



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

(11) 공개번호 10-2024-0135654  
(43) 공개일자 2024년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/32 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/32 (2013.01)  
A61K 47/68031 (2023.08)

(21) 출원번호 10-2024-7027448

(22) 출원일자(국제) 2023년01월19일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년08월14일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/073039

(87) 국제공개번호 WO 2023/143343  
국제공개일자 2023년08월03일

(30) 우선권주장  
PCT/CN2022/074078 2022년01월26일 중국(CN)  
(뒷면에 계속)

(71) 출원인  
바이오사이토젠 파마슈티컬스 (베이징) 컴퍼니 리미티드  
중국, 베이징 102629, 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인터스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버 12

(72) 발명자  
상 청장  
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인터스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12  
양 리우  
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인터스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
리엔목특허법인

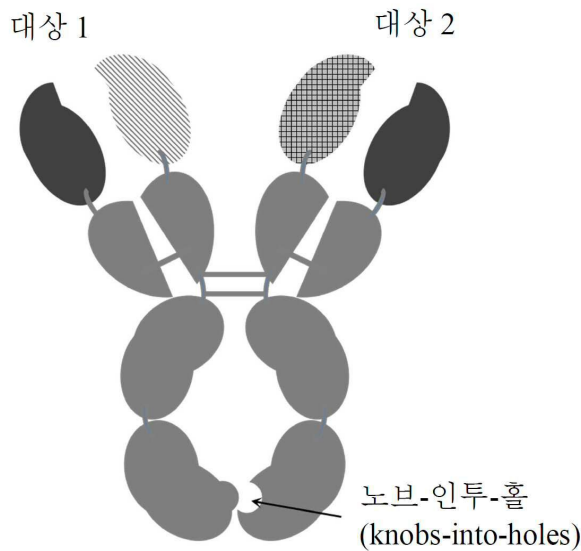
전체 청구항 수 : 총 98 항

(54) 발명의 명칭 항-HER2/TROP2 항체 및 이의 용도

**(57) 요약**

본 개시내용은 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-TROP2 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 2개의 상이한 항원(예를 들어, HER2 및 TROP2)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편), 및 항체 약물 접합체에 관한 것이다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6851* (2017.08)  
*A61K 47/6879* (2017.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 16/30* (2013.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)  
*C07K 2317/31* (2013.01)  
*C07K 2317/622* (2013.01)

(30) 우선권주장

PCT/CN2022/110153 2022년08월04일 중국(CN)  
PCT/CN2022/128951 2022년11월01일 중국(CN)

(72) 발명자

**한 안페이**

중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오  
-메디슨 인터스트리 파크 바오션 사우스 스트리트  
넘버 12

**셴 유엘라이**

중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오  
-메디슨 인터스트리 파크 바오션 사우스 스트리트  
넘버 12

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서:

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, 상기 VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, 상기 VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,

상기 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 7-9에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (2) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 10-12에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (3) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 13-15에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (4) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 16-18에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (5) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 19-21에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (6) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 22-24에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (7) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 25-27에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (8) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 28-30에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (9) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 31-33에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (10) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 34-36에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있는 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VH가: 카바트(Kabat) 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 7-9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 VH가: 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 10-12에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 13-15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 16-18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 19-21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 코티아(Chothia) 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 22-24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 25-27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 28-30에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 31-33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 VH가: 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 34-36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 15**

HER2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

선택된 VH 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 38이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (2) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 39이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (3) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 40이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (4) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 41이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (5) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 42이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37인 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 38의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 39의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 40의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 19**

제15항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 41의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 42의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 21**

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 22**

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 23**

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 25**

HER2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

선택된 VH 서열의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3과 동일한 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및

선택된 VL 서열의 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3과 동일한 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고,

상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 38이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (2) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 39이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (3) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 40이고 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (4) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 41이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (5) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 42이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37인 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TROP2에 추가로 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 28**

폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산으로서,

(1) 각각 서열번호: 7-9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

(2) 각각 서열번호: 10-12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

(3) 각각 서열번호: 13-15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

(4) 각각 서열번호: 16-18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;



H)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편; 또는

(20) 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 것인, 핵산.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 VH가 VL과 쌍을 이루는 경우 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합하는 것인, 핵산.

**청구항 30**

제28항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 또는 상기 이의 단편은 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편인 것인, 핵산.

**청구항 31**

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 것인, 핵산.

**청구항 32**

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 cDNA인 것인, 핵산.

**청구항 33**

TROP2(영양막 세포 표면 항원 2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서:

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, 상기 VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, 상기 VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,

상기 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 43-45에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (2) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 46-48에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (3) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (4) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 52-54에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (5) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 55-57에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (6) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 58-60에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있는 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 VH는 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 43-45에 제시된 아미노산 서열을 갖는



CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 35**

제33항에 있어서, 상기 VH는 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 46-48에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 36**

제33항에 있어서, 상기 VH는 카바트 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 49-51에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 37**

제33항에 있어서, 상기 VH는 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 52-54에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 38**

제33항에 있어서, 상기 VH는 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 55-57에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 39**

제33항에 있어서, 상기 VH는 코티아 번호 체계에 따라 각각 서열번호: 58-60에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 40**

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 TROP2 또는 개 TROP2에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 41**

제33항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 42**

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 43**

TROP2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

선택된 VH 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 61이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (2) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 62이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (3) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 63이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37인 것 중 하나인, 항체 또는

이의 항원 결합 단편.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 61의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 45**

제43항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 62의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 46**

제43항에 있어서, 상기 VH는 서열번호: 63의 서열을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 47**

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 TROP2 또는 개 TROP2에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 48**

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 49**

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 50**

제33항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 51**

TROP2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

선택된 VH 서열의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3과 동일한 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및

선택된 VL 서열의 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3과 동일한 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고,

상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 61이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (2) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 62이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이거나;
- (3) 상기 선택된 VH 서열이 서열번호: 63이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열번호: 37인 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 52**

제33항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 53**

제33항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HER2에 추가로 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 54**

폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산으로서,

- (1) 각각 서열번호: 43-45에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (2) 각각 서열번호: 46-48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (3) 각각 서열번호: 49-51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (4) 각각 서열번호: 52-54에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (5) 각각 서열번호: 55-57에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (6) 각각 서열번호: 58-60에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 상기 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;
- (7) 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 61에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;
- (8) 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 62에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;
- (9) 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 63에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;
- (10) 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 61에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 것인, 핵산.
- (11) 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 62에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 것인, 핵산.
- (12) 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 VL은 서열번호: 63에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것인, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 것인, 핵산.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 상기 VH는 VL과 쌍을 이루는 경우 인간 TROP2 또는 개 TROP2에 특이적으로 결합하는 것인, 핵산.

**청구항 56**

제54항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로블린 중쇄 또는 상기 이의 단편은 인간 또는 인간화 면역글로블린 중쇄 또는 이의 단편인 것인, 핵산.

**청구항 57**

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 것인, 핵산.

**청구항 58**

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 cDNA인 것인, 핵산.

**청구항 59**

HER2에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인; 및 TROP2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인은 제1 중쇄 가변 영역(VH1) 및 제1 경쇄 가변 영역(VL1)을 포함하고; 상기 제2 항원 결합 도메인은 제2 중쇄 가변 영역(VH2) 및 제2 경쇄 가변 영역(VL2)을 포함하는 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 61**

제60항에 있어서,

상기 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역(VH1)이되, 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

상기 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역(VL1)이되, 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

상기 선택된 VH1 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:

- (1) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 7-9에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (2) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 10-12에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (3) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 13-15에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (4) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 16-18에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (5) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 19-21에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;
- (6) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 22-24에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (7) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 25-27에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;
- (8) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 28-30에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1

CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;

(9) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 31-33에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;

(10) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 34-36에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있는 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 62**

제60항 또는 제61항에 있어서,

CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역(VH2)이되, 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및

CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역(VL2)이되, 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고,

상기 선택된 VH2 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:

(1) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 43-45에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;

(2) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 46-48에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;

(3) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;

(4) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 52-54에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;

(5) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 55-57에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있거나;

(6) 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 58-60에 제시되어 있으며, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있는 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 63**

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

(1) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 10-12에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 서열번호: 1-3에 제시되어 있고, 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;

(2) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 19-21에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 서열번호: 1-3에 제시되어 있고, 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;

(3) 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 7-9에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 서열번호: 1-3에 제시되어 있고, 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있고, 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있거나;









**청구항 78**

제60항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 서열번호: 41와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 서열번호: 37과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 서열을 포함하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 서열번호: 61과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 서열을 포함하고, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 서열번호: 37과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 서열을 포함하는 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 79**

제59항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합 단백질 작제물은 이중특이적 항체인 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 80**

제60항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 경쇄 가변 영역과 상기 제2 경쇄 가변 영역은 동일한 것인, 항원-결합 단백질 작제물.

**청구항 81**

제28항 내지 제32항 및 제54항 내지 제58항 중 어느 한 항의 핵산, 또는 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산, 또는 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물을 코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 것인, 벡터.

**청구항 82**

제81항의 벡터를 포함하는 것인, 세포.

**청구항 83**

제82항에 있어서, 상기 세포는 CHO 세포인 것인, 세포.

**청구항 84**

제28항 내지 제32항 및 제54항 내지 제58항 중 어느 한 항의 핵산, 또는 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산, 또는 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물을 코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 것인, 세포.

**청구항 85**

항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항원 결합 단백질 작제물을 생성하는 방법으로서,

- (a) 제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 따른 세포를, 상기 세포가 상기 항체 또는 상기 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항원-결합 단백질 작제물을 생성하기에 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 항체 또는 상기 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 세포에 의해 생성된 상기 항원-결합 단백질 작제물을 수집하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 86**

항체-약물 접합체로서,

- (a) 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는
- (b) 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물에 공유 결합되는 치료제를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 87**

제86항에 있어서, 상기 치료제가 세포독성제 또는 세포증식억제제인 것인, 항체 약물 접합체.

**청구항 88**

제86항 또는 제87항에 있어서, 상기 치료제가 MMAE 또는 MMAF인 것인, 항체 약물 접합체.

**청구항 89**

암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물, 또는 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인, 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법.

**청구항 90**

제89항에 있어서, 상기 대상체가 고형 종양을 갖는 것인, 방법.

**청구항 91**

제89항에 있어서, 상기 암은 갑상선암, 요로상피암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 자궁내막암, 피부암, 위암, 식도 암종, 췌장암, 전립선암, 간암, 림프종 또는 신경교종인 것인, 방법.

**청구항 92**

제89항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 전립선암, 갑상선암, 요로상피암, 두경부암, 자궁내막암, 난소암, 폐암, 유방암, 유암종, 피부암, 간암 또는 고환암인 것인, 방법.

**청구항 93**

제89항에 있어서, 상기 암이 다발성 골수종 또는 신장 암종인 것인, 방법.

**청구항 94**

제89항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 것인, 방법.

**청구항 95**

제89항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 비인간 동물인 것인, 방법.

**청구항 96**

종양 성장의 속도를 감소시키는 방법으로서, 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물, 또는 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는 유효량의 조성물과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 97**

종양 세포를 사멸시키는 방법으로서,

제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물, 또는 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는 유효량의 조성물과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 98**

약제학적으로 허용 가능한 담체 및

- (a) 제1항 내지 제27항 및 제33항 내지 제53항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편,
- (b) 제59항 내지 제80항 중 어느 한 항의 항원-결합 단백질 작제물, 또는
- (c) 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 2022년 1월 26일 출원된 PCT 출원 제PCT/CN2022/074078호, 2022년 8월 4일 출원된 PCT 출원 제PCT/CN2022/110153호 및 2022년 11월 1일 출원된 PCT 출원 제PCT/CN2022/128951호의 이익을 청구한다. 전술한 전체 내용이 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 항체 약물 접합체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 암은 현재 인간의 사망률이 가장 높은 질환 중 하나이다. 세계보건기구(World Health Organization) 통계 데이터에 따르면, 2012년 전 세계 암 발생 건수는 1,400만 명 그리고 사망 건수는 820만 명에 이르렀다. 중국에서는 신규 진단된 암 환자가 307만 명이며 사망자 수는 220만 명이다.

[0006] 최근 항암 항체의 임상적 그리고 상업적 성공으로 인해 항체 기반 치료법에 대한 관심이 높아지고 있다. 암을 치료하기 위한 항체 및 항체-약물 접합체의 추가 개발이 요구된다.

**발명의 내용**

[0007] 본 개시내용은 항-HER2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 두 개의 상이한 항원(예를 들어, HER2 및 TROP2)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 및 이들 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 수반하는 항체 약물 접합체에 관한 것이다.

[0008] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:

[0009] 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, 상기 VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

[0010] CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, 상기 VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,

[0011] 상기 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이며:

[0012] (1) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 7-9에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있고;

[0013] (2) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 10-12에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있고;

[0014] (3) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 13-15에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있고;

[0015] (4) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 16-18에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3

아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있고;

- [0016] (5) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 19-21에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있고;
- [0017] (6) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 22-24에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있고;
- [0018] (7) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 25-27에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있고;
- [0019] (8) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 28-30에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있고;
- [0020] (9) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 31-33에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있고;
- [0021] (10) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 34-36에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 카바트(Kabat) 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 7-9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 10-12에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 13-15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 16-18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 19-21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 코티아(Chothia) 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 22-24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 25-27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 28-30에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 31-33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 34-36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)이다.
- [0035] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 HER2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0036] 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은 다음 중 하나이다:
- [0037] (1) 선택된 VH 서열이 서열번호: 38, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;

- [0038] (2) 선택된 VH 서열이 서열번호: 39, 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0039] (3) 선택된 VH 서열이 서열번호: 40, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0040] (4) 선택된 VH 서열이 서열번호: 41, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0041] (5) 선택된 VH 서열이 서열번호: 42, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37.
- [0042] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 38의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 39의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 40의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 41의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 42의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합한다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0049] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)이다.
- [0050] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0051] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 HER2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0052] 선택된 VH 서열의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3과 동일한 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및
- [0053] 선택된 VL 서열의 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3과 동일한 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL),
- [0054] 여기서 선택된 VH 서열 및 선택된 VL 서열은 다음 중 하나이다:
- [0055] (1) 선택된 VH 서열이 서열번호: 38, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0056] (2) 선택된 VH 서열이 서열번호: 39, 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0057] (3) 선택된 VH 서열이 서열번호: 40, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0058] (4) 선택된 VH 서열이 서열번호: 41, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
- [0059] (5) 선택된 VH 서열이 서열번호: 42, 선택된 VL 서열이 서열번호: 37.
- [0060] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TROP2에 추가로 특이적으로 결합한다.
- [0062] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산에 관한 것이다:
- [0063] (1) 번역글로블린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 7-9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것;
- [0064] (2) 번역글로블린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 10-12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것;
- [0065] (3) 번역글로블린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 13-15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것;



아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것;

- [0081] (19) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것; 또는
- [0082] (20) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 HER2에 결합하는 것.
- [0083] 일부 실시양태에서, VL과 쌍을 이루는 경우 VH는 인간 HER2 또는 개 HER2에 특이적으로 결합한다.
- [0084] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편은 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편이다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 해당 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv)을 코딩한다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 해당 핵산은 cDNA이다.
- [0087] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 TROP2(영양막 세포 표면 항원 2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0088] 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, 상기 VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및
- [0089] CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, 상기 VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,
- [0090] 상기 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:
- [0091] (1) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 43-45에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있으며;
- [0092] (2) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 46-48에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있으며;
- [0093] (3) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49-51에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되어 있으며;
- [0094] (4) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 52-54에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있으며;
- [0095] (5) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 55-57에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있으며;
- [0096] (6) 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 58-60에 제시되어 있고, 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0097] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 43-45에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 46-48에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 카바트 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 49-51에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.

- [0100] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 52-54에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 55-57에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 코티아 번호 체계에 따라 VH는 각각 서열번호: 58-60에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하고, VL은 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 TROP2 또는 개 TROP2에 특이적으로 결합한다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)이다.
- [0106] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 TROP2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0107] 선택된 VH 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:
  - [0108] (1) 선택된 VH 서열이 서열번호: 61, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
  - [0109] (2) 선택된 VH 서열이 서열번호: 62, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
  - [0110] (3) 선택된 VH 서열이 서열번호: 63, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37.
- [0111] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 61의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 62의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 해당 VH는 서열번호: 63의 서열을 포함하며, 해당 VL은 서열번호: 37의 서열을 포함한다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 TROP2 또는 개 TROP2에 특이적으로 결합한다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 인간화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV)이다.
- [0117] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.
- [0118] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 TROP2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0119] 선택된 VH 서열의 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3과 동일한 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및
- [0120] 선택된 VL 서열의 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3과 동일한 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL),
- [0121] 여기서 선택된 VH 서열 및 선택된 VL 서열은 다음 중 하나이다:
  - [0122] (1) 선택된 VH 서열이 서열번호: 61, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
  - [0123] (2) 선택된 VH 서열이 서열번호: 62, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37;
  - [0124] (3) 선택된 VH 서열이 서열번호: 63, 및 선택된 VL 서열이 서열번호: 37.
- [0125] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0126] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HER2에 추가로 특이적으로 결합한다.
- [0127] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산에 관한 것이다:
  - [0128] (1) 번역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 43-45에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상



보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;

- [0129] (2) 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 46-48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0130] (3) 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 49-51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것; 또는
- [0131] (4) 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 52-54에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0132] (5) 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 55-57에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0133] (6) 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 58-60에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2, 및 3을 포함하는 VH를 포함하고, 여기서 VH는 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0134] (7) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 61에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0135] (8) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 62에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0136] (9) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 1-3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 63에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0137] (10) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 61에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0138] (11) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호: 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호: 62에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것;
- [0139] (12) 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편으로서 각각 서열번호 4-6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열번호 63에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 쌍을 이루는 경우 TROP2에 결합하는 것.
- [0140] 일부 실시양태에서, VL과 쌍을 이룰 때 VH는 인간의 TROP2 또는 개의 TROP2에 특이적으로 결합한다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편은 인간 또는 인간화 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편이다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 해당 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv)을 코딩한다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 해당 핵산은 cDNA이다.
- [0144] 일 양태에서, 본 개시내용은 HER2에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 및 TROP2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 항원-결합 단백질 작제물에 관한 것이다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 제1 중쇄 가변 영역(VH1) 및 제1 경쇄 가변 영역(VL1)을 포함하고;

제2 항원 결합 도메인은 제2 중쇄 가변 영역(VH2) 및 제2 경쇄 가변 영역(VL2)을 포함한다.

- [0146] 일부 실시양태에서, 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역(VH1)이되, 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0147] CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역(VL1)이되, 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,
- [0148] 상기 선택된 VH1 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL1 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:
- [0149] (1) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 7-9에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;
- [0150] (2) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 10-12에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;
- [0151] (3) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 13-15에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;
- [0152] (4) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 16-18에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;
- [0153] (5) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 19-21에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;
- [0154] (6) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 22-24에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되며;
- [0155] (7) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 25-27에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되며;
- [0156] (8) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 28-30에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되며;
- [0157] (9) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 31-33에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되며;
- [0158] (10) 선택된 VH1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 34-36에 제시되고, 선택된 VL1 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0159] 일부 실시 양태에서, CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역(VH2)이되, 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0160] CDR 1, 2 및 3을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역(VL2)이되, 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며,
- [0161] 상기 선택된 VH2 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL2 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은:
- [0162] (1) 선택된 VH2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 43-45에 제시되고, 선택된 VL2 CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열번호: 1-3에 제시되며;







- [0201] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 핵산 중 하나 이상, 또는 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산, 또는 설명된 항원-결합 단백질 작제물을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0202] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0203] 일부 실시양태에서, 해당 세포는 CHO 세포이다.
- [0204] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 핵산 중 하나 이상, 또는 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산, 또는 설명된 항원-결합 단백질 작제물을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0205] 일 양태에서, 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물을 생성하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0206] (a) 세포가 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물을 생성하기에 충분한 조건 하에서 본원에 설명된 세포를 배양하는 단계; 및
- [0207] (b) 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 세포에 의해 생성된 항원-결합 단백질 작제물을 수집하는 단계.
- [0208] 일 양태에서, 본 개시내용은 다음에 공유결합된 치료제를 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다:
- [0209] (a) 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는
- [0210] (b) 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물.
- [0211] 일부 실시양태에서, 해당 치료제는 세포독성제(cytotoxic agent) 또는 세포증식억제제(cytostatic agent)이다.
- [0212] 일부 실시양태에서, 치료제는 MMAE 또는 MMAF이다.
- [0213] 일 양태에서, 본 개시내용은 암에 걸린 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이며, 방법은 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물 또는 본원에 설명된 항체-약물 접합체를 포함하는 치료학적 유효량의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 해당 대상체는 고형 종양이 있다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 암은 갑상선암, 요로상피암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 자궁 내막암, 피부암, 위암, 췌장암, 전립선암, 간암, 림프종 또는 신경교종이다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 암은 자궁경부암, 전립선암, 갑상선암, 요로상피암, 두경부암, 자궁내막암, 난소암, 폐암, 유방암, 유암종, 피부암, 간암, 또는 고환암이다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 암은 다발성 골수종 또는 신장 암종이다.
- [0218] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0219] 일부 실시양태에서, 대상체는 비인간 동물이다.
- [0220] 일 양태에서, 본 개시내용은 종양 성장 속도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 방법은 다음을 포함한다
- [0221] 종양 세포를 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물, 또는 본원에 설명된 항체-약물 접합체를 포함하는 유효량의 조성물과 접촉시키는 단계.
- [0222] 일 양태에서, 본 개시내용은 종양 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것으로, 방법은 종양 세포를 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물, 또는 본원에 설명된 항체-약물 접합체를 포함하는 유효량의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0223] 일 양태에서, 본 개시내용은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 다음을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0224] (a) 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편,
- [0225] (b) 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물, 또는
- [0226] (c) 본원에 설명된 항체-약물 접합체.
- [0227] 일 양태에서, 본 개시내용은 HER2에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 및 TROP2에 특이적으로 결합하

는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질 작제물에 관한 것이다.

