스테칸의 일부로서)는 FDA에 의해 승인되었다. 일 구현예에서, 캄프토테신 유사체는 5-고리 화합물 (예를 들어, 캄프토테신이 F 고리가 결여됨)이다. 일 구현예에서, 캄프토테신 유사체는 예를 들어, F 고리를 포함하는, 6-고리 화합물이다.

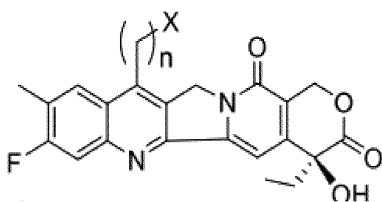
[0470] 일부 예 예컨대 기본 캄프토테신 구조, SN-38 분자 (7-에틸-10-히드록시캄프토테신; 이리노테칸의 활성 대사산물) 및 [Li et al., ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 10, 1386-139]에 개시된 캄프토테신 유사체와 같은 일부 예들은 5개 고리 (A, B, C, D 및 E 고리)를 갖고, 예를 들어, B 고리 상의 치환기를 통해 링커 (예를 들어, 스페이서 Y 또는 Y', 또는 링커 X)에 부착될 수 있다.

[0471] SN-38:



[0472]

[0473] [Li et al., ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 10, 1386-139]의 화합물:



[0474]

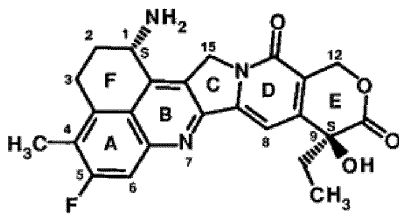
[0475] 임의로 캄프토테신 유사체는 6-고리 화합물 (추가로 F 고리)이고, 여기서 화합물은 이러한 F 고리 상의 치환기

를 통해서 링커에 부착된다. 이러한 6개 고리 화합물의 예는 DXd (CAS No. : 1599440-33-1) 및 엑사테칸을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0476] 따라서, 캄프토테신 유사체는 엑사테칸, SN-38, 및 이러한 모이어티를 포함하는 임의의 다양한 분자를 포함하고, 예를 들어, 엑사테칸은 위치 1 아민에서 치환될 수 있거나 또는 치환되지 않을 수 있고, 예를 들어, 치환기는  $-C(=O)-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $HO-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$  기 또는 미국 특허 제6,835,807호 (이의 개시를 참조로 본 명세서에 편입시킴)에 표시된 다른 기이거나 또는 그를 포함한다.

[0477] 일 구현예에서, 본 개시의 항체는 생체내 또는 시험관내에서 넥틴-4 발현 종양 세포의 존재 하에 (예를 들어, 절단가능한 모이어티의 효소적 절단에 이어서 스페이서 Y'의 자기-제거 시) 화합물 1의 구조를 갖는 엑사테칸 분자를 방출한다.

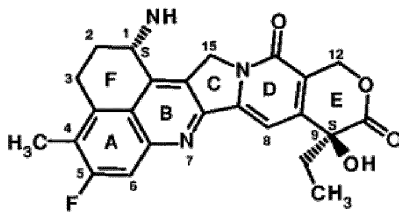
[0478] 캄프토테신 유도체 또는 유사체 엑사테칸은 [Mitsui et al. 1995 Jpn. J. Cancer Res. 86: 776-782] 및 [Takiguchi et al. 1997 Jpn. J. Cancer Res. 88: 760-769]에 기술되어 있고, 이의 개시를 참조로 본 명세서에 편입시킨다. 엑사테칸의 구조는 하기 화합물 1a로 표시된다:



[0479]

[0480] 화합물 1a

[0481] 엑사테칸은 위치 1에서 아미노 기의 질소 원자를 통해 링커에 커플링될 수 있어서, 엑사테칸 모이어티는, 링커에 결합될 때 또는 링커-엑사테칸 분자 ((X-Z) 분자) 내에 존재할 때, 예를 들어, 항체에 접합되어서, 엑사테칸은 화합물 1b의 구조를 가지게 된다:



[0482]

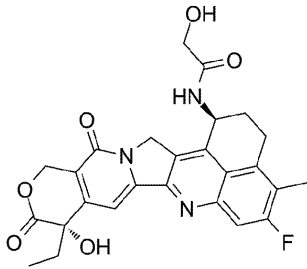
[0483] 화합물 1b

[0484] 따라서, 화합물 1a의 엑사테칸이 위치 1에서 아민을 통해 링커에 부착될 때 (및 예를 들어, 링커가 이후에 항체에 부착될 때), 엑사테칸이 위치 1에서 변형된 기인 것으로 이해된다는 것을 이해할 것이다 (즉, 위치 1의 NH<sub>2</sub> 기가 NH, 또는 대안적으로 OH 또는 O 기로 치환됨). 예를 들어, 엑사테칸은 절단가능한 올리고펩티드를 포함하는 링커를 통해 항체에 커플링될 수 있다. 예는 디-, 트리-, 테트라- 및 펜타-펩티드 예컨대 미국 특허 제6,835,807호에 표시된 글리신 및 페닐알라닌-함유 펩티드, 또는 PAB 분자에 부착된 디펩티드 발린-시트룰린 또는 발린-알라닌을 포함하고, 이의 개시는 참조로 본 명세서에 편입된다. 다양한 적합한 링커-Z 구조는 위치 1에 아미노에서 활성 엑사테칸 또는 엑사테칸 유도체를 방출할 수 있는 것이 알려져 있다. 엑사테칸은, 절단 시 화합물 1a의 구조를 갖는 엑사테칸의 방출을 야기하는, 화학식 VII, VIII 및 IX, 또는 실시예 7의 (PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸) 링커로 표시된 바와 같이, 위치 1 아민에 부착된 p-아미노벤질옥시카르보닐 기 (PAB) 기를 통해 절단가능한 올리고펩티드에 연결될 수 있다. 일례에서, 엑사테칸은, 절단 시 엑사테칸-함유 화합물 13 (Dxd)의 방출을 야기하는, 화학식 III 및 화합물 13 (Dxd)을 비롯하여 실시예 7의 ggfg-Dxd 링커에 표시된 바와 같이, 위치 1 아민에 부착된 (CH<sub>2</sub>-C(=O)) 기를 통해 절단가능한 올리고펩티드에 연결될 수 있다. 화합물 1의 엑사테칸의 위치 1의 NH 또는 NH<sub>2</sub>에서 치환기의 예는  $-C(=O)-$ ,  $-O-C(=O)-$ , 또는 (CH<sub>2</sub>-C(=O)) 포함 기 예컨대  $-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $HO-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$

및  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 를 포함한다.

[0485] 일 구현예에서, 치환된 엑사테칸 유도체 (예를 들어, 위치 1에서 유도됨)는 화합물 13의 구조를 갖는다.

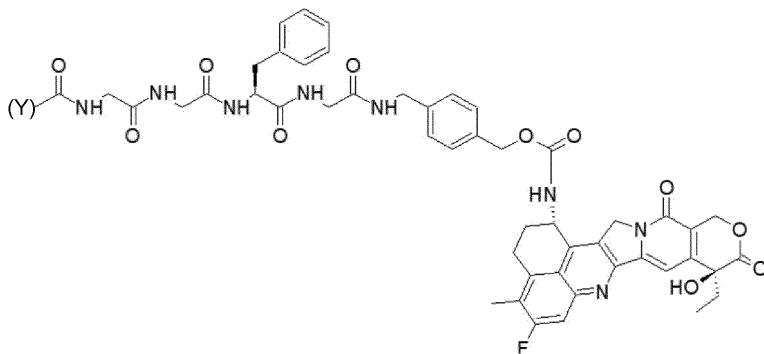
[0486] Dxd의 구조는 하기에 표시된다:



[0487]

[0488] Dxd는 탄소 사슬의/말단에서의 산소 원자를 통해 링커에 커플링될 수 있어서, Dxd 모이어티는, 링커에 결합되었을 때 또는 링커-Dxd 분자 ((X-Z) 분자) 내에 존재할 때, 예를 들어, 항체에 접합되어서, 탄소-사슬-말단 OH는 0로 치환되게 된다.

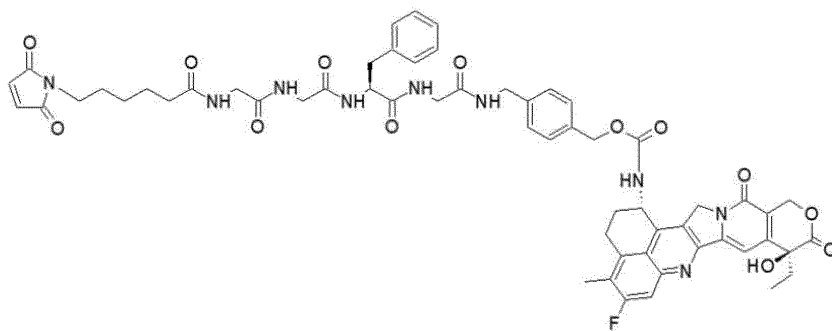
[0489] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 VII로 표시되는 구조이거나, 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 화학식 VII 또는 화합물 3 또는 4의 구조를 포함하는 링커로 작용화된 항-넥틴-4 결합 단백질은 (예를 들어, 세포내에서, 넥틴-4 발현 종양 세포의 존재 하에서) 화합물 1a의 구조를 갖는 화합물을 방출 또는 산출하게 된다:



[0490]

[0491] 화학식 VII

[0492] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 3의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제, 예를 들어, 트리스 (2-카르복시에틸) 포스핀 히드로클로라이드에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.

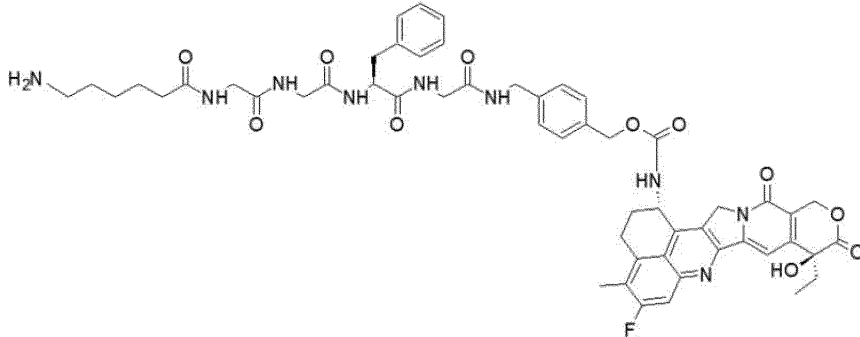


[0493]

[0494] 화합물 3

[0495] 최종 항체-약물 접합체는 화합물 3의 구조 (여기서, 화합물 3은 시스테인 잔기의 S 원자를 통해 결합됨)를 갖는 화합물로 작용화된 하나 또는 다수의 시스테인 잔기를 포함하는 항체를 포함하게 된다.

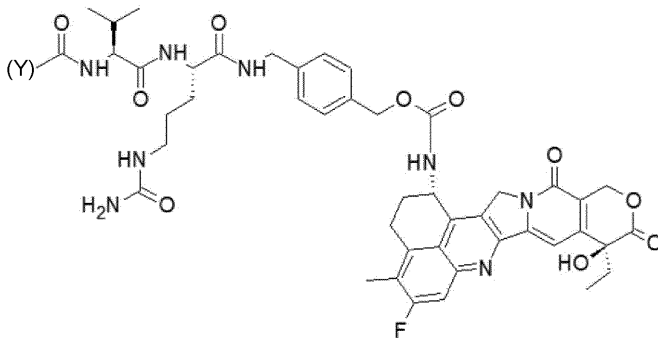
[0496] 다른 구현예에서, 링커는 R 기로서 1차 아민을 가질 수 있고, 트랜스글루타미나제 효소의 존재 하에서 항체와 반응할 때, 링커로 작용화된 하나 또는 다수의 억제제 글루타민 잔기를 포함하는 항체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 링커 (X-Z), 또는 그로 작용화된 항체는 하기 화합물 4로 표시되는 구조를 갖거나 또는 포함한다:



[0497]

[0498] 화합물 4

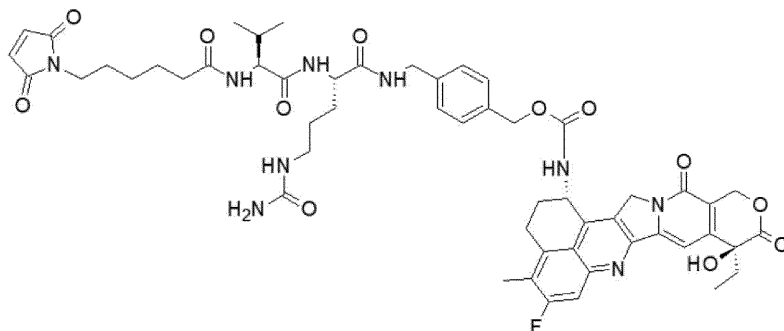
[0499] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 VIII으로 표시되는 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카뱃 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 화학식 VIII 또는 화합물 5, 6 또는 7의 구조를 포함하는 링커로 작용화된 항-넥틴-4 결합 단백질은 하기 화합물 Ia의 구조를 갖는 화합물을 (예를 들어, 세포내에서, 넥틴-4 발현 종양 세포의 존재 하에) 방출 또는 산출하게 된다.



[0500]

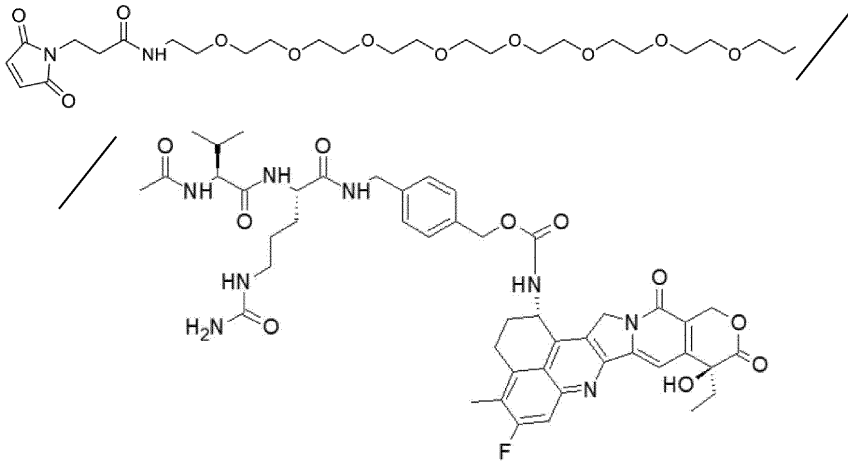
[0501] 화학식 VIII

[0502] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 5 또는 6의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.



[0503]

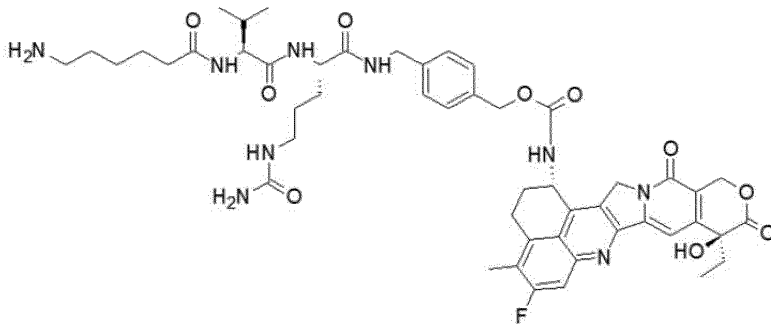
[0504] 화합물 5



[0505]

[0506] 화합물 6

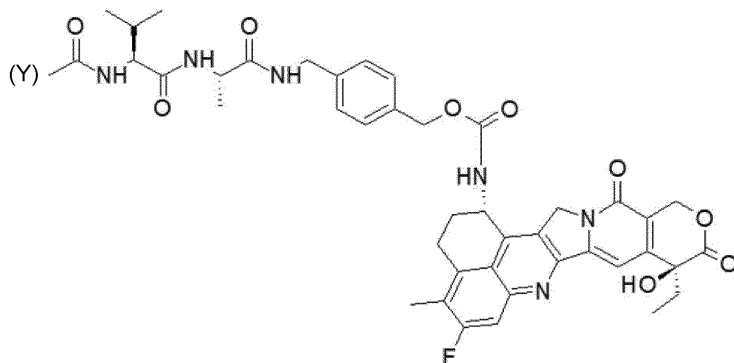
[0507] 다른 구현예에서, 링커는 R 기로서 1차 아민을 가질 수 있고, 트랜스글루타미나제 효소의 존재 하에서 항체와 반응할 때, 링커로 작용화된 하나 또는 다수의 엑셉터 글루타민 잔기를 포함하는 항체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 링커 (X-Z), 또는 그로 작용화된 항체는 하기 화합물 7로서 표시되는 구조를 갖거나 또는 포함한다:



[0508]

[0509] 화합물 7

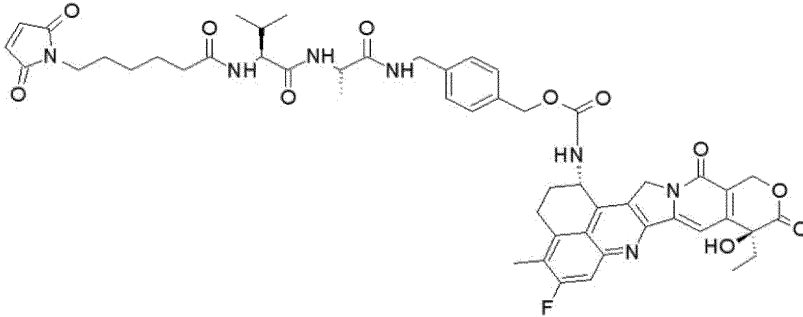
[0510] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 IX로 표시되는 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카뱃 잔기 N297에 결합된 천연, 질두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 화학식 IX의 구조를 포함하는 링커로 작용화된 항-넥틴-4 결합 단백질은 화합물 Ia의 구조를 갖는 화합물을 (예를 들어, 세포내에서, 넥틴-4 발현 종양 세포의 존재 하에) 방출하게 된다.



[0511]

[0512] 화학식 IX

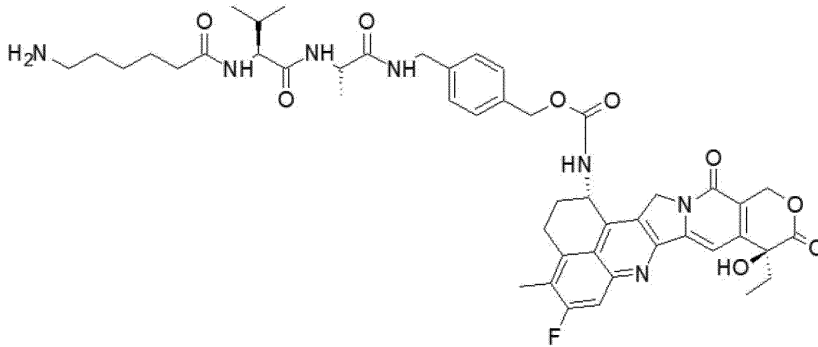
[0513] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 8의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.



[0514]

[0515] 화합물 8

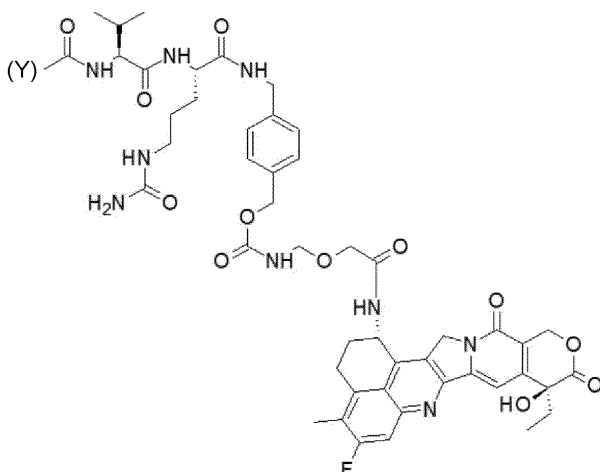
[0516] 다른 구현예에서, 링커는 R 기로서 1차 아민을 가질 수 있고, 트랜스글루타미나제 효소의 존재 하에서 항체와 반응할 때, 링커로 작용화된 하나 또는 다수의 억제제 글루타민 잔기를 포함하는 항체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 링커 (X-Z), 또는 그로 작용화된 항체는 하기 화합물 9로 표시된 구조를 갖거나 또는 포함한다:



[0517]

[0518] 화합물 9

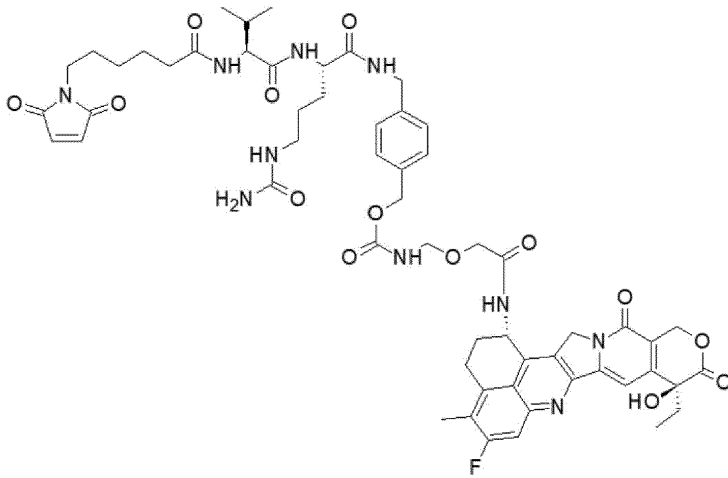
[0519] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 X로 표시되는 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카바트 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다.



[0520]

[0521] 화학식 X

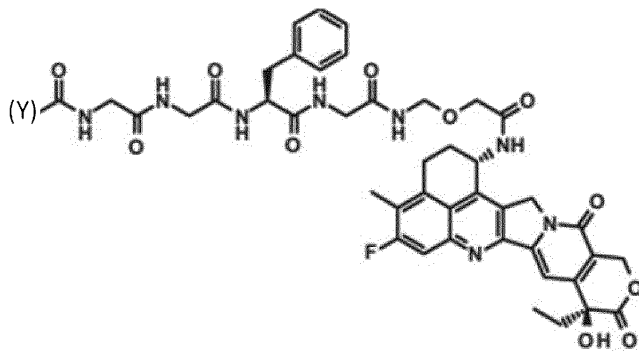
[0522] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 10의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제, 예를 들어, 트리스 (2-카르복시에틸) 포스핀 히드로클로라이드에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.



[0523]

[0524] 화합물 10

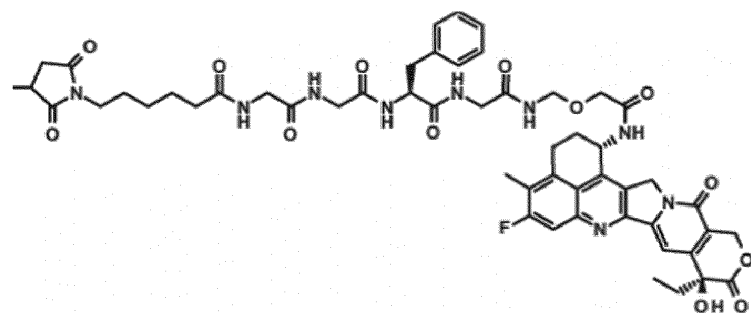
[0525] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 XI로 표시되는 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카뎃 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다.



[0526]

[0527] 화학식 XI

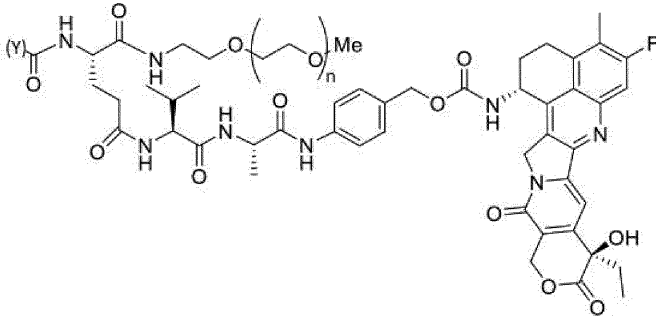
[0528] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 11의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.



[0529]

[0530] 화합물 11

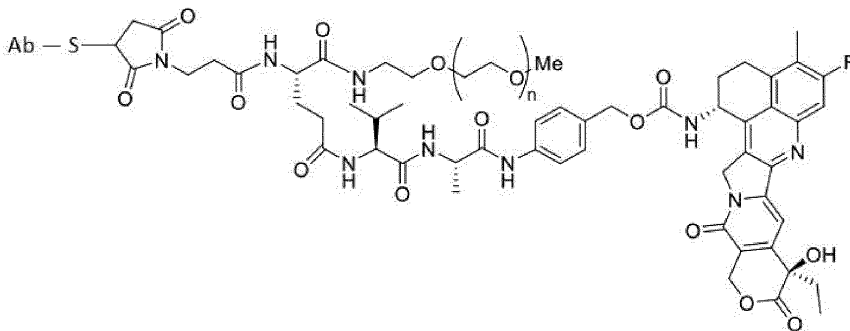
[0531] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 XII에 따른 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카바트 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 링커는 1-72, 1-16, 1-12, 1-8, 1-7, 1-6, 6-24, 6, 8, 16, 18 또는 24개 PEG 단위를 포함할 수도 있다. 하기 화학식에서, PEG 단위의 개수 n은 예를 들어, 1-72, 5-23, 1-15, 1-16, 1-11, 1-12, 1-8, 1-7, 1-6, 7, 15, 17 또는 23일 수 있다.



[0532]

[0533] 화학식 XII

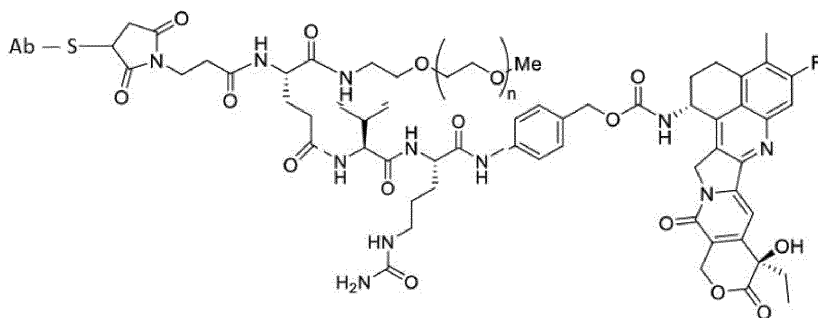
[0534] 이러한 구현예에서, R 기로서 말레이미드를 갖는 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 화학식 XII bis의 구조를 가질 수 있고, 말레이미드 모이어티는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체 (Ab)의 아미노산 (즉, 시스테인)의 황 기 (S)에 결합된다.



[0535]

[0536] 화학식 XII bis

[0537] 세포내에서 절단가능한 펩티드가 발린-시트룰린 화학식 XII의 변이형에서, R 기로서 말레이미드를 갖는 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 화학식 XIIter의 구조를 가질 수 있다:

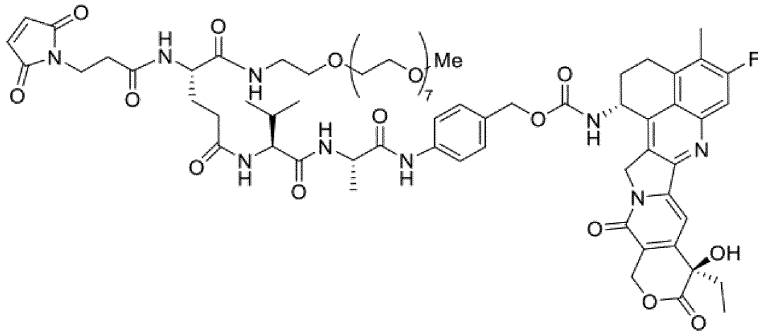


[0538]

[0539] 화학식 XIIter

[0540] R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 14a의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬

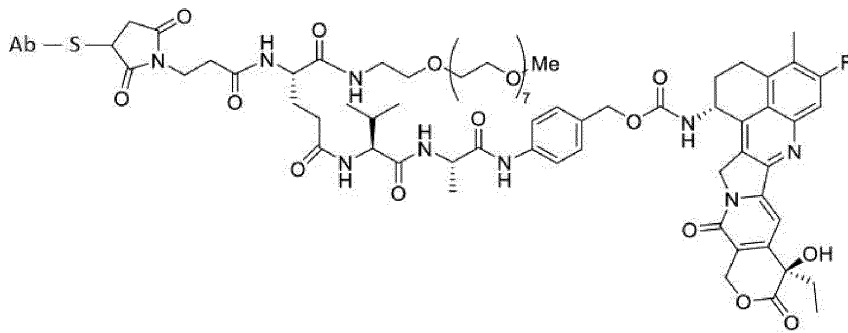
간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 이러한 예에서, 링커 모이어티는 8개 PEG 단위를 포함한다.



[0541]

[0542] 화합물 14a

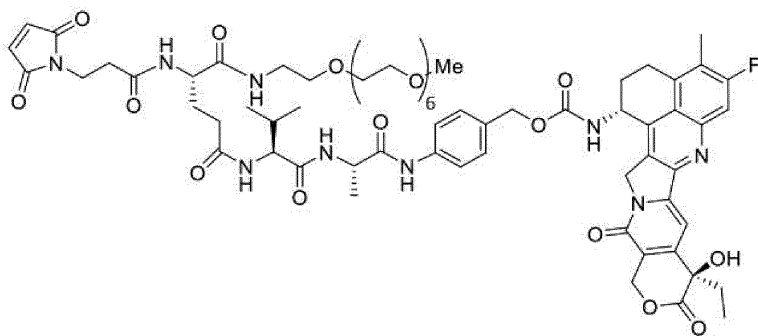
[0543] 이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 하나의 면역접합체 또는 하나의 항체-약물 접합체는 하기 화합물 14a bis의 구조를 가질 수 있다.



[0544]

[0545] 화합물 14a bis

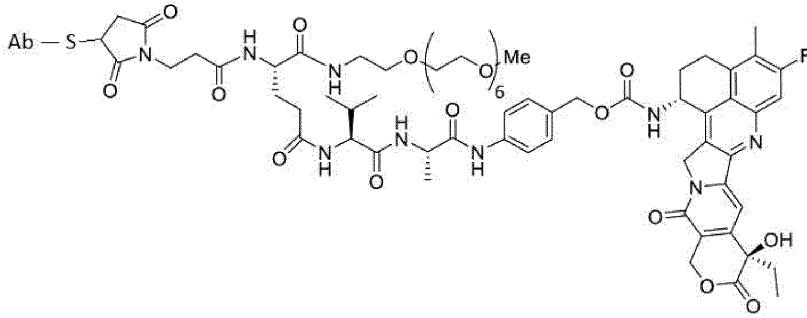
[0546] R 기로서 말레이미드를 갖는 다른 예시적인 링커는 하기 화합물 14b의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 이러한 예에서, 링커 모이어티는 7개 PEG 단위를 포함한다.