[0228] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 적어도 1개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 상보적 결정 영역(CDR)(예를 들어, 면역글로불린 경쇄로부터 유래한 3개의 CDR 중 임의의 것 또는 면역글로불린 중쇄로부터 유래한 3개의 CDR 중 임의의 것)을 함유하고 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 항원 결합 분자를 지칭한다. 항체의 비제한적인 예는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 단쇄 항체, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체의 Fc 영역을 함유할 수 있다. 또한, 용어 항체는 유도체, 예를 들어 항체 단편으로부터 형성되는 이중특이적 항체, 단쇄 항체, 디아바디, 선형 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다.

[0229] 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간으로부터 유래된 내인성 핵산(예를 들어, 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 유전자좌)에 의해 코딩되는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 인간으로부터 수집되거나 인간 세포 배양물(예를 들어, 인간 하이브리도마 세포)에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 비인간 세포(예를 들어, 마우스 또는 햄스터 세포주)에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 박테리아 또는 효모 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 재배열되지 않은 또는 재배열된 인간 면역글로불린 유전자좌(예를 들어 중쇄 또는 경쇄 인간 면역글로불린 유전자좌)를 함유하는 이식유전자 비인간 동물(예를 들어, 소)에서 생성된다.

[0230] 본원에서 사용되는 용어 "키메라 항체"는 적어도 2개의 상이한 종에 존재하는 서열을 함유하는 항체(예를 들어, 인간 및 마우스 항체와 같은 2개의 상이한 포유동물 종으로부터 유래한 항체)를 지칭한다. 키메라 항체의 비제한적인 예는 비인간(예를 들어, 마우스) 항체의 가변 도메인 서열(예를 들어, 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인 서열의 전부 또는 일부) 및 인간 항체의 불변 도메인을 함유하는 항체이다. 키메라 항체의 추가 예는 본원에서 설명되어 있으며 당업계에 알려져 있다.

[0231] 본원에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하고 인간 면역글로불린으로부터 유래된 서열을 함유하는 비인간 항체를 지칭한다. 비제한적인 예에서, 인간화 항체는 수용자 항체의 초가변(예를 들어, CDR) 영역 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간 항체(예를 들어, 공여자 항체), 예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼 항체로부터 유래한 초가변(예를 들어, CDR) 영역 잔기로 대체되는 인간 항체(수용자 항체)이다. 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린 잔기로 대체된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 변형을 통해 항체 성능을 추가로 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해당 인간화 항체는 적어도 1개, 일반적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 함유하며, 여기서 초가변 루프(CDR)의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린의 것에 상응하고 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린의 것이다. 또한, 해당 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 인간화 항체는 당업계에 알려진 분자 생물학 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 인간화 항체를 생성하는 방법의 비제한적인 예가 본원에서 설명되어 있다.

[0232] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단백질 작제물(antigen-binding protein construct)"은 (i) 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 또는 (ii) 적어도 하나 이상의 상이한 항원-결합 도메인을 함께 형성하는 둘 이상의 폴리펩티드(예를 들어, 동일하거나 상이한 폴리펩티드)의 복합체이다. 항원-결합 단백질 작제물의 비제한적인 예와 양태가 본원에 설명되어 있다. 항원-결합 단백질 작제물의 추가 실시예 및 양태는 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 8개 초과 항원 결합 도메인을 갖는다.

[0233] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 도메인(antigen-binding domain)"은 하나 이상의 상이한 항원(들)에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 단백질 도메인(들)(예를 들어, 단일 폴리펩티드로부터의 아미노산들로부터 형성되거나 또는 둘 이상의 폴리펩티드들(예를 들어, 동일하거나 상이한 폴리펩티드들)로부터의 아미노산들로부터 형성됨)을 지칭한다. 일부 예에서, 항원-결합 도메인은 자연 발생 항체의 특이성 및 친화도와 유사한 특이성 및 친화도로 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 항원 결합 도메인의 일례는 VH-VL 이량체에 의해 형성된 항원 결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 VHH이다. 항원-결합 도메인의 비제한적인 예가 본원에서 설명되어 있다. 항원-결합 도메인의 추가 예는 당업계에 공지되어 있다. 일부 예에서, 항원 결합 도메인은 단일 항원에 결합할 수 있다.

- [0234] 본원에 사용된 용어 "이중특이적 항체(bispecific antibody)"는 두 개의 상이한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 에피토프는 동일한 항원에 있을 수도 있고 상이한 항원에 있을 수도 있다.
- [0235] 본원에 사용된 용어 "다중특이적 항체(multispecific antibody)"는 두 개 이상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 에피토프는 동일한 항원에 있을 수도 있고 상이한 항원에 있을 수도 있다.
- [0236] 본원에 사용된 "VHH"는 중쇄 항체의 가변 도메인을 지칭한다. 일부 실시양태에서, VHH는 인간화 VHH이다.
- [0237] 본원에서 사용된 용어 "공통 경쇄(common light chain)"는 2개 이상의 상이한 중쇄와 상호작용하여 상이한 항원 결합 도메인을 형성할 수 있는 경쇄를 지칭하며, 여기서 이들 상이한 항원 결합 도메인은 상이한 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 유사하게, 용어 "공통 경쇄 가변 영역(common light chain variable region)"은 2개 이상의 상이한 중쇄 가변 영역과 상호작용하여 상이한 항원 결합 도메인을 형성할 수 있는 경쇄 가변 영역을 지칭하며, 여기서 이들 상이한 항원 결합 도메인은 상이한 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 자체물은 공통 경쇄를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 자체물은 공통 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다.
- [0238] 항체를 지칭하는 경우 본원에서 사용되는 문구 "특이적으로 결합" 및 "특이적으로 결합하다"는 항체가, 바람직하게는 다른 분자에 비해, 이의 표적 분자(예를 들어, HER2)와 상호작용함을 의미하는데, 이는 상호작용이 표적 분자상에 있는 특정 구조(즉, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존하기 때문이며, 즉, 시약은 일반적으로 모든 분자가 아닌 특정 구조를 포함하는 분자를 인식하고 이에 결합한다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 표적 특이적 항체라고 지칭할 수 있다. 예를 들어, HER2 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 HER2 특이적 항체 또는 항-HER2 항체로 지칭될 수 있다.
- [0239] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 모두 본 발명이 속하는 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 물질이 본원에서 설명되며 당업계에 알려진 다른 적합한 방법 및 물질도 사용될 수 있다. 물질, 방법 및 예는 단지 예시적이며 제한하려는 의도가 아니다. 본원에서 언급되는 모든 공개, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 다른 참조문헌은 전문이 참조에 의해 인용된다. 상충되는 경우 정의를 포함한 본 명세서가 적용된다.
- [0240] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용과 도면 및 청구범위에 따라 명백해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0241] 도 1은 예시적인 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체의 구조를 나타내는 개략도이다.
- 도 2는 NCI-N87 세포에서 정제된 항체의 세포내이입 결과를 나타낸다.
- 도 3는 NCI-N87 세포에서 정제된 항체의 세포내이입 결과를 나타낸다.
- 도 4는 NCI-H292 세포에서 정제된 항체의 세포내이입 결과를 나타낸다.
- 도 5는 NCI-H292 세포에서 정제된 항체의 세포내이입 결과를 나타낸다.
- 도 6은 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 H-1H2-T-6F7, H-2B2-T-6F7, T-6F7-H-1H2 및 H-3C8-T-6F7의 가속화된 안정성을 나타낸다. ND: 검출되지 않음. 동결 1: 1회 동결-해동; 동결 10: 동결-해동 10회 반복.
- 도 7은 폐 선암종 세포를 주사하고 상이한 항체 약물 접합체(ADC)로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 카바트(Kabat) 번호 체계에 의해 정의된 항-HER2 항체 H-1H2, H-2B2, H-3E5, H-3C6 및 H-3C8의 CDR 서열을 나열한다.
- 도 9는 코티아(Chothia) 번호 체계에 의해 정의된 항-HER2 항체 H-1H2, H-2B2, H-3E5, H-3C6 및 H-3C8의 CDR 서열을 나열한다.
- 도 10은 항-HER2 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나열한다.
- 도 11은 카바트(Kabat) 번호 체계에 의해 정의된 항-TROP2 항체 T-3A4, T-4B9, T-4C12, T-5C8 및 T-6F7의 CDR 서열을 나열한다.



도 12는 코티아 번호 체계에 의해 정의된 항-TROP2 항체 T-3A4, T-4B9, T-4C12, T-5C8 및 T-6F7의 CDR 서열을 나열한다.

도 13은 항-TROP2 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나열한다.

도 14는 본 개시내용에 설명된 바와 같은 아미노산 서열을 나열한다.

도 15는 폐 선암종 세포를 주사하고 PBS, MMAE, H-2B2-T-6F7 또는 H-2B2-T-6F7-ADC로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 16은 폐 선암종 세포를 주사하고 PBS, H-2B2-T-6F7-ADC, 사시투주맙 고비테칸 유사체, 디시타맙 베도틴 또는 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 다양한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 17는 난소암 세포를 주사하고 PBS, 동종형-대조군-ADC, H-2B2-T-6F7-ADC, H-2B2-IgG1-ADC, T-6F7-IgG1-SI-ADC, 트라스투주맙 데록스테칸 유사체 또는 DS-1062 유사체로 처리한 다양한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 18은 유방암 세포를 주사하고 PBS, 동종형-대조군-ADC, H-2B2-T-6F7-ADC, H-2B2-IgG1-ADC, T-6F7-IgG1-SI-ADC, 사시투주맙 고비테칸 유사체, 디시타맙 베도틴 또는 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 19는 환자 유래 췌장 종양 단편을 주사하고 5mg/kg에서 PBS, H-2B2-T-6F7-ADC, T-6F7-IgG1-SI-ADC, 사시투주맙 고비테칸 유사체, 디시타맙 베도틴 또는 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 20는 환자 유래 췌장 종양 단편을 주사하고 3mg/kg에서 PBS, H-2B2-T-6F7-ADC, T-6F7-IgG1-SI-ADC, 사시투주맙 고비테칸 유사체, 디시타맙 베도틴 또는 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 21a는 생리식염수 또는 H-2B2-T-6F7-ADC를 투여한 상이한 마우스 군의 평균 체중을 나타내는 그래프이다.

도 21b는 생리식염수 또는 H-2B2-T-6F7-ADC를 투여한 상이한 마우스 군의 평균 체중의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 22는 환자 유래 결장직장 종양 단편을 주사하고, PBS, 6mg/kg의 H-2B2-T-6F7-ADC, 10mg/kg의 사시투주맙 고비테칸, 6mg/kg의 디시타맙 베도틴 또는 6mg/kg의 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 23은 환자 유래 폐 종양 단편을 주사하고, PBS, 3mg/kg 또는 6mg/kg H-2B2-T-6F7-ADC, 3mg/kg H-2B2-IgG1-ADC, 3mg/kg T-6F7-IgG1-SI-ADC, 10mg/kg 사시투주맙 고비테칸, 6mg/kg 디시타맙 베도틴 또는 6mg/kg 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 24는 환자 유래 위 종양 단편을 주사하고, PBS, 3mg/kg 또는 6mg/kg H-2B2-T-6F7-ADC, 10mg/kg 사시투주맙 고비테칸, 6mg/kg 디시타맙 베도틴 또는 6mg/kg 트라스투주맙 데록스테칸으로 처리한 상이한 마우스 군의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프이다.

도 25는 본 발명의 H-2B2-T-6F7-ADC에 대한 혈장 안정성 시험 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0242] 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 두 개의 상이한 에피토프(예를 들어, 두 개의 상이한 항원)에 동시에 결합할 수 있는 인공 단백질이다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 2개의 팔(Arm A 및 B)을 가질 수 있다. 각 팔에는 하나의 중쇄 가변 영역과 하나의 경쇄 가변 영역이 있어 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 영역)을 형성한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 공통 경쇄를 갖는다.

[0243] 본 개시내용은 항-HER2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 두 개의 상이한 항원(예를 들어, HER2 및 TROP2)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편), 및 항체 약물 접합체에 관한 것이다.

[0244] 항HER2 항체 및 항원 결합 단편

- [0245] 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)(ERBB2로도 알려짐)는 수용체 단백질 티로신 키나제의 표피 성장 인자 수용체 서브패밀리에 속하는 막관통 수용체이다.
- [0246] HER2는 유방암 및 위암과 같은 다양한 암 유형에서 과발현되며 유방암에서 음성 예후인자로 보고되고 있다. HER2가 과발현되는 암에 효과적인 항-HER2 약물로는 트라스투주맙, 트라스투주맙 엠탄신, 페르투주맙, 라파티닙 등이 알려져 있다.
- [0247] 본 개시내용은 HER2에 특이적으로 결합하는 여러 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-HER2/TROP2 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 이들 항체로부터 유래된 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.
- [0248] 본원에 설명된 항체 및 항원-결합 단편은 HER2에 결합할 수 있다. 본 개시내용은, 예를 들어 항-HER2 항체 H-1H2("1H2"), H-2B2("2B2"), H-3E5("3E5"), H-3C6("3C6"), H-3C8("3C8"), 및 이로부터 유래된 항체를 제공한다.
- [0249] 1H2 및 1H2 유래 항체(예를 들어, 인간 항체)에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 7-9, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. CDR은 코티아 체계에 의해 정의될 수도 있다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 22-24에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0250] 유사하게, 2B2 및 2B2 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 10-12, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 25-27에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0251] 3E5 및 3E5 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 13-15, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 28-30에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0252] 3C6 및 3C6 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 16-18, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 31-33에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0253] 3C8 및 3C8 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 19-21, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 34-36에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0254] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 서열번호: 7-9, 서열번호: 10-12, 서열번호: 13-15, 서열번호: 16-18, 서열번호: 19-21, 서열번호: 22-24, 서열번호: 25-27, 서열번호: 28-30, 서열번호: 31-33 및 서열번호: 34-36의 군으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR; 및/또는 서열번호: 1-3 및 서열번호: 4-6의 군으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 함유할 수 있다.
- [0255] 일부 실시양태에서, 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 CDR 1, 2, 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다. 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열 및 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 **도 8**(카바트 CDR) 및 **도 9**(코티아 CDR)에 나타나 있다.



또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 6의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0268] 삽입, 결실 및 치환은 CDR 서열 내에서 또는 CDR 서열의 종결 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 발생할 수 있다.

[0269] 또한, 본 개시내용은 HER2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역(VL)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 서열번호: 38, 39, 40, 41, 또는 42이고, 선택된 VL 서열은 서열번호: 37이다.

[0270] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 설명된 임의의 VH 서열의 CDR과 동일한 3개의 VH CDR을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 설명된 임의의 VL 서열의 CDR과 동일한 3개의 VL CDR을 가질 수 있다.

[0271] 또한, 본 개시내용은 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 제공한다. 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄는 **도 8** 또는 **도 9**에서 나타난 바와 같은 CDR을 포함하거나, **도 10**에서 나타난 바와 같은 서열을 갖는다. 폴리펩티드가 상응하는 폴리펩티드 (예를 들어, 상응하는 중쇄 가변 영역 또는 상응하는 경쇄 가변 영역)와 쌍을 이루는 경우, 쌍을 이루는 폴리펩티드는 HER2(예를 들어, 인간 HER2)에 결합한다.

[0272] 항-HER2 항체 및 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항체 단편 및 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체 또는 항체 단편의 항체 변이체(유도체 및 접합체 포함)일 수 있다. 본원에서 제공되는 추가 항체는 다중클론, 단일클론, 다중특이적(다합체, 예를 들어, 이중특이적), 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단쇄 항체, 세포 내 제조 항체(즉, 인트라바디) 및 이의 항원-결합 단편이다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 클래스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 IgG 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0273] 항체 단편은 전장 항체의 목적하는 친화도 및 특이성을 유지하는 한 제공되는 방법에서 사용하기에 적합하다. 따라서, HER2에 결합하는 항체 단편은 HER2에 결합하는 능력을 유지할 것이다. Fv 단편은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은, 예를 들어, scFv에서 자연적으로 공유 결합될 수 있는, 밀착 결합된 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 구성에서, 각 가변 도메인의 3개 CDR이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면에 있는 항원 결합 부위를 정의한다. 종합적으로, 6개의 CDR 또는 이의 서브세트는 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)조차도 일반적으로 전체 결합 부위보다 친화도가 낮음에도 불구하고 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가질 수 있다.

[0274] **항-TROP2 항체 및 항원 결합 단편**

[0275] 종양 관련 칼슘 신호 변환기 2(TACSTD2)로도 알려진 영양막 세포 표면 항원 2(TROP2)는 TACSTD2 유전자에 의해 코딩되고 발현되는 세포 표면 당단백질이다. 이는 상피 접착 분자 Epcam과 높은 구조적 서열 유사성을 가지고 있다. TROP2는 종양과 밀접한 관련이 있는 단백질이다. 이는 주로 칼슘 이온 신호 전달 경로, 사이클린 발현을 조절하고 피브로넥틴 접착을 감소시켜 종양 세포 성장, 증식 및 전이를 촉진한다. 연구에 따르면 TROP2 단백질은 유방암, 결장암, 방광암, 위암, 구강 편평 세포 암종 및 난소암에서 높게 발현되는 것으로 나타났다. 단백질은 종양 세포 증식, 침습, 전이, 확산 및 기타 과정을 촉진할 수 있다. 또한, 유방암 및 기타 암에서 TROP2의 높은 발현은 보다 공격적인 질환 및 종양의 불량한 임상 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0276] 본 개시내용은 TROP2에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 항-HER2/TROP2 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 이들 항체로부터 유래된 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0277] 본원에 설명된 항체 및 항원-결합 단편은 TROP2에 결합할 수 있다. 본 개시내용은 항-TROP2 항체 T-3A4("3A4"), T-4B9("4B9") 및 T-6F7("6F7"), 및 이로부터 유래된 항체를 제공한다.

[0278] 3A4 및 3A4 유래 항체(예를 들어, 인간 항체)에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 43 내지 45, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1 내지 3을 포함한다. CDR은 코티아 체계에 의해 정의될 수도 있다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은

서열번호: 52-54에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.

- [0279] 유사하게, 4B9 및 4B9 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 46-48, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 55-57에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0280] 6F7 및 6F7 유래 항체에 대한 CDR 서열은 카바트 번호 체계에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 49-51, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열번호: 1-3을 포함한다. 코티아 번호 체계하에서 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열번호: 58-60에 제시되어 있으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열번호: 4-6에 제시되어 있다.
- [0281] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 서열번호: 43-45, 서열번호: 46-48, 서열번호: 49-51, 서열번호: 52-54, 서열번호: 55-57, 서열번호: 58-60의 군으로부터 선택된 하나, 둘, 또는 세 개의 중쇄 가변 영역 CDR; 및/또는 서열번호: 1-3, 서열번호: 4-6의 군으로부터 선택된 하나, 둘, 또는 세 개의 경쇄 가변 영역 CDR을 함유할 수 있다.
- [0282] 일부 실시양태에서, 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)이되, CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 CDR 1, 2, 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)이되, CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다. 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열 및 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 **도 11**(카바트 CDR) 및 **도 12**(코티아 CDR)에 나타내었다.
- [0283] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 43; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 44; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 45의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0284] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 46; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 47; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 48의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0285] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 49; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 50; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 51의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0286] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 52; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 53; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 54의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0287] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 55; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 56; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 57의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0288] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 58; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 59; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 60의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중

쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

- [0289] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 1; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 2; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 3의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0290] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 4; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 5; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열번호: 6의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.
- [0291] 삽입, 결실 및 치환은 CDR 서열 내에서 또는 CDR 서열의 종결 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 발생할 수 있다.
- [0292] 또한, 본 개시내용은 TROP2에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역(VL)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열이 서열번호: 61, 62, 및 63이고, 선택된 VL 서열이 서열번호: 37이다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 설명된 임의의 VH 서열의 CDR과 동일한 3개의 VH CDR을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 설명된 임의의 VL 서열의 CDR과 동일한 3개의 VL CDR을 가질 수 있다.
- [0294] 또한, 본 개시내용은 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 제공한다. 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄는 **도 11** 또는 **도 12**에서 나타낸 바와 같은 CDR을 포함하거나, **도 13**에서 나타낸 바와 같은 서열을 갖는다. 폴리펩티드가 상응하는 폴리펩티드(예를 들어, 상응하는 중쇄 가변 영역 또는 상응하는 경쇄 가변 영역)와 쌍을 이루는 경우, 쌍을 이루는 폴리펩티드는 TROP2에 결합한다.
- [0295] 항-TROP2 항체 및 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항체 단편 및 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체 또는 항체 단편의 항체 변이체(유도체 및 접합체 포함)일 수 있다. 본원에서 제공되는 추가 항체는 다중클론, 단일클론, 다중특이적(다합체, 예를 들어, 이중특이적), 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단쇄 항체, 세포 내 제조 항체(즉, 인트라바디) 및 이의 항원-결합 단편이다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 클래스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 IgG 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0296] 항체 단편은 전장 항체의 목적하는 친화도 및 특이성을 유지하는 한 제공되는 방법에서 사용하기에 적합하다. 따라서, TROP2에 결합하는 항체 단편은 TROP2에 결합하는 능력을 유지할 것이다. Fv 단편은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은, 예를 들어, scFv에서 자연적으로 공유 결합될 수 있는, 밀착 결합된 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 구성에서, 각 가변 도메인의 3개 CDR이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면에 있는 항원 결합 부위를 정의한다. 종합적으로, 6개의 CDR 또는 이의 서브세트는 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)조차도 일반적으로 전체 결합 부위보다 친화도가 낮음에도 불구하고 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가질 수 있다.
- [0297] **항체, 항원-결합 단편 및 항원-결합 단백질 작제물**
- [0298] 본 개시내용은 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)을 제공한다. 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 항-HER2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 이들 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체), 항-HER2 항체, 항-TROP2 항체 및 이의 항원-결합 단편은 다양한 형태를 가질 수 있다.
- [0299] 일반적으로 항체(면역글로불린이라고도 함)는 두 가지 종류의 폴리펩티드 사슬, 즉 경쇄와 중쇄로 구성될 수 있다. 본 개시내용의 항체의 비제한적인 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 온전한 4개의 면역글로불린 사슬 항체일 수 있다. 항체의 중쇄는 IgM, IgG, IgE, IgA 또는 IgD를 포함하는 임의의 동중형이거나 IgG1,

IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE1, IgE2 등을 포함하는 하위 동종형일 수 있다. 경쇄는 카과 경쇄 또는 램다 경쇄일 수 있다. 항체는 2개의 동일한 경쇄 복사본과 2개의 동일한 중쇄 복사본을 포함할 수 있다. 각각 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, VH) 및 다수의 불변 도메인(또는 불변 영역)을 함유하는 중쇄는 불변 도메인 내에서 이황화 결합을 통해 서로 결합하여 항체의 "줄기"를 형성한다. 각각 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, VL) 및 하나의 불변 도메인(또는 불변 영역)을 함유하는 경쇄는 각각 이황화 결합을 통해 하나의 중쇄에 결합한다. 각 경쇄의 가변 영역은 결합되는 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 경쇄 및 중쇄 모두의 가변 영역은 보다 보존된 프레임워크 영역(FR) 사이에 끼워진 3개의 초가변 영역을 함유한다.