[0547]

[0548] 화합물 14b

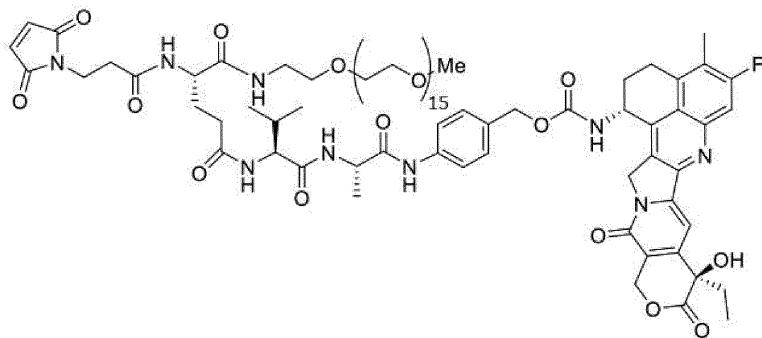
[0549] 이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 하나의 면역접합체 또는 하나의 항체-약물 접합체는 하기 화합물 14b bis의 구조를 가질 수 있다.



[0550]

[0551] 화합물 14b bis

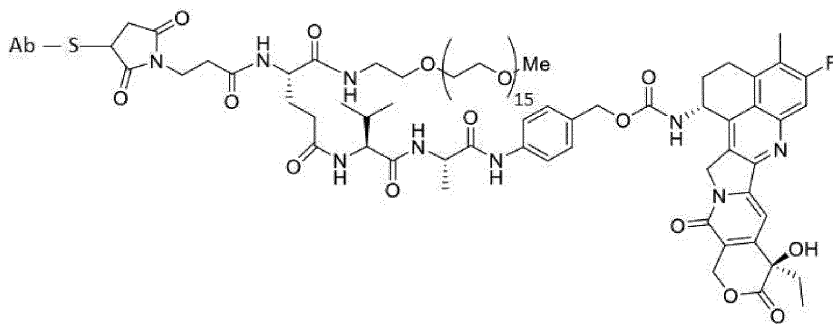
[0552] R 기로서 말레이미드를 갖는 다른 예시적인 링커는 하기 화합물 14c의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 이러한 예에서, 링커 모이어티는 16개 PEG 단위를 포함한다.



[0553]

[0554] 화합물 14c

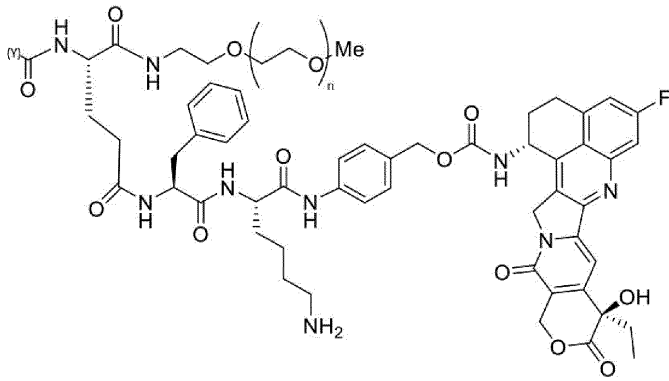
[0555] 이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 하기 화합물 14c bis의 구조를 가질 수 있다.



[0556]

[0557] 화합물 14c bis

[0558] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 XIII에 따른 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의 글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카바트 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응성 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 링커는 1-72, 1-16, 1-12, 1-8, 1-7, 1-6, 6-24, 8, 16, 18 또는 24개 PEG 단위를 포함할 수도 있다. 하기 화학식에서, PEG 단위의 개수 n은 예를 들어, 1-72, 5-23, 1-15, 1-16, 1-11, 1-12, 1-8, 1-7, 1-6, 7, 15, 17 또는 23일 수 있다.



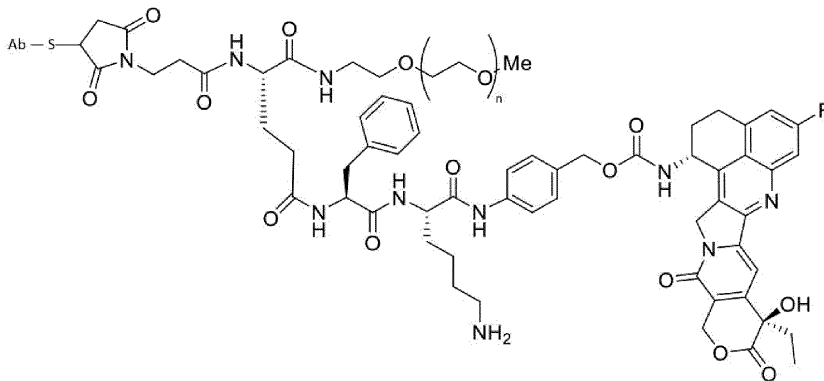
[0559]

[0560]

화학식 XIII

[0561]

이러한 구현예에서, R 기로서 말레이미드를 갖는 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 하기 화학식 XIII bis의 구조를 가질 수 있고, 말레이미드 모이어티는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체 (Ab)의 아미노산 (즉, 시스테인)의 황 기 (S)에 결합된다.



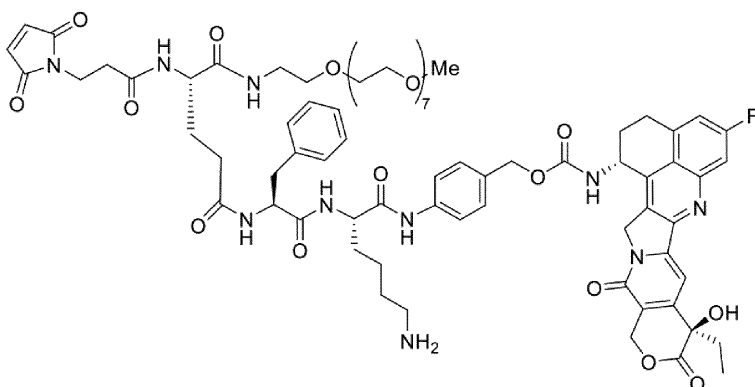
[0562]

[0563]

화학식 XIII bis

[0564]

R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 15a의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 이러한 예에서, 링커 모이어티는 8개 PEG 단위를 포함한다.



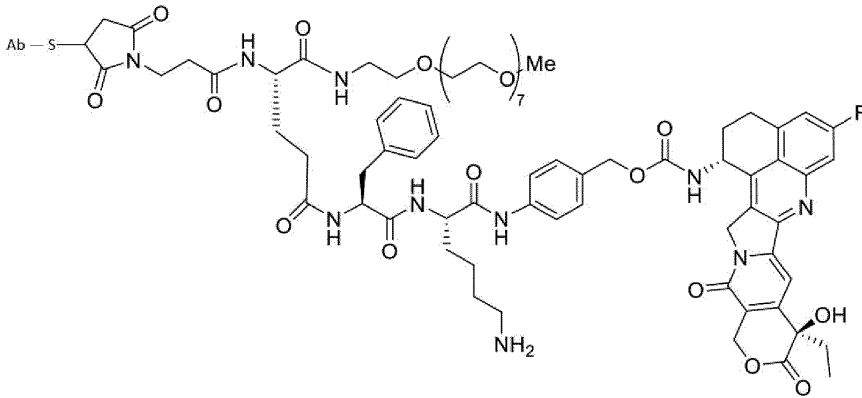
[0565]

[0566]

화합물 15a

[0567]

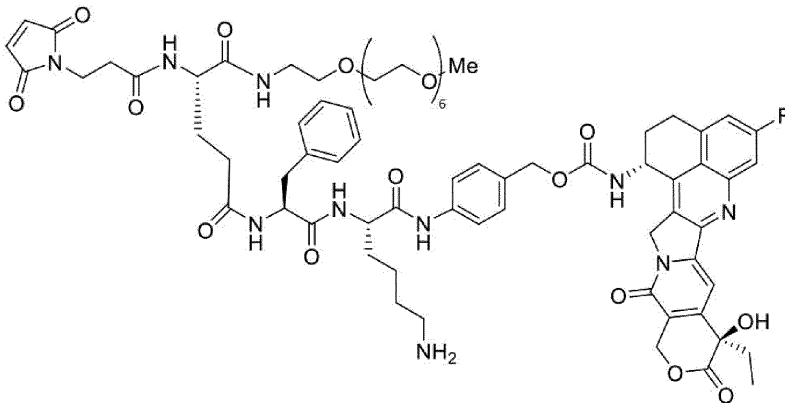
이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 하기 화합물 15a bis의 구조를 가질 수 있다.



[0568]

[0569] 화합물 15a bis

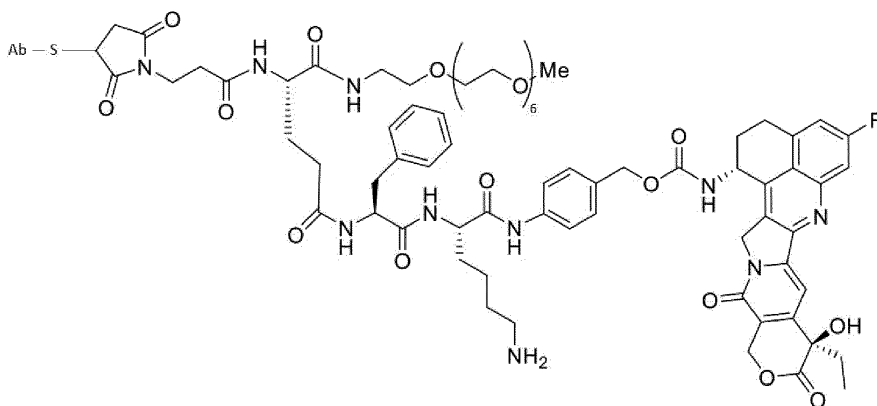
[0570] R 기로서 말레이미드를 갖는 다른 예시적인 링커는 하기 화합물 15b의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 이러한 예에서, 링커 모이어티는 7개 PEG 단위를 포함한다.



[0571]

[0572] 화합물 15b

[0573] 이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 하기 화합물 15b bis의 구조를 가질 수 있다.

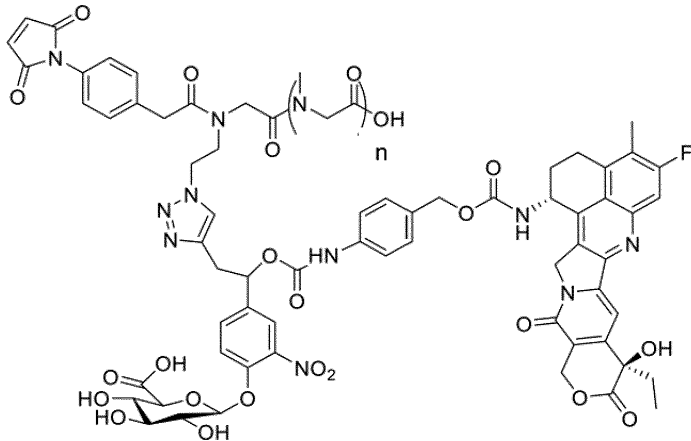


[0574]

[0575] 화합물 15b bis

[0576] 일 구현예에서, 링커 모이어티 (X-Z)는 하기 화학식 XIV에 따른 구조이거나 또는 그를 포함하고, 여기서 (Y)는 반응성 기 (R)와 아미노산 잔기, 예를 들어 항체 상의 유리 아미노, 히드록실, 술폰히드릴 또는 카르복실 기 (예를 들어, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노 기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산 기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 S 원자), 또는 예를 들어 글리코실화된 아미노산 잔기의

글리칸 구조 (예를 들어, 항체의 카바트 잔기 N297에 결합된 천연, 절두형 또는 달리 변형된 N-글리칸)의 반응의 잔기를 (예를 들어, 이의 말단에) 포함하는 스페이서이다. 하기 화학식에서, PSAR 단위의 개수 n은 예를 들어 1-72, 1-24, 1-16, 1-10, 1-12, 1-8, 1-6, 8, 16, 18 또는 24일 수 있다.



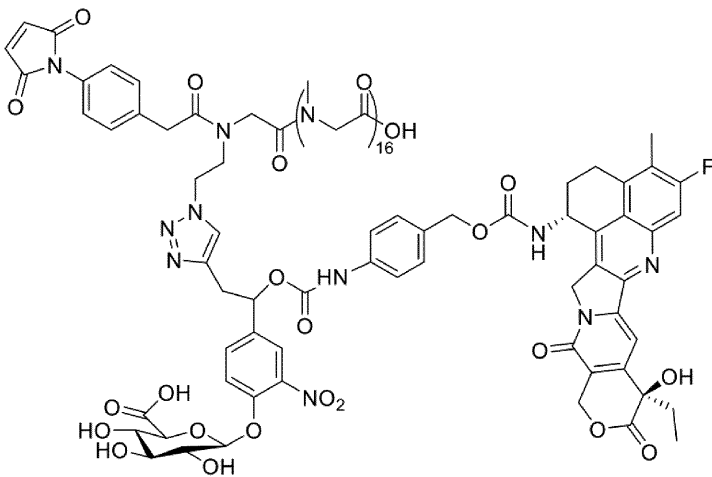
[0577]

[0578]

화학식 XIV

[0579]

R 기로서 말레이미드를 갖는 예시적인 링커는 하기 화합물 16의 구조를 가질 수 있다. 이러한 링커는 사슬 간 디설피드 결합이 환원제에 의해 환원된 후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 항체에 접합될 수 있다.



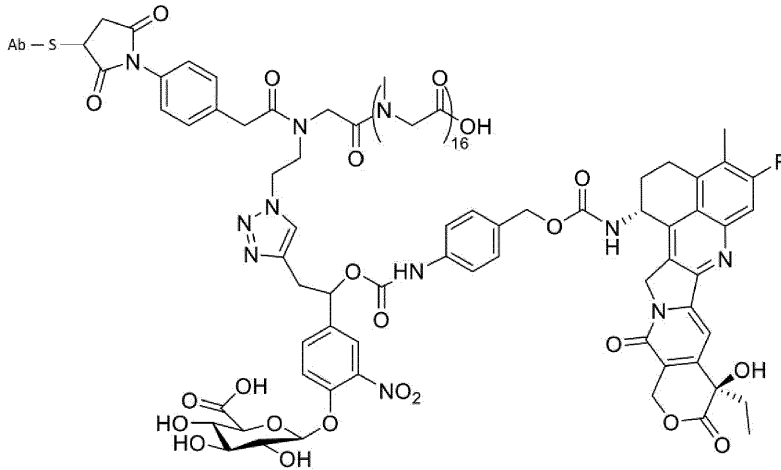
[0580]

[0581]

화합물 16

[0582]

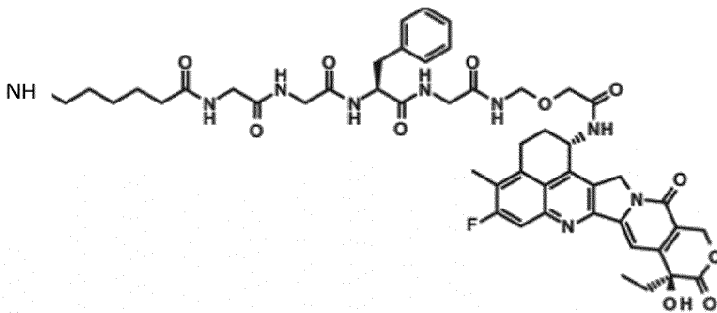
이러한 예에 따라서, 이러한 링커 모이어티를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체는 하기 화합물 16 bis의 구조를 가질 수 있다.



[0583]

[0584] 화합물 16 bis

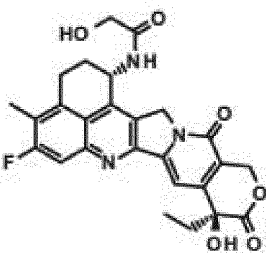
[0585] 다른 구현예에서, 링커가 R 기로서 1차 아민을 가질 수 있고, 트랜스글루타미나제 효소의 존재 하에서 항체와 반응할 때, 링커로 작용화된 하나 또는 다수의 억제제 글루타민 잔기를 포함하는 항체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 링커 (X-Z), 또는 그로 작용화된 항체는 하기 화합물 12로 표시되는 구조를 갖거나 또는 포함한다:



[0586]

[0587] 화합물 12

[0588] 화학식 XI 또는 화합물 11 및 12의 올리고펩티드-함유 링커로 작용화된 항-넥틴-4 결합 단백질은 하기 구조로 표시된 바와 같이, 위치 1 아민에 존재하는 OH-CH<sub>2</sub>-C(=O) 치환기를 갖는 치환된 엑사테칸의 방출을 (예를 들어, 세포내, 넥틴-4 발현 종양 세포의 존재 하에서) 일으킨다:



[0589]

[0590] 화합물 13 (Dxd)

[0591] 1차 아민을 갖는 구조로서 제조될 때 화학식 III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, 또는 XIV의 예시적인 링커는 1차 아민을 갖는 구조로서 제조될 때 트랜스글루타민 효소 (예를 들어, 박테리아 트랜스글루타미나제, BTG)의 존재 하에서 항체와 반응할 수 있어서 트랜스글루타미나제 효소가 항체의 1차 구조 내에서, 예를 들어 면역글로불린 불변 도메인 내에서 또는 불변 영역에 삽입 또는 부착 (예를 들어, 융합)된 TGase 인식 태그 내에서 억제제 글루타민 잔기와 링커의 접합을 촉매하게 된다. 항체에 대한 BTG-매개 접합에서 사용을 위한 방법 및 링커는 PCT 공개 번호 WO2014/202773에 기술되고, 이의 개시는 참조로 편입된다. BTG에 의해 촉매되는 접합은 조성물 중 평균 약물:항체 비의 정밀한 제어를 허용한다. 용어 "트랜스글루타미나제"는 "TGase" 또는 "TG"와 상호교환적으로 사용되고, 펩티드-결합된 글루타민의  $\gamma$ -카르복사미드 기 및 리신의  $\epsilon$ -아

미노 기 또는 구조적으로 관련된 1차 아민 예컨대 아미노 펜틸 기, 예를 들어, 펩티드-결합된 리신 간에 아실-전달 반응을 통해서 단백질을 가교결합시켜서,  $\epsilon$ -( $\gamma$ -글루타미드)리신 이소펩티드 결합을 생성시킬 수 있는 효소를 의미한다. TGase는 특히, 박테리아 트랜스글루타미나제 (BTG) 예컨대 EC 참조 EC 2.3.2.13을 갖는 효소 (단백질-글루타민- $\gamma$ -글루타미드트랜스퍼라제)를 포함한다. 항체의 글루타민 잔기를 언급할 때, 용어 "억셉터 글루타민" 잔기는 TGase에 의해 인식되고 글루타민 및 리신 또는 구조적으로 관련된 1차 아민 예컨대 아미노 펜틸 기 간에 반응을 통해서 TGase에 의해 가교 결합될 수 있는 글루타민 잔기를 의미한다. 바람직하게 억셉터 글루타민 잔기는 표면-노출된 글루타민 잔기이다. 용어 "TGase 인식 태그"는 폴리펩티드 서열에 도입 (예를 들어, 첨부)될 때, 적합한 조건 하에서, TGase 에 의해 인식되고, 아미노산 서열 내 아미노산 측쇄 및 반응 파트너 간 반응을 통해 TGase에 의한 가교를 야기하는, 억셉터 글루타민을 포함하는 아미노산 서열을 의미한다. 인식 태그는 효소 인식 태그를 포함하는 폴리펩티드에 천연적으로 존재하지 않는 펩티드 서열일 수도 있다. TGase 인식 태그의 예는 W02012/059882 및 W02014/072482에 개시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0592] 그 개시가 참조로 본 명세서에 편입되는, W02013/092983 및 W02020/188061에 예시된 바와 같이, 링커-약물 모이어티 ( $X-Z$ )는 1차 아민 및 제1 반응성 기 ( $R$ )를 포함하는 모이어티를 BTG 존재 하에서 항체와 접합시키는 제1 단계에 이어서, (i) 제1 반응성 기와 반응성인 제2 반응성 기 ( $R'$ ) 및 (ii) 세포독성제 ( $Z$ )를 포함하는 분자와 항체-링커 접합체를 반응시키는 단계를 포함하는 2-단계로 항체 (억셉터 글루타민)의 글루타민 잔기에 접합될 수 있다. 반응성 기 쌍  $R$  및  $R'$ 의 예는 이중직교 반응, 예를 들어, 아지드와 시클로옥탄 (구리-무함유 클릭 화학) 간, 니트론 및 시클로옥탄 간, 1,3-쌍극자 고리첨가, 알데히드 및 케톤으로부터 옥심/히드라존 형성 및 테트라진 결합을 할 수 있는 광범위 기를 포함한다 (또한, W02013/092983 참조). 최종 링커 및 작용화된 항체, 또는 이의  $Y$  구성요소는 따라서  $R$  및  $R'$ 의 반응으로부터 생성된  $RR'$  기, 예를 들어 트리아졸을 포함할 수 있다.

[0593] 항-넥틴-4 면역접합체는 약학 제제에 1 mg/mL 내지 500 mg/mL의 농도로 도입될 수 있고, 상기 제제는 2.0 내지 10.0의 pH를 갖는다. 제제는 완충제 시스템, 보존제(들), 등장화제(들), 킬레이트화제(들), 안정화제 및 계면활성제를 더 포함할 수도 있다. 일 구현예에서, 약학 제제는 수성 제제, 즉, 물을 포함하는 제제이다. 이러한 제제는 전형적으로 용액 또는 현탁액이다. 추가 구현예에서, 약학 제제는 수성 용액이다. 용어 "수성 제제"는 적어도 50% w/w 물을 포함하는 제제로서 정의된다. 유사하게, 용어 "수성 용액"은 적어도 50% w/w 물을 포함하는 용액으로 정의되고, 용어 "수성 현탁액"은 적어도 50 %w/w 물을 포함하는 현탁액으로서 정의된다.

[0594] 다른 구현예에서, 약학 제제는 냉동-건조 제제로서, 여기에 사용 전에 의사 또는 환자가 용매 및/또는 희석제를 첨가한다.

[0595] 다른 구현예에서, 약학 제제는 임의의 사전 용해 없이 사용을 위해 준비된 건조 제제 (예를 들어, 냉동-건조 또는 분무-건조)이다.

[0596] 추가 양태에서, 약학 제제는 이러한 항체의 수성 용액, 및 완충제를 포함하고, 여기서 항체는 1 mg/mL 이상의 농도로 존재하고, 상기 제제는 약 2.0 내지 약 10.0의 pH를 갖는다.

[0597] 다른 구현예에서, 제제의 pH는 약 2.0 내지 약 10.0, 약 3.0 내지 약 9.0, 약 4.0 내지 약 8.5, 약 5.0 내지 약 8.0, 및 약 5.5 내지 약 7.5로 이루어진 목록으로부터 선택되는 범위이다.

[0598] 추가 구현예에서, 완충제는 소듐 아세테이트, 소듐 카보네이트, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 소듐 디히드로젠 포스페이트, 디소듐 수소 포스페이트, 소듐 포스페이트, 및 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 특별한 완충제 성분 중 각각 하나는 본 발명의 대안적인 구현예를 구성한다.

[0599] 추가 구현예에서, 제제는 약학적으로 허용가능한 보존제를 더 포함한다. 추가 구현예에서, 제제는 등장화제를 더 포함한다. 추가 구현예에서, 제제는 또한 킬레이트화제를 포함한다. 본 발명의 추가 구현예에서, 제제는 안정화제를 더 포함한다. 추가 구현예에서, 제제는 계면활성제를 더 포함한다. 용이함을 위해 하기 문헌을 참조한다: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19<sup>th</sup> edition, 1995.

[0600] 다른 성분이 본 발명의 약학 제제에 존재하는 것이 가능하다. 이러한 추가 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 증량제, 장성 개질제, 킬레이트화제, 금속 이온, 유성 비히클, 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 쌍성이온 (예를 들어, 아미노산 예컨대 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티

딘)을 포함한다. 이러한 추가 성분은 물론, 본 발명의 약학 제제의 전반적인 안정성에 불리하게 영향을 미쳐서는 안된다.

[0601] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여는 몇몇 투여 경로, 예를 들어, 정맥내를 통한 수도 있다. 적합한 항체 제제는 또한 다른 이미 개발된 치료제 ADC의 경험을 조사하여 결정될 수 있다.

[0602] 임의 구현예에서, 조성물은 본 개시의 다수의 넥틴-4 결합 면역접합체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있고, 샘플 중 면역접합체의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 본 명세서에 개시된 링커로 작용화된 항체 당 적어도 4, 6 또는 8개 아미노산 잔기를 갖는다. 임의 구현예에서, 조성물은 본 개시의 다수의 넥틴-4 결합 면역접합체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있고, 샘플 중 면역접합체의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 링커-캄프토테신 모이어티, 예를 들어, 본 명세서의 화학식의 (X-Z) 단위 또는  $(-Y) - (Pep) - (Y') - (Z)$  단위로 작용화된 항체 당 적어도 2, 4, 6 또는 8개 아미노산 잔기를 갖는다. 임의 구현예에서, 조성물은 본 개시의 다수의 넥틴-4 결합 면역접합체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있고, 샘플 중 면역접합체의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 항체 당 동일한 개수의 작용화된 아미노산을 가지고, 임의로 개수는 4, 6 또는 8이다.

[0603] **악성종의 진단, 예후, 및 치료**

[0604] 일부 양태에서, 그들 표면에서 넥틴-4를 발현하는 종양 세포를 특징으로 하는 암의 진단, 예후, 모니터링 및 치료에서 유용한 항체, 항체 단편 및 면역접합체를 비롯하여 방법을 기술한다. 치료 방법에서, 치료는 인간 대상체 또는 개체에 본 개시의 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 넥틴-4-양성 종양에, 세포독성제, 특정 캄프토테신 유사체의 개선된 전달을 위한 개선된 방법을 제공한다. 세포독성제의 개선된 전달은 넥틴-4 발현 종양 세포의 클러스터 형성 및/또는 앵커리지-독립적 성장의 항체-매개 억제에 결과될 수도 있고, 그 결과로 세포독성제 및/또는 이러한 작용제를 포함하는 ADC의 개선된 종양 침투를 야기한다. 본 개시의 ADC의 치료는 보다 낮거나 또는 이중성 넥틴-4 발현을 갖는 질환의 치료를 위해서, 특히 저항성 질환을 갖거나 또는 다른 ADC가 적합하지 않은 환자를 위해서, 및/또는 단일 작용제 (예를 들어, 화학요법제)로서 독성을 매개하는 추가적인 치료제와 병용하여 사용을 위해 특히 유리하다.

[0605] 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 종양을 세포독성제 또는 화학요법제에 대해 감작시키는데 유용할 수 있다. 항-넥틴-4 항체는 암성 세포의 화학저항성을 감소시켜서, 항암제 자체와 비교하여, 암에 대한 항암제의 독성의 강화 또는 증강에 유용할 수도 있다. 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편을 포함하는 암-감작화 조성물은 종양 (예를 들어, Pgp-발현 종양)을 항암제에 대해 감작화시키고, 화학저항성을 감소시키고, 항암제의 치료적 효과를 개선시키는데 유용할 수도 있다.

[0606] 일 구현예에서, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편은 화학요법제와 병용하여 인간 개체에서 종양을 치료하는데 유용한 것으로 명시될 수 있고, 여기서 항-넥틴-4 항체, 항체 단편 및 화학요법제는 별도 투여를 위해 제제화되고, 동시발생적으로 또는 순차적으로 투여된다. 예를 들어, 치료는 (a) 본 개시의 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편, 및 (b) 항암제, 임의로 화학요법제, 임의로 P-당단백질 (Pgp)에 의해 수송될 수 있는 것으로 알려진 화학요법제, 임의로 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드, 에토포시드, 탁산, 백금 화합물 또는 임의로 캄프토테신의 각각의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0607] 일 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 세포독성제, 예를 들어, 캄프토테신, 엑사테칸 또는 SN-38 분자에 접합된다. 항체 또는 항체 단편은 전형적으로 세포독성제, 예를 들어, 캄프토테신 유사체, 엑사테칸의 다수 분자에 접합될 것이다. 세포독성제, 예를 들어, 캄프토테신 또는 엑사테칸은 프로테아제-절단가능 올리고펩티드 링커, 예를 들어, 임의의 화학식 VII-XIV의 링커-독소를 포함하는 링커를 통해서 항체에 접합될 수 있다. 예시적인 약학 조성물은 항체 분자 당 평균 1 내지 8개 세포독성제 분자 (예를 들어, 캄프토테신 유도체, 엑사테칸, 임의의 화학식 VII-XIV의 링커-독소), 임의로 항체 분자 당 2-8개, 4-8개, 6-8개 세포독성제 분자, 또는 예를 들어, 항체 분자 당 약 2, 4, 5, 6, 7 또는 8개 세포독성제 분자를 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편이 엑사테칸에 접합되는 경우 (즉, 링커, 임의의 화학식 VII-XIV의 링커-독소를 포함), 이러한 면역접합체는 Pgp-발현 종양 (예를 들어, Pgp (MDR1)의 발현을 특징으로 하는 종양)을 치료하는데 특히 유리하다. Pgp의 발현을 특징으로 하는 종양은 화학요법제 및 ADC를 사용한 치료 이후 종양을 포함하고, 예를 들어, 아우리스타틴 (MMAE) 페이로드를 포함하는 ADC를 사용한 치료는 종양 상에서 Pgp 발현을 유도하는 것으로 확인되었다. 추가적으로, 천연 Pgp/MDR1 발현을 특징으로 하는 광범위한 종양이 공지되어 있고, 예를 들어, 유의한 수준의 MDR1이 신장암, 부신피질 암종, 담관암종, 간암, 직장암, 결장암, 뇌암, 췌장암, 전립선암, 중피종, 위암, AML, 갑상선암, DLBC, 식도암, 유방암, 육종, 고환암, 자궁암, 흉선종, 자궁경부암, 폐암, 방광암 (예를 들

어, 요로상피 암종), 및 두경부 편평 세포 암종에 의해 발현된다.

- [0608] 세포독성제에 접합된 넥틴-4 결합체 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체 또는 항체 단편)는 넥틴-4를 (예를 들어, 종양 세포막 또는 세포 표면에서) 발현하는 종양 세포를 특징으로 하는 넥틴-4-발현 암을 갖는 개체를 치료하기 위해 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 암의 예는 요로상피암, 유방암 (예를 들어, 삼중-음성 유방암; HER2-양성 유방암), 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 위암, 직결장암 (예를 들어, 결장암), 두경부 편평 세포 암종 및 식도암이다.
- [0609] 세포독성제에 접합된 넥틴-4 결합체는 넥틴-4 고-발현 종양에서 사용될 수 있다.
- [0610] 세포독성제에 접합된 넥틴-4 결합체는 또한 이종성 및/또는 저 넥틴-4-발현 종양에서 사용될 수도 있다. 이러한 종양에서, 본 개시의 면역접합체는 임의로 MDR1-매개 저항성 및/또는 방관자 항-종양 효과의 회피를 통해서, 유리한 효능을 제공할 수 있다.
- [0611] 세포독성제에 접합된 넥틴-4 결합체는 넥틴-4 발현 수준과 무관하게, 개체 내에서 종양 세포 상에서 넥틴-4 발현 수준의 이종성과 무관하게, 및/또는 개체가 엔포투맘 베도틴으로 사전 치료된 적이 있는지 여부와 무관하게, 개체를 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다. 세포독성제가 엑사테칸인 경우, 세포독성제에 접합된 넥틴-4 결합체는 또한 종양 Pgp 발현과 무관하게 및/또는 개체가 Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제를 포함하는 ADC (예를 들어, 엑사테칸 이외의 캄프토테신 유사체에 접합된 항-넥틴-4 항체를 포함하는 ADC, Dxd에 (예를 들어, GFG-함유 링커를 통해) 접합된 항-넥틴-4 항체를 포함하는 ADC, 또는 아우리스타틴, 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드, 에토포시드, 탁산 또는 백금 화합물에 접합된 항-넥틴-4 항체)로 사전에 치료된 적이 있는지 여부와 무관하게 개체를 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다.
- [0612] 일 구현예에서, 캄프토테신 유도체 분자에 접합된 넥틴-4 결합체는 엔포투맘 베도틴으로 사전 치료된 적이 있는 개체를 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 개체는 임의로 엔포투맘 베도틴 치료 이후에 이종성 및/또는 낮은 넥틴 4-발현 종양을 특징으로 하는 암을 가질 수 있다. 이러한 개체는 임의로 엔포투맘 베도틴 치료 이후에 Pgp-발현 종양을 특징으로 하는 암을 가질 수 있다. 개체는 아우리스타틴 또는 MMAE 분자에 접합된 항체 (예를 들어, 엔포투맘 베도틴)를 사용한 치료 (예를 들어, 그 동안 또는 이후)에도 불구하고 저항성이고/이거나, 반응하지 않았고/않았거나, 재발 및/또는 진행된 암을 가질 수도 있다. 예를 들어, 개체는 국소 진행성 또는 전이성 요로상피암을 가질 수 있고 아우리스타틴 또는 MMAE 분자에 접합된 항체 (예를 들어, 엔포투맘 베도틴)를 사용한 치료를 사전에 받은 적이 있다.
- [0613] 일 구현예에서, 엑사테칸에 링커를 통해 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체는 Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체를 사용해 이전에 치료된 적이 있는 개체를 치료하는데 유리하게 사용된다. 일 구현예에서, 엑사테칸에 링커를 통해 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체는 Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체를 사용한 치료 후에 이종성 및/또는 낮은 넥틴 4-발현 종양을 특징으로 하는 암을 갖는 개체를 치료하기 위해 유리하게 사용된다. 일 구현예에서, 엑사테칸에 링커를 통해 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체는 Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해 접합된 넥틴-4 결합체를 사용한 치료 (예를 들어, 그 동안 또는 이후)에도 불구하고 저항성이고/이거나, 반응하지 않고/않거나, 재발 및/또는 진행된 암을 갖는 개체를 치료하기 위해 유리하게 사용된다. 임의로, Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체는 캄프토테신 유사체에 링커를 통해 접합된 항-넥틴-4 항체를 포함하여서, 링커의 절단 시, 엑사테칸 이외의 캄프토테신 유사체 (예를 들어, Dxd 또는 데록스테칸)를 방출한다. 임의로, Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체는 (예를 들어, GFG-함유 링커를 통해서) Dxd에 접합된 항-넥틴-4 항체를 포함한다. 임의로, Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체는 아우리스타틴, 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드, 에토포시드, 탁산 또는 백금 화합물)에 접합된 항-넥틴-4 항체를 포함한다. 임의로, Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체는 넥틴-4의 IgV 도메인에 결합하는 항-넥틴-4 항체를 포함한다. 임의로, Pgp에 의해 수송될 수 있는 세포독성제에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체는 넥틴-4의 VC1 가교 도메인에 결합하는 항-넥틴-4 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 엑사테칸에 링커를 통해서 접합된 넥틴-4 결합체를 포함하는 면역접합체는 절단 시 엑사테칸의 방출을 야기하는 효소적 절단가능한 모이어티 (및 임의로 자기-희생적 스페이서)를 갖는 링커를 포함한다.
- [0614] 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암에서, 유의한 비율의 개체는 종양 세포에서 높은 수준의 넥틴-4를 발현하게 되고, 예를 들어, 적어도 290의 H-점수 (EV-201 임상 시험 코호트 1 넥틴-4 발현 참조)로 발현하게 될 것이

다. 그러나, 환자의 서브세트는 250 미만의 H-점수를 가지고, 일부는 200 미만이다. 소수의 환자는 150 미만의 H-점수를 가졌고, 일부는 100 미만의 H-점수를 가졌다. 삼중 음성 유방암 (TNBC)에서, 환자의 62%는 중앙 세포 상에서 높은 넥틴-4 발현을 가지며, 38%는 중앙 세포 상에서 낮은 넥틴-4 발현을 갖는 것으로 보고되었다 (Rabat et al., 2017 *Annals Onc.* 28: 769-776). 다른 암 유형에서, 넥틴-4 발현에 대한 중앙값 H-점수 값은 전형적으로 UC, 특히 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 두경부 편평 세포 암종 및 식도암에서 관찰된 것보다 낮았다.

- [0615] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 진행성 재발성 또는 전이성 암, 임의로 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암을 갖는다.
- [0616] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 에스트로겐수용체 및/또는 프로게스테론 수용체에 대해 양성으로 검사되고, 상피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 또는 과량 HER2 단백질에 대해 음성으로 검사된 암 (예를 들어, 유방암)을 갖고, 임의로 암은 HER2에 대해 양성으로 검사되었지만, HER2가 낮은 수준으로 발현된다.
- [0617] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 삼중-음성 유방암 (TNBC), 예를 들어, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 및 과량 HER2 단백질에 대해 음성으로 검사된 유방암을 갖는다.
- [0618] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 HER2 단백질에 대해 양성으로 검사된 암 (예를 들어, 유방암)을 갖고, 임의로 암은 과량 HER2 단백질 (HER2 과발현)을 발현하고, 임의로 암은 낮은 수준의 HER2 단백질 (과량 HER2 발현에 비해 낮음)을 발현한다. 일 구현예에서, 개체는 HER2 폴리펩티드에 결합하는 작용제 (예를 들어, 항체) (예를 들어, 트라스투주맙, 퍼투주맙)와 병용하여, 항-넥틴-4 ADC로 치료되고; 임의로 HER2에 결합하는 작용제는 ADC이고; 임의로 HER2에 결합하는 항체는 세포독성제, 임의로 아우리스타틴, 마이탄시노이드 (예를 들어, DM1) 또는 캄프토테신 유사체 (예를 들어, 화합물 1, 2 또는 13)에 접합되고; 임의로 HER2에 결합하는 항체는 트라스투주맙 엠탄신 또는 트라스투주맙 데록스테칸 (DS-8201a; Enhertu™)이다.
- [0619] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 비-소세포 폐암, 임의로 폐 선암종을 갖는다.
- [0620] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 췌장암을 갖는다.
- [0621] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 난소암을 갖는다.
- [0622] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 두경부 편평 세포 암종을 갖는다.
- [0623] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 식도암을 갖는다.
- [0624] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 직결장암을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 직결장암 (CRC)은 결장암, 직장암, 및 직결장암 (결장 및 직장 영역 둘 모두의 암)을 의미한다.
- [0625] 일 구현예에서, 본 개시에 따라서 치료된 개체는 HER2 단백질에 대해 양성으로 검사된 NSCLC 또는 폐 선암종, 위암, 직결장 암종, 췌장암, 요로상피 암종 또는 방광암을 갖고, 임의로 암은 과량 HER2 단백질을 발현하고 (HER2 과발현), 임의로 암은 낮은 수준의 HER2 단백질을 발현한다 (과량 HER2 발현에 비해 낮음). 일 구현예에서, 개체는 HER2 폴리펩티드에 결합하는 작용제 (예를 들어, 항체) (예를 들어, 트라스투주맙 또는 퍼투주맙)의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체와 병용하여, 본 개시에 따른 항-넥틴-4 ADC로 치료되고; 임의로 HER2에 결합하는 작용제는 ADC이고; 임의로 HER2에 결합하는 항체는 세포독성제, 임의로 아우리스타틴, 마이탄시노이드 (예를 들어, DM1) 또는 캄프토테신 유사체 (예를 들어, 화합물 1, 2 또는 13)에 접합되고; 임의로 Her2에 결합하는 항체는 트라스투주맙 엠탄신 또는 트라스투주맙 데록스테칸 (DS-8201a)이다.
- [0626] 본 명세서에 표시된 바와 같이, 절단 시 (예를 들어, 세포독성제 Z를 포함하는 세포내 절단가능한 링커의 절단 시)에, 엑사테칸을 방출하는 ADC는 Pgp에 의해 수송되는 세포독성제 (엑사테칸 이외), 예를 들어 아우리스타틴 또는 Dxd를 절단 시 방출하는 링커를 갖는 ADC에 저항성인 중앙의 치료에서 특히 유리하다. 따라서, 일 구현예에서, HER2 양성 암이 항-넥틴-4 결합제 (예를 들어, 항-넥틴-4 ADC) 및 항-HER2 ADC와 병용하여 치료되는 경우에, 항-HER2 ADC는 방출 시 (예를 들어, 세포독성제 Z를 포함하는 세포내 절단가능한 링커의 절단 시)에 엑사테칸을 방출하도록 디자인될 수 있다. 항-넥틴-4 결합제 (예를 들어, 항-넥틴-4 ADC)는 절단 시 (예를 들어, 세포독성제 Z를 포함하는 세포내 절단가능한 링커의 절단 시)에 엑사테칸을 방출하도록 디자인될 수 있거나, 또는 임의의 다른 세포독성제 (Z)를 방출할 수 있고, 예를 들어, 여기서 Z는 탁산, 안트라사이클린, 캄프토테신, 에포티론, 미토마이신, 콤브레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 마이탄시노이드, 듀오카마이신, 투블리신, 둘라스타틴, 아우리스타틴, 에네디인, 피롤로벤조디아제핀, 아마톡신 또는 에틸렌미민이다.

- [0627] 따라서, 일 양태에서, 본 개시는 암 (예를 들어, HER2 양성 넥틴-4-양성 암)의 치료에서 사용을 위한, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0628]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0629] 상기 식에서,
- [0630]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0631]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0632]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함하고;
- [0633] 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0634]  $Ab_{HER2}-(X_{HER2}-(Z_{HER2}))$
- [0635] 상기 식에서,
- [0636]  $Ab_{HER2}$ 는 인간 HER2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{HER2}$ 는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0637]  $X_{HER2}$ 는  $Ab_{HER2}$  및  $Z_{HER2}$ 를 연결하는 분자이고,  $X_{HER2}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0638]  $Z_{HER2}$ 는 엑사테칸이다. 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0639] 또한, 일 양태에서, 본 개시는 암 예를 들어, HER2 양성 넥틴-4-양성 암의 치료에서 사용을 위한, 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0640]  $Ab_{HER2}-(X_{HER2}-(Z_{HER2}))$
- [0641] 상기 식에서,
- [0642]  $Ab_{HER2}$ 는 인간 HER2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{HER2}$ 는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0643]  $X_{HER2}$ 는  $Ab_{HER2}$  및  $Z_{HER2}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{HER2}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0644]  $Z_{HER2}$ 는 엑사테칸이고;
- [0645] 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0646]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0647] 상기 식에서,
- [0648]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0649]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;

- [0650]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함한다. 인간 HER2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 방출 시 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0651] 따라서, 일 양태에서, 본 개시는 암 (예를 들어, TROP-2 양성 넥틴-4-양성 암)의 치료에서 사용을 위한, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0652]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0653] 상기 식에서,
- [0654]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0655]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0656]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함하고;
- [0657] 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0658]  $Ab_{TROP-2}-(X_{TROP-2}-(Z_{TROP-2}))$
- [0659] 상기 식에서,
- [0660]  $Ab_{TROP-2}$ 는 인간 TROP-2 폴리펩티드에 특이적으로 결합되는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{TROP-2}$ 는 다토포타맘 또는 사시투주맘의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0661]  $X_{TROP-2}$ 는  $Ab_{TROP-2}$  및  $Z_{TROP-2}$ 를 연결하는 분자이고,  $X_{TROP-2}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0662]  $Z_{TROP-2}$ 는 엑사테칸이다. 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0663] 또한, 일 양태에서, 본 개시는 암, 예를 들어 TROP-2 양성 넥틴-4-양성 암의 치료에서 사용을 위한, 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0664]  $Ab_{TROP-2}-(X_{TROP-2}-(Z_{TROP-2}))$
- [0665] 상기 식에서,
- [0666]  $Ab_{TROP-2}$ 는 인간 TROP-2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{TROP-2}$ 는 다토포타맘 또는 사시투주맘의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0667]  $X_{TROP-2}$ 는  $Ab_{TROP-2}$  및  $Z_{TROP-2}$ 를 연결하는 분자이고,  $X_{TROP-2}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0668]  $Z_{TROP-2}$ 는 엑사테칸이고;
- [0669] 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0670]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0671] 상기 식에서,

- [0672]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0673]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0674]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함한다. 인간 TROP-2 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0675] 따라서, 일 양태에서, 본 개시는 암 (예를 들어, B7H3 양성 넥틴-4-양성 암)의 치료에서 사용을 위한, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0676]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0677] 상기 식에서,
- [0678]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0679]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고,  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0680]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함하고;
- [0681] 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0682]  $Ab_{B7H3}-(X_{B7H3}-(Z_{B7H3}))$
- [0683] 상기 식에서,
- [0684]  $Ab_{B7H3}$ 은 인간 B7H3 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{B7H3}$ 은 에노블리투주맵, 이피나타맵, 미르조타맵, 오브린다타맵, 움부르타맵 또는 보브라미타맵의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0685]  $X_{B7H3}$ 은  $Ab_{B7H3}$  및  $Z_{B7H3}$ 을 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{B7H3}$ 은 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0686]  $Z_{B7H3}$ 는 엑사테칸이다. 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0687] 또한, 일 양태에서, 본 개시는 암, 예를 들어 B7H3 양성 넥틴-4-양성 암의 치료에서 사용을 위한, 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체를 제공하고, 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:
- [0688]  $Ab_{B7H3}-(X_{B7H3}-(Z_{B7H3}))$
- [0689] 상기 식에서,
- [0690]  $Ab_{B7H3}$ 은 인간 B7H3 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고, 임의로  $Ab_{B7H3}$ 은 에노블리투주맵, 이피나타맵, 미르조타맵, 오브린다타맵, 움부르타맵 또는 보브라미타맵의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함하고;
- [0691]  $X_{B7H3}$ 은  $Ab_{B7H3}$  및  $Z_{B7H3}$ 을 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{B7H3}$ 은 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;

- [0692]  $Z_{B7H3}$ 은 엑사테칸이고;
- [0693] 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 하기 화학식으로 표시되는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체와 병용하여 사용을 위한 것이다:
- [0694]  $Ab_{N4}-(X_{N4}-(Z_{N4}))$
- [0695] 상기 식에서,
- [0696]  $Ab_{N4}$ 는 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 항체이고;
- [0697]  $X_{N4}$ 는  $Ab_{N4}$  및  $Z_{N4}$ 를 연결하는 분자이고, 여기서  $X_{N4}$ 는 예를 들어, 생리적 조건 하에서, 임의로 세포내 조건 하에서, 절단가능한 모이어티, 임의로 프로테아제-절단가능 디-, 트리-, 테트라- 또는 펜타-펩티드를 포함하고;
- [0698]  $Z_{N4}$ 는 세포독성제를 포함한다. 인간 B7H3 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다. 임의로,  $Z_{N4}$ 는 엑사테칸이고, 임의로 인간 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 면역접합체는 절단가능한 모이어티의 절단 시에 엑사테칸을 방출한다.
- [0699] 일 양태에서, 본 개시의 치료 방법은 종양 조직에서 넥틴-4 발현의 평가 또는 검출과 독립적이고/이거나, 종양 세포 상에서 넥틴-4의 발현 수준 및/또는 상기 개체 유래 조직 샘플에서 넥틴-4-발현 종양 세포의 빈도 또는 개수에 독립적이다. 일 양태에서, 본 개시의 치료 방법은 종양 Pgp (MDR1) 발현의 평가 또는 검출과 독립적이다.
- [0700] 일 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하고/하거나 항-종양 면역 반응을 유발하는 방법을 제공하고, 상기 개체는 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암 또는 유방암 (예를 들어, TNBC)을 갖고, 상기 방법은 개체가 넥틴-4를 발현하는 세포 (예를 들어, 종양 세포)를 포함하는 종양 조직을 갖는지 여부의 사전 결정을 필요로 하지 않는다.
- [0701] 일 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하고/하거나 종양 세포를 사멸하는 방법을 제공하고, 상기 개체는 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암 또는 유방암 (예를 들어, TNBC)을 갖고, 상기 방법은 개체가 예를 들어, 면역조직화학 평가 (예를 들어, H-점수 또는 다른 적절한 IHC 채점 방법)를 통해 정의된, 높은 수준의 넥틴-4를 발현하는 세포 (예를 들어, 종양 세포)를 포함하는 종양 조직을 갖는지 여부의 사전-결정을 필요로 하지 않는다.
- [0702] 일 양태에서, 개체에서 암을 치료하고/하거나 종양 세포를 사멸시키는 방법은 종양 세포의 넥틴-4 발현의 수준의 사전-결정을 필요로 하지 않는다.
- [0703] 일 양태에서, 개체에서 암, 임의로 진행성 재발성 또는 전이성 요로상피암 또는 유방암 (예를 들어, TNBC, HER2 양성 암)을 치료하는 방법은 290, 250, 200, 150 또는 100 이하 또는 미만의 넥틴-4 발현에 대한 H-점수를 특징으로 하는 암을 갖는 개체를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0704] 개체에서 암의 치료 또는 예방을 위한 임의 구현예에서, 방법은 (i) 그의 종양 세포가 넥틴-4를 발현하는 개체를 확인하는 단계 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정함), 및 (ii) 개체에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수 있다.
- [0705] 개체에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 임의 구현예에서, 방법은 (i) 그의 종양 세포가 (a) 넥틴-4 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정함), 및 (b) HER2를 발현하는 개체를 확인하는 단계로서, 임의로 종양 세포는 낮은 수준의 HER2를 발현하는 것인 단계 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정됨; Herceptest<sup>TM</sup>으로 결정됨) 및 (ii) 개체에게 임의로 Her2 폴리펩티드에 결합하는 작용제 (예를 들어, 항체) (예를 들어, 트라스투주맙, 퍼투주맙)와 병용하여, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체의 유효량을 투여하는 단계로서; 임의로 Her2에 결합하는 항체는 ADC이고; 임의로 Her2에 결합하는 항체는 세포독성제, 임의로 아우리스타틴, 마이탄시노이드 (예를 들어, DM1) 또는 캄프토테신 유도체 (예를 들어, 화합물 1, 2 또는 13)에 접합되고; 임의로 Her2에 결합하는 항체는 트라스투주맙 엠탄신 또는 트라스투주맙 데록스테칸 (DS-8201a)인 단계를 포함하는 것으로 명시될 수 있다.
- [0706] 개체에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 임의 구현예에서, 방법은 (i) 그의 종양 세포가 낮거나 또는 중간 정도 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 개체를 확인하는 단계 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정함), 및 (ii) 단계 (i)에

서 확인된 개체에게, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 집합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수 있다.

- [0707] 개체에서 암 (예를 들어, 넥틴-4 양성 암)의 치료 또는 예방을 위한 임의 구현예에서, 방법은 (i) 그의 암이 낮은 수준의 넥틴-4 발현을 특징으로 하는 개체를 확인하는 단계 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정함), 및 (ii) 단계 (i)에서 확인된 개체에게, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 집합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 일 구현예에서, 개체는 150 또는 100 이하 또는 미만의 넥틴-4 발현에 대한 H-점수를 특징으로 하는 암을 갖는다.
- [0708] 개체에서 암 (예를 들어, 넥틴-4 양성 암)의 치료 또는 예방을 위한 임의의 구현예에서, 방법은 (i) 그의 암이 중간 정도 수준의 종양 넥틴-4 발현을 특징으로 하는 개체를 확인하는 단계 (예를 들어, 면역조직화학으로 결정함), 및 (ii) 개체에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 집합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수 있다. 일 구현예에서, 개체는 290, 250, 200, 150 이하, 또는 미만의 넥틴-4 발현에 대한 H-점수를 특징으로 하는 암을 갖고, 임의로 또한 암은 적어도 100의 넥틴-4 발현에 대한 H-점수를 특징으로 한다.
- [0709] 여전히 추가 구현예에서, 개체에서 암 (예를 들어, 넥틴-4 양성 암)을 치료 또는 예방하기 위한 방법이 제공되고, 방법은 (i) 그의 암이 290, 250, 200, 150, 120 또는 100 이하 또는 미만의 종양 넥틴-4 발현에 대한 H-점수를 특징으로 하는 개체를 확인하는 단계, 및 (ii) 개체에게 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 집합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 임의로, 단계 (i)은 조직화학 (예를 들어, IHC)을 통해서 종양 세포 상에서 넥틴-4 발현을 평가하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수도 있다.
- [0710] 여전히 추가의 구현예에서, 개체에서 암 (예를 들어, 넥틴-4 양성 암; 유방암)을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 방법은 (i) 그의 암이 200, 150, 120 또는 100 이하 또는 미만의 종양 넥틴-4 발현에 대한 QS-점수를 특징으로 하는 개체를 확인하는 단계, 및 (ii) 개체에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 집합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 임의로, 단계 (i)은 조직화학 (예를 들어, IHC)에 의해 종양 세포 상의 넥틴-4 발현을 평가하는 단계를 포함하는 것으로 명시될 수도 있다.
- [0711] 개체 유래, 예를 들어, 생검 유래의 생물학적 샘플을 수득할 수 있고 평가할 수 있다. 임의로, 샘플은 포름알데히드 (예를 들어, 포르말린)-고정 파라핀 포매 (FFPE) 샘플로서 보존된다. 파라핀 제거 이후에, 슬라이드는 넥틴-4 (및/또는 HER2, TROP-2, B7H3)의 발현을 검출하기 위한 방법으로 처리가능하다.
- [0712] 종양 세포에서 넥틴-4, TROP-2, B7H3 및/또는 HER2의 발현은 당분야에 공지된 임의의 방법으로 결정될 수 있다. 일정 구현예에서, 어세이는 면역조직화학 (IHC) 어세이, 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 어세이, 예를 들어 정량적 FACS, ELISA, 면역블롯팅 (예를 들어, 웨스턴 블롯팅, 도트 블롯팅, 또는 세포-내 웨스턴 블롯팅), 및 다른 면역어세이를 포함한다.
- [0713] 조직 절편의 IHC 염색은 샘플 중 단백질의 존재를 평가 또는 검출하는 신뢰할만한 방법으로 확인되었다. 면역조직화학 기술은 일반적으로 발색 또는 형광 방법을 통해서, 원위에서 세포 항원을 프로빙하고 가시화하기 위해 항체를 이용한다. 따라서, 각 마커에 특이적인 항체 또는 항혈청, 일부 구현예에서, 다클론 항혈청, 및 일부 구현예에서, 단일클론 항체가 발현을 검출하는데 사용된다. 항체는 항체 그 자체를, 예를 들어, 방사성 표지, 형광성 표지, 합텐 표지 예컨대, 바이오틴, 또는 효소 예컨대 홀스래디시 퍼옥시다제 또는 알칼리 포스파타제로 직접 표지화하여서 검출될 수 있다. 대안적으로, 미표지된 1차 항체는 1차 항체에 특이적인 항혈청, 다클론 항혈청 또는 단일클론 항체를 포함하여, 표지된 2차 항체와 함께 사용된다. 면역조직화학 프로토콜 및 키트는 당분야에 충분히 공지되어 있고 상업적으로 입수가능하다.
- [0714] 일부 구현예에서, IHC 어세이는 직접 어세이로서, 표적 항원에 대한 항체의 결합이 직접적으로 결정된다. 이러한 직접 어세이는 표지된 시약, 예컨대 형광 태그 또는 효소-표지된 1차 항체를 사용하고, 이것은 추가 항체 상호작용없이 가시화될 수 있다. 일부 구현예에서, 일부 구현예에서, IHC 어세이는 간접 어세이이다. 전형적인 간접 어세이에서, 미접합된 1차 항체는 항원에 결합하고 그 다음에 표지된 2차 항체가 1차 항체에 결합한다. 2차 항체가 효소적 표지에 접합되는 경우에, 발색성 또는 형광성 기질을 첨가하여 항원의 가시화를 제공한다. 신호 증폭은 몇몇 2차 항체가 1차 항체의 상이한 에피토프와 반응할 수 있기 때문에 발생된다. 면역조직화학에 사용되는 1차 및/또는 2차 항체는 전형적으로 검출가능한 분자로 표지될 것이다. 방사성 동위원소, 콜로이드 금 입자, 형광성 표지, 및 효소-기질 표지를 포함한, 수많은 표지가 이용가능하다.
- [0715] 강한 염색, 중간 염색, 및 약한 염색은 당업자에게 충분히 공지된 설명이다. 일부 양태에서 강한 염색, 중

간 염색, 및 약한 염색은 보정된 수준의 염색이고, 범위가 확립되고, 염색 강도는 범위 내에서 비닝된다. 일부 구현예에서, 강한 염색은 강도 범위의 75번째 백분위수 이상인 염색이고, 중간 염색은 강도 범위의 25번째 내지 75번째 백분위수의 염색이고, 낮은 염색은 강도 범위의 25번째 백분위수 미만인 염색이다. 일부 양태에서 당업자는 특정 염색 기술에 친숙하고, 빈 크기를 조정하고, 염색 범주를 정의한다.

[0716] (예를 들어, 항-넥틴-4 항체로 염색시) 다양한 염색 강도를 갖는 대조군 세포주 (예를 들어, 펠렛으로 원심분리하고 포르말린 고정 및 파라핀 포매되고, 예를 들어, 조직 마이크로어레이로서 제조되고, 예를 들어, 항-넥틴-4 항체로 염색됨)는 IHC 분석을 위한 대조군으로서 이용될 수 있다. 당업자는 음성, 약, 중간, 및 고 c-met 염색 강도를 갖는 다른 대조군 세포 펠렛이 본 출원의 교시 및 당분야에 충분히 공지되고 본 명세서에 개시된 방법을 사용해 쉽게 확인될 수 있다는 것을 이해한다.

[0717] 일부 구현예에서, 암 또는 종양은 이것이 (예를 들어, IHC 어세이로 결정하여) 넥틴-4 양성일 때 넥틴-4-발현 암 종양으로 간주된다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 5% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 10% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 20% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 30% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 40% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 50% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 60% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 70% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 80% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 90% 이상이 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 (예를 들어, 임의 강도로 넥틴-4 단백질을 발현함) 넥틴-4 양성이다.

[0718] 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 5% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 10% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 20% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 30% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 40% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 50% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 60% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 70% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 80% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다. 일부 구현예에서, 개체의 암 또는 종양은 샘플 중 종양 세포의 90% 이상이 중간 및/또는 강한 염색 강도로 넥틴-4 단백질을 발현하는 경우 넥틴-4 양성이다.

[0719] 개체의 암 또는 종양이 높은 넥틴-4 발현을 특징으로 하는지 또는 그렇지 않은지 (예를 들어, 낮거나 또는 중간 넥틴-4 발현) 여부를 결정하기 위해 면역조직화학 어세이의 평가는 전형적으로 공지된 채점 방법의 적용을 포함할 것이다.

[0720] 저, 중, 및 고 종양 넥틴-4 발현은 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0005678에 기술된 바와 같은 "H-점수"를 기반으로 결정될 수 있다. H-점수는 0 내지 300 범위를 제공하는, 하기 공식을 통해 획득되고, 0 내지 300의 범위를 제공한다: (3X 강한 염색 세포의 백분율) + (2X 중간 염색 세포의 백분율) + (약한 염색 세포의 백분율)

을). H-점수는 특히 UC에서 사용되어 왔다.