[0300] 상보성 결정 영역(CDR)으로 알려진 이러한 초가변 영역은 항체의 주요 항원 결합 표면을 구성하는 루프를 형성한다. 4개의 프레임워크 영역은 주로 베타 병풍 구조를 채택하고 CDR은 연결되어 일부 경우 베타 병풍 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 사슬의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 근접하게 유지되며 다른 사슬의 CDR과 함께 항원 결합 영역의 형성에 기여한다.

[0301] 항체의 아미노산 서열을 분석하여 항체의 CDR 영역을 식별하는 방법은 널리 알려져 있으며, CDR에 대한 여러 가지 정의가 일반적으로 사용된다. 카바트 정의는 서열 가변성을 기반으로 하며 코티아 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 한다. 이러한 방법 및 정의는, 예를 들어, Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," *Antibody engineering*, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan 외, "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains," *Molecular immunology* 45.14 (2008): 3832-3839; Wu, T.T. 및 Kabat, E.A. (1970) *J. Exp. Med.* 132: 211-250; Martin 외, *Methods Enzymol.* 203:121-53 (1991); Morea 외, *Biophys Chem.* 68(1-3):9-16 (Oct. 1997); Morea 외, *J Mol Biol.* 275(2):269-94 (Jan .1998); Chothia 외, *Nature* 342(6252):877-83 (Dec. 1989); Ponomarenko 및 Bourne, *BMC Structural Biology* 7:64 (2007)에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0302] CDR은 항원의 에피토프를 인식하는 데 중요하다. 본원에서 사용되는 "에피토프"는 항체의 항원 결합 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 표적 분자의 가장 작은 부분이다. 에피토프의 최소 크기는 약 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산일 수 있으나, 에피토프가 항원의 2차 및 3차 구조에 기초한 항원의 3차원 배열에 의존할 수 있기 때문에 이러한 아미노산은 항원의 1차 구조의 연속적인 선형 서열에 있을 필요는 없다.

[0303] 일부 실시양태에서, 항체는 온전한 면역글로불린 분자(예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA)이다. IgG 하위 클래스(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)는 고도로 보존되어 있으며 불변 영역, 특히 힌지 및 상위 CH2 도메인이 상이하다. IgG 서브클래스의 서열 및 차이점은 당업계에서 알려져 있고, 예를 들어, Vidarsson 외, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." *Frontiers in immunology* 5 (2014); Irani 외, "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases." *Molecular immunology* 67.2 (2015): 171-182; Shakib, Farouk, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation.* Elsevier, 2016에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0304] 항체는 또한 임의의 종(예를 들어, 인간, 설치류, 마우스, 래트, 낙타류)으로부터 유래된 면역글로불린 분자일 수 있다. 본원에 개시된 항체는 또한 다중클론, 단일클론, 단일특이적, 다중특이적 항체 및 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 키메라 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항원 결합 도메인 또는 항원-결합 단편은 온전한 항체의 특이적 결합 활성을 유지하는 항체의 일부, 즉 온전한 항체 표적 분자의 에피토프에 특이적 결합을 할 수 있는 항체의 임의의 부분이다. 이는, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 이러한 단편의 변이체를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 예를 들어 scFv, Fv, Fd, dAb, 이중특이적 항체, 이중특이적 scFv, 디아바디, 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 및 항체 결합 도메인이거나 이와 상동성인 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 항원 결합 도메인의 비제한적인 예는, 예를 들어, 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR, 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역, 온전한 항체의 전장 중쇄 또는 경쇄 또는 온전한 항체의 중쇄 또는 경쇄로부터의 개별 CDR을 포함한다.

[0305] 일부 실시양태에서, 해당 scFV는 2개의 중쇄 가변 도메인과 2개의 경쇄 가변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, scFV는 2개의 항원 결합 영역(항원 결합 영역: A 및 B)을 갖고, 두 개의 항원 결합 영역은 상이한 친화도로 각각의 표적 항원에 결합할 수 있다.

[0306] 일부 실시양태에서, 해당 항원-결합 단편은 키메라 항원 수용체(CAR)의 일부를 형성할 수 있다. 일부 실시양태

에서, 해당 키메라 항원 수용체는 CD3 제타 막관통 및 엔도도메인에 융합되는, 본원에 설명된 단쇄 가변 단편(scFv)의 융합체이다. 일부 실시양태에서, 해당 키메라 항원 수용체는 또한 다양한 공동자극 단백질 수용체(예를 들어, CD28, 41BB, ICOS)로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 해당 키메라 항원 수용체는 효능을 증가시키기 위해 다중 신호전달 도메인, 예를 들어, CD3z-CD28-41BB 또는 CD3z-CD28-OX40을 포함한다. 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 바와 같은 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포(예를 들어, T 세포)를 추가로 제공한다.

[0307] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 두 개의 상이한 항원 또는 두 개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0308] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 도 8, 9, 11 및 12로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 도 8, 9, 11 및 12로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함할 수 있다.

[0309] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 치료제에 접합될 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는 치료제에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해당 치료제는 세포독성제(cytotoxic agent) 또는 세포증식억제제(cytostatic agent)(예를 들어, 모노메틸 아우리스타틴 E, 모노메틸 아우리스타틴 F, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 마이토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 다이하이드록시 안트라신, 메이탄시노이드, 예컨대 DM-1 및 DM-4, 다이온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 푸로마이신, 에피루비신 및 사이클로포스파미드 및 유사체)이다.

[0310] 항체의 다합체화는 항체의 자연적 응집을 통해 또는 당업계에 알려진 화학적 또는 제조법 연결 기법을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 정제된 항체 제제(예를 들어, 정제된 IgG1 분자)의 일부 백분율은 항체 동종이량체 및 다른 고차 항체 다합체를 함유하는 단백질 응집체를 자발적으로 형성한다.

[0311] 일부 실시양태에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 제조법 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화하기 위해 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체하여 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "공동"이 제2 항체 분자의 경계면에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다. 이러한 방법은, 예를 들어, WO 96/27011에서 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 포함된다.

[0312] 본원에 설명된 임의의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 안정화 분자(예를 들어, 대상체 또는 용액에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 반감기를 증가시키는 분자)에 접합될 수 있다. 안정화 분자의 비제한적인 예는 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글라이콜) 또는 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민)을 포함한다. 안정화 분자의 접합은 시험관 내(예를 들어, 조직 배양물 내 또는 약제학적 조성물로서 저장되는 경우) 또는 생체 내(예를 들어, 인간 내)에서 항체 또는 항원-결합 단편의 반감기를 증가시키거나 생물학적 활성을 연장시킬 수 있다.

[0313] 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 또한 다양한 형태를 가질 수 있다. 항원 결합 작제물의 많은 상이한 형식이 당업계에 공지되어 있으며 전체 내용이 참조로 본원에 포함되는, 예를 들어 (Suurs 외) "A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges," Pharmacology & therapeutics (2019)에서 설명되어 있다.

[0314] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 BiTe, (scFv)<sub>2</sub>, 나노바디, 나노바디-HSA, DART, TandAb, scDiabody, scDiabody-CH3, scFv-CH-CL-scFv, HSABody, scDiabody-HAS, 또는 탠덤-scFv이다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 VHH-scAb, VHH-Fab, 이중 scFab, F(ab')<sub>2</sub>, 디아바디, 교차Mab, DAF(2 IN 1), DAF(4 IN 1), DutaMab, DT-IgG, 노브-인-홀 공통 경쇄, 노브-인-홀 어셈블리, 전하쌍, Fab-팔 교환, SEED바디, LUZ-Y, Fcab, a κ λ-바디, 직교 Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG,



IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFv, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG, 디아바디-CH3, 삼중 바디, 미니항체, 미니바디, TriBi 미니바디, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, F(ab')<sub>2</sub>-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HCAB, sc디아바디-Fc, 디아바디-Fc, 탠덤 scFv-Fc, 인트라바디, 도크 및 락, ImmTAC, IgG-IgG 접합체, a Cov-X-바디, 또는 scFv1-PEG-scFv2이다.

- [0315] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 TrioMab일 수 있다. TrioMab에서 두 개의 중쇄는 상이한 종에서 유래되며, 여기서 상이한 서열은 중쇄-경쇄 쌍을 제한한다.
- [0316] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 두 개의 상이한 중쇄 및 하나의 공통 경쇄를 갖는다. 중쇄의 이종이량체화는 노브-인-홀(knob-in-holes) 또는 일부 다른 중쇄 쌍 기법을 기반으로 할 수 있다.
- [0317] 일부 실시양태에서, CrossMab 기법을 사용하여 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. CrossMab 기법은 이중특이성 이종이량체 IgG 항체에서 정확한 경쇄 결합을 시행하는 데 사용될 수 있으며, 이 기법은 bi-(1+1), tri-(2+1) 및 tetra-(2+2) 가 이중특이성 항체뿐만 아니라 비-Fc 탠덤 항원-결합 단편 (Fab)-기반 항체를 포함하는 다양한 이중특이성 항체 형식의 생성을 허용한다. 이러한 형식은 일반적인 경쇄 식별, 번역 후 처리/시험관내 화학 조립 또는 올바른 경쇄 결합을 시행하는 돌연변이 세트의 도입 없이 도메인 교차를 사용하여 기존 항체 쌍에서 파생될 수 있다. 이 방법은 Klein 외, "The use of CrossMab technology for the generation of bi-and multispecific antibodies." MABs. Vol. 8. No. 6. Taylor & Francis, 2016에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 일부 실시양태에서, 중쇄의 CH1과 경쇄의 CL 도메인은 교환된다.
- [0318] 항원-결합 단백질 작제물은 듀오바디(Duobody)일 수 있다. IgG4 항체에서 자연적으로 발생하는 Fab 교환 메커니즘은 제어된 Fab 교환이라는 메커니즘인 IgG1 항체의 제어된 물질에서 모방된다. 이 형식은 중쇄-경쇄 간의 특정 페어링을 보장할 수 있다.
- [0319] 이중 가변 도메인 항체(DVD-Ig)에서는 이중특이적 표적화를 위해 추가 VH 및 가변 경쇄(VL) 도메인이 각 N 말단에 추가된다. 이 형식은 IgG-scFv와 유사하지만 추가된 결합 도메인은 각 중쇄 N-말단에 대한 scFv 대신 해당 N-말단에 개별적으로 결합된다.
- [0320] scFv-IgG에서는 두 scFv가 중쇄(CH3)의 C-말단에 연결된다. scFv-IgG 형식은 두 개의 상이한 2가 결합 부위를 가지며 결과적으로 4가라고도 한다. scFv-IgG에는 중쇄와 경쇄 쌍 문제가 없다.
- [0321] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 IgG-IgG 형식을 가질 수 있다. 2개의 온전한 IgG 항체는 중쇄의 C-말단을 화학적으로 연결함으로써 접합된다.
- [0322] 항원-결합 단백질 작제물은 또한 Fab-scFv-Fc 형식을 가질 수 있다. Fab-scFv-Fc 형식에서는 경쇄, 중쇄, 그리고 Fc 영역과 scFv를 함유하는 제3 사슬이 조립된다. 이는 효율적인 제조 및 정제를 보장할 수 있다.
- [0323] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 TF일 수 있다. 세 개의 Fab 단편이 이황화 가교로 연결되어 있다. 두 개의 단편은 중앙 관련 항원(TAA)을 표적으로 삼고, 한 개의 단편은 합텐(hapten)을 표적으로 한다. TF 형식에는 Fc 영역이 없다.
- [0324] ADAPTIR에는 Fc 영역의 각 측면에 결합된 두 개의 scFv가 있다. 이는 구성의 기초로서 온전한 IgG를 포기하지만 반감기를 연장하고 정제를 촉진하기 위해 Fc 영역을 보존한다.
- [0325] 이중특이적 T 세포 인계이저(Bispecific T cell Engager, "BiTE")는 하나의 펩티드 사슬상에 있는 두 개의 scFv, VLA VHA 및 VHB VLB로 구성된다. 이는 결합 도메인만 있고 Fc 영역이 없다.
- [0326] BiTE-Fc에서는 Fc 영역이 BiTE 작제물에 융합된다. Fc 영역을 추가하면 반감기가 향상되어 지속적인 IV를 피하면서 유효 농도가 길어진다.
- [0327] DART(이중 친화성 재표적화)에는 반대쪽 단편을 연결하는 두 개의 펩티드 사슬이 있어서, VLA는 VHB와, VLB는 VHA와 융합되며 C 말단의 황 결합이 서로 융합된다. DART에서 황 결합은 BiTE에 비해 안정성을 개선할 수 있다.
- [0328] DART-Fc에서는 Fc 영역이 DART 구조에 부착된다. 이는 DART와 마찬가지로 이황화 결합을 통해 두 개, 세 개의 사슬을 조립하여 생성될 수 있다. 한 사슬에는 제3 사슬과 이합체화되는 Fc 영역의 절반이 함유되어 있으며 Fc 영역만 발현된다. Fc 영역을 추가하면 반감기가 향상되어 지속적인 IV를 피하면서 유효 농도가 길어진다.
- [0329] 4가 DART에서는 4개의 펩티드 사슬이 조립된다. 기본적으로 두 개의 DART 분자는 Fc 영역의 절반으로 생성되어 이합체화된다. 이 형식은 두 표적 모두에 2가 결합을 가지므로 4가 분자이다.

- [0330] 탠덤 디아바디(TandAb)는 두 개의 디아바디로 구성된다. 각 디아바디는 공유 결합된 VHA 및 VLB 단편과 VHA 및 VLB 단편으로 구성된다. 두 개의 디아바디는 펩티드 사슬로 연결되어 있다. 이는 두 개의 scFv로 구성된 디아바디에 대한 안정성을 개선할 수 있다. 이는 두 개의 2가 결합 부위를 가진다.
- [0331] ScFv-scFv-독소는 독소 및 안정화 링커가 있는 2개의 scFv를 포함한다. 이는 특정 페이로드 전달에 사용될 수 있다.
- [0332] 모듈식 scFv-scFv-scFv에서 TAA에 대한 하나의 scFv는 짧은 인식 가능한 펩타이드로 태그가 지정되어 두 개의 scFv로 구성된 bsAb로 조립되며, 하나는 CD3에 대한 것이고 다른 하나는 인식 가능한 펩티드에 대한 것이다.
- [0333] ImmTAC에서는 안정화되고 가용성인 T 세포 수용체가 CD3를 인식하는 scFv에 융합된다. TCR을 사용함으로써 ImmTAC는 가공된 단백질, 예를 들어 세포 내 단백질을 표적으로 삼는 데 적합하다.
- [0334] 삼중특이적 나노바디에는 반감기 연장을 위한 추가 모듈과 함께 두 개의 단일 가변 도메인(나노바디)이 있다. 반감기를 향상시키기 위해 추가 모듈이 추가되었다.
- [0335] TriKE(TriKE)에서는 2개의 scFv가 인간 IL-15를 포함하는 폴리펩티드 링커를 통해 연결된다. NK의 생존과 증식을 증가시키기 위해 IL-15에 대한 링커가 추가된다.
- [0336] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질 작제물은 이중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 1+1(각 표적에 대해 1가)이 되도록 설계되고 IgG1 하위유형 구조를 갖는다. 이는 HER2 및 TROP2의 발현 수준이 낮은 세포에 대한 결합력을 감소시키고, HER2 및 TROP2를 공동 발현하는 세포에 대한 결합력을 증가시켜 향상된 표적화 기능을 달성할 수 있다. 돌연변이 S239D 및/또는 I332E(SI 돌연변이)는 또한 Fc $\gamma$ RIIIA에 대한 항체 친화도를 향상시키기 위해 항체 중쇄에 도입될 수 있다.
- [0337] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원 결합 단편, 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체) 또는 관련 항체 약물 접합체(ADC)는 서열번호: 80과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 불변 영역, 및 서열번호: 81 또는 서열번호: 82와 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 불변 영역을 갖는다.
- [0338] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 공통 경쇄를 갖는다.
- [0339] **항체 약물 접합체(ADC)**
- [0340] 본원에 설명된 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 치료제(약물)에 접합될 수 있다. 치료제는 항체 또는 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 공통 경쇄를 갖는다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 해당 치료제는 세포독성제(cytotoxic agent) 또는 세포증식억제제(cytostatic agent)(예를 들어, 모노메틸 아우리스타틴 E, 모노메틸 아우리스타틴 F, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 마이토마이신, 에토포사이드, 테도포사이드, 빈크리стин, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 다이하이드록시 안트라신, 메이탄시노이드, 예컨대 DM-1 및 DM-4, 다이온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 푸로마이신, 에피루비신 및 사이클로포스파미드 및 유사체)이다. 세포독성제, 세포증식억제제 또는 면역조절제의 유용한 부류에는, 예를 들어 항류블린제, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 복제 억제제 및 알킬화제가 포함된다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 치료제는 화학치료제, 면역치료제 등과 같은 세포독성 시약, 항바이러스제 또는 항미생물제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 접합될 치료제는 MMAE(모노메틸 아우리스타틴 E), MMAD(모노메틸 아우리스타틴 D) 또는 MMAF(모노메틸 아우리스타틴 F)로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0343] 일부 실시양태에서, 치료제는 아우리스타틴 E(돌라스타틴-10의 유도체로도 공지되어 있음) 또는 이의 유도체와 같은 아우리스타틴이다. 아우리스타틴은, 예를 들어 아우리스타틴 E와 케토산 사이에 형성된 에스테르일 수 있다. 예를 들어, 아우리스타틴 E는 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응하여 각각 AEB 및 AEVB를 생성할 수 있다. 다른 전형적인 아우리스타틴에는 AFP, MMAF 및 MMAE가 포함된다. 예시적인 아우리스타틴의 합성 및

구조는 미국 특허 출원 공개 제2003-0083263호; 국제 특허 공개 제WO 04/010957호, 국제 특허 공개 제WO 02/088172호, 및 미국 특허 제7,498,298호, 제6,884,869호, 제6,323,315호; 제6,239,104호; 제6,034,065호; 제5,780,588호; 제5,665,860호; 제5,663,149호; 제5,635,483호; 제5,599,902호; 제5,554,725호; 제5,530,097호; 제5,521,284호; 제5,504,191호; 제5,410,024호; 제5,138,036호; 제5,076,973호; 제4,986,988호; 제4,978,744호; 제4,879,278호; 제4,816,444호; 및 제4,486,414호에 설명되어 있고, 각각은 그 전체 내용은 모든 목적을 위해 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0344] 아우리스타틴은 미세소관 역학과 핵 및 세포 분열을 방해하고 항암 활성을 갖는 것으로 나타났다. 아우리스타틴은 튜불린과 결합하여 암세포에 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 발휘할 수 있다. 아우리스타틴 또는 생성된 항체-약물 접합체가 목적하는 세포에 대해 세포증식억제 또는 세포독성 효과를 발휘하는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있는, 당업계에서 공지된 다수의 상이한 검정이 있다.