- [0721] 본 명세서의 임의 방법의 일부 구현예에서, 낮거나 또는 중간 정도 넥틴-4 발현 (예를 들어, 낮거나 또는 중간 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 종양 또는 종양 세포)은 약 250 이하, 약 220 이하, 약 200 이하, 약 180 이하, 약 160 이하, 약 150 이하, 약 140 이하, 약 130 이하, 약 120 이하, 약 110 이하 또는 약 100 이하의 H-점수에 상응한다.
- [0722] 본 명세서의 임의 방법의 일부 구현예에서, 낮은 넥틴-4 발현 (예를 들어, 낮은 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 종양 또는 종양 세포)은 200 이하, 약 180 이하, 약 160 이하, 약 150 이하, 약 140 이하, 약 130 이하, 약 120 이하, 약 110 이하 또는 약 100 이하의 H-점수에 상응한다.
- [0723] 본 명세서의 임의 방법의 일부 구현예에서, 높은 넥틴-4 발현 (예를 들어, 높은 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 종양 또는 종양 세포)은 약 290 이상의 H-점수에 상응한다.
- [0724] 다른 예에서, 넥틴-4 염색은 하기 공식을 사용하여 퀵 점수 (Quick score) (QS)에 따라 채점될 수 있다:  $QS = P$  (양성 세포의 백)  $\times I$  (강도), 최대 점수는 300이다. QS는 예를 들어, 유방암에서 사용되어 왔다. 예를 들어, TNBC에서, 일부 연구 그룹은 낮은 넥틴-4 발현 그룹을  $QS =$  또는  $< 100$ 으로서 정의하였다. 본 명세서의 임의 방법의 일부 구현예에서, 낮거나 또는 중간 정도 넥틴-4 발현 (예를 들어, 낮거나 또는 중간 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 종양 또는 종양 세포)은 약 200 이하, 약 180 이하, 약 160 이하, 약 150 이하, 약 140 이하, 약 130 이하, 약 120 이하, 약 110 이하 또는 약 100 이하의 QS-점수에 상응한다.
- [0725] HER2의 종양 세포 발현을 평가하기 위한 어세이는 당분야에 충분히 공지되어 있다. 예를 들어, 어세이 예컨대 FDA-승인된 SPoT-Light HER2 CISH가 HER2 과발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 발색성 원위치 혼성화 (CISH)는 HER2 유전자 증폭을 검출한다. 이 기술은 감산 프로브 기술 발색성 원위치 혼성화 (Subtraction Probe Technology Chromogenic In Situ Hybridization)라고도 하고, 유방암 세포가 세포 표면에서 HER2 수용체 단백질을 과발현하는지 여부를 확인하는데 사용되는 검사이다.
- [0726] HER에 대해 광범위하게 사용되는 다른 어세이는 HercepTest™ (Dako North America, Inc.)로서, 포르말린-고정, 파라핀-포매된 암 조직에서 HER2 단백질 과발현을 결정하는데 사용되는 반정량적 면역조직화학 어세이이다. 예를 들어, 낮은 수준의 HER2를 발현하는 종양은 HercepTest™을 통해서 +1 내지 +2의 점수로서 확인될 수 있다.
- [0727] 일 양태에서, 치료는 기존 신경병증, 당뇨병 또는 고혈당증, 심부전증, 안구 병리를 갖는 개체에서 사용된다. 이러한 병태는 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체에 비해서 더 높은 독성 또는 보다 협소한 치료창을 갖는 항-넥틴-4 ADC 예컨대 엔포투맙 베도틴을 사용한 치료에 대해 개체를 부적합하게 만들 수 있다.
- [0728] 임의 구현예에서, 치료 방법은 임의로 (a) 개체에서 암 병기 및/또는 질환 진행을 평가하는 단계; 및 (b) 개체가 재발성, 전이성, 및/또는 진행성 암을 갖는 경우, 개체에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수도 있다.
- [0729] 일부 구현예에서, 본 발명은 요로상피암을 갖는 개체에서 종양을 치료하는 방법을 포함하고, 방법은 (a) 개체에서 암 병기 및/또는 질환 진행을 평가하는 단계; 및 (b) 개체가 재발성, 전이성, 및/또는 진행성 암을 갖는 경우, 개체에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0730] 임의로, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체로 치료되는 개체는 수술 및/또는 치료제, 예를 들어, 화학요법제, 항체, ADC 또는 방사선요법을 사용하는 치료 (예를 들어, 그 동안 또는 이후에)에도 불구하고, 저항성이거나, 비반응성이거나, 또는 재발성 및/또는 진행성인 암 (예를 들어, 요로상피암, 유방암 (예를 들어, 삼중-음성 유방암; HER2-양성 암), 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 위암, 직결장암, 두경부 편평 세포 암종 또는 식도암)을 가질 수도 있다.
- [0731] 본 명세서의 임의 구현예에서, 치료 반응은 잘 알려진 기준, 예를 들어, 고형 종양에서 반응 평가 기준 (RECIST), 예컨대 버전 1.1 (참조: Eisenhauer et al. (2009) Eur. J. Cancer 45:228-247), 또는 면역-관련 반응 기준 (irRC) (참조: Wolchock et al. (2009) Clinical Cancer Research 15:7412-7420)에 따라서 정의 및/또는 평가될 수 있다.
- [0732] 임의로, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체로 치료되는 개체는 화학요법제 (예를 들어, P-당단백질 (Pgp)에 의해 수송될 수 있는 것으로 알려진 화학요법제, 예를 들어 안트라사이클린 (독소루비신, 다우노루비신, 탁산 (파클리탁셀, 도세탁셀), 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신), 및 에토포시드를 사용한 치료 이

후에 저항성을 나타내거나, 그에 대해 비반응성이거나 또는 진행된 종양 또는 암을 갖는다. Pgp에 의해 인식되는 화합물은 전형적으로 약간의 소수성인 것을 특징으로 하고 (옥탄올 대 물 분배 계수,  $\log P > 1$ ), 종종 생리적 조건 하에서 순 양이온 전하를 갖는 적정가능한 양자를 함유하고, 주로 방향족 모이어티를 갖는 "천연 생산물"이다.

[0733] 일부 구현예에서, 항-넥틴-4 항체, 항체 단편을 포함하는 ADC는 화학요법제의 병용 투여 부재 하에서 사용되거나 또는 투여된다.

[0734] 다른 구현예에서, 항-넥틴-4 항체, 항체 단편 또는 이를 포함하는 ADC는 임의로 화학요법제와 병용하여 사용되거나 또는 투여된다. 예시적인 화학요법제는 암사크린, 블레오마이신, 부셀판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로파라빈, 크리산타스파제, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 쟈시타빈, 히드록시 카바미드, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 류코보린, 리포숨 독소루비신, 리포숨 다우노루비신, 로무스틴, 멜팔란, 머캅토푸린, 메스나, 메토티렉세이트, 미토마이신, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 펜토스타틴, 프로카르바진, 라티트렉세드, 사트라플라틴, 스트렙토조신, 테가푸르-우라실, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오테과, 티오구아닌, 토포테칸, 트레오수판, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 또는 이의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 항-넥틴-4 항체, 항체 단편 (또는 이를 포함하는 ADC) 및 화학요법제는 별도 투여를 위해 체제화되고 동시발생적으로 또는 순차적으로 투여된다.

[0735] 임의로, 개체는 진행되었거나, 재발되었거나, 또는 사전 요법을 사용한 사전 치료에 반응하지 않은 암을 갖는 것을 특징으로 할 수 있고, 임의로 또한 사전 요법은 엔포투맵 베도틴의 투여 및/또는 PD-1 중화제 (예를 들어, 켈브롤리주맵, 아테졸리주맵, 니블루맵)의 투여를 포함하고, 임의로 사전 요법은 화학요법제이다.

[0736] 임의로, 임의 구현예에서, 개체는 엔포투맵 베도틴을 사용한 치료에 부적격하고/하거나, 엔포투맵 베도틴을 사용한 치료에 적합하지 않거나 또는 권고되지 않는 암을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0737] 캄프토테신 유도체 분자에 접합된 항-넥틴-4 항체를 사용해 인간을 치료하기 위한 예시적인 치료 프로토콜은 예를 들어 환자에게 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 방법은 캄프토테신 유도체 분자에 접합된 항-넥틴-4 항체의 적어도 1회 용량이 0.1-10 mg/kg 체중, 0.1-5 mg/kg 체중, 0.1-1 mg/kg 체중, 1-10 mg/kg 체중 또는 1-5 mg/kg 체중의 용량으로 투여되는 적어도 1회의 투여 주기를 포함한다. 일 구현예에서, 다수의 용량, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10회 용량이 투여된다. 일 구현예에서, 투여 용량은 적어도 2주, 3주 또는 4주까지 분리된다. 일 구현예에서, 투여는 매주, 2주마다, 3주마다, 또는 4주마다이다.

[0738] 일 구현예에서 본 개시의 항-넥틴-4 항체 약물 접합체는 i.v로 투여된다.

[0739] **실시예**

[0740] **실시예 1: Her2, TROP-2, B7H3 및 넥틴-4를 공발현하는 인간 종양 세포**

[0741] HER2 및 넥틴-4 유전자 발현의 연구는 상이한 유형의 암에서 핵심 게놈 변화의 다차원 맵을 기반으로 The Cancer Genome Atlas (미국립 암 연구소와 국립 인간 게놈 연구소 간 협업)를 사용하여 수행되었다. HER2 및 넥틴-4 발현의 유의한 상관성이 특히 췌장암, 폐 선암종 환자, 유방암 및 방광암 환자 유래 샘플에서 관찰되었다. 관찰된 최고 상관성은 췌장암이었고, 상관성 값: Spearman 0.71 및 Pearson 0.78이었다.

[0742] SUM185 및 SUM190 인간 유방암 종양 세포주 (Biovit Inc.) 상에서 HER2 및 넥틴-4 발현은 유세포측정을 통해 결정되었다. SUM185은 ER 음성, PR 음성 및 HER2 양성 역형성 유방 암종을 갖는 환자의 흉막 삼출액으로부터 기원한다. 이 세포주는 Her2를 과발현한다. SUM190은 ER 음성, PR 음성 및 HER2 양성 (중폭) 유방암을 갖는 환자 유래 원발성 종양으로부터 기원한다. 종양 세포는 항-넥틴-4 항체 (감소된 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 N297Q 돌연변이를 함유하는 인간 IgG1 이소타입으로서 변형된 ASG-22ME), 항-TROP-2 항체, 항-B7H3 항체 또는 항-Her2 항체 (Fc 감마 수용체 결합이 감소된 N297Q 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 이소타입으로서 변형된 트라스트주맵)를 비롯하여, 이소타입 대조군으로, 10 µg/mL (4°C)로 염색되었고, 이어서 1:200의 희석율의 PE 접합된 다클론 염소 항 인간 항체로 염색되었다. 샘플은 Canto II (HTS)를 사용한 세포형광 분석을 통해 분석되었다.

[0743] HER2 및 넥틴-4에 대한 대표적인 결과는 SUM190 인간 유방암 종양 세포 경우에 도 1 및 SUM185 인간 유방암 종

양 세포 경우에 도 2에 도시된다. MFI: 형광 강도의 중앙값. SUM190 종양 세포는 낮은 수준 내지 중간 수준 (중앙값 형광 단위 1777)으로 HER2를 비롯하여, 낮은 수준 (중앙값 991 형광 단위)으로 넥틴-4를 발현하였다. SUM185 세포는 중간 내지 높은 수준 (중앙값 형광 단위 2880)으로 HER2를 비롯하여 더 높은 수준 (중앙값 4326 형광 단위)으로 넥틴-4를 발현하였다. 추가적으로, SUM185 세포는 TROP-2 및 B7H3을 높은 수준 (각각 중앙값 형광 단위 17327 및 11481)으로 발현하였다. 발현 데이터는 하기 표 1에 표시된다.

표 1:

	HER2 (MFI)	넥틴- 4 (MFI)	TROP-2 (MFI)	B7H3 (MFI)
SUM185	2880	4326	17327	11481
SUM190	1777	991		

실시예 2: 항-HER2 ADC와 병용된 항-넥틴-4 캄프토테신-유도체 ADC의 효능

항-넥틴-4 항체-약물 접합체를 제조하였고, HER2+ 넥틴4+ 인간 종양 세포 상에서 효능에 대해 트라스투주맙 항체-약물 접합체와 비교하였다. 항-넥틴-4 항체-약물 접합체는 인간 IgG1 이소타입으로서 SEQ ID NO: 6 및 7의 VH 및 VL을 갖는 것을 제조하였다.

N41 VH:

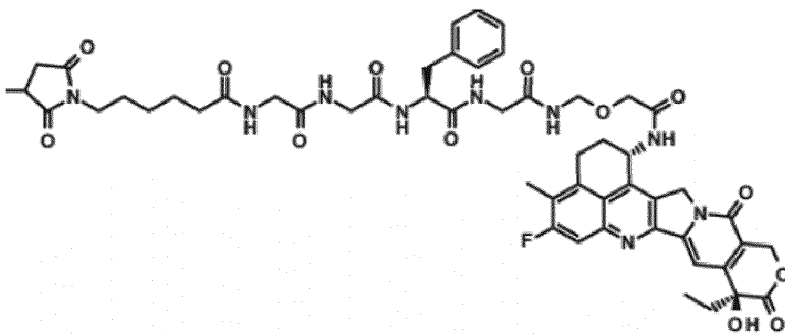
QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGSTDYN  
 AAFISRLSISKDTSKSVVFFKMNSLQADDTAIYYCARELIHAMDNWGQTSVTVSS  
 (SEQ ID NO: 6).

N41 VL:

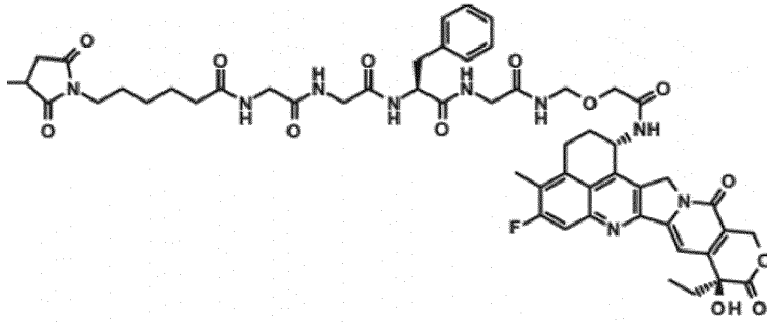
DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGNPQLLVFAATNLADGVPS  
 RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFHWGTPTFGGGTKLEIK  
 (SEQ ID NO: 7).

항-HER2 항체-약물 접합체는 트라스투주맙 (인간 IgG1 이소타입)의 중쇄 및 경쇄를 갖는 것이 제조되었다. 항-넥틴-4 및 항-HER2 항체 둘 모두는 각각이 사슬간 디설피드의 부분 환원 이후에 항체의 시스테인 잔기를 통해서 링커-캄프토테신 유도체에 확률적으로 접합되었다. 2-10 몰당량 범위의 환원제 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 히드록로라이드를 항체 (3 mg/mL)와 함께 2시간 동안 교반 (350-400rpm, +37 °C) 하에서 인큐베이션하여 디설피드를 환원시켰다. 링커-독소의 접합은 +37°C에서 교반 후 상에서 밤새 인큐베이션된 9.2 또는 12 몰당량으로 몰과량의 링커-독소의 첨가를 통해 수행되었다. 최종 ADC는 약 8의 평균 약물 로딩 (약물:항체 비)을 가졌다. 추가 예에서, 항-넥틴-4 항체는 또한 동일한 방법을 사용하여 링커를 함유하는 제2 캄프토테신 (SN-38)에 접합되었다. 이 실시예에서 사용된 ADC는 다음과 같다:

N4 ADC1: 하기 구조를 갖는 링커에 접합된 항-넥틴-4:

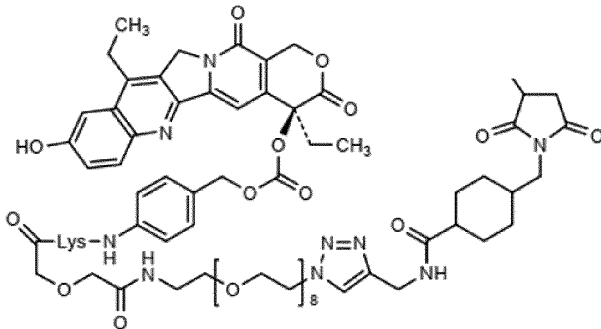


[0752] Her2 ADC1: 하기 구조를 갖는 링커에 접합된 항-HER2:



[0753]

[0754] N4 ADC2: 하기 구조를 갖는 링커에 접합된 항-넥틴-4:



[0755]

[0756] 최종 ADC는 실시예 1의 MCF-7 종양 세포, 병용 사용했을 때 넥틴-4/HER2 발현 SUM190의 사멸을 유도하는 그들 능력에 대해 시험되었다. 간략하게, 세포는 96-웰 플레이트 (V=80  $\mu$ l)에 플레이팅된 세포였다. N4 ADC1 및 HER2 ADC1 또는 인간 IgG1-이소타입 대조군 (IC)-링커-독소 또는 베지 (농도 5x)는 (530 nM 내지 30 nM)에서 시작하여 1:2 연속 희석으로 시험하였고, N4 ADC1 및 이소타입 대조군 경우 1:5 연속 희석 (7 nM 내지 7x10<sup>-2</sup> nM)하였다. N4 ADC2 및 이소타입 대조군은 (530 nM 내지 5.3 10<sup>-2</sup>)로부터 시작하여 1:10 연속 희석으로 시험하였다. 세포 사멸을 유발하는 ADC의 능력은 Incucyte S3-2 장비를 사용하여 합류를 평가하여 결정하였고; 치료 후 6일에 생존능은 Enspire2 장비와 함께 Cell Titer Glo™ (CTG) 어세이를 사용하여 결정하였다. 각각의 ADC에 대한 IC50 값은 GraphPad Prism8을 사용해 6일차에 발광성 세포 생존능을 사용해 결정하였다. 실험은 2회 반복하였다.

[0757] 결과는 항-넥틴-4 ADC 및 항-Her2 ADC의 병용은 단독으로 사용된 양쪽 ADC와 비교하여 넥틴-4+ Her2+ 종양 세포의 사멸을 유발하는데서 개선된 역가 (더 낮은 IC50)를 가졌음을 보여주었다.

[0758] **실시예 3: 인간 프레임워크 서열을 갖는 항-hu넥틴-4 항체의 제1 세트의 모델링 및 생성**

[0759] 인간 VH 및 VK 주형은 항체 5E7의 CDR의 도입을 위해 확인되었다. 각각의 VH, VJ, VK 및 JK 프레임워크는 개별적으로 분석되었다. 각각 SEQ ID NO: 19 및 20의 VH 및 VL 아미노산 서열을 갖는 부모 항체는 이후에 IGHJ4\*01 (FR4)과 함께 인간 하위그룹 IGHV1-46\*01로부터의 중쇄 프레임워크 (FR1, FR2, FR3)의 VH에 도입, 및 IGKJ4\*01 (FR4)과 함께, 인간 하위그룹 IGKV2-28\*01로부터의 경쇄 프레임워크 (FR1, FR2, FR3)의 VL에 도입을 통해서 변형되었다.

[0760] 부모 키메라 항체 Fab (HPLP)는 하기 중쇄 및 경쇄 서열을 사용해 모델링되었다:

[0761] HP 중쇄 (가변 도메인 밀출표시):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKA  
TLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTS  
GGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKRVPEPKSCDK (SEQ ID NO: 67)

[0762]

[0763] LP 중쇄 (가변 도메인 밑줄표시):

DVVMTQAAAFSNPVTGLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFS  
SSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 68)

[0764]

[0765] 인간화된 항체 Fab H0L0는 하기 중쇄 및 경쇄 서열을 사용해 모델링되었다:

[0766] H0 중쇄:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRV  
 TMRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGYGNYGDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTG  
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
 KPSNTKVDKRVPEPKSCDK (SEQ ID NO: 69)

[0767]

[0768] L0 중쇄:

DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFS  
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 70)

[0769]

[0770] 경쇄 및 중쇄 인간화된 변이체의 디자인을 위해서, 5E7 HPLP 및 H0L0 3차원 모델을 중첩시켰고, 모든 아미노산 차이는 하나씩 면밀히 조사하였다. 잔기 간에 사슬내 및 사슬외 연결은 또한 소정 사슬에 역돌연변이를 도입시켜서 임의의 중요한 저에너지 결합의 파괴를 확인하고 피하기 위해서 평가되었다.

[0771]

원시 CDR-그래프트로부터 출발하여, 잠재적인 역돌연변이를 확인하고 나서 인간과 마우스 간 프레임워크 차이 잔기를 검토하였다.

[0772]

중쇄 디자인:

[0773]

위치 72 (카밧 번호매김에 따라서 잔기 71)에서 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기는 역돌연변이되어서 부모 항체에 존재하는 류신을 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 TRD와 비교하여 서열 TLD를 갖는다. 이러한 역 돌연변이는 입체 충돌을 피하기 위해서 잔기 79의 것과 커플링되어야 한다.

[0774]

위치 79에서 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기는 역돌연변이되어서 부모 항체에 존재하는 트레오닌을 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 TVY와 비교하여 서열 TTY를 갖는다. 위치 79의 트레오닌은 VH 도메인 내부에서 배향되고, 임의의 다른 잔기와 접촉되지 않는다. 위치 79의 발린이 트레오닌과 잘 중첩되어 있지만, 이러한 잔기는 R72, M34, C22 및 I51과 많은 결합을 형성한다. I51의 회전체 위치는 V79 (카밧 번호매김에 따른 V78)와 접촉으로 설명된다. 잔기 72 (R72L; 카밧 번호매김에 따른 잔기 71)에 역돌연변이의 도입은 V79가 존재하는 경우에 I51 및 L72 사이에 입체 충돌을 도입하게 된다.

[0775]

위치 74에서 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이 잔기는 역돌연변이되어서 부모 항체에 존재하는 리신을 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 DTS와 비교하여 서열 DKS를 갖는다. 위치 74의 리신 잔기는 분자 표면에 노출되고, 결정적인 위치를 차지하지만, 잠재적 결합 부위에 가깝지는 않다.

[0776]

위치 28의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기는 역돌연변이되어서 부모 항체에 존재하는 이소류신을 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 YTF와 비교하여 서열 YIF를 갖는다. 위치 28에서 이소류신 및 트레오닌은 잘 중첩된다. 그들은 분자 표면에 노출되고, 파라토프에 가까운 항체의 상부에 위치된다. 이 잔기가 결합에 참여할 수 있다는 것을 배제할 수 없다. 더욱이, 이 잔기는 IMGT 정의에 따른 CDR-H1에 포함된다.

[0777]

SEQ ID NO: 39로 표시된 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄 변이체 (H1)는 R71L 및 V78T 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 41로 표시된 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄 변이체 (H2)는 R71L, T73K 및 V78T 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 43으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 제3 중쇄 변이체 (HE)는 T28I, R71L, T73K 및 V78T 치환을 가졌다. 치환의 번호매김은 카밧에 따른다.

[0778]

경쇄 디자인:

[0779] 위치 2의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기가 역돌연변이되어서 부모 항체의 발린 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 DIV와 비교하여 서열 DVV를 갖는다. 잔기 V2는 CDR-L1에 위치한 잔기 K27과 상호작용하고, 이것은 CDR-L3에 위치한 잔기 E98과 더욱 상호작용한다.

[0780] 위치 69의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이하여서, 부모 항체의 세린 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 SGS와 비교하여 서열 SSS를 갖는다. 잔기 S69는 VL 도메인 내부에 배향되고, 인접한 잔기 W40 및 M56 (CDR-L2에 위치됨)과 많은 결합을 형성하는데 반해서, G69 (카뱃 번호매김에 따라 G64)는 M56과 h-결합을 형성한다. 모든 이들 잔기는 잘 중첩된다. 잔기 W40은 전체 내부 네트워크의 중심이다.

[0781] 위치 11의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이하여서, 부모 항체의 아스파라긴 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 SLP와 비교하여 서열 SNP를 갖는다. 잔기 L11은 잔기 P8과 상호작용하고 P8 베타 가닥을 견고하게 할 가능성이 있다.

[0782] 위치 8의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이하여서, 부모 항체의 알라닌 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 SPL과 비교하여 서열 SAL을 갖는다. 잔기 명시된 바와 같이, 잔기 P8은 잔기 L11과 상호작용하고, 이러한 상호작용은 P8 베타 가닥을 견고하게 할 가능성이 있다.

[0783] SEQ ID NO: 61의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 변이체 (L1)는 I2V 및 G64S 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄 변이체 (L2)는 I2V, L11N 및 G64S 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 갖는 제3 경쇄 변이체 (L3)는 I2V, P8A, L11N 및 G64S 치환을 가졌다. 치환의 번호매김은 카뱃에 따른다.

[0784] 각각의 중쇄 (표 2의 "H" 사슬) 및 경쇄 (표 2의 "L" 사슬) 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 표 2에 표시된다.

[0785] 표 2

사슬	SEQ ID NO	서열 (아미노산 치환 굵은체, 카뱃 CDR 밑줄)
H1	39	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDP</u> <u>SDSYTNY</u> <u>NQKFKGRVTMT</u> <b>L</b> <u>DTSTST</u> <b>T</b> <u>YME</u> <u>LSLR</u> <u>SEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQ</u> <u>GLVTVSS</u>
H2	41	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDP</u> <u>SDSYTNY</u> <u>NQKFKGRVTMT</u> <b>L</b> <u>DK</u> <u>STST</u> <b>T</b> <u>YME</u> <u>LSLR</u> <u>SEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQ</u> <u>GLVTVSS</u>
H3	43	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGY</u> <b>I</b> <u>FTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDP</u> <u>SDSYTNY</u> <u>NQKFKGRVTMT</u> <b>L</b> <u>DK</u> <u>STST</u> <b>T</b> <u>YME</u> <u>LSLR</u> <u>SEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQ</u> <u>GLVTVSS</u>
L1	61	<u>DV</u> <u>MTQSP</u> <u>LSL</u> <u>PVTPGEPASISCRSSKSL</u> <u>LH</u> <u>SNGIT</u> <u>YLYWYLQKPGQSP</u> <u>QLLIYQMS</u> <u>NLAS</u> <u>GVPDRFSS</u> <u>SGSGTDFTLKI</u> <u>SRVEAEDVGVYYCAQ</u> <u>NLELPWTFGGG</u> <u>TKVEIK</u>
L2	63	<u>DV</u> <u>MTQSP</u> <u>LSN</u> <u>PVTPGEPASISCRSSKSL</u> <u>LH</u> <u>SNGIT</u> <u>YLYWYLQKPGQSP</u> <u>QLLIYQMS</u> <u>NLAS</u> <u>GVPDRFSS</u> <u>SGSGTDFTLKI</u> <u>SRVEAEDVGVYYCAQ</u> <u>NLELPWTFGGG</u> <u>TKVEIK</u>
L3	65	<u>DV</u> <u>MTQ</u> <u>S</u> <b>A</b> <u>LSN</u> <u>PVTPGEPASISCRSSKSL</u> <u>LH</u> <u>SNGIT</u> <u>YLYWYLQKPGQSP</u> <u>QLLIYQMS</u> <u>NLAS</u> <u>GVPDRFSS</u> <u>SGSGTDFTLKI</u> <u>SRVEAEDVGVYYCAQ</u> <u>NLELPWTFGGG</u> <u>TKVEIK</u>

[0786] 하기 표 3에 표시된 중쇄 및 경쇄 조합을 갖는 항체를 생산하였다.

[0788] 표 3

		경쇄			
		L0	L1	L2	L3
중쇄	H0	H0L0	H0L1	H0L2	H0L3
	H1	H1L0	H1L1	H1L2	H1L3
	H2	H2L0	H2L1	H2L2	H2L3
	H3	H3L0	H3L1	H3L2	H3L3

[0789]

[0790] 실시예 4: SPR에 의한 넥틴-4에 대한 결합의 특징규명

[0791] 실시예 3의 표 3의 항체는 인간 IgG1 이소타입 항체로서 클로닝되었고, 생산 및 정제된 다음에 인간 넥틴-4에 대한 결합에 대해 시험되었다. 16개 인간화된 변이체의 친화성을 비롯하여, 그들 결합 및 해리 상수가 SPR 분석으로 평가되었다. 표 4는 4는 모든 계산된 상수 (친화성 상수 KD (nM), 결합 상수 ka (1/Ms) 및 해리 상수 kd (1/s))를 요약한다.

[0792] 전체 인간 IGKHV-46\*01 및 IGHJ4\*01 중쇄 프레임워크 및 전체 인간 IGKV-28\*01 및 IGHJ4\*01 경쇄 프레임워크를 갖는 H0L0 항체는 KD가 80.2 nM이었다. 표 4에 표시된 바와 같이, 다른 변이체는 H0L0에 비해서 낮은 KD를 나타냈다.

[0793] 중쇄 H3은 부모 항체와 가까운 KD 값을 회복하였다. 그러므로, H3에 도입된 역돌연변이는 인간화된 항체의 안정화에 중요하다. 해리 상수 값의 등급은 H0에서 H3로 표시된다.

[0794] 표 4

항체	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
5E7	5.9 ± 1.2	4.8E+5 ± 1.0E-5	2.7E-3 ± 0.3E-3
H0L0	80.2	1.7E+5	1.4E-2
H1L0	67.3	1.1E+5	7.2E-3
H2L0	46.4	1.3E+5	6.2E-3
H3L0	35.8	1.1E+5	4.1E-3
H3L1	22.0 ± 0.4	4.0E+5 ± 0.3E+5	8.7E-3 ± 0.4E-3
H3L2	25.9	3.1E+5	8.1E-3
H3L3	27.0	2.6E+5	7.0E-3

[0795]

[0796] 실시예 5: 인간 프레임워크 서열을 갖는 항-hu넥틴-4 항체의 제2 세트의 모델링 및 생성

[0797] 실시예 3에서 생성된 인간화된 항체의 SPR 데이터를 기반으로 새로운 항체를 디자인하였다.

[0798] 중쇄 디자인

[0799] 위치 38의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이시켜서 부모 항체의 리신 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 VRQ와 비교하여 서열 VKQ를 갖는다. K38은 잔기 E46과 염 가교의 일부이다.

[0800] 위치 40의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이시켜서 부모항체의 아르기닌 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 QAP와 비교하여 서열 QRP를 갖는다. 잔기 R40은 Q43과 접촉하고, 이 잔기는 경쇄의 잔기 Q43과 2개 수소 결합을 형성하는 Q39와 접촉한다. 이러한 역돌연변이에 의해서, 중쇄의 잔기 Q43은 분기된 위치를 차지하지만, Q39와 접촉은 유지되고 L0-Q43과 2개 수소 결합도 역시 유지된다.

[0801] 위치 48의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이시켜서 부모 항체의 이소류신 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 WMG와 비교하여 서열 WIG를 갖는다. 잔기 I48은 A68, M81 및 F64 (CDR-H2에 위치됨)와 상호작용한다.

[0802] 위치 70의 잔기의 역할을 조사하기 위해서, 이러한 잔기를 역돌연변이시켜서 부모 항체의 류신 잔기를 보존하였다. 부모 항체는 H0L0 항체의 TMT와 비교하여 서열 TLT를 갖는다. 잔기 L70은 잔기 M81, I51 (CDR-H2에 위치함), Y60 (CDR-H2에 위치함) 및 W36과 상호작용한다. 잔기 M70 (카뱃 번호매김에 따라 M69)은 잔기 I51 (CDR-H2에 위치됨), Y60 (CDR-H2에 위치됨) 및 W36과 상호작용한다. 잔기 I51이 상이한 회전체 위치를 차지하는 것을 제외하고, 모든 다른 잔기는 완벽하게 잘 중첩되고, 2개 네트워크는 거의 동등하다.

[0803] SEQ ID NO: 45로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 제4 중쇄 변이체 (H4)는 R38K 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 갖는 제5 중쇄 변이체 (H5)는 R38K 및 A40R 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 갖는 제6 중쇄 변이체 (H6)는 R38K, A40R 및 M48I 치환을 가졌다. SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 갖는 제7 중쇄 변이체 (H7)는 R38K, A40R, M48I 및 M69L 치환을 가졌다. 제8 (H8; SEQ ID NO: 53), 제9 (H9; SEQ ID NO: 55) 및 제10 (H10; SEQ ID NO: 57) 사슬은 상이한 조합의 치환을 갖도록 디자인되었다.

아미노산 잔기의 번호매김은 카밧에 따른다.

[0804] 각각의 중쇄 (표 5의 "H" 사슬) 및 경쇄 (표 5의 "L" 사슬) 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 표 5에 표시된다.

[0805] 표 5

사슬	SEQ ID NO	서열 (아미노산 치환 굵은체, 카밧 CDR 밑줄)
H4	45	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWV<b>KQ</b>APGQGLEWMGEIDPDSYNTY</u> <u>NQKFKGRVTMT<b>LDK</b>STST<b>TY</b>MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT</u> LVTVSS
H5	47	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWV<b>KQ</b>RPGQGLEWMGEIDPDSYNTY</u> <u>NQKFKGRVTMT<b>LDK</b>STST<b>TY</b>MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT</u> LVTVSS
H6	49	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWV<b>KQ</b>RPGQGLEW<b>I</b>GEIDPDSYNTY</u> <u>NQKFKGRVTMT<b>LDK</b>STST<b>TY</b>MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT</u> LVTVSS
H7	51	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWV<b>KQ</b>RPGQGLEW<b>I</b>GEIDPDSYNTY</u> <u>NQKFKGRVT<b>LT</b><b>LDK</b>STST<b>TY</b>MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT</u> LVTVSS
H8	53	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWV<b>KQ</b>APGQGLEW<b>I</b>GEIDPDSYNTY</u> <u>NQKFKGRVTMT<b>LDK</b>STST<b>TY</b>MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT</u> LVTVSS

[0806] 하기 표 6에 표시된 중쇄 및 경쇄 조합을 갖는 항체를 생산하였다.

[0808] 표 6

		경쇄			
		L0	L1	L2	L3
중쇄	H4	H4L0	H4L1	H4L2	H4L3
	H5	H5L0	H5L1	H5L2	H5L3
	H6	H6L0	H6L1	H6L2	H6L3
	H7	H7L0	H7L1	H7L2	H7L3
	H8		H8L1		

[0809] 실시예 6: SPR에 의한 벡틴-4에 대한 결합의 특징규명 (제2 세트)

[0810] 실시예 5의 표 6의 항체는 인간 IgG1 이소타입 항체로서 클로닝되었고, 생산 및 정제된 다음에 인간 벡틴-4에 대한 결합에 대해 시험되었다. 16개의 인간화된 변이체의 친화성을 비롯하여, 그들 결합 및 해리 상수가 SPR 분석으로 평가되었다. 표 7은 모든 계산된 상수 (친화성 상수 KD (nM), 결합 상수 ka (1/Ms) 및 해리 상수 kd (1/s))를 요약한다.

[0811] 전체 인간 IGKHV-46\*01 및 IGHJ4\*01 중쇄 프레임워크 및 전체 인간 IGKV-28\*01 및 IGHJ4\*01 경쇄 프레임워크를 갖는 H0L0 항체는 kD가 80.2 nM이었다. 표 7에 표시된 바와 같이, 다른 변이체는 H0L0에 비해서 낮은 KD를 나타냈다. 특히 변이체 H4L1, H5L3 및 H8L1은 키메라 부모 항체 (5.9 nM ± 1.2의 KD를 가짐)에 가까운 KD를 가졌다.

[0813] 표 7

인간화된 변이체	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
ch5E7	5.9 ± 1.2	4.8E+5 ± 1.0E-5	2.7E-3 ± 0.3E-3
H0L0	80.2	1.7E+5	1.4E-2
H4L1	19.5 ± 0.8	3.1E+5 ± 0.3E+5	5.9E-3 ± 0.3E-3
H4L2	26.8	2.0E+5	5.4E-3
H4L3	21.6 ± 1.1	2.5E+5 ± 0.3E+5	5.2E-3 ± 0.2E-3
H5L1	24.5	2.3E+5	5.6E-3
H5L2	23.8	2.2E+5	5.3E-3
H5L3	21.5 ± 0.4	2.5E+5 ± 0.1E+5	5.3E-3 ± 0.0E-3
H6L1	32.1	1.9E+5	6.2E-3
H6L2	41.3	1.4E+5	5.8E-3
H6L3	38.6	1.3E+5	5.1E-3
H7L1	29.7	2.0E+5	6.0E-3
H7L2	39.5	1.6E+5	6.3E-3
H7L3	49.0	1.1E+5	5.5E-3
H8L1	19.2	2.5E+5	4.8E-3

[0814]

[0815] 실시예 7: 유세포측정 어세이에 의한 넥틴-4에 대한 결합의 특징규명

[0816] 실시예 3의 표 3 및 실시예 5의 표6의 인간화된 항체를 클로닝하고, 생산 및 정제한 다음에 유세포측정을 통해서 넥틴-4 발현 세포에 대한 결합에 대해 시험하였다. 인간 IgG1 형식의 인간화된 변이체의 결합은 높은 수준으로 넥틴-4를 발현하는 SUM190 세포주에서 결정되었다. EC50 및 포화 단계에서 MedFi에 반응하는 최대 MedFI는 하기 표 8에 표시된다.

[0817] L0 또는 L1 사슬을 보유하는 모든 인간화된 변이체는 나머지에 비해서 낮은 결합 능력을 갖는다 (보다 낮은 평탄기). 대조적으로, L2 또는 L3 사슬을 보유하는 모든 인간화된 변이체는 부모 키메라 5E7 항체 (ch5E7)와 비교하여 유사한 결합 능력을 갖는다. 변이체 H5L3은 최고 MedFi 값을 나타낸다.

[0818] 표 8

항체	EC <sub>50</sub>	Max MedFi
ch5E7	1.10	25213
H0L0	0.542	15507
H1L0	0.64	17251
H2L0	0.45	16704
H3L0	0.88	17596
H3L1	1.79	17208
H3L2	1.19	22887
H3L3	1.45	23814
H4L1	1.49	18399
H4L2	1.44	24352
H4L3	1.60	24840
H5L1	1.43	18263
H5L2	1.14	25276
H5L3	1.29	27095
H6L1	1.15	18263
H6L2	1.30	24779
H6L3	1.01	24840
H7L1	1.27	17816
H7L2	1.30	23404
H7L3	1.23	25026
H8L1	1.63	17251

[0819]

[0820] 실시예 8: 세포내 내재화 어세이

[0821] 실시예 3의 표 3 및 실시예 5의 표 6의 인간화된 변이체를 클로닝하였고, 생산 및 정제한 다음에 넥틴-4 내재화를 유도하는 그들 능력에 대해 시험되었다. 키메라 부모 5E7 항체 및 이소타입 대조군은 음성 대조군으로서 사용되었다. 이러한 분석은 판독치로서 사용되는 Cell Titer Glo™ (CTG) 어세이와 함께 Fab-ZAP 인간 내재화 키트 어세이로 수행하였다. 실험은 상이한 수준의 넥틴-4를 발현하는 2개 세포주에서 수행되었다. MDA-MB-468은 SUM190에 비해서 낮은 넥틴-4 발현을 갖는다.

[0822] SUM190 세포주에 대한 내재화 어세이

[0823] SUM190 세포주에 대한 내재화 어세이의 결과는 하기 표 9에 표시되는데, 내재화 효율 (SUM190 세포주에 대한 키메라 부모 항체 내재화 효율에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 실험은 이중 (2회 독립 실험)으로 수행되었다.

[0824] 표 9

항체	SUM190 에서 내재화 효율 (키메라 부모 항체 내재화 잠재력에 대해 정규화)	
	100.0	100.0
키메라 부모 5E7	100.0	100.0
H0L0	65.9	35.4
H1L0	83.7	58.6
H2L0	74.2	61.8
H3L0	81.4	69.7
H3L1	82.1	41.0
H3L2	69.8	45.5
H3L3	65.3	59.6
H4L1	73.5	72.6
H4L2	83.6	67.6
H4L3	81.9	61.0
H5L1	71.5	52.4
H5L2	81.3	86.0
H5L3	82.8	74.9
H6L1	71.3	54.5
H6L2	69.7	63.5
H6L3	78.7	92.8
H7L1	128.7	73.1
H7L2	89.6	74.8
H7L3	88.5	61.3
H8L1	131.9	65.2

[0825]

[0826]

SUM190 세포주에서 수행된 실험으로 결정된 내재화 효율은 인간화된 변이체 H3L0, H4L2, H5L2, H5L3, H6L3 및 H7L2가 부모 항체 (5E7)와 비교하여 75% 이상의 내재화를 유도한다는 것을 보여주어서, 흥미로운 내재화 잠재성을 나타낸다. H8L1 및 H7L1 변이체는 1차 실험에서 키메라 5E7에 비해서 더 강력하였지만, 이 결과는 2차 실험에서 확인되지 않았음을 유의해야 한다.

[0827]

MDA-M-468 세포주에 대한 내재화 어세이

[0828]

SUM190 세포주에 대한 내재화 어세이의 결과는 하기 표 10에 표시되는데, 내재화 효율 (MDA-M-468 세포주에 대한 키메라 부모 항체 내재화 효율에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 실험은 이중 (2회 독립 실험)으로 수행되었다.

[0829] 표 10

항체	MDA-MB-468 에서 내재화 효율 (키메라 부모 항체 내재화 효율에 대해 정규화)	
키메라 부모 5E7	100.0	100.0
H0L0	-36.2	-36.2
H1L0	-7.4	-7.4
H2L0	-35.5	-35.5
H3L0	1.2	1.2
H3L1	48.2	48.2
H3L2	13.7	13.7
H3L3	43.8	43.8
H4L1	31.0	31.0
H4L2	64.2	64.2
H4L3	43.8	43.8
H5L1	33.4	33.4
H5L2	39.4	39.4
H5L3	87.8	87.8
H6L1	61.6	61.6
H6L2	58.5	58.5
H6L3	66.3	66.3
H7L1	79.0	79.0
H7L2	58.7	58.7
H7L3	51.8	51.8
H8L1	71.2	71.2

[0830]

[0831]

얻어진 결과는 단지 H5L3 인간화된 변이체만이 일관되게 부모 키메라 5E7 항체의 효능의 75% 이상에 충분히 도달된데 반해서, 모든 다른 변이체는 효율이 덜 하였고, 그들 대부분은 실험 간에 이질적인 결과를 가졌다는 것을 보여준다.

[0832]

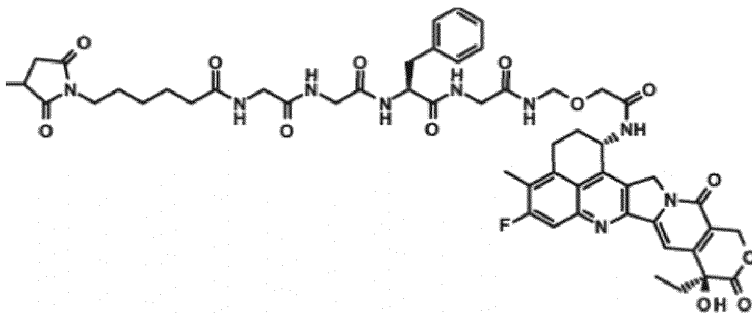
**실시예 9: 종양 세포주에 대한 ADC로서 항체의 시험관내 세포독성**

[0833]

넥틴-4 저/SUM190 유방암 모델

[0834]

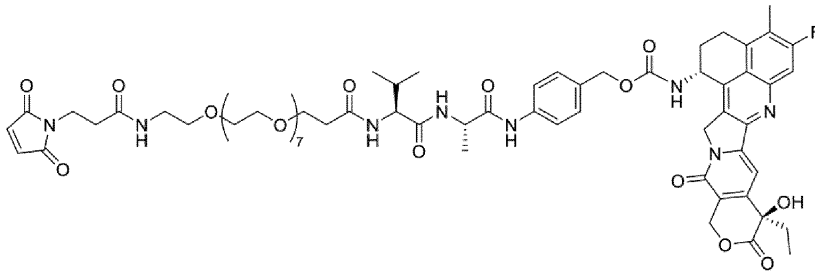
SUM190 세포를 사멸시키는 캄프토테신 유사체 (Dxd 또는 엑사테칸)와 접합된 5E7 항체의 능력을 평가하였다. 이러한 실험에서, 5E7 항체는 항-Ig-유사 V 도메인 항체 엔포투맵 및 N41 및 동등한 약물 대 항체 비로 동일한 독소가 접합된 대조군 항체와 함께 시험되었다. 제1 ADC는 ggf-g-Dxd라고 하는, 하기 도시된 구조를 갖는 세포내 절단가능한 테트라펩티드 링커 (GGFG)를 포함하는 링커를 통해서 캄프토테신 유사체 (Dxd)에 항체 당 8개 독소 (DAR=8)로 항체를 (시스테인 잔기에) 접합시킨 것이 제조되었다:



[0835]

[0836]

제2 ADC는 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸이라고 하는, 하기 구조를 갖는 절단가능한 링커를 통해서 다른 캄프토테신 유사체 (엑사테칸)에 항체 당 8개 독소 (DAR=8)로 항체를 접합시킨 것이 제조되었다:



[0837]

[0838] 간략하게, 각 시험된 Ab의 용량-범위 (출발점 150 nM, 3지점에 대해 희석 배율 2, 그 다음에 5지점에 대해 5)는 CTG 기질의 첨가를 통한 세포 생존능 측정 이전 5일 동안 세포와 인큐베이션되었다. 발광도 대 Ab 농도가 그래프 상에 표시되었다.

[0839] 각각의 ADC 경우, ADC의 농도 범위는 넥틴-4-발현 세포와 인큐베이션되었다. 인큐베이션 후에, CTG 기질은 1/1 비로 첨가되었고 발광 신호는 플레이트 판독기 (Enspire)로 판독하였다. 이것은 세포 생존능에 비례하는 존재하는 ATP (대사적 활성 세포의 지시자)의 정량을 허용하였다.

[0840] 결과는 도 3A에 도시된다. 도 3A는 모두 동등한 약물 대 항체 비 (DAR=8)에서, 이소타입 대조군 항체 (IC)와 함께, 캄프토테신 유사체 Dxd (GGFG-Dxd 링커를 포함) 또는 엑사테칸 ((PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸 링커를 포함)에 접합된 5E7 항체에 의한 인간 유방암 세포의 사멸을 도시하고, V-도메인 결합 Enhertu™ (트라스투주맙 데록스테칸 (항-HER2))과 비교되었다.

[0841] 모든 넥틴-4-표적화 ADC는 비-표적화된 ADC (IC-GGFG-캄프토테신)에 비해서 보다 효율적으로 세포 생존능을 감소시켰다.

[0842] SUM185, MDA-MB-468, MC38 및 B16F10 세포주

[0843] 엑사테칸에 접합된 항체 5E7 ((PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸 링커를 포함)은 다른 암 세포주에 대한 세포 사멸에 대해 추가로 시험되었다. 도 3B는 "5E7-엑사테칸" (엑사테칸 링커 (PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸에 접합된 5E7)의 효능은 HER-2 및 넥틴-4 발현 SUM185 및 SUM190을 비롯하여, MDA-MB-468 (TNBC) 인간 종양 세포 및 인간 넥틴-4-발현 MC38 (결장암), 및 B16F10 (흑색종) 쥐 종양 세포의 사멸을 초래할 수 있다는 것을 도시한다. 세포 생존능에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 하기 표 11에 표시된다.

[0844] 표 11

세포주	MDA-MB-468	SUM185	SUM190	MC38-huN4	B16F10-huN4
EC <sub>50</sub> (nM)	1.5E+05	3E+05	7E+05	2.3E+5	9.8E+5

[0845]

[0846] 실시예 10: 인간 유방암의 마우스 모델 (넥틴-4 저/SUM190 모델)에서 ADC의 생체내 효능

[0847] 인간 유방암의 마우스 모델에서 엔포투맙 및 N41과 비교하여, 캄프토테신 ADC로서 5E7 항체의 효능을 비교하였다. 이러한 실험에서, 5E7 항체는 항체 당 8개 독소의 동등한 약물 대 항체 비 (DAR=8)로 ggfg-Dxd 링커에 접합된 대조군 Ab 및 N41 및 엔포투맙과 함께 시험되었다.

[0848] SUM190 세포는 PBS에 1/2로 희석된 성장 인자가 존재하는 100 μl의 매트릭셀 중 50만 세포의 용량으로 CB17-SCID 면역결핍 마우스에 피하로 생착되었다. 종양이 195와 250 mm<sup>3</sup> 사이의 부피에 도달했을 때, 마우스는 3 mg/kg의 캄프토테신 ADC의 단일 주사로 정맥내 치료를 위해 9마리 마우스의 그룹으로 임의 추출하였다. 종양 성장은 주 당 2회 추적하였다. 카플란 마이어 생존 곡선은 하기 기준에 따라 GraphPad Prism V7 소프트웨어를 사용하여 확립하였다: 종양 부피가 1500 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 마우스를 안락사시켰고 희생 당일에 폐사로 간주하였다 (D). 종양이 괴사 징후를 보일 때, 마우스를 안락사시켰고 같은 날 폐사로 간주하였다 (D) (개체 종양 성장 그래프에 붉은색 별 표시).

[0849] 결과는 10 mg/kg 용량에서, 모든 ADC가 종양 부피의 증가를 방지하는데 유사하게 효율적이었음을 보여주었다. 그러나, ADC의 더 낮은 용량 (3 mg/kg)에서, 항체 5E7은 종양 성장을 방지하는 강력한 능력을 보였지만, N41 및 엔포투맙 둘 모두는 종양 성장을 제어하는 능력을 더 이상 보이지 않았다. 3 mg/kg 용량에 대한 결과는 도 4에 도시된다.

[0850] 실시예 11: 약물 저항성의 유방암 모델 (인간 유방암, HER2/넥틴-4 코/SUM185 모델)에서 ADC의 비교 시험관내 효능

[0851] 다음으로 Padcev™ (엔포투맵 베도틴) 및 Enhertu™과 비교하여, SUM185 세포를 사멸하는 캄프토테신 유사체와 접합된 5E7 Ab의 능력을 평가하였다. 이러한 설정은 항-HER2 저항성의 모델로서 사용되었다. SUM185 세포는 넥틴-4를 상대적으로 높은 수준으로 발현하는데, 넥틴-4 발현 수준은 이들 세포에서 HER2의 약 2배이다 (실시예 1 참조). 이러한 실험에서, 5E7 항체는 Padcev™ (DAR=4, FDA-승인된 PADCEV™에 대한 사양) 및 대조군 항체와 함께 DAR=8을 갖는 ADC로서 시험되었고 모두 동등한 약물 대 항체 비로 동일한 독소가 접합되었다. 5E7은 ggfg-Dxd 링커를 통해서 캄프토테신 유사체 DxD와 접합되었다.

[0852] 간략하게, 각각의 시험된 Ab의 용량 범위 (출발점 150 nM, 3지점에 대해 희석 배율 2, 그 다음에 5지점에 대해 5)는 CTG 기질의 첨가에 의한 세포 생존능 측정 이전 5일 동안 세포 상에서 인큐베이션되었다. 발광도 대 Ab 농도는 그래프 상에 표시되었다.

[0853] 각각의 ADC 경우, ADC의 농도 범위는 넥틴-4-발현 세포와 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후에, CTG 기질은 1:1 비로 첨가되었고, 발광 신호는 플레이트 판독기 (Enspire)로 판독하여서, 세포 생존능에 비례하는 존재하는 ATP (대사적 활성 세포의 지시자)의 정량을 허용하였다.

[0854] 결과는 도 5에 도시된다. 5E7-ggfg-Dxd 및 Padcev™은 ENHERTU™에 비해서 더 효율적으로 SUM185를 사멸시킬 수 있었다. 각 경우에, 넥틴 4-표적화된 ADC는 그들 비-표적화된 ADC (IC) 대응물에 비해서 더 효율적으로 세포 생존능을 감소시켰다.

[0855] 실시예 12: 항-넥틴-4 항체의 중 교차-반응성의 특징규명

[0856] 항-넥틴-4 항체는 마우스, 사이노몰거스 및 래트 넥틴-4 단백질 (하기 서열에 표시되지 않은 N-말단 V5 태그 포함)을 각각 발현하도록 만든 상이한 CHO 세포주에 대한 결합에 대해서 유세포측정을 통해 시험되었다.

[0857] 세포에 의해 발현되는 단백질의 성숙한 아미노산 서열은 하기와 같았다:

[0858] 마우스 넥틴-4:

ELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQ  
 PPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPEEGQGLTLA  
 ASCTAEGSPAPSVTWDETVKGTQSSRSFTHPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDRRI  
 THTLQVAFLAEASVRGLEDQNLWQVREGATLKCLSEGQPPPKYNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGFPP  
 LTTEHSGVYVCHVSNELSSRDSQVTVEVLDPEDPGKQVDLVASVIVGVIAALLFCLLVVVVLMRSR  
 YHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHSDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPE  
 GRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEDDDQDEGIKQAMNHVQENGTLRKPTGNGIY INGRGHL  
 V (SEQ ID NO:12)

[0859]

[0860] 래트 넥틴-4:

MPLSLGAEMWGPPEAWLLLLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGQVAWAR  
 VDPNEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSF  
 QARMRLRVLPPLPSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDETVKGTQSSRSFKHSRSAAVT  
 SEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDRITHTLQVAFLAEASVRGLEDQNLWHVREGATLKCLSE  
 GQPPPKYNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGFPPLTTEHSGVYVCHVSNELSSRASQVTVEVLDPEDPGKQ

[0861]

VDLVASVVVGVIAALLFCLLVVVVLMRSRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHTDPRS  
 QPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEDDDQDEGI  
 KQAMNHVQENGTLRKPTGNGIY INGRGHLV (SEQ ID NO: 13)

[0862]

[0863] 사이노몰거스 넥틴-4:  
 GELETSDVVTVVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVQVAVARADAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVE  
 QPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQLTL  
 AASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQR  
 ITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHVGVREGAMKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGF  
 PLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVVDLDPQEDSGKQVDLVSASVVVVGVIAALLFCLLVVVVLM  
 SRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENIRRLHSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEE  
 PEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEEEDQDEGIKQAMNHVQENGTLRKPTGNGIY INGRG  
 HLV (SEQ ID NO: 14)

[0864]

[0865] 항체 5E7는 인간, 사이노몰거스를 비롯하여, 래트 넥틴 4 단백질에 결합하였지만, 마우스 넥틴 4 단백질에 대한 결합은 결여되었다. 도 6A 및 6B는 래트 및 사이노몰거스 넥틴-4-발현 CHO 세포주에 대한 항-넥틴-4 항체의 결합을 보여준다.

[0866] 실시예 13: 넥틴 패밀리 교차 반응성의 특징규명

[0867] 항-넥틴-4 항체는 인간 넥틴 1, 넥틴 2, 넥틴 3 및 PVR 단백질을 각각 발현하도록 만든 상이한 CHO 세포주에 대한 결합에 대해서 유세포측정을 통해서 시험되었다. 각각의 세포주의 발현은 각각 알려진 항-인간 넥틴1, 항-인간 넥틴2, 항-인간 넥틴3 및 항-인간 PVR 항체를 사용해 제어 및 검증하였다. 세포에 의해 발현되는 단백질의 성숙한 아미노산 서열은 다음과 같았다:

[0868] 넥틴-1:

MGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGVHSQVVQVNDMSYGFIGTDVVLHCSFANPLPSVKITQVTWQKST  
 NGSKQNVAIYNPSMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTDGTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPTGNRESQLN  
 LTVMAKPTNWIEGTQAVLRAKKGQDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETRLKGEAEYQEIRNPNGTVTV  
 ISRYRLVPSREAHQQSLACIVNYHMDRFKESLTLNVQYEPVETIEGFDGNWYLQRMDVKLTCKADANP  
 PATEYHWTTLNGSLPKGVEAQNRTLFFKGPINYSLAGTYICEATNPIGTRSGQVEVNITEFPYTPSPP  
 EHGRRAGFPVPTAIGGVAGSILLVLIIVGGIIVVALRRRRHTFKGDYSTKKHVYNGYSKAGIPQHHP  
 MAQNLQYPDDSDDEKKAGPLGSSYEEEEEEEEGGGGGERKVGPHPKYDEDAKRPYFTVDEAEARQD  
 GYGDRTLGYQYDPEQLDLAENMVSQNDGSFISKKEWYV (SEQ ID NO: 15)

[0869]

[0870] 넥틴-2:

MARAAALPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVLPCHELLPPVPGLYISLV  
 TWQRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATALALHGLTVEDEG

[0871]

NYTCEFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSLSDWEA  
 KETQVSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTKVEHESFEEPALIPVTLVRYPPEVVISGYDDNW  
 YLGRTDATALSCDVRSNPEPTGYDWSTSTGTFPTSAVAQGSQVLVIAVDSLNTTFVCTVTNAVGMGRA  
 EQVIFVRETPNTAGAGATGGIIGGIIAAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDEDELEGPSPYKP  
 PTPKAKLEAQEMPSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGS  
 PIPVPPGPPAVEDVSLDLEDEEGEEEEYLDKINPIYDALSYSSPSDSYQKGFVMSRAMYV (SEQ  
 ID NO: 16)

[0872]

[0873] 벡틴-3:

MARTLRPSPLCPGGGKAQLSSASLLGAGLLLQPPTPPPLLLLLFPLLLFSRLCGALAGPIIVEPHVTA  
 VWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSSQTVAVHHPQYGFVQGEYQGRVLFKNYSLNDATITLH  
 NIGFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSTTVTVLVEPTVSLIKGPDSLIDGGNETVAAICIAATGKPVVAHI  
 DWEGDLGEMESTTTSFPNETATIIISQYKLPTRFARGRRITCVVHKPALEKDIRYSFILDIIQYAPEVS  
 VTGYDGNWVFGKGVNLKCNADANPPFFKSVWSRLDGGQWPDGLLASDNTLHFVHPLTFNYSVGYICKV  
 TNSLGQRSDQKVIYISDPPTTTTLQPTIQWHPSTADIEDLATEPKKLPFPLSTLATIKDDTIATIIAS  
 VVGALFIVLVSVLAGIFCYRRRRTRFRGDYFAKNYIPPSDMQKESQIDVLQQDELDSPDSVKKENKN  
 PVNNLIRKDYLEEPEKTQWNNVENLNRFERPMDYYEDLKMGMKFVSDHYDENEDDLVSHVDGVSISR  
 REWYV (SEQ ID NO:17)

[0874]

[0875] PVR (벡틴-5):

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVAFHQQTQGPSYSESKRLEFV  
 AARLGAELRNASLRMFLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGPEVPM  
 ARCSTVGGRRPPAQITWHSDLGGMPTSQVPGFLSGTVTSLWILVPSQVDGKNVTCKVEHESFEKP  
 QLLTVNLTVYYPEVVISISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLI  
 RPVDKPIINTTLICNVTNALGARQAEALTQVQKEGPPSEHSGISRNAIIFLVLGILVFLILLGIGIYFYW  
 SKCSREVLWHCHLCPSSSTEHASASANGHVSYSAVSRENSSSQDPQTEGTR (SEQ ID NO: 18)

[0876]

[0877] 결과는 인간 벡틴 패밀리 구성원에 대한 항-벡틴-4 항체의 교차 반응성이 존재하지 않았다는 것을 보여주었다.

도면은 인간 벡틴 1, 인간 벡틴 2, 인간 벡틴 3 및 인간 PVR 발현 CHO 세포 상에서 항-벡틴-4 항체의 유세포 측정 결과를 도시한다. 표시된 어떠한 항체도 각 세포주에 결합하지 않는다.

[0878] 실시예 14: SPR에 의한 벡틴-4와 결합 경쟁에 대한 에피토프 맵핑

[0879] 이전에 보고된 항체 N4.1 (N41), 항체 14A5 및 엔포투맵과 함께, 키메라 항체 5E7은 Ni-NTA (NTA) Biosensors (Fortebio)를 사용한 OCTET 분석과 함께, SPR (표면 플라즈몬 공명) 방법을 통해서 야생형 인간 벡틴-4 단백질과 결합에 대해 다른 것과 경쟁하는 그들 능력에 대해 시험되었다. 간략하게, Kinetic 완충액 10X에 5 µg/mL로 희석된 인간 벡틴4-His-BirA 단백질을 바이오센서 상에 포획하였다. 제1 항체를 Kinetic 완충액 10X에 10 µg/mL로 희석하여 주입한 다음에, 신호를 포화시키기 위해 Kinetic 완충액 10X 중에 10 µg/mL로 희석된 제1 항체의 제2 주입을 후속하였다. 제2 항체는 Kinetic 완충액 10X에 10 µg/mL로 희석되어 주입되었다.

[0880] 결과는 하기 표 12에 표시된다. 검은색 사각형은 제1 및 제2 항체 간 실질적 또는 직접 경쟁을 의미하고 (제1 항체는 제2 항체의 결합 상실을 방지/유발함), X 표시된 사각형은 잠재적 부분 경쟁을 의미하고 (제1 항체가 잠재적 감소를 유발하지만 제2 항체의 결합 상실은 아님), 흰색 사각형은 경쟁이 없음을 의미한다. 항체 5E7은 벡틴-4와 결합에 대해 다른 것과 경쟁하였다.

[0881] 표 12

		2차 mAb 주사				
		5E7	엔포투맵	N41	14A5	MABT64
1차 mAb 주사	5E7			X	X	X
	엔포투맵	X				
	N41					
	14A5					
	MABT64					

[0882]

[0883] 실시예 15: 벡틴-4 점 돌연변이체를 사용한 항체의 에피토프 맵핑

[0884] 세포 표면 발현된 인간 넥틴-4 점 돌연변이체

[0885] 비-인간 넥틴-4 단백질 중에서 종-간 차이와 함께, 항체의 중 결합 프로파일 (인간, 사이노몰거스 및 래트 넥틴-4에 결합하지만 마우스 넥틴-4에 결합하지 않음)과 함께, 전체-길이 및 Ig-유사 V 도메인-결실된 단백질에 대한 항-넥틴-4 항체의 결합 프로파일은 Ig-유사 V 도메인 및 Ig-유사 C2 1형 도메인 ("C1"이라고도 함)의 접합부에서 잔기의 확인을 허용하였다. 넥틴-4 도메인의 공개된 구조와 조합하여, 표면 노출된 아미노산 잔기에 넥틴-4 돌연변이를 디자인하였다. 넥틴-4 도메인 구조는 단백질 데이터 은행 참조: 4FRW (도메인 V 및 C1)를 기반으로 모델링하였다. 사용된 인간 넥틴-4는 NCBI 참조 서열: NP\_112178.2였고, 사용된 마우스 넥틴-4는 NCBI 참조 서열: AAL79833.1이었고, 사용된 사이노몰거스 넥틴-4는 NCBI 참조 서열: XP\_005541277.1이었고, 사용된 래트 넥틴-4는 NCBI 참조 서열: NP\_001102546.1이었다. 그 다음으로, 넥틴-4 돌연변이체를 발현하는 세포는 넥틴-4 상의 동일한 부위에 결합하는 항체를 확인하기 위해서 상이한 넥틴-4 돌연변이체에 대한 결합의 상실에 대해 항-넥틴-4 항체를 시험하는데 사용된다. 특히, 잔기 K197T 및/또는 S199A에서 C1-V 접합 치환을 갖는 돌연변이체, 또는 도메인 C1 및 V의 접합부에 추가적 및/또는 인접한 치환을 갖는 돌연변이체 7, 7bis 및 9는 면역접합체로서 유리한 적용을 갖는 항체를 확인할 수 있다. 돌연변이체 7은 치환 S195A/K197T/S199A를 가졌다. 돌연변이체 7bis는 치환 A72P/G73N/K197T/S199A를 가졌다. 돌연변이체 9는 핵심 잔기 Q234 치환을 포함하였고, 치환 L150S/S152A/Q234R/I236S를 가졌다. 도 7A 및 7B는 인간 넥틴-4 단백질의 분자적 모델을 도시하는 것으로서, 돌연변이체 7 (7A) 및 돌연변이체 7bis (7B)에서 치환된 잔기의 위치를 표시하고; 이들 돌연변이체는 C1 도메인에 있고, 넥틴-4 단백질의 반대면 상에 있는 V 도메인 및 도메인 C1의 접합부에 2개 부위가 확인된다. 도 8A 및 8B는 인간 넥틴-4 단백질의 분자적 모델의 상이한 도면을 도시하고, 돌연변이체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9에서 치환된 잔기의 위치가 표시된다.