[0345] 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN<sup>TM</sup>); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프루술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스파오르아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌아민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 펜스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로수레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아제린, 블레오마이신, 각티노마이신, 칼라케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 마이토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항-대사물질; 테노프테린, 메토티렉세이트, 프테린, 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모피, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루오리딘, 엔오시타빈, 플록시우리딘, 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리코스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프로린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트랙세이트; 테포아민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘타티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토잔트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK7; 라즈옥산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2',2',2'-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈데인신; 다카르바진; 만무스틴; 미토브로니톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁센, 예컨대 파실리락셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 독세탁셀(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 잼시타빈; 6-티오구아닌; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 마이토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 하나의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한, 이 정의에는 중앙 상에서 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬 작용제, 예컨대, 예를 들어, 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(파레스톤)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 항-안드로겐, 예컨대, 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기 중 임의의 하나의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다. 화학요법제의 상세한 설명은, 예를 들어 US20180193477A1에서 찾아볼 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0346] 일부 실시양태에서, 항원 결합 구조체는 절단 가능한 링커, 예를 들어 SPBD 링커 또는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(VC) 링커를 통해 약물에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물은 비절단성 링커, 예를 들어 SMCC 또는 설폰-SMCC를 사용하여 형성된 MCC 링커를 통해 약물에 커플링된다. 주어진 ADC에 대한 적절한 링커의 선택은 당업자가 항원 결합 작제물에 대한 부착 부위, 약물의 임의의 구조적 제약 및 약물의 소수성과 같은 관련 인자를 고려하여 용이하게 수행할 수 있다(예를 들어 Nolting, 5장,

Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, 2013, Ducry (Ed.), Springer의 검토 참조). 다수의 특정 링커-독소 조합이 설명되어 있으며 특정 실시양태에서 ADC를 제조하기 위해 본원에 설명된 항원 결합 작제물과 함께 사용될 수 있다. 예시는 아우리스타틴, 예컨대 MMAE 및 MMAF, 캄토테신, 예컨대 SN-38, 듀오카르마이신 및 PBD 이량체를 갖는 절단 가능한 펩티드-기반 링커; 아우리스타틴 MMAF 및 MMAE를 갖는 비-절단 가능한 MC-기반 링커; 칼리케아미신 및 독소투비신을 갖는 산-불안정성 히드라존-기반 링커; 메이탄시노이드, 예컨대 DM1 및 DM4 및 메이탄시노이드 DM1을 갖는 비스-말레이미도-트리옥시에틸렌 글라이콜(BMPEO)-기반 링커를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 이러한 치료제 및 링커는, 예를 들어 Peters & Brown, (2015) Biosci. Rep. e00225; Dosio 외, (2014) Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 9:35-65; 미국 특허 공개 제 US 2015/0374847호 및 제US20180193477A1호에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0347] 목적하는 약물 및 선택된 링커에 따라, 당업자는 이들을 서로 결합시키기 위한 적합한 방법을 선택할 수 있다. 예를 들어, 아민 커플링 방법과 같은 일부 통상적인 커플링 방법을 사용하여 공유 결합을 통해 항체에 접합하기 위한 반응성 기를 여전히 함유하는 목적하는 약물-링커 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물-말레이미드 복합체(즉, 말레이미드 연결 약물)가 본 개시내용의 페이로드 보유 반응성 기를 위해 사용될 수 있다. ADC 제조 시 티올기와 결합할 수 있는 가장 일반적인 반응기는 말레이미드이다. 또한 유기 브롬화물, 요오드화물도 자주 사용된다.

[0348] ADC는 당업자에게 알려진 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 당업계에 공지된 여러 경로 중 하나에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, Bioconjugate Techniques(G. T. Hermanson, 2013, Academic Press) 참조). 예를 들어, 접합은 (1) 항체의 친핵성 기 또는 친전자성 기와 2가 링커 시약의 반응에 의해, 공유 결합을 통해 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성한 후, 이어서 활성화된 약물 모이어티 D와 반응하거나; 또는 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기 또는 친전자성 기와 링커 시약의 반응에 의해, 공유 결합을 통해 약물-링커 중간체 D-L을 형성한 후, 이어서 항체의 친핵성 기 또는 친전자성 기와 반응함으로써 달성될 수 있다. 본원에 설명된 ADC를 준비하기 위해 다양한 항체, 약물 모이어티 및 링커와 함께 접합 방법(1)과 (2)를 사용할 수 있다. 다양한 제조된 링커, 링커 성분 및 독소는 시판되거나 표준 합성 유기 화학 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 March's Advanced Organic Chemistry(Smith & March, 2006, Sixth Ed., Wiley); Toki 외, (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Frisch 외, (1997) Bioconj. Chem. 7:180-186; Bioconjugate Techniques(G.T. Hermanson, 2013, Academic Press); US20210379193A1 및 US20180193477A1에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 또한, 선택된 항원 결합 작제물과의 반응에 적합한 다수의 미리 형성된 약물-링커가 또한 상업적으로 입수 가능하며, 예를 들어, DM1, DM4, MMAE, MMAF 또는 듀오카르마이신 SA를 포함하는 링커-독소는 Creative BioLabs (Shirley, N.Y.)로부터 입수 가능하다.

[0349] ADC를 제조하는 방법의 몇 가지 구체적인 예는 당업계에 공지되어 있으며 미국 특허 제8,624,003호(포트법), 미국 특허 제8,163,888호(1단계), 미국 특허 제5,208,020호(2단계 방법) 및 US20180193477A1에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 다른 방법은 당업계에 공지되어 있으며, Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, 2013, Ducry (Ed.), Springer에 설명된 방법을 포함한다.

[0350] 약물 로딩은 ADC 분자 내 항체당 약물 모이어티의 수로 표시된다. 일부 항체-약물 접합체의 경우 약물 로딩은 항체의 부착 부위 수에 따라 제한될 수 있다. 예를 들어, 본원에 설명된 특정한 예시적인 실시양태에서와 같이 부착이 시스테인 티올인 경우, 약물 로딩은 항체당 0-8개의 약물 모이어티 범위일 수 있다. 특정 실시양태에서, 더 높은 약물 로딩, 예를 들어  $p \geq 5$ 는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성 또는 세포 투과성 손실을 유발할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체-약물 접합체에 대한 평균 약물 로딩 범위는 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 또는 약 3 내지 약 5일 수 있다. 실제로, 특정 항체-약물 접합체의 경우 항체당 약물 모이어티의 최적 비율은 약 4일 수 있는 것으로 나타났다. 일부 실시양태에서, DAR은 약 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8이다. 일부 실시양태에서, 조성물 중 평균 DAR은 약 1 내지 약 2, 약 2 내지 약 3, 약 3 내지 약 4, 약 4 내지 약 5, 약 5 내지 약 6, 약 6 내지 약 7, 또는 약 7 내지 약 8이다.

[0351] **항체 및 ADC 특성**

[0352] 항-HER2 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항체, 이중특이적 항체 또는 이의 항체 단편) 또는 이로부터 유래된 ADC는 본원에 설명된 바와 같은 임의의 항-HER2 항체 또는 이의 임의의 항원-결합 단편으로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함할 수 있다.

[0353] 항원에 대한 항체의 친화도를 측정하기 위해 사용될 수 있는 일반적인 기법은, 예를 들어 ELISA, RIA 및 표면

플라스몬 공명(SPR)을 포함한다. 동역학적 속도 상수(KD=koff/ka)의 몫으로부터 친화도를 추론할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 0.1 s<sup>-1</sup> 미만, 0.01 s<sup>-1</sup> 미만, 0.001 s<sup>-1</sup> 미만, 또는 0.0001 s<sup>-1</sup> 미만의 해리 속도(koff)로 ERBB2(예를 들어, 인간 HER2, 개 ERBB2, 원숭이 ERBB2, 및/또는 마우스 ERBB2)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해리 속도(koff)는 0.01s<sup>-1</sup> 초과, 0.001 s<sup>-1</sup> 초과, 0.0001s<sup>-1</sup> 초과 또는 0.00001s<sup>-1</sup> 초과이다. 일부 실시양태에서, 해리 속도(koff)는 7 x 10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup> 미만이다.

[0354] 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(ka)는 1 x 10<sup>2</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>3</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>4</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>5</sup>/Ms 초과 또는 1 x 10<sup>6</sup>/Ms 초과이다. 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(ka)는 1 x 10<sup>5</sup>/Ms 미만, 1 x 10<sup>6</sup>/Ms 미만, 또는 1 x 10<sup>7</sup>/Ms 미만이다. 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(ka)은 1.3 x 10<sup>5</sup>/Ms 초과이다.

[0355] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 1 x 10<sup>-6</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-7</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-8</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-9</sup> M 미만 또는 1 x 10<sup>-10</sup> M 미만의 KD로 ERBB2(예를 들어, 인간 HER2, 개 ERBB2, 원숭이 ERBB2, 및/또는 마우스 ERBB2)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, KD는 5nM, 4 nM, 3nM, 2nM, 또는 1nM 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 1 x 10<sup>-7</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-8</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-9</sup> M 초과, 또는 1 x 10<sup>-10</sup> M 초과이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 HER2에 약 5nM, 4.5nM, 4nM, 3nM 또는 0.27nM 이하의 KD로 결합한다.

[0356] 항-TROP2 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 또한 본원에 설명된 임의의 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함할 수 있다.

[0357] 일부 구현에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 0.1s<sup>-1</sup> 미만, 0.01s<sup>-1</sup> 미만, 0.001s<sup>-1</sup> 미만, 또는 0.0001s<sup>-1</sup> 미만의 해리 속도(koff)로 TROP2(예를 들어, 인간 TROP2, 개 TROP2, 원숭이 TROP2, 및/또는 마우스 TROP2)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해리 속도(koff)는 0.01s<sup>-1</sup> 초과, 0.001 s<sup>-1</sup> 초과, 0.0001s<sup>-1</sup> 초과, 또는 0.00001s<sup>-1</sup> 초과이다.

[0358] 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(ka)는 1 x 10<sup>2</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>3</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>4</sup>/Ms 초과, 1 x 10<sup>5</sup>/Ms 초과 또는 1 x 10<sup>6</sup>/Ms 초과이다. 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(ka)는 1 x 10<sup>5</sup>/Ms 미만, 1 x 10<sup>6</sup>/Ms 미만, 또는 1 x 10<sup>7</sup>/Ms 미만이다.

[0359] 동역학적 속도 상수(KD=koff/ka)의 몫으로부터 친화도를 추론할 수 있다. 일부 실시양태에서, KD는 1 x 10<sup>-6</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-7</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-8</sup> M 미만, 1 x 10<sup>-9</sup> M 미만 또는 1 x 10<sup>-10</sup> M 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM 또는 1nM 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 1 x 10<sup>-7</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-8</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-9</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-10</sup> M 초과, 1 x 10<sup>-11</sup> M 초과, 또는 1 x 10<sup>-12</sup> M 초과이다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 15nM 또는 10nM 이하의 KD로 인간 TROP2에 결합한다.

[0360] 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 TROP2 및 HER2 둘 모두에 결합하기 때문에, TROP2 및 HER2를 모두 발현하는 세포의 경우, 항원-결합 단백질 작제물은 이들 세포에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는다. 결합력은 이들 세포에 대한 항원-결합 단백질 작제물의 결합 친화도를 측정하는 데 사용될 수 있다. 결합력은 개별 비공유 결합 상호작용의 다중 친화력의 축적된 강도이다.

[0361] 열적 안정성도 결정될 수 있다. 본원에 설명된 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체), 또는 이로부터 유래된 ADC는 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95° C 초과 Tm을 가질 수 있다. IgG가 다중-도메인 단백질로서 설명될 수 있기 때문에, 용융 곡선은 때때로 제1 변성 온도 Tm D1 및 제2 변성 온도 Tm D2를 갖는 2개의 전이를 나타낸다. 이들 두 피크의 존재는 종종 각각 Fc 도메인(Tm D1) 및 Fab 도메인(Tm D2)의 변성을 나타낸다. 두 개의 피크가 있는 경우 Tm은 일반적으로 Tm D2를 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원 결합 단편은 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91,

92, 93, 94, 또는 95° C 초과 Tm D1을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 항체 또는 항원 결합 단편은 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95° C 초과 Tm D2를 갖는다. 일부 실시양태에서, Tm, Tm D1, Tm D2는 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95° C 미만이다.

[0362] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 (예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체, 또는 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 세포(예를 들어, NCI-N87 세포 또는 NCI-H292 세포) 작제물은 적어도 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 세포내이입 속도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 세포내이입 속도는 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다.

[0363] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 개 ERBB2, 원숭이 ERBB2, 또는 마우스 ERBB2에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합은 FACS에 의해 결정된 양성 세포의 백분율로 측정된다. 일부 실시양태에서, 양성 세포의 백분율은 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다. 일부 실시양태에서, 양성 세포의 백분율은 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다. 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 개 ERBB2, 원숭이 ERBB2, 또는 마우스 ERBB2에 결합할 수 없다.

[0364] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 개 TROP2, 원숭이 TROP2, 또는 마우스 TROP2에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합은 FACS에 의해 결정된 양성 세포의 백분율로 측정된다. 일부 실시양태에서, 양성 세포의 백분율은 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다. 일부 실시양태에서, 양성 세포의 백분율은 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다. 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는 개 TROP2, 원숭이 TROP2, 또는 마우스 TROP2에 결합할 수 없다.

[0365] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC는, 예를 들어 HPLC로 측정된 경우 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 초과하는 순도를 가진다. 일부 실시양태에서, 항체의 순도는, 예를 들어 HPLC로 측정된 경우 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 미만이다.

[0366] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체), 또는 이로부터 유래된 ADC는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 또는 700(µg/mL)을 초과하는 수율을 갖는다. 일부 실시양태에서, 수율은 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600 또는 700(µg/mL) 미만이다.

[0367] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC의 안정성은 모세관 등전점 포커싱(Capillary Isoelectric Focusing, cIEF) 방법(주성분, 산성 성분 및 알칼리성 성분의 백분율로 표시됨)에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 주성분의 백분율은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 다양한 조건에 적용된 후, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다. 일부 실시양태에서, 조건은 4° C에서 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 저장하는 것, 25° C에서 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 저장하는 것, 또는 40° C에서 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 저장하는 것이다. 일부 실시양태에서, 조건은 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 또는 50회 동안 동결-해동이다. 일부 실시양태에서, 조건은 조성물을 pH3.5에서 약 또는 적어도 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10시간 동안 저장하는 것이다. 일부 실시양태에서, 처리 후, 산성 성분의 백분율

은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다. 일부 실시양태에서, 처리 후, 알칼리성 성분의 백분율은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다. 일부 실시양태에서, 처리 후, 주성분의 백분율은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다. 일부 실시양태에서, 산성 성분의 백분율은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다. 일부 실시양태에서, 알칼리성 성분의 백분율은, 예를 들어 cIEF에 의해 측정 시 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 72.5%, 75%, 77.5%, 80%, 82.5%, 85%, 87.5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 미만이다.

[0368] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체) 또는 이로부터 유래된 ADC의 세포 사멸 능력은(예를 들어, NCI-N87 또는 NCI-H292 세포에서) IC50 (ng/mL)에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, IC50은 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 또는 500000ng/mL 초과이다. 일부 실시양태에서, IC50은 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 또는 500000ng/mL 미만이다.

[0369] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 항-TROP2 항체, 항-HER2 항체 또는 이중특이적 항체), 또는 이로부터 유래된 ADC는 종양 성장 억제 백분율(TGI%)이 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200%를 초과한다. 일부 실시양태에서, 해당 항체의 종양 성장 억제 백분율은 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 미만이다. TGI%는, 예를 들어, 처리 시작 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일, 또는 처리 시작 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월에서 결정될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 종양 성장 억제 백분율(TGI%)은 다음 공식을 사용하여 계산된다:

[0370] 
$$TGI (\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$$

[0371] Ti는 i일 차에 처리군의 평균 종양 부피이다. T0는 0일 차에 처리군의 평균 종양 부피이다. Vi는 i일 차에 대조군의 평균 종양 부피이다. V0는 0일 차에 대조군의 평균 종양 부피이다.

[0372] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 기능성 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 효과기 기능은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 효과기 기능은 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 효과기 기능은 ADCC 및 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, 해당 Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 S239D 및/또는 I332E(SI 돌연변이) 중 하나 또는 둘 모두가 항체 Fc 영역에 도입되어 FcγRIIIA에 대한 항체 친화도를 향상시켜 ADCC 효과를 증가시킨다. SI 돌연변이에 대한 자세한 설명은 US7662925에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0373] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 기능성 Fc 영역을 갖지 않는다. 예를 들어, 해당 항체 또는 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편이다.

[0374] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)은 항체 약물 접합체에 혼입된다.

[0375] **제조합 벡터**

[0376] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 제조합 벡터(예를 들어, 발현 벡터), (즉, 숙주 세포가 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하도록) 제조합 벡터가 도입되는 숙주 세포 및 제조합 기법에 의한 제조합 항체 폴리펩티드 또는 이의 단편의 생성을 제공한다.

[0377] 본원에서 사용되는 "벡터"는 벡터가 숙주 세포에 도입되는 경우 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세

포에 전달할 수 있는 임의의 작제물이다. "발현 벡터"는 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에서 코딩된 폴리펩티드로서 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드를 전달하고 발현할 수 있다. 따라서, 발현 벡터에서, 관심 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에서 또는 관심 폴리뉴클레오티드의 통합 부위 근처에 있는 또는 이에 축적하는 숙주 세포의 게놈에서 프로모터, 인핸서 및/또는 폴리-A 테일과 같은 조절 요소와 작동 가능하게 연결되어 벡터 내에서 발현하도록 배치되어, 관심 폴리뉴클레오티드가 발현 벡터와 함께 도입된 숙주 세포에서 번역될 것이다.

[0378] 벡터는 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 전기천공, 화학적 형질감염(예를 들어, DEAE-덱스트란), 형질전환, 형질감염, 및 감염 및/또는 형질도입(예를 들어, 재조합 바이러스를 사용)에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 따라서, 벡터의 비제한적인 예는 바이러스 벡터(재조합 바이러스를 생성하는 데 사용될 수 있음), 네이키드 DNA 또는 RNA, 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터 및 양이온성 축합제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터를 포함한다.

[0379] 일부 구현에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)는 바이러스 발현 시스템(예를 들어, 백시니아 또는 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스)을 사용하여 도입되며, 이는 비병원성(결함), 복제 적격 바이러스의 사용을 수반할 수 있거나, 복제 결함 바이러스를 사용할 수 있다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 일반적으로 바이러스 패키징 세포를 보완하는 경우에만 발생한다. 적합한 시스템은, 예를 들어, Fisher-Hoch 외, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner 외, 1989, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexner 외, 1990, Vaccine, 8:17-21; 미국 특허 제4,603,112호, 제4,769,330호 및 제5,017,487호; WO 89/01973; 미국 특허 제4,777,127호; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld 외, 1991, Science, 252:431-434; Kolls 외, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler 외, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzman 외, 1993, Circulation, 88:2838-2848; 및 Guzman 외, 1993, Cir. Res., 73:1202-1207에서 개시되어 있다. 이러한 발현 시스템에 DNA를 포함시키는 기법은 당업자에게 널리 알려져 있다. DNA는, 또한 예를 들어 Ulmer 외, 1993, Science, 259:1745-1749, 및 Cohen, 1993, Science, 259:1691-1692에서 설명되는 바와 같이 "네이키드" DNA일 수 있다. 네이키드 DNA의 흡수는 세포 내로 효율적으로 운반되는 생분해성 비드에 DNA를 코팅하여 증가될 수 있다.

[0380] 발현을 위해, 본원에 개시된 항체 코딩 또는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 삽입물은 적절한 프로모터(예를 들어, 이중성 프로모터), 예컨대, 파지 램다 PL 프로모터, 대장균(*E. Coli*) lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터 및 레트로바이러스 LTR의 프로모터 등에 작동적으로 연결될 수 있다. 다른 적합한 프로모터는 당업자에게 알려져 있다. 발현 작제물은 전사 개시, 종결 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 수 있다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 초기에 개시되는 번역 및 번역될 폴리펩티드의 말단에 적절하게 위치하는 종결 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 수 있다.

[0381] 표시된 바와 같이, 발현 벡터는 적어도 하나의 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다. 이러한 마커는 진핵 세포 배양을 위한 다이하이드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 저항성 및 대장균 및 다른 박테리아에서 배양하기 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 저항성 유전자를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예컨대, 대장균, 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 및 쥐장티푸스균(*Salmonella typhimurium*) 세포; 진균 세포, 예컨대, 효모 세포; 곤충 세포, 예컨대 초파리 S2 및 담배거세미나방 Sf9 세포; 동물 세포, 예컨대, CHO, COS, 보우 흑색종 및 HK 293 세포; 및 식물 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 설명된 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 알려져 있다.

[0382] 박테리아에 사용하기 위한 비제한적인 벡터는 Qiagen으로부터 이용 가능한 pQE70, pQE60 및 pQE-9; Stratagene으로부터 이용 가능한 pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 Pharmacia로부터 이용 가능한 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5를 포함한다. 비제한적인 진핵 벡터는 Stratagene으로부터 이용 가능한 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 및 Pharmacia로부터 이용 가능한 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL을 포함한다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0383] 사용하기에 적합한 비제한적인 박테리아 프로모터는 대장균 lacI 및 lacZ 프로모터, T3 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, 램다 PR 및 PL 프로모터 및 trp 프로모터를 포함한다. 적합한 진핵생물 프로모터는 CMV 즉시 초기 프로모터, HSV 티미딘 키나아제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR의 프로모터, 예컨대, 라우스 육종 바이러스(RSV)의 프로모터 및 메탈로싸이오네인 프로모터, 예컨대, 마우스 메탈로싸이오네인-I 프로모터를 포함한다.

[0384] 효모 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)에서, 알파 인자, 알코올 산화효소 및 PGH와 같은 구



성적 또는 유도성 촉진체를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 검토를 위해, Ausubel 외, (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY 및 Grant 외, *Methods Enzymol.*, 153: 516-544 (1997)를 참조한다.