[0886] 넥틴-4 돌연변이체는 PCR을 통해서 생성되었다. 증폭된 서열은 아가로스 겔 상에서 러닝되었고 Macherey Nagel PCR Clean-Up 겔 추출 키트를 사용해 정제되었다. 이어서, 각 돌연변이체에 대해 생성된 정제된 PCR 생산물은 ClonTech InFusion 시스템을 사용해, 발현 벡터에 결합시켰다. 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 미니프렘으로 제조였고 시퀀싱되었다. 시퀀싱 후에, 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 Promega PureYield™ 플라스미드 미디프렘 시스템을 사용해 미디프렘으로 제조되었다. HEK293T 세포는 DMEM 배지 (Invitrogen)에서 성장되었고, Invitrogen의 Lipofectamine 2000을 사용하여 벡터로 형질감염시켰으며, 이식유전자 발현에 대해 시험하기 전에 48시간 동안 37°C에 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 돌연변이체는 하기 표에 표시된 바와 같이, Hek-293T 세포에 형질감염되었다. 표적화된 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 1로 표시되는 리더 펩티드를 갖는 넥틴-4 단백질에 대한 위치를 참조하여, 야생형 넥틴-4에 존재하는 잔기 / 잔기의 위치 / 돌연변이체 넥틴-4에 존재하는 잔기를 열거하는 하기 표 13에 표시된다.

[0887] 표 13

돌연변이체	SEQ ID NO: 1의 넥틴-4에 대한 아미노산 치환
1	S58P/G59D/Q61A/N106D/P107A
2	V90S/P92A/A93S/E95A/G96D
3	A76S/Q77R/E78A/S91N
4	A72P/G73N/G75S
5	A158P/E160G/S243A/F244S
6	H238A/I239T/H241Q
7	S195A/K197T/S199A
7bis	A72P/G73N/K197T/S199A
8	T190A/T191Q/S193A
9	L150S/S152A/Q234R/I236S

[0888] 항체 및 넥틴-4 돌연변이체 간 결합의 결과는 하기 표 14에 표시된다. (+)는 항체-넥틴-4 결합이 발생된 것을 의미한다. (-)는 항체-넥틴-4 결합이 발생되지 않은 것을 의미한다. 돌연변이체 5와 관련된 결과는 상기 단백질의 발현 부재로 인해서, 관련없다.

[0890] 표 14

	EXPI 배지 (대조군)	돌연변이체 1	돌연변이체 2	돌연변이체 3	돌연변이체 4	돌연변이체 5	돌연변이체 6	돌연변이체 7	돌연변이체 7bis	돌연변이체 8	돌연변이체 9
CHG1-M-1N4-5E7	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
엔포투맵	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
N41	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14A5.2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

[0891]

[0892] 그러므로, 항체 5E7은 돌연변이체 7 및 7bis에서 돌연변이된 C1 도메인 잔기를 포괄하는 넥틴-4 상의 결합 부위를 갖는다 (S195A/K197T/S199A 및 A72P/G73N/K197T/S199A). 따라서, 항체 5E7은 엔포투맵, N41 및 14A5와 상이한 넥틴-4 상의 에피토프에 결합한다 (넥틴-4의 V 도메인 상의 에피토프에 결합함).

[0893] **실시예 16: 엑사테칸 ADC의 생체내 효능**

[0894] 인간 유방암 세포주 SUM190PT는 Ham's F12, FBS 1 g/L, HEPES 10 mM, 에탄올아민 5 mM, 인슐린 5 µg/mL, 히드로코르티손 1 µg/mL, 아포-트랜스페린 5 µg/mL, 트리오오도 티로닌 (T3) 6.7 ng/mL, 소듐 셀레나이트 8.7 ng/mL을 함유하는 다음의 세포 배양 배지에서 배양되었다.

[0895] 면역결핍 CB17-SCID 마우스는 7주령 내지 8주령에서 사용되었다. 각각 인간 Fc 영역을 갖는 항-넥틴-4 항체 엔포투맵, 5E7 및 6A7을 생산하였고, 세포내 절단가능한 링커 ggfg-Dxd 또는 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸를 통해서 페이로드 Dxd (테록스테칸) 또는 엑사테칸에 접합시켰다. 항체 6A7은 5E7과 대부분의 CDR을 공유하고, 비슷한 넥틴-4 결합 친화성을 갖고, 넥틴-4 상의 동일한 부위에 결합한다 (6A7 아미노산 서열 경우에, 2021년 11월 24일 출원된 PCT/EP2021/082872 참조). ggfg-Dxd 링커는 절단 시에 Dxd (테록스테칸)를 방출하게 되고, PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸 링커는 절단 시에 엑사테칸을 방출하게 된다.

[0896] SUM190 세포는 PBS에 1/2로 희석된 성장 인자를 함유하는 100 µl의 매트릭셀 중 50만 용량으로 CB17-SCID 면역결핍 마우스에 피하로 생착시켰다. 21일에, 실험에 따라서 종양이 146.9 ± 63.2 mm<sup>3</sup> 또는 213.2 ± 77.5 mm<sup>3</sup>의 평균 부피에 도달했을 때, 마우스는 실험에 따라서 8마리 또는 9마리의 그룹으로 임의 추출하였고, 3 또는 10 mg/kg 체중 ADC 또는 대조군으로서 PBS의 단일 주사로 정맥내 처치되었다. 종양 성장은 주 당 2회 추적하였다. 카플란 마이어 생존 곡선은 하기 기준에 따라서 GraphPad Prism V7 소프트웨어를 사용해 확립되었다: 종양 부피가 1500 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 마우스는 안락사시켰고, 희생 당일에 폐사로 간주되었다 (D). 종양이 고도로 과사되었을 때, 마우스는 안락사시켰고, 동일한 날에 폐사로 간주되었다 (D).

[0897] 3 mg/kg 용량에 대한 결과가 도 9A 및 9B에 표시되는데, K197T/S199A 돌연변이를 갖는 넥틴-4에 대한 결합이 상실된 것으로 확인된 항-IgVC1 ADC 5E7-ggfg-Dxd는 마우스에서 종양 성장을 제한하는데서 최고 효율을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 링커 절단 시에 엑사테칸을 방출하도록 디자인된 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸과 접합된 5E7은 10 mg/kg 용량에 대해 도 9C에 도시된 바와 같이, 링커 절단 시 Dxd를 방출하도록 디자인된 ggfg-Dxd와 접합된 5E7과 비교하여 마우스에서 종양 성장의 제어에서 더 높은 효율을 보인다.

[0898] **실시예 17: Pg-p-발현 암 모델에서 ADC의 시험관내 효능**

[0899] MDR1 P-당단백질 (Pgp)을 내생적으로 발현하는 MC-38 세포는 넥틴-4를 발현하도록 조작되었고, DMEM + 10% FBS에서 배양되었다. 세포는 ADC의 존재 하에서 Pgp의 억제제로서 작용하는 것으로 알려진 사이클로스포린 A (5 µM, DMSO 중 원액) 또는 비히클 (DSMO)로 처리되었다. 시험된 ADC는 다음과 같았다:

- [0900] (a) Padcev<sup>TM</sup>,
- [0901] (b) 절단 시 Dxd를 방출하는 ggfg-Dxd 링커를 통해서 테록스테칸 (Dxd)에 접합된 항체 5E7 (5E7-GGFG-DxD), 및
- [0902] (c) 절단 시 엑사테칸을 방출하는 PEG(8U)-Val-Ala-PAB-엑사테칸 링커를 통해서 엑사테칸에 접합된 항체 5E7

(5E7-엑사테칸).

[0903] ADC 및 동등한 이소타입 대조군 ADC는 150 내지 2.3 10<sup>-3</sup> nM 범위의 용량으로 사용되었다. 세포와 5일의 공동-인큐베이션 후에, 세포 생존능은 Cell Titer Glo™ (CTG) 기질을 첨가하여 측정되었다. 발광도 대 Ab 농도를 그래프화하였다.

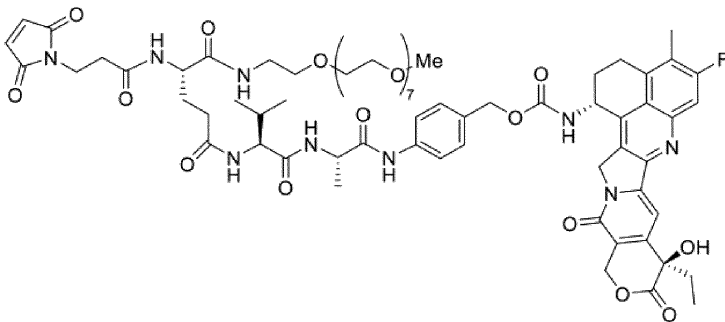
[0904] 도 10A는 Padcev™ (엔포투맘 베도틴), Dxd에 접합된 항체 5E7 또는 엑사테칸에 접합된 5E7이 처치된 세포의 발광도 (세포 생존능을 의미)를 도시한다. 페이로드로서 엑사테칸을 갖는 ADC (5E7-엑사테칸)는 약물 저항성의 이러한 상황에서 세포 생존능을 감소시키는데 매우 강력하였다. 도 10B는 Pgp 억제제 사이클로스포린의 존재 또는 부재 하에서, Padcev™ (엔포투맘 베도틴), Dxd에 접합된 항체 5E7 또는 엑사테칸에 접합된 5E7이, 150 nM ADC로 처치된 MC38 세포의 종양 성장 (곡선 하 면적)을 도시하고, 대조군 항체에 대해 정규화된다. 결과는 Padcev™ 및 Dxd에 접합된 항체 5E7의 항-종양 활성이 엑사테칸에 접합된 5E7이 고도로 효과적인 농도에 서 Pgp에 의해 음성적으로 영향받는다는 것을 시사한다.

[0905] **실시예 18: 분지형 PEG-디펩티드-엑사테칸 ADC의 생체내 효능**

[0906] 항-VC 도메인 항-넥틴-4 항체는 상이한 분지형 PEG 링커를 통해 엑사테칸에 접합되었고, 최종 ADC는 생체내 SUM190 종양 모델 (넥틴-4 저/SUM190 유방암 모델)에서 평가되었다.

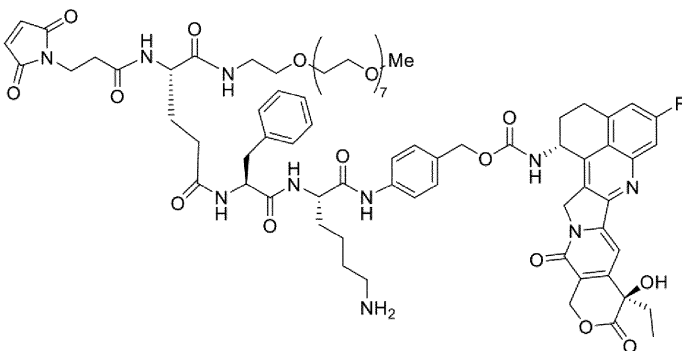
[0907] ADC는 항-VC 도메인 항-넥틴-4 (N4) 인간 IgG1 이소타입 항체 6A7이 상이한 링커를 통해 엑사테칸에 항체 당 8 개 독소 (DAR=8)로 (시스테인 잔기에) 접합시켜서 제조되었다. 시험된 링커-독소는 다음과 같다:

[0908] *VA-PAB-엑사테칸-PEG(8U)* :



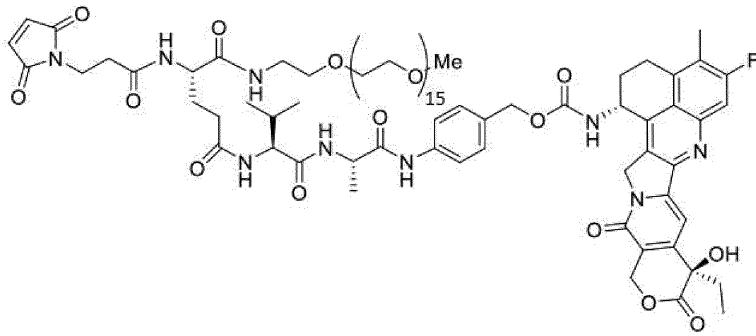
[0909]

[0910] *FK-PAB-엑사테칸-PEG(8U)* :



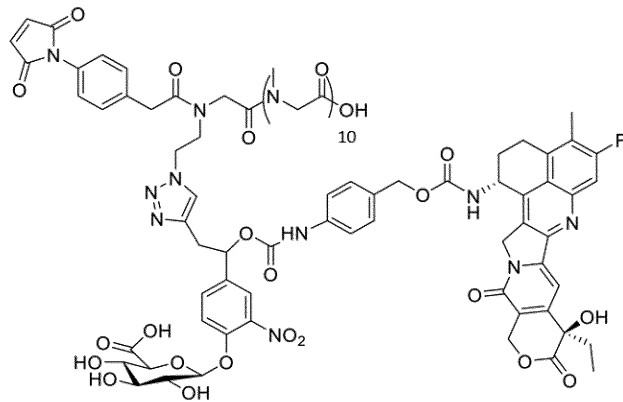
[0911]

[0912] VA-PAB-엑사테칸-PEG(16U) :



[0913]

[0914] PSAR10-엑사테칸 :



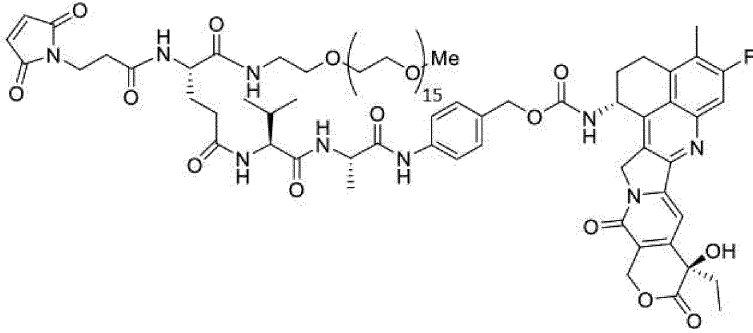
[0915]

[0916] SUM190 세포는 PBS에 1/2로 희석된 성장 인자가 존재하는 100  $\mu$ l의 매트릭셀 중 50만 세포의 용량으로 CB17-SCID 면역결핍 마우스에 피하로 생착되었다. 종양이 200과 250  $\text{mm}^3$  사이의 부피에 도달했을 때, 마우스는 3 mg/kg의 ADC의 단일 주사로 정맥내 치료를 위해 10마리 마우스의 그룹으로 임의 추출되었다. 종양 성장은 주당 2회 추적하였다. 카플란 마이어 생존 곡선은 하기 기준에 따라 GraphPad Prism V7 소프트웨어를 사용하여 확립하였다: 종양 부피가 1500  $\text{mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 안락사시켰고 희생 당일에 폐사로 간주하였다 (D). 종양이 괴사 징후를 보일 때, 마우스를 안락사시켰고 같은 날 폐사로 간주하였다 (D) (개체 종양 성장 그래프에 붉은색 별 표시).

[0917] 결과는 3 mg/kg 용량에서 모든 ADC는 종양 부피 증가의 방지에서 효율적이었음을 보여주었다. 유리 독소 (항-넥틴-4 항체에 접합되지 않음, "IC"로 표시됨)로서 투여된 상이한 링커-독소는 종양 성장의 방지에서 덜 효율적이었다. IC (유리 독소)에 대한 결과는 도 11에 도시된다. ADC에 대한 결과는 도 12에 도시된다.

[0918] 실시예 19: 분지형 PEG-디펩티드-엑사테칸 ADC의 생체내 약동학 및 효능

[0919] 항-VC 도메인 항-넥틴-4 항체 6A7은 VA-PAB-엑사테칸-PEG(16U) 링커 (구조는 하기에 도시됨)를 통해서 엑사테칸에 (DAR=8)로 접합되었고, 상이한 저용량으로 생체내 SUM190 종양 모델 (넥틴-4 저/SUM190 유방암 모델)에서 평가되었다. 이 실험은 최대 1 mg/kg 체중의 상이한 투약 용법을 시험하였고, 순환계 중 ADC 농도와 항-종양 효능의 상관성을 평가하였다.



[0920]

[0921] SUM190 세포는 PBS에 1/2로 희석된 성장 인자가 존재하는 100  $\mu$ l의 매트릭셀 중 50만 세포의 용량으로 CB17-SCID 면역결핍 마우스에 피하로 생착되었다. 종양이 부피가 150과 250 mm<sup>3</sup> 사이에 도달했을 때, 마우스는 0.11 mg/kg, 0.33 mg/kg, 0.66 mg/kg 또는 1 mg/kg 체중 (각각 2.2  $\mu$ g, 6.6  $\mu$ g, 13.2  $\mu$ g, 및 20  $\mu$ g 용량)으로 ADC의 단일 주사, 또는 대조군으로서 PBS로 정맥내 치료를 위해 20마리 그룹으로 임의 추출되었다. 종양 성장을 측정하였고 혈장 샘플을 같은 날에 수득하였으며, 혈장 샘플은 치료 후 5분, 5시 (시간), 24시에 수집되었고, 그 다음에 혈장 샘플 및 종양 성장 측정은 72시, 7일차에 이어서, 이후에 주간 기반으로 수행하였다.

[0922] 결과는 도 13에 도시된다. 도 13의 상단 좌측 패널은 PBS가 종양 부피의 증가를 방지하지 않았다는 것을 보여준다. 도 13의 상단 우측 패널은 1 mg/kg 용량의 ADC에 대한 결과로서, 강한 항-종양 효능을 보여주었음을 도시한다. 도 13의 하단 패널은 시간 경과에 따른 혈장 중 ADC의 농도를 도시하는 것으로서, ADC는 ADC가 항-종양 활성을 보인 시간 동안 검출가능한 채로 남아있었음을 보여준다.

[0923] **실시예 20: 분지형 PEG-디펩티드-엑사테칸 ADC의 생체내 안전성**

[0924] DAR-8로 VA-PAB-엑사테칸-PEG(16U) 링커에 접합된 항-VC 도메인 항-넥틴-4 항체의 용량 범위 연구가 3 mg/kg 체중 내지 30 mg/kg 체중 범위의 용량에서 수행되었다.

[0925] 제1 실험에서, ADC는 1일 및 22일에 3, 10, 또는 30 mg/kg 체중으로 스프라그 다우리 래트에 정맥내 볼루스로 주사되었다. 혈장 샘플은 연구 기간 동안 수집되었고 (용량-수준 당 시점 당 n=3 숫컷), 전체 항-넥틴-4 항체의 농도 (전체 항체; TA) (DAR  $\geq$  0) 및 ADC (DAR  $\geq$  1)는 ELISA로 측정되었고, 유리 엑사테칸 (Exa)은 LC-MS로 측정되었다.

[0926] 도 14A는 3 mg/kg 용량 (상단 패널) 및 10 mg/kg 용량 (하단 패널)에 대한 결과를 도시하고, 도 14B는 30 mg/kg 용량에 대한 결과를 도시한다. 각 분석물에 대해서, 정량 하한 (LLOQ) 미만의 농도 값은 LLOQ/2에서 표시되었다. Y 축은 분석물 혈장 농도 (ng/mL)에 해당되고, X 축은 시간 (일수)에 해당된다. 기호 및 막대는 각 그룹의 평균 및 표준 편차를 표시한다.

[0927] 제2 실험에서, ADC는 1일 및 22일에 3, 10, 또는 30 mg/kg 체중으로 모리셔스 사이노몰거스 원숭이에서 정맥내 볼루스로 주사되었다. 혈장은 연구 과정에 따라 수집되었고 (용량 수준 당 n=1 숫컷 및 1 암컷), 전체 항-넥틴-4 항체의 농도 (전체 항체; TA) (DAR  $\geq$  0) 및 ADC (DAR  $\geq$  1)는 ELISA로 측정되었고, 유리 엑사테칸 (Exa)은 LC-MS로 측정되었다.

[0928] 도 15A는 3 mg/kg 용량 (상단 패널) 및 10 mg/kg 용량 (하단 패널)에 대한 결과를 도시하고, 도 15B는 30 mg/kg 용량에 대한 결과를 도시한다. 각 분석물에 대해서, 정량 하한 (LLOQ) 미만의 농도 값은 LLOQ/2에서 표시되었다. Y 축은 분석물 혈장 농도 (ng/mL)에 해당되고, X 축은 시간 (일수)에 해당된다. 기호 및 막대는 각 그룹의 평균 및 표준 편차를 표시한다.

[0929] 래트 및 비-인간 영장류 둘 모두에서의 결과는 ADC가 시험된 최고 용량 (30 mg/kg 체중)에서 안전하고 충분히 용인되었다는 것을 입증하였다.

[0930] 본 명세서에서 인용되는, 공개물, 특허 출원, 및 특허를 포함하여, 모든 참조는 본 명세서의 다른 곳에서 작성된 특정 문헌의 임의의 별도 제공되는 편입과 무관하게, 각각의 참조가 개별적으로 특별히 참조로 편입된다고 표시하고 본 명세서에 그 전체로 기재되는 것과 동일한 정도까지 (법이 허용하는 최대 정도까지) 그들 전체로 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0931] 달리 명시하지 않으면, 본 명세서에서 제공되는 모든 정확한 값은 상응하는 근사값을 대표한다 (예를 들어, 특

정 인자 또는 측정과 관련하여 제공되는 모든 정확한 예시적인 값은 적절한 경우에 "약"으로 수식되는 상응하는 근사 측정을 제공하는 것으로 간주될 수 있음). "약"이 수치와 함께 사용되는 경우에, 이것은 명시된 수치의 +/-10% 에 상응하는 값을 포함하는 것으로 명시할 수 있다.

[0932] 구성요소 또는 구성요소들과 관련하여 "포함하는", "갖는", "포괄하는" 또는 "함유하는" 등과 같은 용어를 사용하는 본 발명의 임의의 양태 또는 구현예의 본 명세서에서의 설명은 달리 명시하지 않거나 또는 명확하게 문맥에 의해 모순되지 않으면 특정 구성요소 또는 구성요소들로 "이루어지는", "본질적으로 이루어지는" 또는 "실질적으로 포함하는" 본 발명의 유사한 양태 또는 구현예에 대한 뒷받침을 제공하고자 한다 (예를 들어, 특정 구성요소를 포함하는 것으로 본 명세서에 기술되는 조성물은 달리 명시하지 않거나 또는 명확하게 문맥에 의해 모순되지 않으면, 그 구성요소로 이루어지는 조성물을 기술하는 것으로 이해해야 함).

[0933] 본 명세서에서 제공하는 임의의 모든 예 또는 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더욱 잘 설명하려는 의도이고 달리 청구하지 않으면 본 발명의 범주를 제한하려는 것이 아니다. 명세서에서의 어떠한 표현도 임의의 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실시예에 필수적인 것으로 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0934] 표 15

SEQ ID NO:	설명	서열
1	신호 펩티드를 갖는 h 넥틴-4	MPLSLGAEMW GPEAWLLLLL LLASFTGRCP AGELETSDV VTVVLGQDAKL PCFYRGDSGE QVGQVAWARV DAGEGAQELA LLHVKYGLHV SPAYEGRVEQ PPPRNPLDG SVLLRNAVQA DEGEYECRVS TFPAGSFQAR LRLRVLPPL PSLNPGPALE EGQGLTLAAS CTAEGSPAPS VTWDTEVKGT TSSRSFKHSR SAAVTSEFHL VPSRSMNGQP LTCVVSHPGL LQDQRITHIL HVSFLAEASV RGLDQNLWH IGREGAMKLC LSEGQPPPSY NWTRLDGPLP SGVRVDGDTL GFPLTTEHSGI YVCHVSNEFSSRDSQVTV DVLDPQEDSG KQVDLVASV VVVGIVIAALL FCLLVVVVVL MSRYHRRKAQ QMTQKYEEL TLTRENSIRR LSHHTDPRS QPEESVGLRA EGHDPDSLKDN SSCSVMSEEP EGRSYSTLTT VREIETQTEL LSPGSGRAEE EEDQDEGIKQ AMNHVQENG TLRKPTGNG IYINGRHLV
2	면역화에 사용된 h 넥틴-4	GRCPAGELETSDVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELAL LHVKYGLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGS FQARLRLRVLPPLPSLNPGLAEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTT SRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLA EASVRGLEDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGF PPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVASV
3	v 도메인	GELETSDVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHVKY GLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARL RLR
4	Ig-유사 C2 1형	PPLPSLNPGLAEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSR SAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRIT
5	Ig-유사 C2 2형	ASVRGLEDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGF PPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVASV
6	N41 VH	QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLVGIWSSG STDYNAAFISRLSISKDTSKQVFFKMNLSLQADDTAIYYCARELIHAMDNWGQGT SVTVSS
7	N41 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVITTCRASENIYSNLAWYQQKQGNPQLLVFAATNLA DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINLSQSEDFGTYYCQHFVGTPTFGGGTKLEIK
8	인간 넥틴 4-His-BirA	GELETSDVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHVKY GLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARL RRLRVLPPLPSLNPGLAEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSF KHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASV RGLDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLT TEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVASHHHHHHHHLLD AQKMVWNR
9	야생형 N4 구성체	GELETSDVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHVKY GLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARL RRLRVLPPLPSLNPGLAEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSF KHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASV RGLDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLT TEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVASVVVVGIVIAALLF CLLVVVVVLMRSYHRRKAQMTQKYEELTLTRENSIRRLSHHTDPRSQPEESV GLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRAEEEE EEDQDEGIKQAMNHVQENGLTRKPTGNGIYINGRHLV
10	C1C2 구성체	PPLPSLNPGLAEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSR SAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASV RGLDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLT TEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVASVV VVVGIVIAALLFCLLVVVVLMRSYHRRKAQMTQKYEELTLTRENSIRRLSHHT DPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPGRSYSTLTTVREIETQTELL SPGSGRAEEEEEDQDEGIKQAMNHVQENGLTRKPT GNGIYINGRHLV
11	C2 구성체	ASVRGLEDQNLWHIGREGAMKLCLESEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGF

[0935]

		PPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVVDVLDPEQEDSGKQVDLVSASVWVGVIA ALLFCLLVVVVLMRSYHRRKAQOMTQKYEELTLTRENSIRRLSHHTDPRSQP EESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGR AEEEDDQDEGIKQAMNHVQENGLRAKPTGNGIYINGRHLV
12	마우스 넥틴-4-v5	ELETSDVVTVVLGQDAKLPFCYRGPDEQVGVQVAVARVDPNEGIRELALLHSHKYG LHVNPAYEDRVEQPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMR LRVLVPLPLSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTQSSRSFT HPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDRRITHTLQVAFLEAESVRG LEDQNLWQVREGATLKLSEGGQPPKYNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGFPPPLT EHSGVYVCHVSNESSRDSQVTVVLDPEDPGKQVDLVSASVIIVGVIAALLFCL LVVVVLMRSYHRRKAQOMTQKYEELTLTRENSIRRLSHHSDPRSQPEESVGL RAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEDD QDEGIKQAMNHVQENGLRAKPTGNGIYINGRHLV
13	래트 넥틴-4 v5	MPLSLGAEMWGPEAWLLLLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPFCYRG DPEQVGVQVAVARVDPNEGTRERLALLHSHKYGLHVSPAYEDRVEQPPPRDPLDGS ILLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPEEGQGLT LAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTQSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPL TCVVSHPGLLQDRRITHTLQVAFLEAESVRGLEDQNLWHVREGATLKLSEGGQ PPKYNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGFPPPLTEHSGVYVCHVSNESSRASQVTV VLDPEDPGKQVDLVSASVWVGVIAALLFCLLVVVVLMRSYHRRKAQOMTQKYE EELTLTRENSIRRLSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPPE RSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEDDQDEGIKQAMNHVQENGLRAKPT GNGIYINGRHLV
14	사이노 넥틴-4 v5	GELETSDVVTVVLGQDAKLPFCYRGRDSEQVGVQVAVARADAGEGAQELALLHSHKY GLHVS PAYEGRVEQPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARL RLRVLPPLPSLNPGPALLEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTSSRSF KHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDRRITHLHVSLFAEASVR GLEDQNLWHVREGAMKLKLEGGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVVDGDTLGFPPPL TEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVVDVLDPEQEDSGKQVDLVSASVWVGVIAALLF CLLVVVVLMRSYHRRKAQOMTQKYEELTLTRENSIRRLSHHTDPRSQPEESV GLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEE EDQDEGIKQAMNHVQENGLRAKPTGNGIYINGRHLV
15	넥틴-1	MGLAGAAGRWGLALGLTAFPLPGVHSQVQVNDMSYGFIGTDVVLHCSFANPLP SVKITQVWQKSTNGSKQNVAIYNPSMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTDGTIRLSR LELEDEGVYICEFATFPPTGNRESQLNLTVMAKPTNWIEGTQAVLRAKKGDDKVL VATCTSANGKPPSVVSWETRLKGEAEYQEIERNPNGTVTVISRYRLVPSREAHQSS LACIVNYHMDRFKESLTLNVQYEPVTEIEGFDGNWYLQRMVVKLTKCADANPPAT EYHWTTLNGLSLPKGVEAQNRTLFFKGPINYSLAGTYICEATNPIGTRSGQVEVNI TEFPYTPSPPEHRRRAGPVPTAIGGVAGSILLVLI VVGGI VVALRRRRHTFKGD YSTKKHVYNGYKAGIPQHHPMAQNLQY PDDSDDEKKGAPLGGSSYEEEEEE EGGGGERKVGPHPKYDEDAKRPYFTVDEAEARQDGYGDRTLGYQYDPEQLDLA ENMVSQNDGSFISKKEWYV
16	넥틴-2	MARAAALLPSRSPTPLLWPLLLLLLLE TGAQDVRVQVLPPEVRGQLGGTVLPC LLPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQVAAAFHPKMGPSFPSKPGSERLSFVSAKQ STGQDTEAELQDATALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQ AEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSLWWEAKETQVSGTLAGTVTVT SRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEAPALIPVTLVSRYPPEVSI SGYDDNWYLG RTDATALSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQVLIHAVDSLNTTFVCT VTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAGAGATGGIIGGIIAIIATAVAATGILICRQQ RKEQTLQGAEEDEDELEGGPPSYKPTPKAKLEAQEMPSQLFTLGASEHSPKTPYF DAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGLHPGATSLGSPIPVPPGPAVEDVSLDLE DEEGEEEEYLKINPIYDALSYSSPSDSYQKGFVMSRAMYV
17	넥틴-3	MARTLRPSPLCPGGGKALSSASLLGAGLLQPPTPPPLLLLLLPLLLSRLCGA LAGPIIVEPHVTAVWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSSQTVAVHHPQYG FSVQGEYQGRVLFKNYSLNDATITLHNI GFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSTTVT VLVEPTVSLIKGPDSLIDGGNETVAAICIAATGKPVAHIDWEGDLGEMESTTTSF PNETATIISQYKLFPTRFARGRRITCVVKHPALEKDIRYSFILDIQYAPEVSVTG YDGNWFVGRKGVNLKCNADANPPPFSVWSRLDGQWPDGLLASDNTLHFVHPLTF NYSGVYICKVTNSLQQRSDQVIYISDPPTTTTLQPTIQWHPSTADIEDLATEPK KLPFPLSTLATIKDDTIATIASVVGALFIVLVSVLAGIFCYRRRRTRFRGDYFA