- [0385] 숙주 세포로의 작제물의 도입은 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 방법은 Davis 외, *Basic Methods In Molecular Biology* (1986)과 같은 많은 표준 실험실 매뉴얼에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.
- [0386] 벡터에 인핸서 서열을 삽입하여 고등 진핵생물에 의한 본 개시내용의 항체를 코딩하는 DNA의 전사를 증가시킬 수 있다. 인핸서는 제공되는 숙주 세포 유형에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키는 작용을 하는 DNA의 시스 작용 요소이며, 일반적으로 약 10 내지 300bp이다. 인핸서의 예는 염기쌍 100 내지 270의 복제 원점 후반부에 위치한 SV40 인핸서, 거대세포바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 원점 후반부에 있는 폴리오마 인핸서, 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.
- [0387] 번역된 단백질을 소포체의 내강, 주변세포질 공간 또는 세포의 환경으로 분비하기 위해 적절한 분비 신호가 발현된 폴리펩티드에 통합될 수 있다. 이 신호는 폴리펩티드에 내인성일 수 있거나 이종 신호일 수 있다.
- [0388] 해당 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 융합 단백질(예를 들어, GST 융합) 또는 히스티딘-태그와 같은 변형된 형태로 발현될 수 있으며, 분비 신호뿐만 아니라 추가의 이종성 기능 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 폴리펩티드의 N-말단에 첨가되어, 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선시킬 수 있고, 정제 동안, 또는 후속 취급 및 보관 동안 지속될 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩티드에 펩티드 모이어티를 첨가할 수 있다. 이러한 영역은 폴리펩티드의 최종 제조 전 제거될 수 있다. 특히, 분비 또는 배설을 유발하고, 안정성을 개선하며, 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩티드에 펩티드 모이어티를 첨가하는 것은 당업계에서 친숙하고 일상적인 기법이다.
- [0389] 본 개시내용은 또한 본원에 기설정된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 핵산 서열 및 본원에 설명된 임의의 아미노산 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 아미노산 서열을 제공한다.
- [0390] 본 개시내용은 또한 본원에 설명된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 상동성을 갖는 핵산 서열 및 본원에 설명된 임의의 아미노산 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 제공한다.
- [0391] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 설명된 임의의 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 본원에 설명된 임의의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 임의의 아미노산 서열에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 500개 또는 600개 미만의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 250개, 300개, 350개, 또는 400개 미만의 아미노산 잔기이다.
- [0392] 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 (i) 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 (ii) 아미노산 서열로 구성되며, 여기서 아미노산 서열은 본원에 설명된 서열 중 임의의 하나이다.
- [0393] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 (i) 핵산 서열을 포함하거나; 또는 (ii) 핵산 서열로 구성되며, 여기서 핵산 서열은 본원에 설명된 서열 중 임의의 하나이다.
- [0394] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 해당 서열을 최적의 비교를 목적으로 정렬한다(예를 들어, 갭을 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입할 수 있고, 비상동성 서열을 비교 목적을 위해 무시할 수 있음). 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열 내의 위치와 제2 서열 내의 대응 위치를 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 점유할 때, 분자는 이 위치에서 동일하다(본원에서 사

용되는 아미노산 또는 핵산 “동일성(identity)” 이란 아미노산 또는 핵산 “상동성(homology)” 과 동등하다). 양 서열 사이의 동일성 백분율은 2개 서열의 최적 정렬을 위해 도입해야 하는 갭의 수와 각 갭의 길이를 고려하여 서열이 공유하는 동일 위치 수의 함수이다. 예를 들어, 서열 비교 및 2개의 서열 사이의 동일성 백분율 결정은 갭 페널티 12, 갭 확장 페널티 4 및 프레임시프트 갭 페널티 5를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 사용하여 달성될 수 있다.

[0395] 서열 상동성(예를 들어, 아미노산 서열 상동성 또는 핵산 상동성)의 백분율 또한 결정될 수 있다. 서열 상동성의 백분율을 결정하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 유사한 물리화학적 특성(상동성 백분율)으로 보존된 아미노산 잔기, 예를 들어 류신 및 이소류신을 사용하여 서열 유사성이 측정될 수 있다. 유사한 물리화학적 특성을 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 당업계에서 정의되어 있다. 이러한 패밀리는, 예를 들어 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 무극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타 분지 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 많은 경우, 상동성 백분율은 동일성 백분율보다 더 높다.

[0396] 본 개시내용은 본원에 설명된 임의의 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산(예를 들어, cDNA)은 본원에 설명된 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 본원에 설명된 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 본원에 설명된 scFv 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0397] 일부 실시양태에서, 벡터는 본원에 설명된 바와 같은 핵산 중 2개를 가질 수 있으며, 여기서 벡터는 HER2에 함께 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 한 쌍의 벡터가 제공되며, 여기서 각각의 벡터는 본원에 설명된 바와 같은 핵산 중 하나를 포함하고, 벡터 쌍은 함께 HER2에 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 본원에서 설명된 바와 같은 핵산 중 2개를 포함하며, 여기서 벡터는 TROP2에 함께 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 한 쌍의 벡터가 제공되며, 여기서 각각의 벡터는 본원에 설명된 바와 같은 핵산 중 하나를 포함하고, 벡터 쌍은 함께 TROP2에 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 코딩한다. 일부 실시양태에서, VL 영역은 동일하다.

[0398] 특정 항체나 폴리펩티드를 발현하기 위해 벡터를 구성할 수도 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 항-HER2 항체 경쇄(HER2-K) 및 중쇄(HER2-H)를 공동 발현하도록 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 5' 말단에서 3' 말단까지의 거대세포바이러스 프로모터(CMV), HER2-K, 폴리아데닐화(PolyA), CMV, HER2-H, 유인원 공포 바이러스 40 종결자(SV40) 및 글루타민 신테타제 마커(GS)의 서열을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 항-TROP2 항체 경쇄(TROP2-K) 및 항-TROP2 항체 중쇄(TROP2-H)를 공동 발현하도록 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 5' 말단에서 3' 말단까지 CMV, HER2-K, PolyA, HER2-H, SV40 및 GS의 서열을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 항-TROP2 항체 scFv 폴리펩티드 사슬을 발현하도록 구축될 수 있다.

[0399] **항체, 항원-결합 단편 및 항원-결합 단백질 작제물의 제조 방법**

[0400] 인간 단백질의 단리된 단편은 다중클론 및 단일클론 항체 준비를 위한 표준 기법을 사용하여 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 다중클론 항체는 항원성 펩티드 또는 단백질을 여러 회 주사(예를 들어, 피하 또는 복강 내 주사)하여 동물에서 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원성 펩티드 또는 단백질은 적어도 하나의 보조제가 주사된다. 일부 실시양태에서, 항원성 펩티드 또는 단백질은 면역화될 종에서 면역원성인 제제에 접합될 수 있다. 동물에게 항원성 펩티드 또는 단백질을 1회 이상(예를 들어, 2회, 3회 또는 4회) 주사할 수 있다.

[0401] 전장 폴리펩티드 또는 단백질이 사용될 수 있거나, 대안적으로, 이의 항원성 펩티드 단편이 면역원으로 사용될 수 있다. 단백질의 항원성 펩티드는 단백질의 아미노산 서열의 적어도 8개(예를 들어, 적어도 10개, 15개, 20개, 또는 30개)의 아미노산 잔기를 포함하고 단백질의 에피토프를 포함하여 펩티드에 대해 생성된 항체가 단백질과 특정 면역 복합체를 형성하도록 한다.

[0402] 면역원은 일반적으로 적합한 대상체(예를 들어, 적어도 하나의 인간 면역글로불린 유전자좌를 발현하는 인간 또는 이식유전자 동물)를 면역화하여 항체를 제조하는 데 사용된다. 적절한 면역원성 제제는, 예를 들어 재조합적으로 발현되거나 화학적으로 합성된 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 해당 제제는 프로인트 완전 또는 불완전 보조제 또는 유사한 면역자극제와 같은 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

- [0403] 다중클론 항체는 면역원으로서 폴리펩티드 또는 이의 항원성 펩티드(예를 들어, 단백질의 일부)를 적합한 대상체에 면역화하여 위에서 설명되는 바와 같이 제조될 수 있다. 면역화된 대상체의 항체 역가는 고정화된 폴리펩티드 또는 펩티드를 사용하는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)과 같은 표준 기법에 의해 시간 경과에 따라 모니터링될 수 있다. 원하는 경우, 해당 항체 분자는 포유동물로부터(예를 들어 혈액으로부터) 단리될 수 있으며, 단백질 G 크로마토그래피의 단백질 A와 같은 잘 알려진 기법에 의해 추가로 정제되어 IgG 분획을 수득할 수 있다. 면역화 후 적절한 시점에, 예를 들어 특정 항체 역가가 가장 높을 때, 항체 생성 세포를 대상체로부터 수득할 수 있으며 표준 기법, 예컨대, Kohler 외, (*Nature* 256:495-497, 1975)에서 처음 설명된 하이브리도마 기법, 인간 B 세포 하이브리도마 기법(Kozbor 외, *Immunol. Today* 4:72, 1983), EBV 하이브리도마 기법(Cole 외, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985) 또는 트라이오마 기법에 의해 단일클론 항체를 제조하는 데 사용할 수 있다. 하이브리도마를 생성하는 기술은 널리 알려져 있다(일반적으로 *Current Protocols in Immunology*, 1994, Coligan 외, (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY 참조). 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는 관심 폴리펩티드 또는 에피토프에 결합하는 항체에 대한 하이브리도마 배양 상층액을 스크리닝하여, 예를 들어, 표준 ELISA 검정을 사용하여 검출된다.
- [0404] 본원에 설명된 항체 또는 항원-결합 단편의 변이체는 본원에 설명된 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 DNA를 뉴클레오티드를 적절하게 변화시키거나 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변이체는, 예를 들어 항체의 항원 결합 부위 또는 항원 결합 도메인을 구성하는 아미노산 서열 내 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체 집단에서, 일부 항체 또는 항원 결합 단편은 표적 단백질에 대한 증가된 친화도를 가질 것이다. 결실, 삽입 및/또는 조합의 임의의 조합이 이루어져 표적에 대한 결합 친화도가 증가된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 도달할 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편에 도입된 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수를 변경하는 것(예를 들어, 증가 또는 감소), 글리코실화 부위의 유형을 변경하는 것(예를 들어, 상이한 당이 세포에 존재하는 효소에 의해 부착되도록 아미노산 서열을 변경) 또는 새로운 글리코실화 부위를 도입하는 것과 같은 항체 또는 항원 결합 단편에 새로운 번역 후 변형을 변경하거나 도입할 수 있다.
- [0405] 본원에 개시된 항체는 포유동물을 포함하는 임의의 종의 동물로부터 유래될 수 있다. 천연 항체의 비제한적인 예는, 인간, 영장류, 예를 들어 원숭이 및 유인원, 소, 돼지, 말, 양, 낙타류(예를 들어, 낙타 및 라마), 닭, 염소 및 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 햄스터 및 토끼)로부터 유래된 항체를 포함하며, 이는 인간 항체를 생성하도록 유전자 조작된 이식유전자 설치류를 포함한다.
- [0406] 파지 디스플레이(패닝)를 사용하여 원하는 결합 친화도로 항체 서열을 최적화할 수 있다. 이 기법에서, (VH 또는 VL을 포함하는) 단쇄 Fv를 코딩하는 유전자를 파지 외피 단백질 유전자에 삽입하여, 파지가 그 내부에 단백질에 대한 유전자를 함유하면서 그 외부에 scFv를 "표시"하도록 하여, 유전자형과 표현형 사이의 연결을 초래할 수 있다. 이러한 표시 파지는 표시된 항원 결합 부위와 표적 항원 사이의 상호작용을 검출하기 위해 표적 항원에 대해 스크리닝될 수 있다. 따라서, 시험관 내 선택이라는 과정을 통해 대규모의 단백질 라이브러리를 스크리닝하고 증폭할 수 있으며, 목적하는 결합 친화도를 갖는 항체 서열을 수득할 수 있다.
- [0407] 인간 및 인간화 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된(또는 이로부터 유래된 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는) 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 생성에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를, 예를 들어, CDR에 포함할 수 있다.
- [0408] 일부 실시양태에서, 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체)에 공유 결합 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 공유 결합 변형은 화학적 또는 효소적 합성이나 효소적 또는 화학적 절단을 통해 이루어질 수 있다. 해당 항체 또는 항체 단편의 다른 유형의 공유 변형은 항체 또는 단편의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시켜 분자 내로 도입된다.
- [0409] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결합된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어, WO 2008/077546에서 설명되는 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정된 바와 같이 Asn 297에 부착된 모든 당구조(예를 들어, 복합, 하이브리드 및 고-만노스 구조)의 합에 대해, Asn297에서 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 297번 위치(Fc 영역 잔기의 Eu 번호 체계; 또는 카바트 번호 체계의 314번 위치)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭

하나; Asn297은 또한 항체의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림, 즉, 위치 294와 300 사이에 약 ±3개 아미노산에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸 이질성을 감소시키기 위해, 항체의 Fc 영역은 위치 297의 아스파라긴을 알라닌(N297A)으로 대체하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0410] 일부 실시양태에서, Fab-arm 교환을 회피하여 생성 효율을 용이하게 하기 위해, 항체의 Fc 영역을 추가로 조작하여 IgG4의 위치 228(EU 번호 체계)의 세린을 프롤린(S228P)으로 대체하였다. S228 돌연변이에 관한 상세한 설명은, 예를 들어, Silva 외, "The S228P mutation prevents *in vivo* and *in vitro* IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation." *Journal of Biological Chemistry* 290.9 (2015): 5462-5469에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0411] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 방법은 이중특이적 항체를 제조하도록 설계된다. 이중특이적 항체는 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화하기 위해 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체하여 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "공동"이 제2 항체 분자의 경계면에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다. 이러한 방법은, 예를 들어, WO 96/27011에서 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 포함된다.

[0412] 일부 실시양태에서, 이중이량체화를 촉진하기 위해 각 중쇄에 "노브" 또는 "홀"을 생성하기 위해 CH3 도메인을 조작하는 것과 관련된 KIH(노브-인투-홀) 기술이 사용될 수 있다. KIH 기법은, 예를 들어 Xu, Yiren 외, "Production of bispecific antibodies in 'knobs-into-holes' using a cell-free expression system." *MAbs*. Vol. 7. No. 1. Taylor & Francis, 2015에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 포함된다. 일부 실시양태에서, 하나의 중쇄는 T366W 및/또는 S354C(노브) 치환(EU 번호 체계)을 갖고, 다른 중쇄는 Y349C, T366S, L368A 및/또는 Y407V(홀) 치환(EU 번호 체계)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 하나의 중쇄는 다음 치환 Y349C 및 T366W(EU 번호 체계) 중 하나 이상을 갖는다. 다른 중쇄는 다음 치환 E356C, T366S, L368A 및 Y407V(EU 번호 체계)를 하나 이상 가질 수 있다. 또한, 두 치환된 IgG의 힌지 영역에 치환(-ppcpScp-->-ppcpPcp-)이 도입될 수도 있다.

[0413] 또한, 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 이중특이적 항체를 정제할 수 있다. 음이온 교환 크로마토그래피는 디에틸-아미노에틸 그룹(DEAE)과 같이 양으로 하전된 그룹을 함유하는 이온 교환 수지를 사용하여 전하를 기준으로 물질을 분리하는 과정이다. 용액에서 수지는 양으로 하전된 반대 이온(양이온)으로 코팅된다. 음이온 교환 수지는 음으로 하전된 분자와 결합하여 반대 이온을 대체한다. 음이온 교환 크로마토그래피는 등전점(pI)을 기준으로 단백질을 정제하는 데 사용할 수 있다. 등전점은 단백질이 순전하를 가지지 않는 pH로 정의된다. pH > pI일 때 단백질은 순 음전하를 띠고, pH < pI일 때 단백질은 순 양전하를 띤다. 따라서, 일부 실시양태에서, 2개의 Arm A를 포함하는 동종이량체에 대한 pI와 2개의 Arm B를 포함하는 동종이량체에 대한 pI가 상이하도록, 상이한 아미노산 치환이 2개의 중쇄에 도입될 수 있다. Arm A와 Arm B를 갖는 이중특이적 항체의 pI는 동종이량체의 두 pI 사이 어딘가에 있을 것이다. 따라서, 두 동종이량체와 이중특이적 항체는 상이한 pH 조건에서 방출될 수 있다. 본 개시내용은 pI를 조정하기 위해 몇몇 아미노산 잔기 치환이 중쇄에 도입될 수 있음을 보여준다.

[0414] 이중특이적 항체에는 또한 예를 들어 가교결합 또는 "이중접합체(heteroconjugate)" 항체가 포함될 수 있다. 예를 들어, 이중접합체의 항체 중 하나는 아비딘에 결합되고 다른 하나는 비오틴에 결합될 수 있다. 이중접합체 항체는 또한 임의의 편리한 가교결합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교결합제 및 가교 기법은 당업계에서 널리 알려져 있고, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0415] **치료 방법**

[0416] 본원에 설명된 방법 압과 관련된 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 일반적으로, 방법은 치료학적 유효량의 조작된 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체), 또는 본원에 설명된 항체 약물 접합체를 이러한 치료를 필요로 하는 또는 필요로 하는 것으로 결정된 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0417] 이러한 맥락에서 사용된 "치료(treat)"는 암과 관련된 장애의 적어도 하나의 증상을 개선하는 것을 의미한다. 종종 암은 사망을 초래하고; 따라서 치료를 통해 기대 수명이 증가할 수 있다(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년). 암과 관련된 상태의 치료를 위해 본원에 설명된 제제의 치료 유효량을 투여하면 암세포 수의 감소 및/또는 증상 완화를 초래할 것이다.
- [0418] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 자가 성장 능력을 갖는 세포, 즉 신속하게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상적인 상태 또는 병태를 지칭한다. 해당 용어는 조직병리학적 유형이나 침습 단계에 관계없이 모든 유형의 암성 성장 또는 발암 과정, 전이성 조직 또는 악성 변형 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "종양"은 암성 세포, 예를 들어, 암성 세포 덩어리를 지칭한다. 본원에 설명된 방법을 사용하여 치료하거나 진단할 수 있는 암은 폐, 유방, 갑상선, 림프, 위장 및 생식기-비뇨관에 영향을 미치는 것과 같은 다양한 장기 시스템의 악성 종양뿐만 아니라 대부분의 대장암, 신세포 암종, 전립선암 및/또는 고환 종양, 폐의 비소세포암종, 소장의 암 및 식도의 암과 같은 악성 종양을 포함하는 선암종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 작용제는 대상체의 암종을 치료하거나 진단하기 위해 설계된다. 용어 "암종"은 당업계에서 인정되며 호흡계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식기계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종 및 흑색종을 포함하는 상피 또는 내분비 조직의 악성 종양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암은 신장 암종 또는 흑색종이다. 예시적인 암종은 식도, 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장 및 난소 조직에서 형성되는 암종을 포함한다. 해당 용어는, 또한 예를 들어, 암종성 조직 및 육종성 조직으로 구성되는 악성 종양을 포함하는 암육종을 포함한다. "선암종"은 선 조직으로부터 유래하거나 종양 세포가 인식 가능한 선 구조를 형성하는 암종을 지칭한다. 용어 "육종"은 당업계에서 인정되며 중간엽 유래의 악성 종양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암은 화학요법 내성 암이다.
- [0419] 일 양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 암을 치료하는 방법, 대상체에서 시간에 따른 종양 부피의 증가 속도를 감소시키는 방법, 전이 발생의 위험을 감소시키는 방법 또는 대상체에서 추가 전이 발생의 위험을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 치료는 암의 진행을 정지시키거나, 둔화시키거나, 지연시키거나, 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해당 치료를 통해 대상체에서 암의 하나 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 기간의 감소로 이어질 수 있다.
- [0420] 일 양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 설명된 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 항체 약물 접합체를 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들어 암, 예를 들어 유방암, 유암종, 자궁경부암, 결장직장암, 자궁내막암, 신경교종, 두경부암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 피부암, 위암, 식도암, 고환암, 갑상선암, 또는 요로상피암을 갖거나, 또는 이를 갖는 것으로 확인되거나 진단된 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.
- [0421] 본원에서 사용되는 용어 "대상체" 및 "환자"는 명세서 전반에 걸쳐 상호교환적으로 사용되며, 본 발명의 방법에 따른 치료가 제공되는 인간 또는 비인간 동물을 설명한다. 수의학 및 비수의학 적용이 본 발명에 의해 고려된다. 인간 환자는 성인 또는 청소년(예를 들어, 18세 미만)일 수 있다. 환자는 인간 외에도 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그, 토끼, 페럿, 고양이, 개 및 영장류를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 고릴라 등), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 게르빌루스쥐, 햄스터, 페럿, 토끼), 토끼목, 돼지(예를 들어, 돼지, 미니어처 피그), 말, 개, 고양이, 소 및 다른 가축, 농장 및 동물원 동물이 포함된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 개이다.
- [0422] 일부 실시양태에서, 암은 갑상선암, 요로상피암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 자궁내막암, 피부암, 위암, 식도암종, 췌장암, 전립선암, 간암, 림프종 또는 신경교종이다.
- [0423] 일부 실시양태에서, 암은 자궁경부암, 전립선암, 갑상선암, 요로상피암, 두경부암, 자궁내막암, 난소암, 폐암, 유방암, 유암종, 피부암, 간암, 또는 고환암이다.
- [0424] 일부 실시양태에서, 암은 췌장암, 폐암, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 결장암, 피부암 또는 뇌암이다.
- [0425] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 암 위험이 있는 환자의 치료에 사용될 수 있다. 암 환자는 당업계에 알려진 다양한 방법으로 식별될 수 있다.
- [0426] 본원에 사용된 "유효량"은 질환, 예를 들어, 암의 진행을 정지시키거나, 둔화시키거나, 지연시키거나 억제하는 것을 포함하는 유익하거나 목적하는 결과를 달성하기에 충분한 양 또는 투여량을 의미한다. 유효량은, 예를 들어, 항체, 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및/또는 이의 조성물이 투여될 대상체의 연령 및 체중, 증상의 중증도 및 투여 경로에 따라 달라질 것이

며, 따라서 투여는 개별적 기준으로 결정될 수 있다.

- [0427] 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항체, 항원-결합 단편 또는 항체-약물 접합체의 유효량은 환자에서 자가면역 질환 또는 암의 진행을 개선하고/하거나, 정지시키고/시키거나, 안정화하고/하거나, 역촉진하고/하거나, 억제하고/하거나, 둔화시키고/시키거나 지연시키기에 충분한 양이거나, 시험관 내에서 세포 (예를 들어, 생검된 세포, 본원에 설명된 임의의 암 세포, 또는 세포주(예를 들어, 암 세포주))의 증식을 개선하고/하거나, 정지시키고/시키거나, 안정화하고/하거나, 역촉진하고/하거나, 둔화시키고/시키거나 지연시키기에 충분한 양이다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, 항체, 항원 결합 단편, 또는 항체-약물 접합체의 유효량은, 특히, 환자 이력뿐만 아니라 사용된 조성물의 유형(및/또는 투여량)과 같은 다른 인자에 따라 달라질 수 있다.
- [0428] 본원에 개시된 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 항체-약물 접합체 및/또는 조성물을 투여하기 위한 유효량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 당업자는 투여되어야 하는 투여량이, 예를 들어, 본원에 개시된 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 항체-약물 접합체 및/또는 조성물이 투여되는 포유동물, 투여의 경로, 특정 유형의 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 및/또는 본원에 개시된 조성물 및 포유동물에게 투여되는 다른 약물에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다.
- [0429] 유효량의 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 항체 약물 접합체의 전형적인 일일 투여량은 0.01mg/kg 내지 100mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 투여량은 100mg/kg, 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 또는 0.1mg/kg 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서 투여량은 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 0.1mg/kg, 0.05mg/kg 또는 0.01mg/kg 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서 투여량은 약 또는 적어도 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.9mg/kg, 0.8mg/kg, 0.7mg/kg, 0.6mg/kg, 0.5mg/kg, 0.4mg/kg, 0.3mg/kg, 0.2mg/kg 또는 0.1mg/kg이다.
- [0430] 본원에 설명된 임의의 방법에서, 적어도 하나의 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체), 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 설명된 임의의 항체, 항원-결합 단편, 항체-약물 접합체, 또는 약제학적 조성물), 및 선택적으로, 적어도 하나의 추가의 치료제가 대상체에게 적어도 1주에 1회(예를 들어, 1주에 1회, 1주에 2회, 1주에 3회, 1주에 4회, 1일에 1회, 1일에 2회, 또는 1일에 3회) 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 두 가지 상이한 항체 및/또는 항원-결합 단편이 동일한 조성물(예를 들어, 액체 조성물)로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 항체, 이의 항원-결합 단편, 항원-결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 항체-약물 접합체, 및 적어도 하나의 추가 치료제가 동일한 조성물로 투여된다(예를 들어, 액체 조성물). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 항체 또는 항원-결합 단편 및 하나 이상의 추가 치료제는 두 가지 상이한 조성물(예를 들어, 하나 이상의 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 액체 조성물 및 하나 이상의 추가 치료제를 함유하는 고체 경구 조성물)로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 알약, 정제 또는 캡슐로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 서방성 경구 제제로 투여된다.
- [0431] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제는 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 설명된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약제학적 조성물)을 투여하기 전 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제 및 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 설명된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물)은 대상체에서 하나 이상의 추가 치료제 및 적어도 하나의 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어, 본원에 설명된 임의의 항체 또는 항원-결합 단편) 또는 항체-약물 접합체의 생활성 기간에 중첩이 존재하도록 대상체에 투여된다.
- [0432] 일부 실시양태에서, 해당 대상체는 연장된 기간에 걸쳐(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년의 기간에 걸쳐) 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 설명된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약제학적 조성물)을 투여할 수 있다. 숙련된 의료 전문가 는 치료의 효과를 진단하거나 추적하기 위해 본원에 설명된 방법 중 임의의 방법(예를 들어, 암의 적어도 하나의 증상 관찰)을 사용하여 치료 기간을 결정할 수 있다. 본원에 설명된 바와 같이, 숙련된 의료 전문가는 또한 대상체에 투여되는 항체 또는 항원 결합 항체 단편, 항체-약물 접합체(및/또는 하나 이상의 추가 치료제)의 정

체 및 수를 변경(예를 들어, 증가 또는 감소)할 수 있고, 또한 (예를 들어, 본원에서 설명되고 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여) 치료 효과의 평가에 기초하여 대상체에 대한 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 항체 단편(및/또는 하나 이상의 추가 치료제)의 투여량 또는 투여 빈도를 조정(예를 들어, 증가 또는 감소)할 수 있다.

[0433] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에게 투여될 수 있다. 해당 추가 치료제는 B-Raf의 억제제, EGFR 억제제, MEK의 억제제, ERK의 억제제, K-Ras의 억제제, c-Met의 억제제, 역형성 림프종 키나아제(ALK)의 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K)의 억제제, Akt의 억제제, mTOR의 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤의 티로신 키나아제(BTK)의 억제제 및 아이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1) 및/또는 아이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2)의 억제제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 인돌아민 2,3-이산소화효소-1(IDO1)의 억제제(예를 들어, 에파카도스타트)이다.

[0434] 일부 실시양태에서, 해당 추가 치료제는 HER3의 억제제, LSD1의 억제제, MDM2의 억제제, BCL2의 억제제, CHK1의 억제제, 활성화된 고슴도치 신호전달 경로의 억제제 및 에스트로겐 수용체를 선택적으로 분해하는 작용제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다.

[0435] 일부 실시양태에서, 해당 추가 치료제는 트라벡테딘, nab-파클리탁셀, 트레바나닙, 파조파닙, 세디라닙, 팔보시클립, 에베롤리무스, 플루오로피리미딘, IFL, 레고라페닙, 레오리신, 알립타, 지카디아, 서텐트, 템시롤리무스, 약시티닙, 에베롤리무스, 소라페닙, 보트리엔트, 파조파닙, IMA-901, AGS-003, 카보잔티닙, 빈플루닌, Hsp90 억제제, Ad-GM-CSF, 테마졸로미드, IL-2, IFN $\alpha$ , 빈블라스틴, 탈로미드, 다카바진, 사이클로포스파마이드, 레날리도마이드, 아자시티딘, 레날리도마이드, 보르테조미드, 암루비신, 카르필조립, 프랄라트렉세이트 및 엔자스타우린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0436] 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 보조제, TLR 효능제, 종양 괴사 인자(TNF) 알파, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, IL-17 길항제, HVEM 길항제, ICOS 효능제, CX3CL1을 표적화하는 치료, CXCL9를 표적화하는 치료, CXCL10을 표적화하는 치료, CCL5를 표적화하는 치료, LFA-1 효능제, ICAM1 효능제 및 셀렉틴 효능제로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0437] 일부 실시양태에서, 카보플라틴, nab-파클리탁셀, 파클리탁셀, 시스플라틴, 페메트렉스드, 잼시타빈, FOLFOX, 또는 FOLFIRI가 대상체에 투여된다.

[0438] 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA 항체 또는 항-GITR 항체이다.

[0439] **약제학적 조성물 및 투여 경로**

[0440] 또한, 본원에 설명된 항원-결합 단백질 작제물, 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 항원-결합 단편 또는 항체-약물 접합체 중 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 또는 4개)를 함유하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 본원에 설명된 임의의 항원 결합 단백질 작제물, 항체, 항원-결합 단편 또는 항체-약물 접합체 중 2개 이상(예를 들어 2개, 3개 또는 4개)은 임의의 조합으로 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 해당 약제학적 조성물은 당업계에 알려진 임의의 방식으로 제제화될 수 있다.

[0441] 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로(예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내)에 적합하도록 제제화된다. 해당 조성물은 멸균 희석제(예를 들어, 멸균수 또는 식염수), 고정 오일, 폴리에틸렌 글라이콜, 글리세린, 프로필렌 글라이콜 또는 다른 합성 용매, 항균 또는 항진균제, 예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등, 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 바이실레이트, 킬레이트제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산, 완충액, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장제, 예컨대 당(예를 들어, 텍스트로스), 폴리알코올(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨), 또는 염(예를 들어, 소듐 클로라이드) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 리포솜 현탁액도 약제학적으로 허용되는 담체로 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호 참조). 조성물의 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 다회 용량 바이알로 제제화되고 봉입될 수 있다. 필요한 경우(예를 들어, 주사 가능한 제제에서와 같이), 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 흡수는 흡수를 지연시키는 제제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 포함시켜 연장될 수 있다. 대안적으로, 제어 방출은 생분해성, 생체적합성 중합체(예를 들어, 에틸렌 바이닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글라이콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산; Alza

Corporation 및 Nova Pharmaceutical, Inc.)를 포함할 수 있는 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템에 의해 달성될 수 있다.

[0442] 본원에 설명된 임의의 항원-결합 단백질 작제물, 항체, 항원-결합 단편, 항체-약물 접합체 중 하나 이상을 함유하는 조성물은 투여량 단위 형태(즉, 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유하는 물리적으로 별개의 단위)로 비경구(예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내) 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0443] 조성물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물(예를 들어, 원숭이)에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. LD50(집단의 50%에 대한 치사 용량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정할 수 있다: 해당 치료 지수의 비율은 LD50:ED50이다. 높은 치료 지수를 나타내는 작용제가 바람직하다. 약제가 바람직하지 않은 부작용을 나타내는 경우, 잠재적인 손상을 최소화하기 위해(즉, 원치 않는 부작용을 감소시키기 위해) 주의를 기울여야 한다. 독성 및 치료 효능은 다른 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다.

[0444] 예시적인 용량은 대상체의 체중의 킬로그램당 본원에 설명된 임의의 항원-결합 단백질 구축물, 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 항체-약물 접합체의 밀리그램 또는 마이크로그램(예를 들어, 약 1 µg/kg 내지 약 500mg/kg; 약 100 µg/kg 내지 약 500mg/kg; 약 100 µg/kg 내지 약 50mg/kg; 약 10 µg/kg 내지 약 5mg/kg; 약 10 µg/kg 내지 약 0.5mg/kg; 또는 약 0.1mg/kg 내지 약 0.5mg/kg)의 양을 포함한다.

[0445] 해당 약제학적 조성물은 투여를 위한 지침과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 설명된 바와 같은 다양한 용도를 위한 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항체-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0446] 실시예

[0447] 본 발명은 다음 실시예에서 더 설명되며, 이는 청구범위에서 설명되는 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0448] 실시예 1. HER2 및 TROP2 발현 검출

[0449] 상이한 인간 종양 세포주에서 HER2 및 TROP2의 발현 수준을 결정하기 위해 기능적 게놈 RNA-seq를 수행하였다. 그 결과는 다음 표에 나타내었다.

표 1

[0450] RNA seq 결과(FPKM 스크리닝 임계값: 15)

번호	세포 명칭	조직 유형	공급원	HER2	TROP2
1	카관-1	췌장	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-79	48	163
2	Panc 02.03	췌장	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2553	44	1236
3	NCI-H1781	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5894	88	370
4	NCI-H1650	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5883	32	1100
5	HCC827	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2868	28	368
6	NCI-N87	위	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5822	1444	761
7	NUGC-4	위	Cobioer, 카탈로그 번호: CBP60493	61	72
8	DU 145	전립선	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-81	17	162
9	BT_20	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-19	27	221
10	ZR-75-1	유방	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1500	69	70
11	SK-BR-3	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-30	811	336
12	HCC70	유방	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2315	20	1187
13	BT-474	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-20	519	22
14	HCC1954	유방	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2338	1005	1057
15	OVCAR-3	난소	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-161	15	150
16	SK-OV-3	난소	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-77	331	145
17	DLD-1	결장	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-221	19	137
18	COLO 205	결장	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-222	33	52
19	COLO 201	결장	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-224	47	102
20	HCT-8	결장	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-244	26	35
21	A-431	피부	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1555	18	1797



[0451] FPKM: 매핑된 판독 백만 회당 킬로 베이스당 판독 수

[0452] 또한, 유세포 분석법(FACS)을 사용하여 다음 인간 종양 세포에서 HER2 및 TROP2 단백질의 발현을 검출하였다. 항-hTROP2-PE(R&D Systems, Inc., 카탈로그 번호: FAB650P) 및 PE 항-인간 CD340(erbB2/HER-2)(Biolegend Inc., 카탈로그 번호: 324406)을 포함하는 표지된 항체를 사용하였다. 기하 평균 형광 강도(MFI) 결과는 아래 표에 나와 있다.

**표 2**

[0453] HER2 및 TROP 발현으로 인해 상이한 세포주가 생성된다.

번호	세포주	조직 유형	공급원	HER2	TROP2
1	NCI-H1650	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5883	25741	123249
2	HCC827	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2868	11094	82675
3	NCI-N87	위	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5822	392949	14348
4	DU 145	전립선	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-81	9788	19741
5	ZR-75-1	유방	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1500	45502	43987
6	BT-474	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-20	309012	17643
7	HCC1954	유방	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-2338	229418	161383
8	A-431	피부	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1555	15353	280176
9	NCI-H1975	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5908	14768	12442
10	MDA-MB-23	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-26	6803	2477
11	NCI-H292	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1848	11963	224754
12	U-87 MG	뇌	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-14	584	373
13	SNU-5	위	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-5973	15301	533
14	Hs 746T	위	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-135	161	172
15	MDA-MB-46	유방	Shanghai Institutes for Biological Sciences	617	13546
16	BxPC-3	췌장	ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1687	7968	14495
17	A549	폐	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-185	8542	183
18	MCF7	유방	ATCC, 카탈로그 번호: HTB-22	6814	57151
19	LoVo	결장	ATCC, 카탈로그 번호: CCL-229	6455	166

[0454] 데이터는 HER2와 TROP2가 다양한 종양 세포주에서 고도로 발현된다는 것을 나타낸다.

[0455] 실시예 2. 항-HER2 항체

[0456] 항-HER2 항체 생성

[0457] 인간 HER2 단백질(ACRO Biosystems Inc., 카탈로그 번호: HE2-H5253, 인간 HER2 단백질의 서열번호: 64의 위치 23-652를 포함함) 또는 이 단백질을 코딩하는 DNA를 보조제로 유화시키고, 이를 사용하여 RenLite™ 마우스 (Biocytogen, 계내에서 공통 경쇄 치환과 조합된 완전한 인간 중쇄 가변 도메인)를 면역화시켰다. 마우스는, 예를 들어 PCT/CN2021/097652에 설명되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 면역화 전, 안와후혈을 음성 대조군으로 채취하였다.

[0458] 1차 면역화에는 프로인트(Freund) 완전 보조제 CFA를 사용하였고, 2차, 3차, 4차 면역화에는 프로인트 불완전 보조제 IFA를 사용하였다. 총 4회의 면역화를 수행하였다. 1차 면역화와 2차 면역화는 2주 간격으로, 나머지 면역화는 1주 간격으로 간격을 두었다. 4차 면역화 1주일 후 안와후혈을 채취하였고 ELISA를 통해 혈청의 항체 역가를 검출하였다. 1주일 후, 임펄스 면역화를 위해 고역가 마우스에 미부 정맥을 통해 인간 HER2 단백질을 추가로 주사하였다.

[0459] 항-HER2 항체를 추가로 수득하거나 항-HER2 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열을 수득하기 위해 면역화된 마우스로부터 항원-특이적 면역 세포를 분리하였다. 예를 들어, 단일 세포 기술(예를 들어, Beacon® Optofluidic System, Berkeley Lights Inc.를 사용함)을 사용하여 항원-특이적 단일클론 항체를 분비하는 혈장 세포를 스크리닝하여 발견하였고, 역전사 및 PCR 시퀀싱을 사용하여 항체 가변 영역 서열을 수득하였다. 수득된 가변 영역 서열을 항체 발현에 사용하여 FACS를 사용하여 HER2에 대한 결합 친화도를 확인하였다. 이 방법으로 수득한 예시적인 항체는 H-2A10, H-1H2, H-2B2, H-3E5, H-3C6 및 H-3C8을 포함하였다. 이들 항체는 실질적으로 동일한

경쇄를 함유하였고, 이들의 VL 및 VL CDR 1-3 서열은 도 8 및 9에 나타나 있다. H-1H2, H-2B2, H-3E5, H-3C6 및 H-3C8의 VH 및 VL 영역이 도 10에 나타나 있다.

[0460] 다양한 IgG1, IgG2 및 IgG4 항체가 제조되었다. 항체의 명칭은, VH<sub>H</sub>VL 항체가 상이한 동종형에 연결되어 있는 경우 해당 동종형을 명칭에 추가한다. 예를 들어, H-1H2의 VH와 VL이 IgG1 불변 영역에 연결되면 항체의 이름은 H-1H2-IgG1로 명명된다. 다른 동종형의 예는 다음과 같다: H-1H2-IgG2, H-1H2-IgG4.

[0461] 항-HER2 항체 세포내이입 시험

[0462] 샘플 항-HER2 항체(2.5 µg/mL) 및 pHAb-염소 항-인간 IgG 2차 항체(Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd., 카탈로그 번호: G9845)를 고 HER2 발현으로 BT-474 세포에 첨가하였다. 1시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리하였고 FACS 완충액으로 세척하였다. MFI 값은 유세포 분석기를 사용하여 측정하였고, 항-HER2 항체의 세포내이입 속도를 계산하였다. 결과를 하기 표에 나타내었다(표 3). 동종형 대조군을 위해 관련 없는 표적 단백질을 표적으로 하는 항체가 사용되었다.

**표 3**

[0463] 항-HER2 항체 세포내이입 비율

항체	MFI	양성 백분율(%)
동종형 대조군	9841	1.1%
트라스투주맙 유사체	50377	88.0%
페르투주맙 유사체	100376	97.1%
H-1H2-IgG1	364980	99.9%
H-2B2-IgG1	282143	99.9%
H-3E5-IgG1	290833	99.8%
H-3C6-IgG1	324006	99.9%
H-3C8-IgG1	269321	99.9%
H-2A10-IgG1	115617	99.8%

[0464] 트라스투주맙은 HER2 표적화 인간화 단일클론 항체이며, 이의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호: 65-66에 나타나 있다.

[0465] 페르투주맙은 또한 HER2 표적화 항체이며, 이의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호: 67-68에 나타나 있다.

[0466] 데이터에 따르면 H-1H2-IgG1, H-2B2-IgG1, H-3E5-IgG1, H-3C6-IgG1 및 H-3C8-IgG1은 동종형 대조군(ISO), 양성 대조군 트라스투주맙 및 페르투주맙에 비해 세포내이입 속도가 양호하였다.

[0467] 항-HER2 항체 중간 결합 분석

[0468] 인간 HER2(hHER2)를 발현하는 BT-474 세포, 원숭이 HER2(fasHER2)를 발현하는 CHO-S 세포(CHO-fasHER2) 및 개 (*Canis lupus familiaris*) HER2(dHER2)를 발현하는 NIH3T3 세포(NIH3T3-dHER2)를 5×10<sup>4</sup> 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 옮겼다. 연속적으로 희석된 샘플 항-HER2 항체를 96웰 플레이트에 첨가하였고, 4° C에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 세포를 유세포 분석 전에 4° C의 암실에서 15분 동안 2차 항체 항-hIgG-Fc-Alex Flour 647(RL1-H)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 109-606-170)과 함께 배양하였다.

[0469] CHO-fasHER2 세포는 *Macaca fascicularis*(필리핀 원숭이) HER2 아미노산 서열(서열번호: 74)의 위치 174-804로 CHO-S 세포를 형질 감염시켜 수득하였다. NIH3T3-dHER2 세포는 NIH3T3(ATCC, 카탈로그 번호: CRL1658) 세포를 *Canis lupus familiaris*(개) HER2(서열번호: 75)의 아미노산 서열을 함유하는 작제물(작제물은 CAG 프로모터-개 HER2 CDS-P2A-EGFP-WPRE-PA를 함유함)로 형질 감염시켜 수득하였다.

[0470] 시험 결과는 하기 표에 나타나 있다. 5가지 항-HER2 항체는 모두 hHER2 및 fasHER2에 결합할 수 있다. 이들 5개 항체 중에서 H-1H2-IgG1, H-2B2-IgG1 및 H-3C8-IgG1도 hHER2, fasHER2 및 dHER2와의 중간 결합을 나타내었다.

**표 4**

[0471]

항-HER2 항체 중간 결합 분석

항체	HER2 단백질	양성 세포 백분율	평가
H-1H2-IgG1	hHER2	100%	결합
	fasHER2	46.6%	결합
	dHER2	79.6%	결합
H-2B2-IgG1	hHER2	99.9%	결합
	fasHER2	42.3%	결합
	dHER2	90.3%	결합
H-3E5-IgG1	hHER2	100%	결합
	fasHER2	43.4%	결합
	dHER2	1.87%	결합 없음
H-3C6-IgG1	hHER2	99.9%	결합
	fasHER2	67.1%	결합
	dHER2	2.66%	결합 없음
H-3C8-IgG1	hHER2	100%	결합
	fasHER2	48.1%	결합
	dHER2	95.6%	결합

[0472]

항-HER2 항체 친화성 시험

[0473]

인간(hHER2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: HE2-H5225)(서열번호: 64의 위치 23-652), 마우스(mHER2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: ER2-M5220)(서열번호: 76), 개(dHER2, Sino Biological Inc., 카탈로그 번호:70024-D08H)(서열번호: 75의 위치 1-652) 또는 원숭이(fasHER2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: HE2-C52Hb)(서열번호: 74)의 His-태그된 HER2 단백질에 대한 항-HER2 항체의 친화도를 30° C Octet 시스템을 사용하여 생물층 간섭계(BLI)에 의해 측정하였다. 총 5개의 단일클론 항체를 시험하였다: H-1H2-IgG1, H-2B2-IgG1, H-3E5-IgG1, H-3C6-IgG1 및 H-3C8-IgG1.