[0936]

		KNYIPPSDMQKESQIDVLLQDELDSPDSVKKENKPNVNNLIRKDYLEEPKQTQ NNVENLNRFRPMDYYEDLKMGMKFFVSDEHYDENEDDLVSHVDGSGVISRREWYV
18	PVR 넥틴-5	DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVVFHQIQ GPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDI WLRVLAQPONTAEVQKQVLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQV PGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPLLTVNLTVYYPPEVS ISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPV DKPINTTLCNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRNAIFLVLGILVFLI LLGIGIYFYWSKCSREVLWHCHLCPSSTEHASASANGHVSYSAVSRENSSSQDPQ TEGTR
19	5E7 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWKQRPQGLEWIGEIDPSD SYTNYNQKFKGKATLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGNYGDIYWGQG TTLTVSSASTKGP
20	5E7 VL	DVVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPWTFGGGKLE IKRTVAAP
21	5E7 CDR-H1 카뎀	SYWMH
22	5E7 CDR-H2 카뎀	EIDPDSYTNYNQKFKG
23	5E7 CDR-H3 카뎀	GYGNYGDIY
24	5E7 CDR-L1 카뎀	RSSKSLHNSGITYLY
25	5E7 CDR-L2 카뎀	QMSNLAS
26	5E7 CDR-L3 카뎀	AQNLLELPWT
27	5E7 CDR-H1 IMGT	GYIFTSYW
28	5E7 CDR-H2 IMGT	IDPDSYTN
29	5E7 CDR-H3 IMGT	VRGYGNYGDIY
30	5E7 CDR-L1 IMGT	KSLHNSGITYLY
31	5E7 CDR-L2 IMGT	QMS
32	5E7 CDR-H1 초티아	GYIFTSY
33	5E7 CDR-H2 초티아	PSDS
34	5E7 CDR-H3 초티아	YGNYGDIY
35	5E7 CDR-L1 초티아	SKSLHNSGITYLY
36	5E7 CDR-L3 초티아	NLELPW
37	5E7 H0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHWVRQAPGQLEWIMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDIYWGQG TLVTVSS
38	5E7 H0 DNA	CAG GTT CAG CTG GTT CAG TCA GGT GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGA GCT AGC GTG AAA GTG TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ACC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTA CGA CAG GCA CCA GGA CAA GGG CTG GAA TGG ATG GGC GAA ATC GAT CCC TCT GAC AGC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGT AGG GTC ACT ATG ACT CGC GAC ACA TCC ACC AGT ACC GTC TAC ATG GAG CTC TCC AGT TTG CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTG GTC ACT GTG AGC TCA
39	5E7 H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHWVRQAPGQLEWIMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMTLDTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDIYWGQG TLVTVSS
40	5E7 H1 DNA	CAG GTT CAG CTG GTC CAG AGT GGT GCA GAA GTG AAG AAA CCT GGC GCT TCA GTG AAG GTA TCC TGC AAA GCC TCT GGG TAC ACC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTT CGC CAA GCT CCA GGA CAG GGC TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATC GAT CCC TCT GAC TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGA AGG GTG ACG ATG

[0937]

		ACT CTC GAC ACT AGC ACC AGC ACA ACC TAC ATG GAG CTG AGT TCA CTT CGG TCT GAG GAT ACT GCC GTC TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGG AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGT CAA GGC ACA CTG GTG ACA GTG TCC AGC
41	5E7 H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMT <b>LDK</b> STST <b>TY</b> MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGQGWGG TLTVVSS
42	5E7 H2 DNA	CAG GTG CAG CTG GTT CAG TCA GGA GCA GAG GTC AAG AAA CCT GGT GCT TCT GTG AAG GTG TCC TGC AAA GCC AGT GGC TAT ACC TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTT CGG CAA GCT CCA GGT CAG GGC TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATC GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGG AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCT ACA TCC ACC ACT TAC ATG GAG CTG AGT TCT CTT CGC TCC GAA GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGG ACT CTC GTG ACA GTC AGC AGC
43	5E7 H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <b>I</b> FTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMT <b>LDK</b> STST <b>TY</b> MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGQGWGG TLTVVSS
44	5E7 H3 DNA	CAG GTT CAG CTG GTC CAG TCA GGT GCA GAA GTG AAG AAA CCT GGA GCT AGC GTG AAG GTG TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ATC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTA CGC CAA GCT CCA GGT CAG GGG TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCC TCT GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGA CGG GTT ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACT TCA ACG ACC TAC ATG GAG CTT TCC TCT CTG AGG AGT GAG GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGC CAA GGC ACA CTC GTC ACA GTG AGC AGT
45	5E7 H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <b>I</b> FTSYWMHWV <b>KQ</b> APGQGLEWMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMT <b>LDK</b> STST <b>TY</b> MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGQGWGG TLTVVSS
46	5E7 H4 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCT GGA GCC GAA GTG AAG AAA CCA GGT GCT AGC GTG AAA GTG AGT TGC AAG GCT TCC GGC TAC ATC TTT ACC AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTC AAA CAG GCA CCT GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACG AGT ACT ACC TAC ATG GAA CTG TCC TCT CTT CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGT CAA GGC ACT CTG GTC ACA GTG AGC TCA
47	5E7 H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <b>I</b> FTSYWMHWV <b>KQR</b> PGQGLEWMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMT <b>LDK</b> STST <b>TY</b> MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGQGWGG TLTVVSS
48	5E7 H5 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCA GGT GCA GAA GTC AAG AAA CCA GGA GCT AGC GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ATC TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG CGC CCT GGT CAA GGA CTG GAA TGG ATG GGC GAG ATT GAT CCC AGT GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGC AGG GTG ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACT TCA ACC ACG TAC ATG GAG CTC AGT TCC CTT CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTC TAC TAT TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTG GTC ACA GTG AGC TCA
49	5E7 H6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <b>I</b> FTSYWMHWV <b>KQR</b> PGQGLEW <b>I</b> GEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMT <b>LDK</b> STST <b>TY</b> MELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGQGWGG TLTVVSS
50	5E7 H6 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG AGT GGA GCA GAG GTG AAG AAA CCA GGA GCT TCA GTC AAG GTA TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ATC

[0938]

		TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAA CGC CCT GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CCC TCC GAT TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTG ACG ATG ACA CTG GAC AAG TCT ACA TCC ACT ACC TAC ATG GAA CTC AGC TCA CTT CGG AGT GAG GAC ACA GCC GTC TAT TAC TGT GCT AGG GGC TAT GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACT CTG GTC ACA GTG AGC TCA
51	5E7 H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGIEDPSD SYTNYNQKFKGRVMT <b>L</b> <b>D</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>T</b> YME <b>L</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>E</b> <b>D</b> TAVYYCARGYGNYGDYWGQG TLVTVSS
52	5E7 H7 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCA GGC GCT GAA GTC AAG AAA CCC GGA GCA TCC GTG AAG GTG TCC TGT AAG GCC TCT GGG TAC ATC TTT ACG AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGT CAA GGG CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATC GAT CCA AGC GAC TCA TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGT CGC GTT ACA CTG ACT CTG GAC AAG AGT ACC TCC ACC ACC TAC ATG GAA CTG AGT TCT TTG CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAT TAC TGC GCT AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTG GTC ACA GTG AGC TCA
53	5E7 H8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGIEDPSD SYTNYNQKFKGRVMT <b>L</b> <b>D</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>T</b> YME <b>L</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>E</b> <b>D</b> TAVYYCARGYGNYGDYWGQG TLVTVSS
54	5E7 H8 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTT CAG CTG GTA CAG TCA GGT GCC GAA GTG AAG AAA CCT GGT GCA TCC GTC AAA GTG AGC TGC AAA GCC AGT GGG TAC ATC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTT AAG CAG GCT CCA GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGC GAA ATC GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTG ACA ATG ACT CTG GAC AAG TCT ACC TCT ACC ACC TAT ATG GAG CTG TCT AGC CTT CGG AGT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCT AGG GGA TAC GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTC GTC ACT GTG TCC AGC GCG AGC ACC AAG GGC
55	5E7 H9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGIEDPSD SYTNYNQKFKGRVMT <b>L</b> <b>D</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>T</b> YME <b>L</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>E</b> <b>D</b> TAVYYCARGYGNYGDYWGQG TLVTVSS
56	5E7 H9 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTT CAG CTG GTT CAG TCT GGC GCT GAA GTC AAG AAA CCT GGA GCC AGT GTC AAG GTG TCA TGC AAA GCT TCC GGG TAC ATC TTT ACG AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG GCA CCA GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGT GAG ATC GAT CCC TCA GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGT AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACA AGC ACC GTG TAC ATG GAA CTC TCC TCT CTT CGG AGT GAG GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACT CTG GTC ACA GTG TCC TCT GCG AGC ACC AAG GGC
57	5E7 H10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWMHWVKQAPGQGLEWVGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVMT <b>L</b> <b>D</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>T</b> YME <b>L</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>E</b> <b>D</b> TAVYYCARGYGNYGDYWGQG TLVTVSS
58	5E7 H10 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTA CAG CTG GTT CAG TCA GGT GCT GAG GTG AAG AAG CCA GGT GCA TCC GTG AAG GTC AGC TGC AAA GCC TCT GGG TAC ATC TTT ACC AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG GCT CCT GGA CAA GGA CTG GAA TGG GTT GGG GAG ATT GAC CCC AGT GAC TCC TAT ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGG AGG GTC ACG ATG ACT CTC GAC AAG TCA ACC TCC ACA ACC TAC ATG GAA CTG TCC TCT TTG CGG AGT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGC GAT TAC TGG GGA CAA GGC ACT CTT GTC ACA GTG AGC TCT GCG AGC ACC AAG GGC
59	5E7 L0	DIVMTQSPFLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQ

[0939]

		MSNLAGVVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKVEIK
60	5E7 L0 DNA	GAC ATC GTG ATG ACA CAG AGT CCC TTG TCC TTG CCT GTG ACT CCT GGA GAA CCC GCT AGC ATT AGC TGC AGA AGC AGC AAG TCC CTT CTC CAC TCT AAC GGC ATA ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCA GGG CAG AGT CCC CAA CTC CTG ATC TAC CAG ATG TCC AAC CTG GCA TCT GGC GTT CCT GAT CGG TTC TCA GGG TCA GGT TCT GGC ACT GAC TTC ACA CTG AAG ATC TCC AGG GTA GAG GCC GAA GAT GTC GGA GTG TAC TAT TGT GCC CAG AAT CTG GAG CTT CCA TGG ACC TTT GGA GGT GGC ACC AAA GTC GAG ATT AAG
61	5E7 L1	DVMTQSP <del>LS</del> LPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGIT <del>Y</del> LYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVVPDRFSSSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKVEIK
62	5E7 L1 DNA	GAT GTC GTG ATG ACC CAG AGT CCA CTG TCC CTT CCT GTC ACT CCT GGT GAA CCA GCC AGT ATT TCC TGT CGG TCA AGC AAA TCC CTC CTT CAC TCC AAC GGC ATT ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCC GGC CAA TCT CCC CAG TTG CTC ATC TAC CAG ATG AGC AAT CTG GCC TCT GGA GTA CCC GAC AGG TTC AGC TCT AGT GGA TCA GGG ACA GAC TTC ACA CTG AAG ATC AGC AGA GTG GAA GCT GAG GAT GTT GGC GTG TAC TAT TGC GCA CAG AAC CTG GAG TTG CCT TGG ACC TTT GGA GGT GGC ACT AAG GTG GAG ATA AAG
63	5E7 L2	DVMTQSP <del>LS</del> LPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGIT <del>Y</del> LYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVVPDRFSSSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKVEIK
64	5E7 L2 DNA	GAC GTC GTG ATG ACT CAG TCC CCT CTC TCT AAT CCC GTT ACT CCT GGA GAA CCA GCC AGC ATT TCC TGC AGA AGC AGC AAA TCC CTG CTG CAC AGT AAC GGC ATA ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCA GGG CAA AGT CCC CAG TTG CTG ATC TAC CAG ATG TCC AAC TTG GCT TCA GGT GTG CCT GAT CGG TTC AGT AGC TCT GGG TCT GGC ACA GAC TTC ACC CTG AAG ATC TCA AGG GTC GAA GCA GAG GAT GTA GGC GTG TAT TAC TGT GCC CAG AAT CTC GAG CTT CCC TGG ACC TTT GGA GGT GGA ACT AAG GTG GAG ATA AAG
65	5E7 L3	DVMTQSP <del>LS</del> LPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGIT <del>Y</del> LYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVVPDRFSSSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKVEIK
66	5E7 L3 DNA	GAT GTG GTC ATG ACT CAG TCT GCC TTG AGC AAT CCC GTA ACT CCA GGT GAA CCA GCC AGC ATA AGT TGT CGG TCA AGC AAG AGT CTC CTT CAC TCC AAT GGC ATT ACC TAT CTC TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCT GGT CAG TCT CCC CAA CTG CTG ATC TAC CAG ATG AGC AAC CTG GCA AGT GGA GTC CCT GAC AGG TTC TCC TCC TCA GGA TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTG AAG ATC TCC AGA GTG GAA GCT GAG GAT GTT GGC GTG TAC TAT TGC GCT CAG AAC CTG GAG TTG CCC TGG ACC TTT GGC GGA GGG ACT AAG GTG GAG ATA AAG
67	5E7 HP FAB	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWKQRPQGGLWEIGEDPSD SYTNYNQKFKGKATLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQG TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDK
68	5E7 LP FAB	DVMTQA <del>AF</del> SNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGIT <del>Y</del> LYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVVPDRFSSSGSGSDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSDKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	5E7 H0 FAB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME <del>LS</del> SLRSED <del>T</del> AVYYCARGY <del>G</del> NYGDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDK
70	5E7 L0 FAB	DIVMTQSP <del>LS</del> LPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGIT <del>Y</del> LYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGYYCAQNLELPWTFGGGTKVEIK

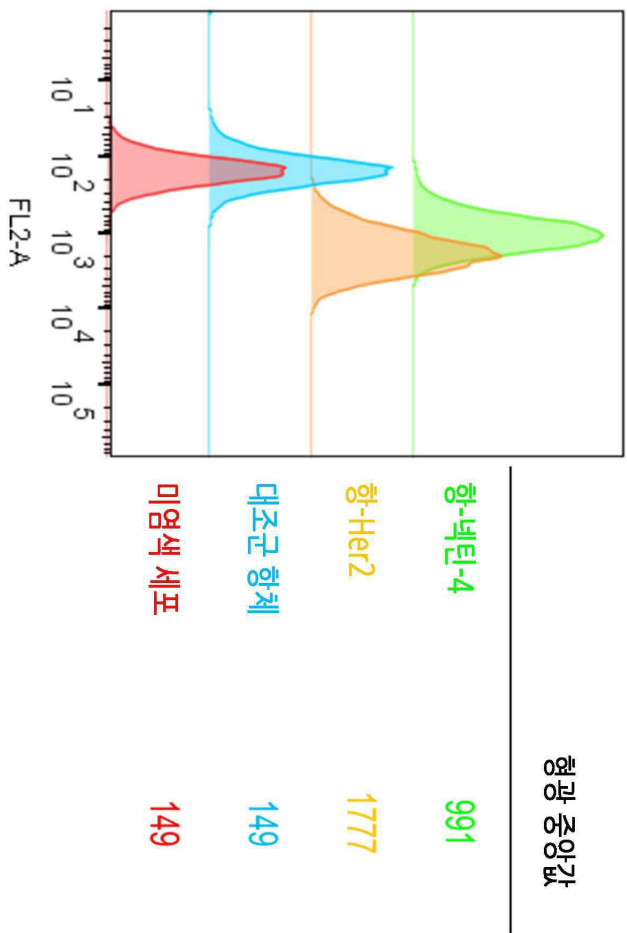
[0940]

		IKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
71	링커 DGGFG	DGGFG
72	링커 DDGGFG	DDGGFG
73	링커 KDGGFG	KDGGFG
74	링커 GGFGGGF	GGFGGGF
75	링커 GGFGG	GGFGG
76	링커 GGFGGG	GGFGGG
77	전체 사슬 5E7 H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWMEIDPSD SYTNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDYAVYYCARGYGNVYDYGWQG TLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDSGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKS LSLSPGK
78	전체 사슬 5E7 L3	DVVMTQSALSNPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLAGVDPDRFSSSSGGTDFTLKISRVEADVGVYYCAQNLLELPWTFGGGKVE IKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

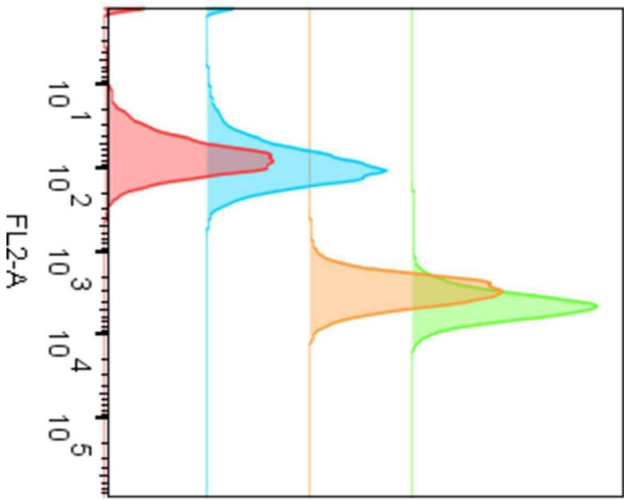
[0941]

도면

도면1



도면2



평균 중앙값

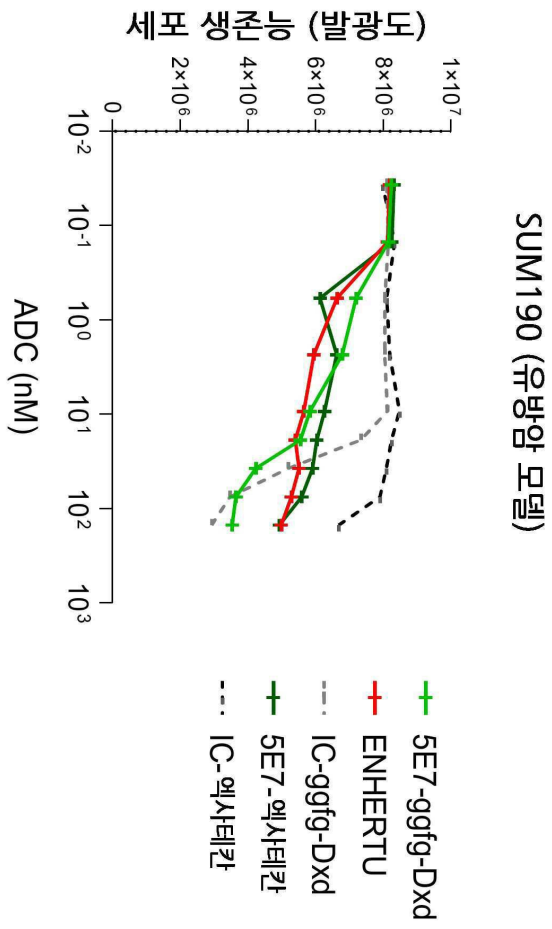
항-넥틴-4 4326

항-Her2 2880

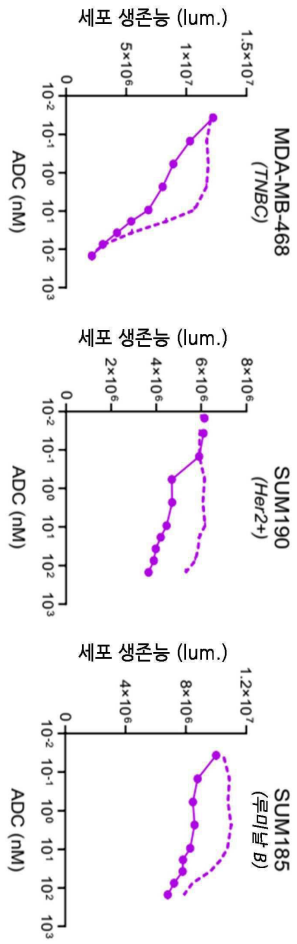
대조군 항체 94.5

미염색 세포 71.5

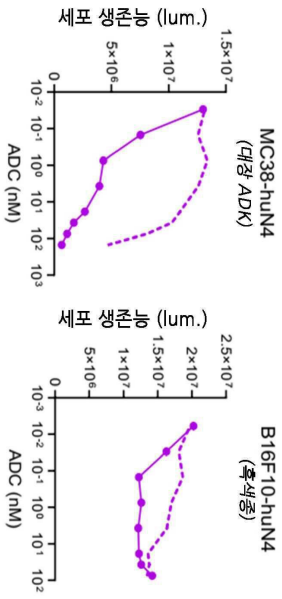
도면3a



### 인간 유방암 모델 (인간 넥틴-4의 내생성 발현)



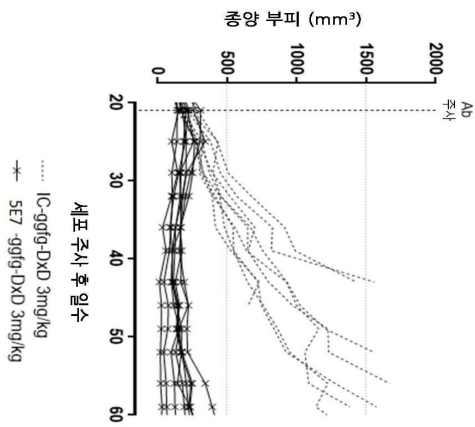
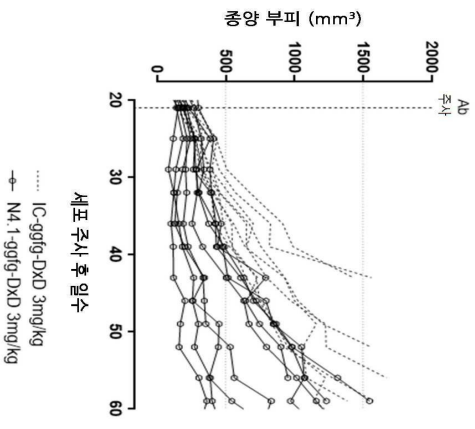
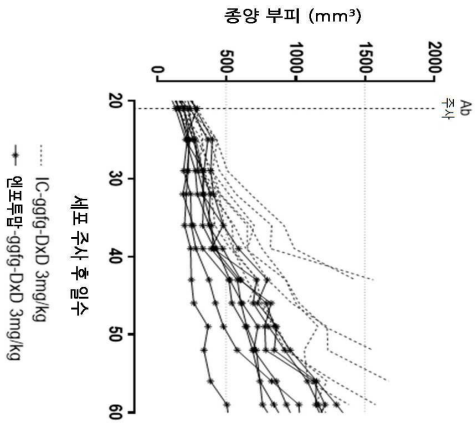
### 마우스 암 모델 (인간 넥틴-4-형질감염)



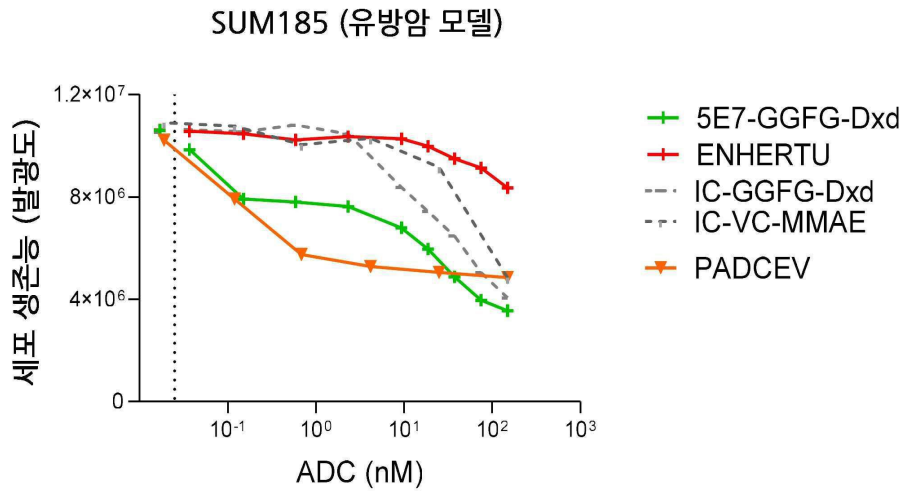
--- IC-엑시테칸  
—●— 5E7-엑시테칸

도면3b

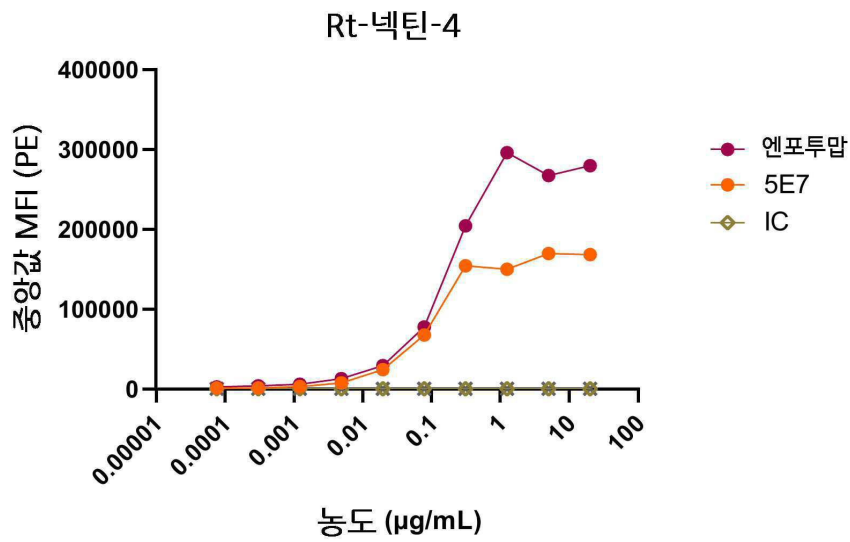
도면4



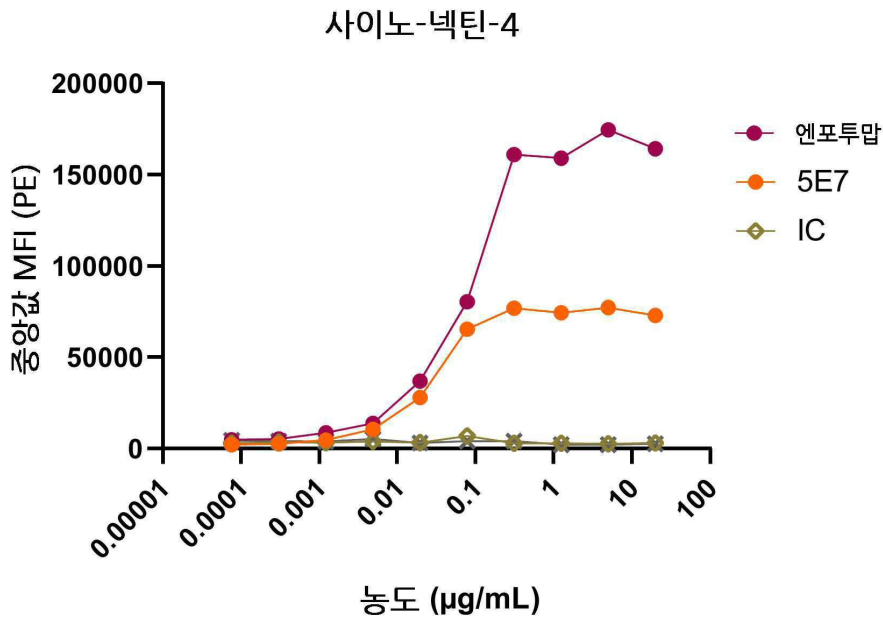
도면5



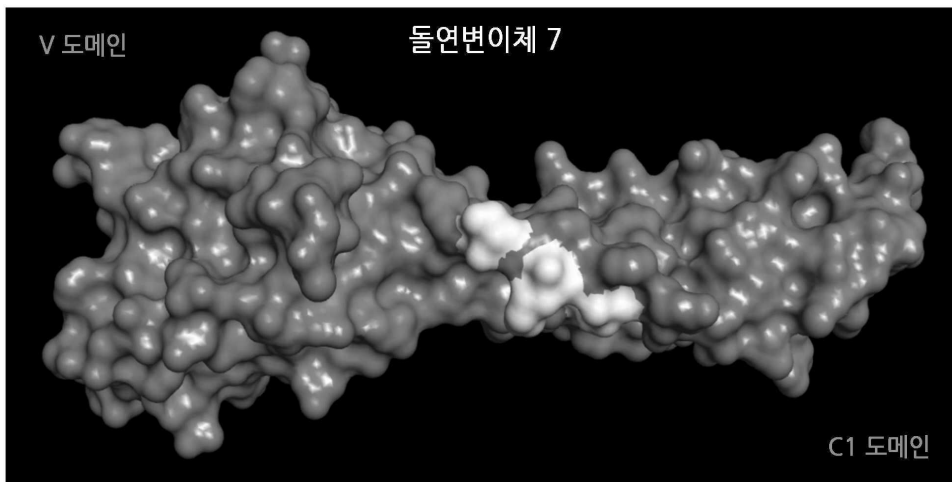
도면6a



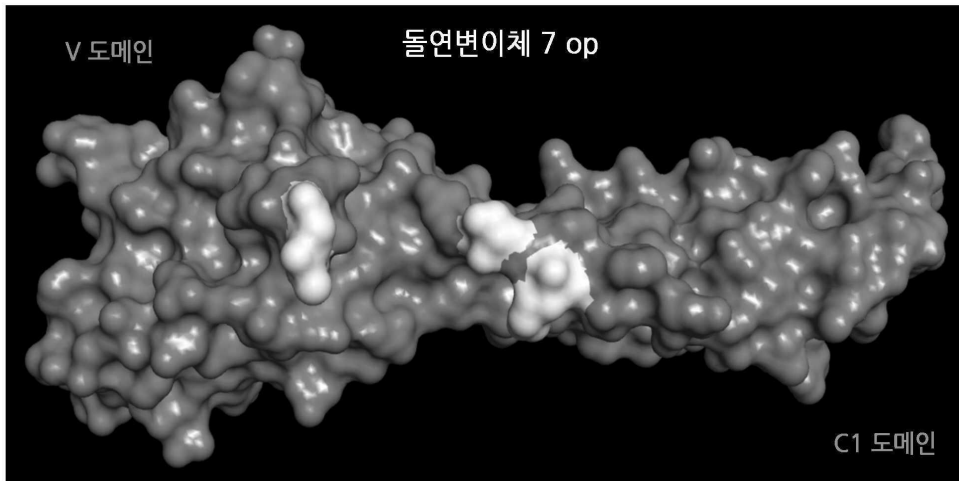
도면6b



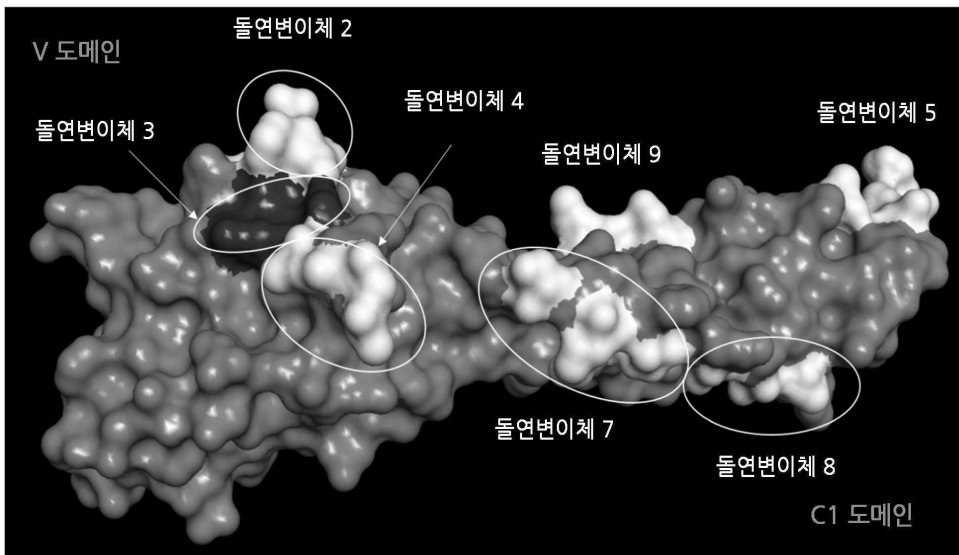
도면7a



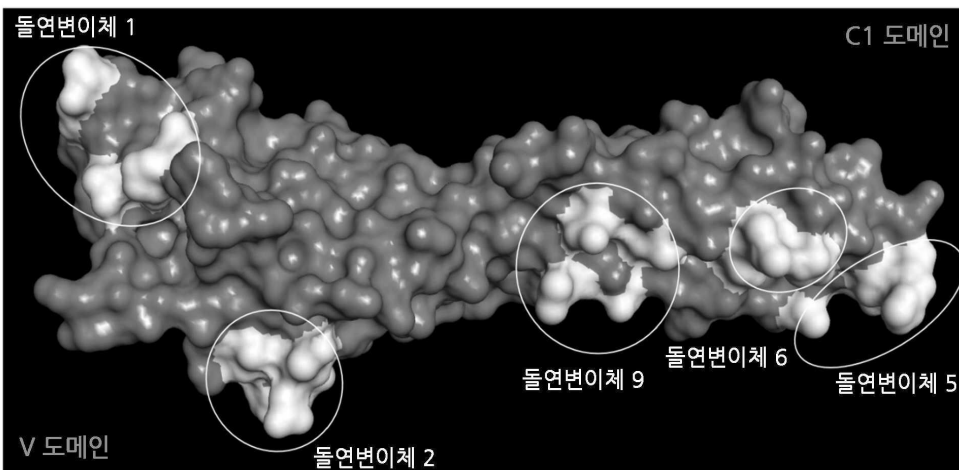
도면7b



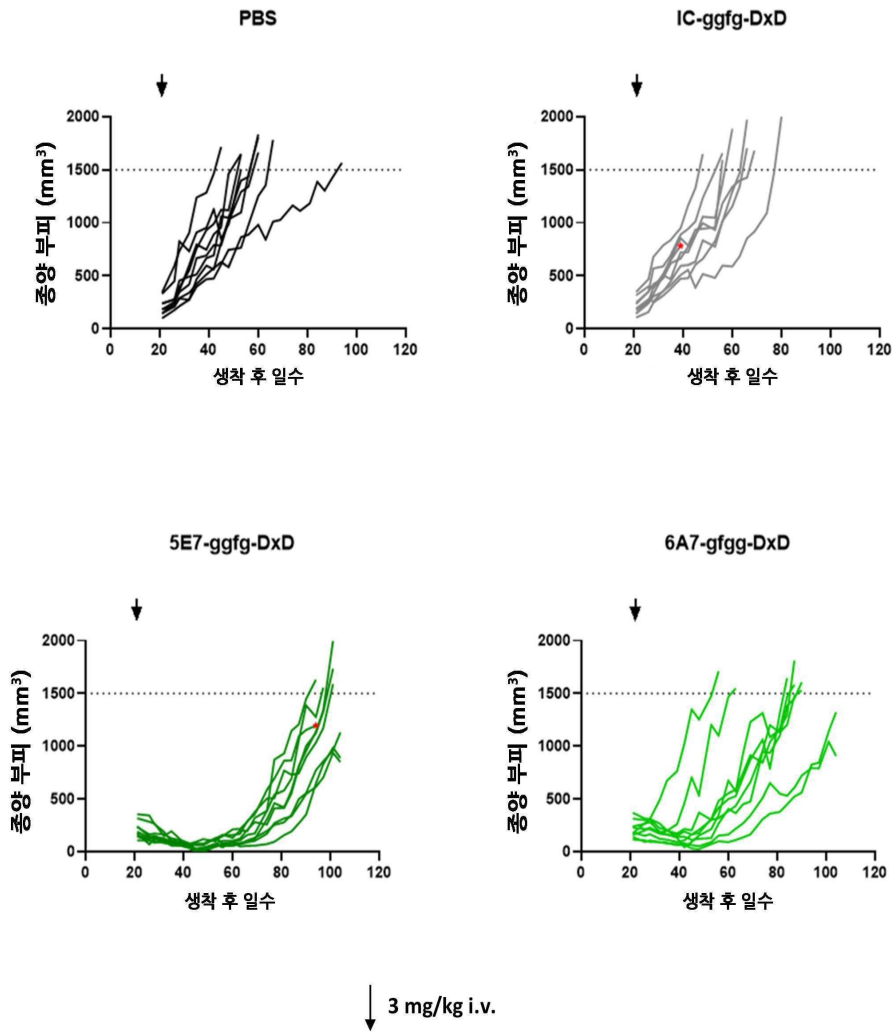
도면8a



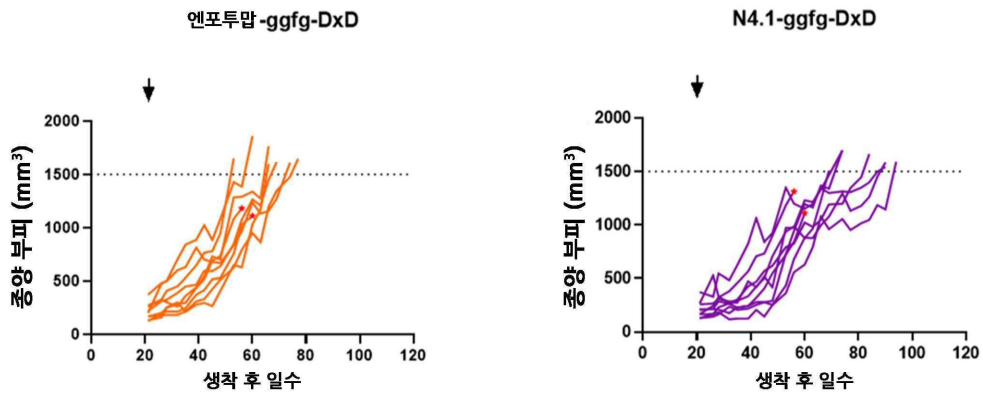
도면8b



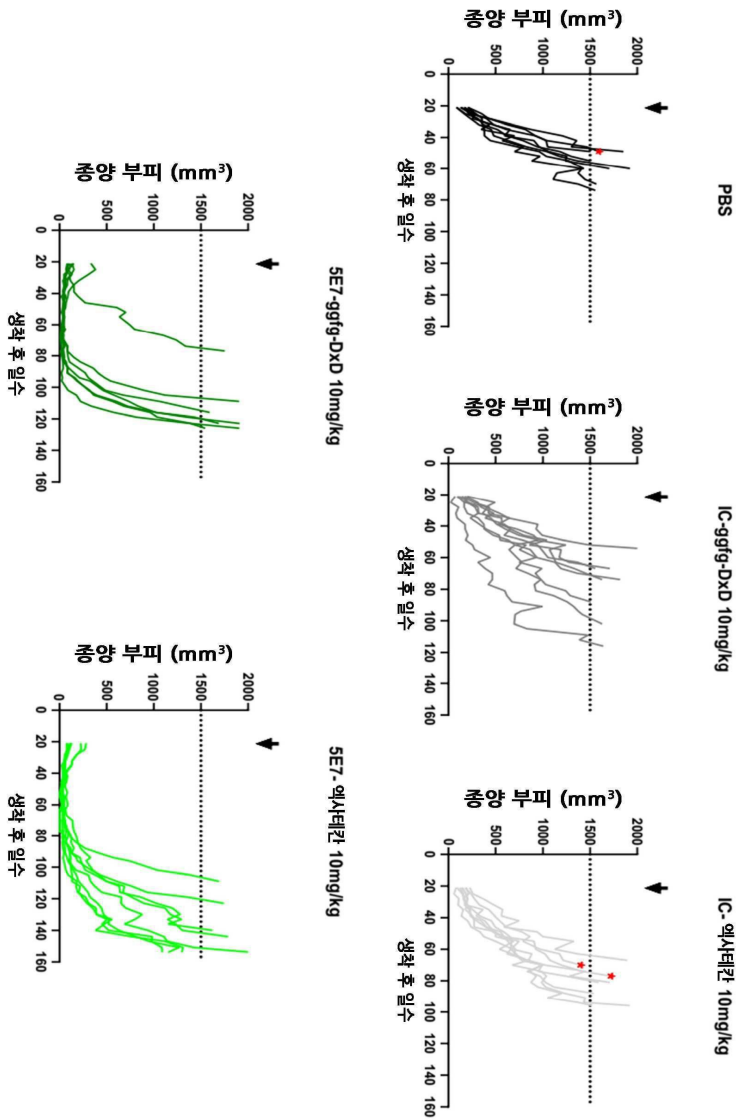
도면9a



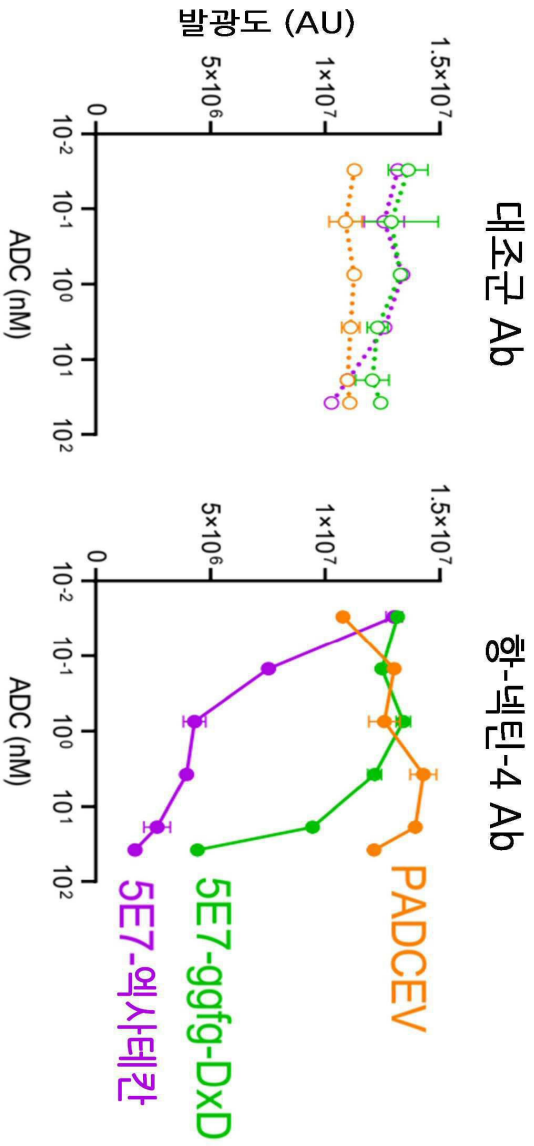
도면9b



도면9c

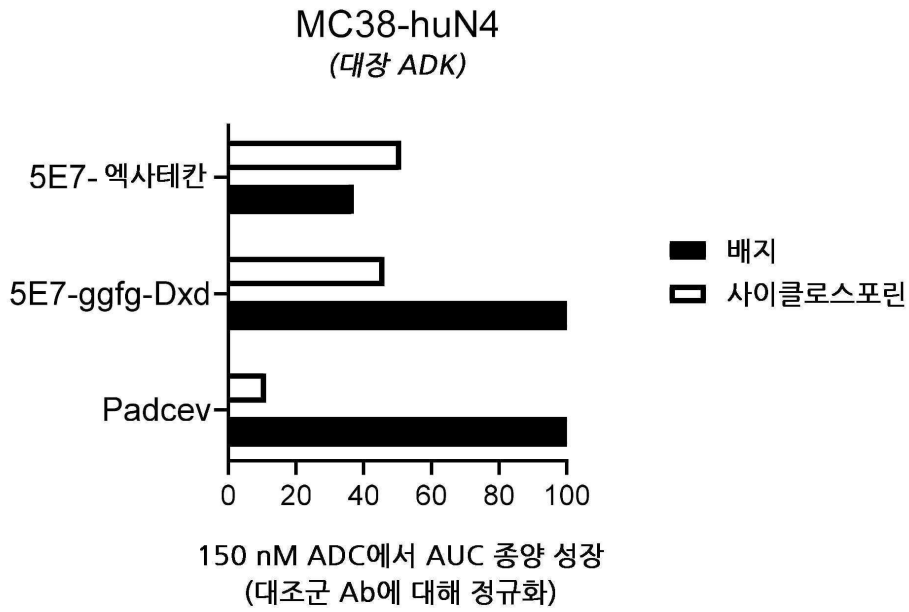


인간 넥틴-4 발현 MC38 (MC38-HuN4)  
(대장 선암종)

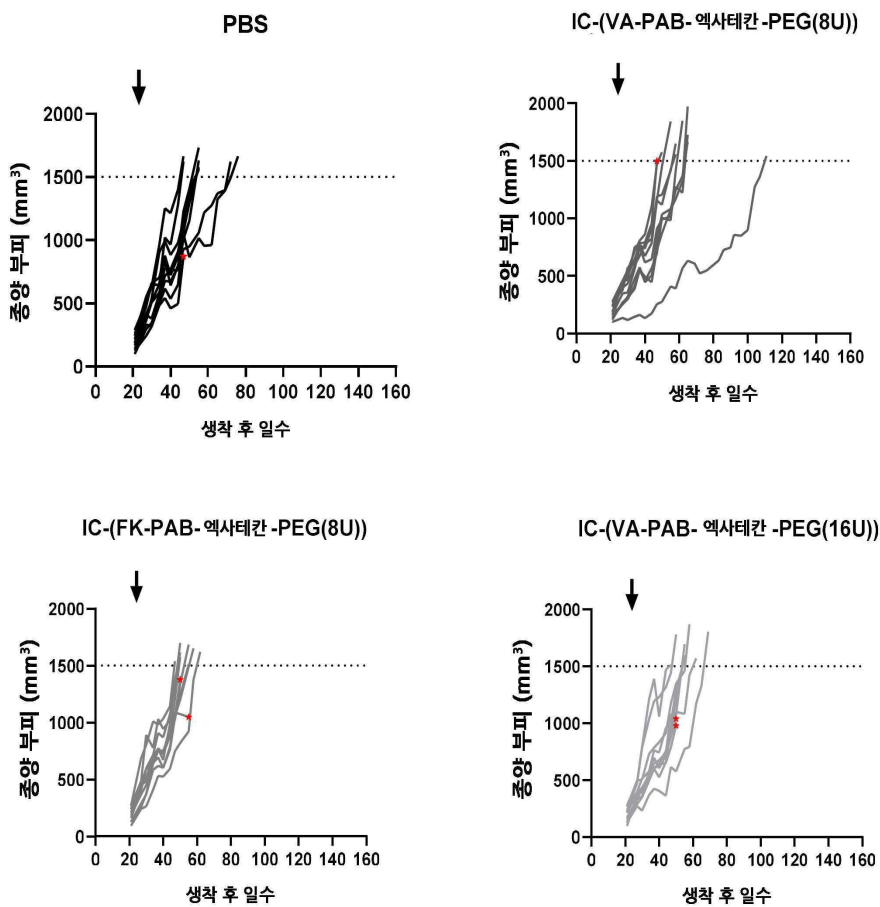


도면10a

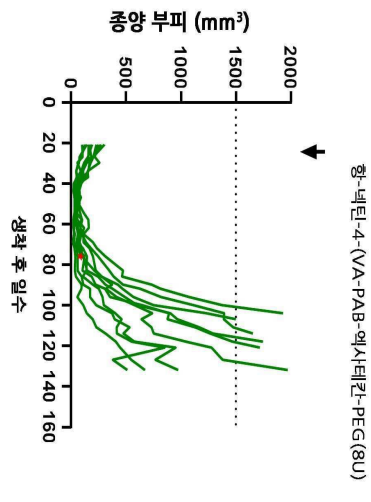
도면10b



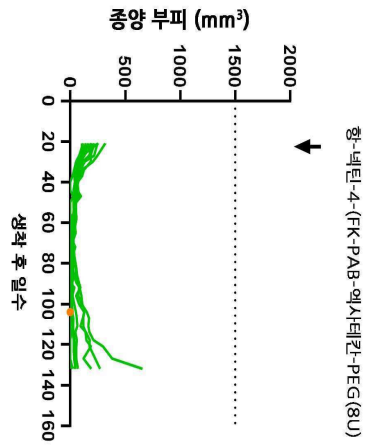
도면11



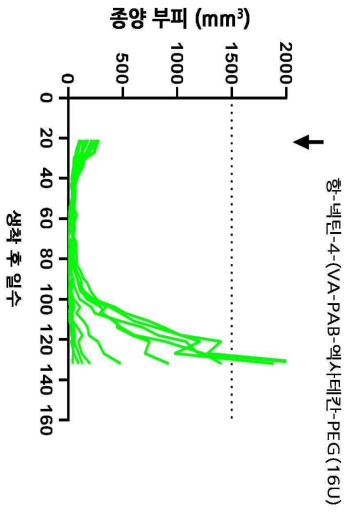
도면12



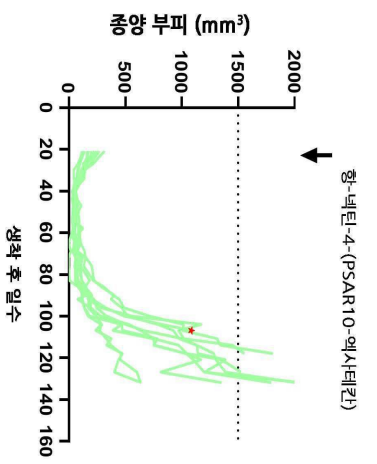
형-네택틴-4-(VA-PAB-에시타크릴-PEG(8U))



형-네택틴-4-(FK-PAB-에시타크릴-PEG(8U))

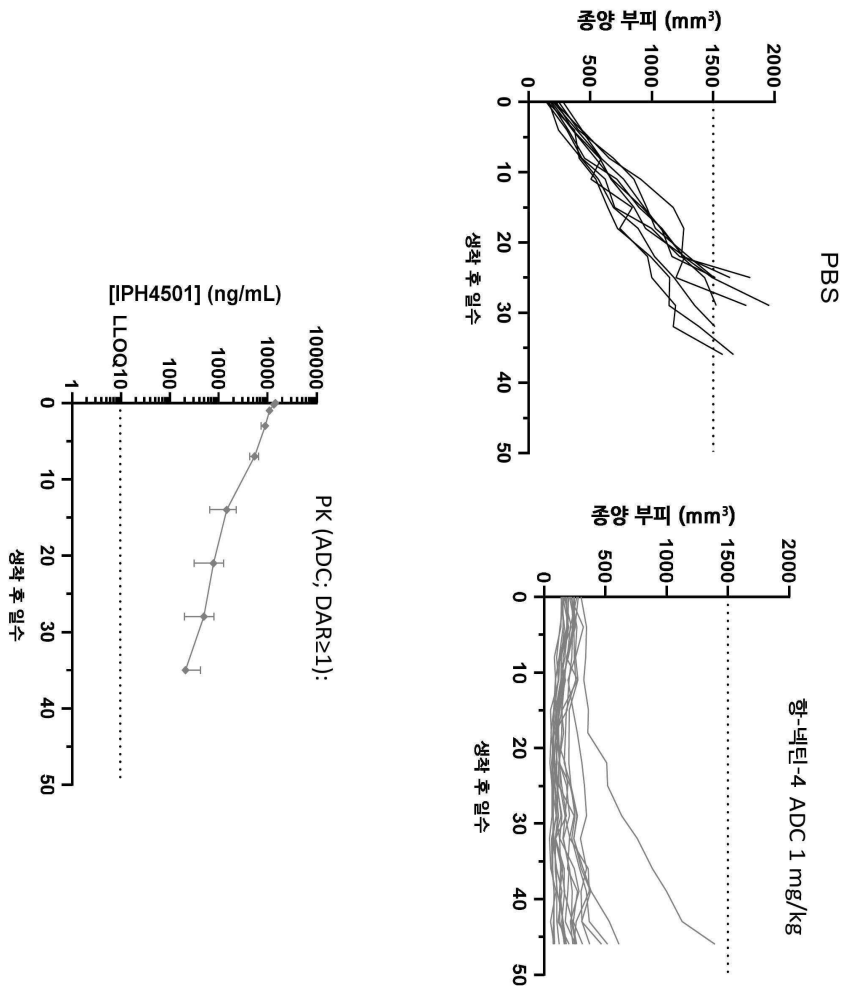


형-네택틴-4-(VA-PAB-에시타크릴-PEG(16U))

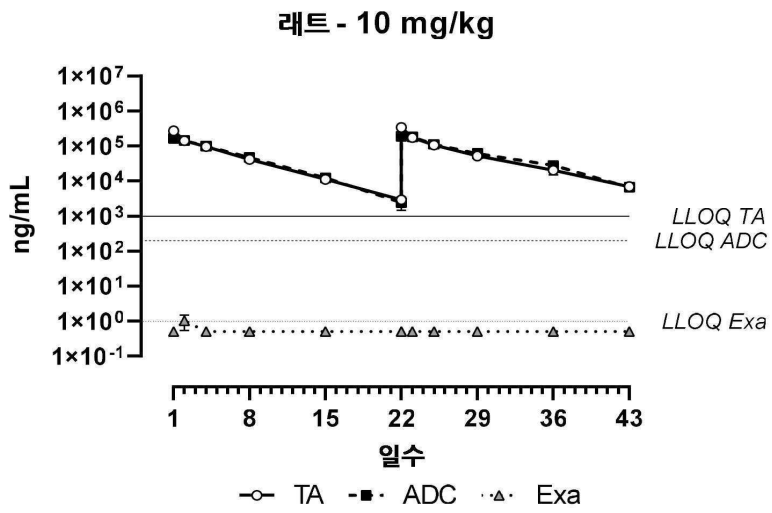
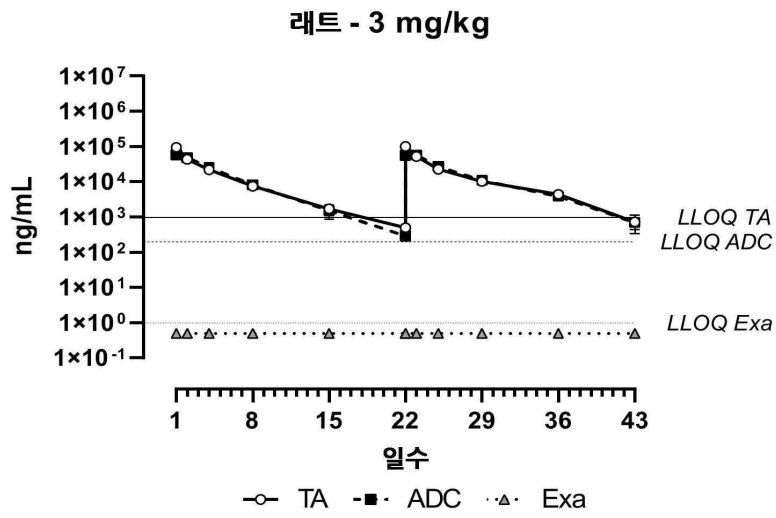


형-네택틴-4-(PSAR10-에시타크릴)

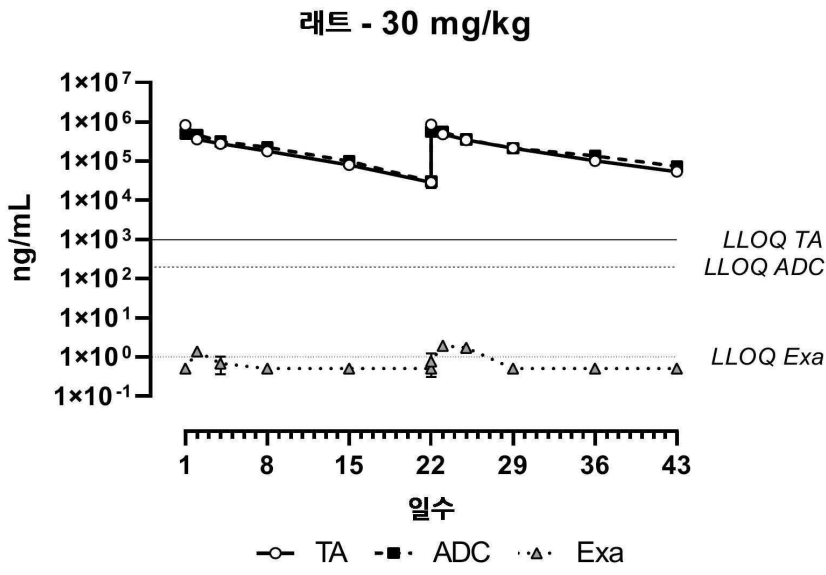
도면13



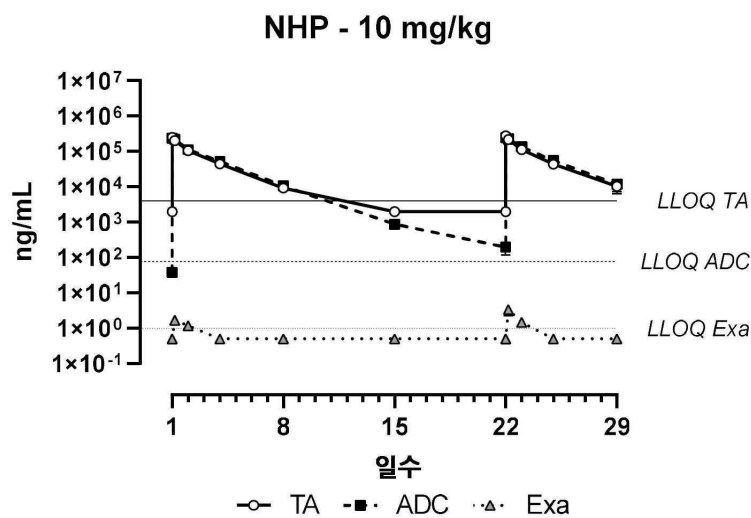
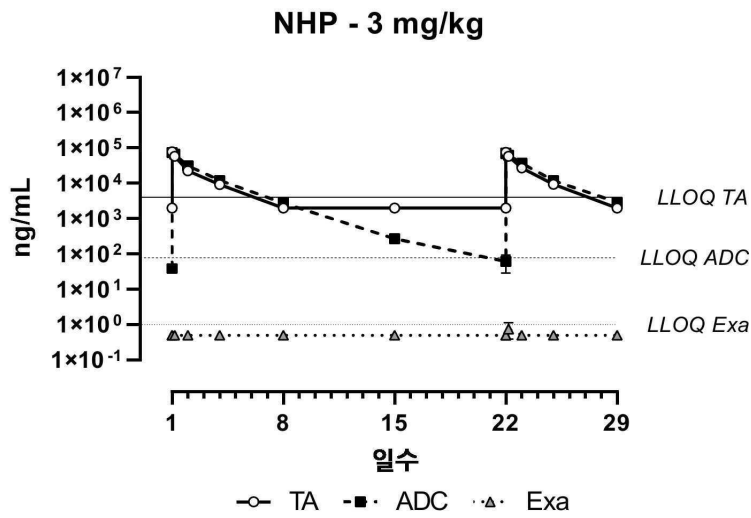
도면14a



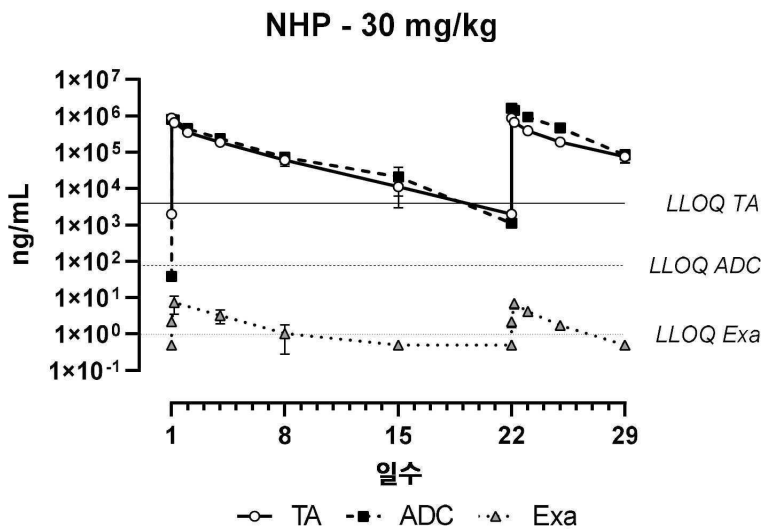
도면14b



도면15a



도면15b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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