[0474]

항-HER2 항체를 AHC 바이오센서(ForteBio Inc., 카탈로그 번호: 18-5060)에 10ug/mL로 로딩하여 1.0nm의 반응을 생성하였다. 동역학 측정은 재조합 His-태그된 HER2 단백질의 농도 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM, 200nM 및 400nM에서 수행되었다. 결합 단계는 180초 동안 지속되었고 해리 단계는 300초 동안 지속되었으며 10mM 글라이신-HCl, pH1.7을 사용한 재생 단계가 이어졌다. 데이터 분석은 표준 1:1 결합 모델을 사용하는 Octet 데이터 분석 프로그램(DataAnalytic11)을 사용하여 수행되었다. 동역학적 속도 상수(KD=koff/kon)의 몫으로부터 친화도 값을 추론하였다.

[0475]

당업자가 이해하는 바와 같이, 매개변수(예를 들어, 항체 농도)를 적절하게 조정한 동일한 방법을 각각의 시험된 항-HER2 항체에 대해 수행하였다. 시험된 항체에 대한 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 5**

[0476]

친화도 시험 결과

항체	HER2 단백질	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD(M)
H-1H2-IgG1	hHER2	4.19E+05	1.65E-02	3.93E-08
	fasHER2	4.16E+05	1.67E-02	4.00E-08
	mHER2	결합 없음	--	--
	dHER2	4.71E+05	1.50E-03	3.19E-09
H-2B2-IgG1	hHER2	2.33E+05	1.05E-02	4.49E-08
	fasHER2	2.51E+05	9.59E-03	3.82E-08
	mHER2	결합 없음	--	--
	dHER2	3.49E+05	1.52E-02	4.36E-08
H-3E5-IgG1	hHER2	1.56E+05	6.56E-04	4.20E-09
	fasHER2	1.24E+05	9.07E-04	7.33E-09
	mHER2	결합 없음	--	--
	dHER2	결합 없음	--	--

H-3C6-IgG1	hHER2	1.50E+05	2.32E-04	1.55E-09
	fasHER2	1.63E+05	2.94E-04	1.80E-09
	mHER2	결합 없음	--	--
	dHER2	결합 없음	--	--
H-3C8-IgG1	hHER2	4.56E+05	2.36E-03	5.19E-09
	fasHER2	4.60E+05	2.38E-03	5.16E-09
	mHER2	결합 없음	--	--
	dHER2	4.78E+05	2.92E-03	6.11E-09

[0477] 결과는 다섯 항-HER2 항체 모두 인간 HER2 및 원숭이 HER2에 대해 우수한 결합 친화도를 나타냄을 나타내었다. 이들 다섯 항체 중 H-1H2-IgG1, H-2B2-IgG1, H-3C8-IgG1도 개 HER2에 대해 우수한 결합 친화도를 나타내었다.

[0478] 실시예 3. 항-TROP2 항체의 제조 및 분석

[0479] 항-TROP2 항체 생성

[0480] hTrop2-Fc(ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: TR2-H5253, 인간 TROP2 단백질 서열번호: 69 아미노산 31-274 포함) 및 mTrop2-his(ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: TR2-M52H6, *Mus musculus* TROP2 단백질 서열번호: 79의 아미노산 25-270 포함)을 사용하여 RenLite™ 마우스를 교차 면역화하였다. 면역화 전, 음성 대조군으로서 마우스로부터 안와후혈을 수집하였다. 1차 면역화에는 프로인트(Freund) 완전 보조제 CFA를 사용하였고, 2차, 3차, 4차 면역화에는 프로인트 불완전 보조제 IFA를 사용하였다. 총 4회의 면역화를 실시하였다. 3차 면역화 1주일 후 안와후혈을 채취하여 ELISA를 통해 항인간 TROP2 항체와 항마우스 TROP2 항체의 혈청 역가를 검출하였다. 1주일 후, mTrop2-his를 피하 주사하여 역가가 높은 마우스를 4차 면역화를 위해 선택하였다. 4차 면역화 2주 후, 인간 TROP2 항원을 발현하는 CHO-S 세포를 미부 정맥 주사를 통한 임펄스 면역화에 사용하였고, hTROP2-Fc를 복강내 주사를 통한 임펄스 면역화에 사용하였다.

[0481] 항-TROP2 항체를 추가로 수득하기 위해 또는 항-TROP2 항체의 경쇄 및 중쇄 V 영역 서열을 수득하기 위해 항원-특이적 면역 세포를 (면역화된 마우스의 면역 기관으로부터) 단리하였다. 단일 세포 기술(예를 들어, Beacon® Optofluidic System, Berkeley Lights Inc.)을 사용하여 항원 특이적 단일클론 항체를 분비하는 형질 세포를 스크리닝하여 발견한 다음 역전사 및 PCR 시퀀싱을 사용하여 항체 가변 영역 서열을 수득하였다. FACS에 의해 TROP2에 대한 발현된 항체의 결합을 확인하기 위해 항체 발현을 위해 가변 영역 서열을 인간 IgG 불변 영역을 함유하는 골격 벡터에 클로닝하였다. 이 방법으로 수득한예시적인 완전 인간 항체는 T-3A4, T-4B9, T-4C12, T-5C8 및 T-6F7을 포함한다. 이들 항체는 동일한 경쇄를 가지며, 서열은 항-HER2 항체의 공통 경쇄 서열과 일치한다. T-3A4, T-4B9 및 T-6F7의 CDR 서열과 VH 및 VL 서열은 도 11 내지 도 13에 나타나 있다.

[0482] 다양한 IgG1, IgG2 및 IgG4 항체가 만들어졌다. 불변 영역은 일부 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, SI 돌연변이(EU 번호 체계: S239D 및 I332E 돌연변이)가 T-6F7-IgG1의 Fc 영역에 도입되면 생성된 항체는 T-6F7-IgG1-SI로 명명된다.

[0483] 항-TROP2 항체 세포내이입 검출

[0484] 항-TROP2 항체(1.25 µg/mL) 및 pHAb-염소 항-인간 IgG 2차 항체를 인간 TROP2(서열번호: 69)를 고도로 발현하는 CHO 세포(CHO-hTROP2)에 첨가하였다. 1시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리하였고 FACS 완충제로 세척하였다. MFI는 유세포 분석기상에서 검출되었으며, 항-TROP2 항체의 세포내이입 속도가 계산되었다. 결과를 하기 표에 나타내었다.

표 6

항- TROP2 항체 세포내이입 비율

[0485]

항체	MFI	양성 백분율(%)
사시투주맙 고비테칸 항체 유사체	22965	51.2%
DS-1062 항체 유사체	21847	43.9%
T-3A4-IgG1-SI	23169	69.0%
T-4B9-IgG1-SI	20844	62.7%
T-4C12-IgG1-SI	23929	71.9%
T-5C8-IgG1-SI	29914	82.9%

T-6F7-IgG1-SI	29478	92.2%
---------------	-------	-------

[0486] 사시투주맵 고비테칸(Trodelvy™)은 인간화 항-TROP2 단일클론 항체-약물 접합체이다. 사시투주맵 고비테칸 유사체의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호: 70-71로 제시된다.

[0487] DS-1062는 TROP2 지향 항체 약물 접합체로 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암(NSCLC) 환자를 대상으로 3상 임상 시험이 진행 중이다. DS-1062의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호: 72-73으로 나타나 있다.

[0488] 사시투주맵 고비테칸과 DS-1062의 항체 부분을 비교 목적으로 사용하였다. 데이터는 대조군(사시투주맵 고비테칸 항체 유사체 및 DS-1062 항체 유사체)과 비교하여 T-3A4-IgG1, T-4B9-IgG1, T-4C12-IgG1, T-5C8-IgG1 및 T-6F7-IgG1 모두 양호한 세포내이입율을 가지고 있다.

[0489] **항-TROP2 중간 결합 분석**

[0490] CHO-hTROP2, *Macaca fascicularis*(필리핀 원숭이) TROP2를 발현하는 CHO-S 세포(fasTROP2, 서열번호: 77)(CHO-fasTROP2), 및 *Canis lupus familiaris*(개) TROP2를 발현하는 CHO-S 세포(dTROP2, 서열번호: 78)(CHO-dTROP2)를  $5 \times 10^4$  세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 옮겼다. 샘플 항체의 구배 희석액을 96-웰 플레이트에 첨가하였고, 4° C에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 세포를 유세포 분석 전에 4° C의 암실에서 15분 동안 Anti-hIgG-Fc-Alex Flour 647(RL1-H)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 카탈로그 번호:109-606-170)과 함께 배양하였다. 그 결과를 다음 표에 나타내었다:

**표 7**

[0491] 항-TROP2 항체 중간 결합 분석

항체	TROP2 단백질	양성 세포 백분율	평가
T-3A4-IgG1-SI	hTROP2	57.1%	결합
	fasTROP2	82.8%	결합
	dTROP2	37.3%	결합
T-4B9-IgG1-SI	hTROP2	72.6%	결합
	fasTROP2	73.4%	결합
	dTROP2	68.3%	결합
T-4C12-IgG1-SI	hTROP2	64.0%	결합
	fasTROP2	67.4%	결합
	dTROP2	70.6%	결합
T-5C8-IgG1-SI	hTROP2	63.9%	결합
	fasTROP2	75.7%	결합
	dTROP2	23.1%	결합
T-6F7-IgG1-SI	hTROP2	65.0%	결합
	fasTROP2	70.9%	결합
	dTROP2	39.0%	결합

[0492] 결과는 T-6F7-IgG1-SI, T-4C12-IgG1-SI, T-3A4-IgG1-SI, T-5C8-IgG1-SI 및 T-4B9-IgG1-SI가 모두 인간 TROP2, 원숭이 TROP2, 및 개 TROP2에 결합할 수 있음을 보여주었다.

[0493] **항-TROP2 항체 친화성 시험**

[0494] 인간(hTROP2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: TR2-H5223), 개(dTROP2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: TR2-C52H4) 및 붉은털 원숭이/시노물구스(fasTROP2, ACROBiosystems Inc., 카탈로그 번호: R52H3)의 His-태깅된 TROP2 단백질에 대한 항-TROP2 항체의 친화도를 미리 고정화된 Protein A 센서 칩이 장착된 비아코어(Biacore, INC., Piscataway NJ) 8K 바이오센서를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정하였다.

[0495] 정제된 항-TROP2 항체를 0.5 µg/mL로 희석한 후 10 µL/분에서 Biacore 8K 바이오센서에 주사한 뒤 약 50초 동안 실행하면 원하는 단백질 밀도(예를 들어, 약 120 반응 단위(RU))를 달성할 수 있었다. 이후, 200nM 농도의 His-태그된 TROP2 단백질을 180초 동안 30 µL/분으로 주사하였다. 해리를 600초 동안 모니터링하였다. 글라이신(pH 2.0, 30 µL/min, 30초)으로 각 적정을 마지막으로 주사한 후 칩이 재생되었다.

[0496] 동역학적 결합 속도(kon)와 해리 속도(koff)는 Biacore 8K Evaluation Software 3.0를 사용하여 데이터를 전체적으로 1:1 Langmuir 결합 모델에 맞춰서 동시에 획득하였다(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology 6. 99-110). 동역학적 속도 상수(KD=koff/kon)의 몫으로부터 친화도를 추론하였다.

[0497] 당업자가 이해하는 바와 같이, 매개변수(예를 들어, 항체 농도)를 적절하게 조정한 동일한 방법을 각각의 시험 대상 항체에 대해 수행하였다. 시험된 항체에 대한 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 8**

항-TROP2 항체 친화도 시험 결과

[0498]

항체	TROP2 단백질	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD(M)	평가
T-3A4-IgG1-SI	hTROP2	9.70E+04	4.58E-03	4.72E-08	결합
	fasTROP2	5.98E+04	2.55E-03	4.27E-08	결합
	dTROP2	8.62E+03	1.89E-04	2.19E-08	결합
T-4B9-IgG1-SI	hTROP2	5.68E+05	5.82E-03	1.02E-08	결합
	fasTROP2	7.81E+05	5.56E-03	7.12E-09	결합
	dTROP2	4.34E+06	5.75E-02	1.32E-08	결합
T-4C12-IgG1-SI	hTROP2	7.65E+04	7.34E-03	9.59E-08	결합
	fasTROP2	5.84E+04	8.65E-03	1.48E-07	결합
	dTROP2	9.35E+05	2.75E-03	2.93E-09	결합
T-5C8-IgG1-SI	hTROP2	6.40E+04	3.44E-03	5.38E-08	결합
	fasTROP2	7.18E+04	1.59E-03	2.21E-08	결합
	dTROP2	결합 없음	--	--	결합 없음
T-6F7-IgG1-SI	hTROP2	1.65E+05	4.28E-03	2.60E-08	결합
	fasTROP2	1.17E+05	2.21E-03	1.90E-08	결합
	dTROP2	4.71E+04	9.23E-05	1.96E-09	결합

[0499] 결과는 시험된 모든 항체가 인간 TROP2에 대해 우수한 결합 친화도를 갖고 있음을 나타낸다. 시험된 항체 중에서 T-3A4-IgG1-SI, T-4B9-IgG1-SI 및 T-6F7-IgG1-SI도 원숭이 및 개 TROP2에 대해 중간 결합 친화도를 가지고 있다.

[0500] 실시예 4. 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체

[0501] 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체의 제조

[0502] 항-HER2 항체(H-1H2, H-2B2, H-3E5, H-3C6 및 H-3C8) 및 항-TROP2 항체(T-3A4, T-4B9, T-4C12, T-5C8 및 T-6F7)이 쌍을 이루어 다양한 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 항체의 경쇄 및 중쇄에 대한 벡터를 만들었다. 3개의 벡터를 CHO-S 세포에 공동 형질 감염시켰다. 14일 배양 후, 세포 상층액을 수집하였고 Protein A 친화성 크로마토그래피로 정제하였다.

[0503] 두 중쇄 사이의 잘못된 페어링 가능성을 감소시키기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. Fc 영역에서는 노브-인트루-홀 돌연변이가 항-TROP2 Arm 중쇄 및 항-HER2 Arm 중쇄에 도입되었다. 획득된 예시적인 이중특이적 항체는: H-1H2-T-6F7, H-2B2-T-6F7, H-3C8-T-6F7 및 T-6F7-H-1H2를 포함하였다. 이중특이성 항체의 결합 친화도를 확인하기 위해, 항-HER2 또는 항-TROP 대조군 이중특이성 항체를 또한 작제하였으며, 여기서 대조군 이중특이성 항체의 한 팔은 HER2 또는 TROP를 인식하고, 다른 팔은 CD28(CD28 RenLite 공-경쇄 항체)을 인식한다. 이들 대조군 이중특이적 항체는 H-2B2-CD28, H-3C8-CD28, CD28-H-1H2 및 CD28-T-6F7로 명명되었다.

[0504] 이 항체들은 모두 노브-인트루-홀 돌연변이를 가지고 있다. H-1H2-T-6F7에서, H-1H2의 중쇄 불변 영역은 노브 돌연변이를 갖고, T-6F7의 불변 영역은 홀 돌연변이를 갖는다. T-6F7-H-1H2에서, T-6F7의 중쇄 불변 영역은 노브 돌연변이를 갖고, H-1H2의 중쇄 불변 영역은 홀 돌연변이를 갖는다. 예시적인 항체 구조가 도 1에 나타나 있고, 여기서 표적 1 및 표적 2는 각각 HER2 및 TROP2, 또는 각각 TROP2 및 HER2, 또는 각각 HER2 및 CD28, 또는 각각 CD28 및 HER2, 또는 각각 CD28 및 TROP2일 수 있다.

[0505] 경쇄 불변 영역, 노브 돌연변이를 수반하는 중쇄 불변 영역, 및 홀 돌연변이를 수반하는 중쇄 불변 영역의 서열이 도 14에 나타나 있다.

[0506] 정제된 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체를 비-환원 SDS-PAGE(나트륨 도데실 황산염-폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 및 SEC-HPLC(크기 배제 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피)로 분석하였다.

[0507] 비-환원 SDS-PAGE는 4-12% 아크릴아미드 겔을 사용하여 수행되었다. 단백질 샘플은 다음과 같이 제조되었다. 먼저, 2.4 µL의 단백질 샘플을 6 µL Tris-Glycine SDS 샘플 완충제(2 ×)(Invitrogen LC2676) 및 3.6 µL 증류수와 혼합하였다. 그런 다음 혼합물을 2분간 끓인 후 로딩하기 전에 즉시 원심분리하였다. 각 샘플 4 µg을 겔에 넣었다.

[0508] SEC-HPLC 방법에서는 항체 샘플을 정제수를 사용하여 1mg/mL로 희석하고 Agilent 1290 크로마토그래프 시스템(XBridge™ Protein BEH SEC 컬럼(200 Å, Waters Corporation)과 연결)을 사용하였다. 다음 매개변수가 사용되었다: 이동상: 25mmol/L 인산염 완충액(PB) + 300mmol/L NaCl, pH 6.8; 유속: 1.8mL/분; 컬럼 온도: 25°C; 검출 파장: 280nm; 주사량: 10 µL; 샘플 트레이 온도: 약 4°C; 및 러닝타임: 7분. 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 9**

[0509] 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체의 제조

ID	샘플	수율(µg/mL)	SEC-HPLC
1	H-2B2-T-6F7	431.15	90.01%
2	H-3C8-T-6F7	517.96	91.30%
3	H-1H2-T-6F7	716.54	90.80%
4	H-1H2-T-4B9	188.31	60.07%
5	H-2B2-T-4B9	48.00	38.31%
6	H-3C8-T-4B9	20.73	36.77%
7	H-1H2-T-3A4	255.00	85.53%
8	H-2B2-T-3A4	331.46	60.12%
9	H-3C8-T-3A4	567.69	62.87%
10	T-6F7-H-1H2	657.69	96.67%

[0510] 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 결합 활성 확인

[0511] NCI-H292 세포 및 NCI-N87 세포에 대한 항-HER2/TROP2 항체의 결합 활성을 유세포 분석법으로 검증했다. 실험에 사용된 2차 항체는 AF647-접합된 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 카탈로그 번호:109-606-170)였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 10**

[0512] 결합 유세포 분석법 시험 결과

항체	NCI-H292	NCI-N87
NC	0.78%	1.72%
NC+ 2차 항체	1.21%	2.97%
트라스투주맙 유사체	97.8%	98.5%
사시투주맙 유사체	97.4%	98.7%
H-2B2-T-6F7	97.1%	98.9%
T-6F7-H-1H2	97.6%	98.7%

[0513] 결과는 H-2B2-T-6F7 및 T-6F7-H-1H2가 둘 모두 HER2 및 TROP2를 동시에 발현하는 NCI-H292 세포 및 NCI-N87 세포에 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0514] 개 종양 세포주에 대한 항체 결합 검증

[0515] 개 유방암 세포주 CMT-U27(ATCC, 카탈로그 번호: CRL-3456)에 대한 항-HER2 항체, 항-TROP 항체 및 항-HER2/TROP2 항체의 결합 활성을 유세포 분석법으로 측정하였다. 실험에 사용된 2차 항체는 FITC-접합된 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 카탈로그 번호:109-096-170)이다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 11**

결합 유세포 분석법 시험 결과

[0516]

항체	CMT-U27
NC	0.74%
NC+ 2차 항체	0.82%
인간 IgG1 대조군	1.59%
H-1H2-IgG1	97.6%
H-2B2-IgG1	98.0%
H-3C8-IgG1	97.8%
T-6F7-IgG1-S1	1.74%
T-6F7-H-1H2	82.9%
H-2B2-T-6F7	96.8%
H-3C8-T-6F7	98.3%

[0517]

결과는 항-HER2 단일클론 항체 H-1H2-IgG1, H-2B2-IgG1 및 H-3C8-IgG1, 및 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 T-6F7-H-1H2, H-2B2-T-6F7 및 H-3C8-T-6F7이 모두 개 세포주 CMT-U27에 결합할 수 있음을 나타내었다.

[0518]

**항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 세포내이입 시험**

[0519]

항-HER2 항체, 항-TROP2 항체, 또는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 및/또는 염소 항-인간 IgG 2차 항체를 각각 인간 HER2 및 TROP2를 고도로 발현하는 NCI-N87 세포에 첨가하였고, 1시간 동안 배양하였다. 세포를 원심분리하였고 FACS 완충제로 세척하였다. MFI는 유세포 분석기로 측정되었다. NCI-N87 세포에 대한 항체의 세포내이입 비율을 계산하였다. 그 결과는 다음 표에 나타내었다(표 12). 동종형 대조군을 위해 관련 없는 표적 단백질을 표적으로 하는 항체가 사용되었다.

[0520]

직접적인 검출을 위해, 1차 항체(예를 들어, 항-HER2 항체, 항-TROP2 항체 또는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체)를 pH 민감성 마커로 직접 표지하여 세포내이입 속도를 검출하였다. 간접적인 검출을 위해, pH 민감성 마커로 표지된 염소 항-인간 IgG 2차 항체를 사용하여 1차 항체(예를 들어, 항-HER2 항체, 항-TROP2 항체 또는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체)의 세포내이입을 검출하였다.

**표 12**

항체 세포내이입율

[0521]

항체	직접 검출 (1차 항체)		간접 검출 (1차 항체 + 2차 항체)	
	MFI	양성 집단 백분율	MFI	양성 집단 백분율
NC	4778	1.39%	4871	1.11%
동종형 대조군	4899	1.86%	4924	1.88%
트라스투주맙 유사체	18924	82.5%	23420	87.3%
페르투주맙 유사체	15748	74.7%	20988	79.5%
사시투주맙 유사체	16622	70.1%	16087	72.2%
H-2B2-IgG1	25903	90.8%	33590	91.5%
H-3C8-IgG1	24575	91.1%	36342	92.8%
H-1H2-IgG1	20192	88.2%	34929	92.2%
T-6F7-IgG1-S1	12177	45.1%	33652	89.9%
H-2B2-CD28	7988	10.4%	41603	88.2%
H-3C8-CD28	11483	46.0%	50727	93.5%
CD28-H-1H2	7061	6.27%	58524	96.2%
CD28-T-6F7	5120	1.86%	19808	68.4%
H-2B2-T-6F7	20290	82.8%	54948	95.5%
H-3C8-T-6F7	27439	88.8%	49078	93.5%
T-6F7-H-1H2	17498	78.6%	59289	92.8%
H-1H2-T-6F7	19963	86.3%	57243	94.0%



- [0522] 그 결과 이중특이적 항체에서 세포내이입율은 H-3C8-T-6F7>H-2B2-T-6F7>T-6F7-H-1H2로 나타났다. 이중특이적 항체는 상응하는 단일클론 항체와 유사하거나 더 높은 세포내이입 비율을 나타내었다. 단일 팔 대조군 이중특이적 항체(H-2B2-CD28, H-3C8-CD28, CD28-H-1H2 및 CD28-T-6F7)는 상응하는 이중특이적 항체 또는 단일클론 항체보다 유의하게 낮은 세포내이입율을 나타냈다.
- [0523] 간접 검출의 경우, 마커 표지된 염소 항-인간 2차 항체는 1차 항체(예를 들어, 항-HER2 항체, 항-TROP2 항체, 또는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체)의 가교 결합을 야기하여, 증가된 세포내이입을 야기할 수 있다.
- [0524] 또한, 정제된 항체 H-1H2-T-6F7, H-2B2-T-6F7, H-3C8-T-6F7 및 T-6F7-H-1H2를 각각 NCI-N87 세포 또는 NCI-H292 세포와 함께 세포 배양액에서 배양하였다. IncuCyte(Sartorius AG, IncuCyte® S3)를 24시간 동안 배양하여 항체의 세포내이입을 검출하였다. NCI-N87 및 NCI-H292 세포의 세포내이입 결과를 **도 2 내지 도 5**에 나타내었다.
- [0525] NCI-N87 세포의 세포내이입 결과는 **도 2 및 도 3**에 나타내었다.
- [0526] NCI-N87 세포주에서는 24h 세포내이입 효율 측면에서 이중특이성 항체가 상응하는 단일클론 항체와 유사한/더 높은 세포내이입을 나타내었고, 대조군 이중특이적 항체는 세포내이입 활성이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이중특이적 항체의 세포내이입 속도는 다음과 같다: H-3C8-T-6F7>H-2B2-T-6F7>T-6F7-H-1H2.
- [0527] NCI-H292 세포의 세포내이입 결과는 **도 4 및 도 5**에 나타내었다.
- [0528] NCI-H292 세포주에서 24시간 이내의 세포내이입 속도는 다음과 같다: 이중특이적 항체의 세포내이입 효율은 T-6F7-IgG1-SI 단일클론 항체의 세포내이입 효율보다 약하지만 항-HER2 단일클론 항체 및 대조 이중특이적 항체의 세포내이입 효율보다는 강하다.
- [0529] **항-HER2/TROP2 이중특이적 항체의 안정성**
- [0530] 4개의 항-HER2/TROP2 항체 H-1H2-T-6F7, H-2B2-T-6F7, T-6F7-H-1H2 및 H-3C8-T-6F7을 pH 6.0의 완충제(3mg/mL 히스티딘, 80mg/mL 수크로스 및 0.2mg/mL Tween 80)를 사용하여 5mg/mL로 희석하였다. 희석된 항체를 밀봉된 에펜도르프 튜브에  $4 \pm 3^\circ\text{C}$ (이하  $4^\circ\text{C}$ 라 함)에서 7일 동안 보관; 또는  $40 \pm 3^\circ\text{C}$ (이하  $40^\circ\text{C}$ )에서 7일 동안 유지하여 열안정성을 평가하였다.
- [0531] 구체적으로, 다음의 시험을 수행하였다: (1) 가시적 불용성 물체의 용액 외관 및 존재를 관찰하는 것; (2) 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피(SEC-HPLC)에 의해 항체의 순도 변화를 검출하는 것(모든 피크 면적의 합에 대한 주요 피크 면적의 백분율(순도, %)로 표시됨); (3) 소수성 상호작용 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피(HIC-HPLC) 방법을 사용하여 항체의 겔보기 소수성의 변화를 검출하는 것(주요 피크의 체류 시간(HIC, min)으로 표시됨); (4) 환원(CE-SDS(R)) 및 비환원(CE-SDS(NR)) 조건하에 모세관 전기영동-나트륨 도데실 황페이트(CE-SDS)에 의해 항체의 순도 변화를 검출하는 것(모든 피크 면적의 합에 대한 주요 피크 면적의 백분율(순도, %)로 표시됨); (5) 모세관 등전 포커싱(Capillary Isoelectric Focusing, cIEF) 방법에 의해 항체 내의 전하 변이를 검출하는 것(주성분, 산성 성분 및 알칼리성 성분의 백분율로 표시됨).
- [0532] SEC-HPLC 실험에서, 항체 샘플을 정제수로 1mg/ml로 희석하고, Agilent 1290 크로마토그래프 시스템(XBridge™ Protein BEH SEC 컬럼(200 Å, Waters Corporation)과 연결됨)을 사용하였다. 다음 매개변수가 사용되었다: 이동상: 25mmol/L 인산염 완충제(PB) + 300mmol/L NaCl, pH 6.8; 유속: 1.8mL/분; 컬럼 온도: 25°C; 검출 파장: 280nm; 주사량: 10 µL; 샘플 트레이 온도: 약 4°C; 및 러닝타임: 7분.
- [0533] HIC-HPLC 실험에는 Agilent 1260 크로마토그래프 시스템(ProPac™ HIC-10 컬럼(4.6 x 250mm, Thermo Scientific)과 연결)을 사용하였고, 샘플은 이동상 A를 사용하여 0.5mg/mL로 희석하였다. 다음 매개변수가 사용되었다: 이동상 A: 1.0M 황산암모늄, 20mM 아세트산나트륨, 10% 아세트오니트릴 pH 6.5; 이동상 B: 20mM 아세트산나트륨, 10% 아세트오니트릴 pH 6.5; 유속: 0.8mL/분; 구배: 0분 100% A, 2분 100% A, 32분 100% B, 34분 100% B, 35분 100% A 및 45분 100% A; 컬럼 온도: 30°C; 검출 파장: 280nm; 주사량: 10 µL; 샘플 트레이 온도: 약 10°C; 및 러닝타임: 30분.
- [0534] cIEF 실험에서는 샘플 준비를 위해 Maurice cIEF Method Development Kit(Protein Simple, 카탈로그 번호: PS-MDK01-C)를 사용하였다. 구체적으로, 8 µL 단백질 샘플을 키트에서 다음 시약과 혼합하였다: 1µL Maurice cIEF pI 마커-4.05, 1µL Maurice cIEF pI 마커-9.99, 35µL 1% 메틸 셀룰로스 용액, 2µL 모리스 cIEF 500 mM 아르기닌, 4µL 암포라이트(Pharmalyte pH 범위 3-10), 및 물(최종 부피가 100µL가 되도록 첨가됨). Maurice

분석기(Protein Simple, Santa Clara, CA)에서 Maurice cIEF 카트리지(PS-MC02-C)를 사용하여 이미징 모세관 등전 포커싱 스펙트럼을 생성하였다. 샘플은 총 10분 동안 포커싱되었다. 기구상에 설치된 분석 소프트웨어를 사용하여 280nm 초점 단백질의 흡광도를 통합하였다.

[0535] CE-SDS 실험에서, Maurice(Protein simple, Maurice™) 및 Maurice CE-SDS Size Application Kit(Protein simple, 카탈로그 번호: PS-MAK02-S)를 사용하였다.

[0536] CE-SDS(NR)에서 54 µL 샘플 완충액, 6 µL 항체 샘플, 2.4 µL 25x 내부 표준, 3 µL 250nM 요오도아세트아미드 (SIGMA, 카탈로그 번호: 16125)를 미세원심분리 튜브에 첨가한 후 3000rpm에서 1분 동안 원심분리하고 70° C 수조에서 10분 동안 가열하였다. 이어서, 샘플을 실온으로 냉각시킨 후, 10000rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상층액 샘플 제제를 이후 96 웰 플레이트로 옮기고 Maurice에서 시험하였다. 다음의 파라미터가 사용되었다: 주입 전압 4.6kV, 주입 시간 20초, 분리 전압 5.75kV, 및 분리 시간 40분.

[0537] CE-SDS(R)에서 54 µL 샘플 완충액, 6 µL 항체 샘플, 2.4 µL 25x 내부 표준, 3 µL 2-메르캅토에탄올(SIGMA, 카탈로그 번호: M6250)을 마이크로원심분리 튜브에 첨가한 후, 3000rpm에서 1분 동안 원심분리하고 70° C 수조에서 10분 동안 가열하였다. 이어서, 샘플을 실온으로 냉각시킨 후, 10000rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 이어서, 50 µL 상층액 샘플 제제를 96웰 플레이트로 옮기고, Maurice에서 시험하였다. 주입 전압은 4.6kV, 주입 시간은 20초, 분리 전압은 5.75kV, 분리 시간은 30분이었다.

[0538] H-1H2-T-6F7, H-2B2-T-6F7, T-6F7-H-1H2 및 H-3C8-T-6F7의 상세한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0539] 결과는 H-3C8-T-6F7-IgG1과 H-2B2-T-6F7-IgG1이 더 나은 안정성과 물리적, 화학적 특성을 가지고 있음을 나타내었다.

[0540] **실시예 5. 항체 약물 접합체**

[0541] Protein A 정제 후, H-2B2-IgG1, H-3C8-IgG1, H-1H2-IgG1, T-6F7-IgG1-SI, H-2B2-CD28, H-3C8-CD28, CD28-T-6F7, CD28-H-1H2, H-2B2-T-6F7, H-3C8-T-6F7, H-1H2-T-6F7 및 T-6F7-H-1H2를 투석하였고 한외여과에 의해 PBS 완충액으로 농축시켰다. 농도는 UV 흡수에 의해 결정되었다. 이들 항체는 후속 항체 약물 커플링 반응에 사용되었다.

[0542] **약물 분자 및 항체 결합**

[0543] 정제된 항체 H-2B2-IgG1, H-3C8-IgG1, H-1H2-IgG1, T-6F7-IgG1-SI, H-2B2-CD28, H-3C8-CD28, CD28-T-6F7, CD28-H-1H2, H-2B2-T-6F7, H-3C8-T-6F7, H-1H2-T-6F7 및 T-6F7-H-1H2를 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(VC) 링커를 통해 MMAE(모노메틸 아우리스타틴 E) 또는 MMAF(모노메틸 아우리스타틴 F)와 커플링시켰다. 수득된 ADC의 약물-항체 비율(DAR)은 3 대 4였다.

[0544] 항체-약물 접합체 명칭은 항체 명칭 바로 뒤에 “ADC” 를 붙인다. 예를 들어, H-2B2-IgG1이 MMAE에 결합되면 H-2B2-IgG1-ADC로 명명된다.

[0545] SEC-HPLC 및 HIC-HPLC는 항체와 약물 분자의 결합을 검출하는 데 사용되었다. SEC-HPLC 시험 결과는 아래 표와 같다(표 13). 동종형-대조군-ADC의 경우, 인간 IgG1 동종형 대조군을 MMAE에 결합하여 동종형-대조군-ADC를 형성했다.

**표 13**

SEC 크로마토그래피

[0546]

ADC	ADC			항체	항체		
	HMW	주요 피크	LMW		HMW	주요 피크	LMW
H-2B2-IgG1-ADC	1.71	98.29	/	H-2B2-IgG1	2.17	97.83	/
H-3C8-IgG1-ADC	/	100.0	/	H-3C8-IgG1	/	100.0	/
H-1H2-IgG1-ADC	/	100.0	/	H-1H2-IgG1	/	100.0	/
T-6F7-IgG1-SI-ADC	2.33	94.53	3.13	T-6F7-IgG1-SI	0.81	98.15	1.04
H-2B2-CD28-ADC	3.41	69.93	26.66	H-2B2-CD28	3.87	77.39	18.74
H-3C8-CD28-ADC	1.80	74.61	23.59	H-3C8-CD28	2.71	79.96	17.33
CD28-T-6F7-ADC	1.97	71.04	26.99	CD28-T-6F7	5.41	81.87	12.72
CD28-H-1H2-ADC	1.18	94.41	4.41	CD28-H-1H2	2.74	94.73	2.53

H-1H2-T-6F7-ADC	1.55	88.25	10.20	H-1H2-T-6F7	2.38	93.40	4.22
H-3C8-T-6F7-ADC	2.28	90.16	7.56	H-3C8-T-6F7	2.67	95.30	2.03
H-2B2-T-6F7-ADC	1.31	90.82	7.87	H-2B2-T-6F7	1.93	92.55	5.52
T-6F7-H-1H2-ADC	0.70	97.77	1.53	T-6F7-H-1H2	1.18	98.09	0.73
사시투주맵-SI-ADC	5.16	94.84	/	사시투주맵-SI	1.26	98.74	/
트라스투주맵-ADC	1.43	98.57	/	트라스투주맵	6.32	93.68	/
동종형-대조군-ADC	2.22	97.78	/	동종형 대조군	3.29	96.71	/

[0547] HIC-HPLC 검출 결과를 표 14에 나타내었다. 결과는 ADC의 DAR이 약 3임을 나타낸다. 여기서 평균 DAR은 PA%(PA%는 280nm 피크 아래 면적으로 측정된 피크 면적 백분율)에 상응하는 약물 로드 0, 2, 4, 6 또는 8을 곱하고 100으로 나누어 결정된다. 예를 들어, H-2B2-IgG1-ADC의 평균 DAR=[(7.81×0)+(36.65×2)+(39.81×4)+(12.01×6)+(3.71×8)]/100=3.34 .

표 14

[0548] HIC-HPLC 시험 결과

	각 DAR 피크의 PA%					평균 DAR
	D0	D2	D4	D6	D8	
H-2B2-IgG1-ADC	7.81	36.65	39.81	12.01	3.71	3.34
H-3C8-IgG1-ADC	4.69	31.40	43.70	15.22	4.99	3.69
H-1H2-IgG1-ADC	8.19	38.70	41.12	9.82	2.16	3.18
T-6F7-IgG1-SI-ADC	9.85	38.72	33.14	9.79	8.51	3.37
H-2B2-CD28-ADC	13.04	37.50	26.82	15.46	7.18	3.32
H-3C8-CD28-ADC	9.23	34.88	32.82	15.31	7.76	3.55
CD28-T-6F7-ADC	9.37	31.49	25.66	23.94	9.55	3.86
CD28-H-1H2-ADC	8.05	37.07	36.09	14.42	4.36	3.40
H-1H2-T-6F7-ADC	6.63	33.01	35.83	17.71	6.82	3.70
H-3C8-T-6F7-ADC	10.74	35.32	32.55	15.84	5.55	3.40
H-2B2-T-6F7-ADC	12.20	40.16	32.26	12.07	3.32	3.08
T-6F7-H-1H2-ADC	8.49	37.06	37.83	13.13	3.49	3.32
사시투주맵-SI-ADC	15.41	42.55	28.41	7.71	5.92	2.92
트라스투주맵-ADC	4.52	28.80	40.08	18.08	8.52	3.95
동종형-대조군-ADC	10.42	36.75	36.59	12.91	3.32	3.24

[0549] 시험관 내 사멸 활성

[0550] 세포 배양 플레이트에서 배양된 인간 위암 세포주 NCI-N87 또는 인간 폐암 세포주 NCI-H292를 치료하기 위해 상이한 농도의 정제된 ADC(10000ng/mL, 2000ng/mL, 400ng/mL, 80ng/mL, 16ng/mL, 3.2ng/mL, 0.64ng/mL, 0.13ng/mL)를 사용하였고, IncuCyte(Sartorius AG, IncuCyte® S3)와 72시간 배양 후 사멸 활성을 검출하였다. 결과를 하기 표에 나타내었다.

표 15

[0551] 시험관 내 사멸 결과

ADC	IC50(ng/mL)	
	NCI-N87	NCI-H292
H-3C8-IgG1-ADC	2.56	65581
H-2B2-IgG1-ADC	2.24	2743
H-1H2-IgG1-ADC	3.96	20813
T-6F7-IgG1-SI-ADC	11.2	126
H-2B2-CD28-ADC	265	2853
H-3C8-CD28-ADC	82.7	2945
CD28-T-6F7-ADC	1500	1505
CD28-H-1H2-ADC	128	3260
H-1H2-T-6F7-ADC	21.8	929

H-2B2-T-6F7-ADC	22.7	167
H-6F7-T-1H2-ADC	19.8	675.5
H-3C8-T-6F7-ADC	17.6	208.5
트라스투주맙-ADC	14.8	289288
동종형 대조군	2180	36207

[0552] NCI-N87 세포주에서는 HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC가 대조군 이중특이적 항체 ADC보다 강한 사멸능력을 나타내었다(IC50>10배). NCI-H292 세포주에서 HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC 사멸은 TROP2 단일클론 항체 ADC보다 낮지만 HER2 단일클론 항체 ADC 및 대조 이중특이적 항체 ADC보다 강력하다. 데이터는 HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC가 HER2/TROP2 이중-표적-발현 세포주를 선택적으로 사멸시켰다는 것을 나타내었다. 또한, H-2B2-T-6F7-ADC의 시험관 내 세포 사멸 능력은 모 T-6F7-IgG1-SI-ADC와 유사하여 H-2B2-T-6F7-ADC가 TROP2-high/HER2-low 종양에 대해 잠재적인 효능을 갖고 있음을 시사한다.

[0553] **실시예 6. NCI-H1975 이중이식 모델의 항-종양 활성**

[0554] 폐 선암종 모델에서 ADC가 생체 내 종양 성장에 미치는 영향에 대해 시험되었다. 약  $5 \times 10^6$  NCI-H1975(폐 선암종 세포)를 B-NDG 마우스(Biocytogen Pharmaceuticals(Beijing) Co., Ltd., Beijing, China; 카탈로그 번호: B-CM-002)에 피하 주사하였다. 마우스의 종양이 약  $100\text{mm}^3$ 의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 나누었다. 이후, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에게 인산 완충 식염수(PBS) 또는 ADC를 주사하였다.

[0555] 주사량은 마우스의 체중과 목적하는 투여량인 3mg/kg을 기준으로 계산되었다. 종양의 장축과 단축의 길이를 측정하여 종양의 부피를  $0.5 \times (\text{장축}) \times (\text{단축})^2$ 으로 계산하였다. 마우스의 체중도 주 2회 측정되었다.

[0556] 종양 성장 억제 백분율(TGI%)은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:  $\text{TGI}(\%) = [1 - (\text{Ti} - \text{T0}) / (\text{Vi} - \text{V0})] \times 100$ . Ti는 i일 차에 처리군의 평균 종양 부피이다. T0는 0일 차에 처리군의 평균 종양 부피이다. Vi는 i일 차에 대조군의 평균 종양 부피이다. V0는 0일 차에 대조군의 평균 종양 부피이다.

[0557] 통계분석을 위해 T-test를 수행하였다. 60%보다 높은 TGI%는 종양 성장의 명확한 억제를 나타낸다.  $P < 0.05$ 는 유의한 차이를 나타내는 임계값이다.

**표 16**

군 배정

[0558]

군	마우스의 수	ADC	투여량	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	5	동종형-대조군-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G3	5	트라스투주맙-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G4	5	사시투주맙-SI-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G5	5	T-6F7-H-1H2-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G6	5	H-3C8-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G7	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G8	5	H-1H2-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G9	5	H-2B2-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G10	5	H-3C8-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G11	5	T-6F7-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G12	5	CD28-H-1H2-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G13	5	H-3C8-CD28-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G14	5	H-2B2-CD28-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G15	5	CD28-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2

[0559] 상이한 군의 마우스의 체중은 모두 증가하였다. 군 배정 당일(0일 차) 각 군의 평균 체중은 22.0g~22.6g 범위였으며; 실험 종료(28일 차)시 각 군의 평균 체중은 21.3g~24.1g 범위였으며, 각 군의 평균 체중은 94.1%~112.2% 범위에 있었다. 결과는 시험된 ADC가 내약성이 우수하고 마우스에게 분명히 독성이 없음을 나타내었다.

[0560] ADC로 처리된 군의 종양 크기는 도 7에 나타내었다. 아래 표는 군 배정 당일(0일 차), 군 배정 후 11일(11일 차), 군 배정 후 21일(21일 차), 및 실험 종료 시(28일 차)의 종양 부피; 마우스의 생존율; 종양 성장 억제 값 (TGI); 및 처리군과 대조군 사이의 종양 부피 및 체중의 통계적 차이(P 값)를 포함하는, 이 실험에 대한 결과를 요약한다.

표 17

[0561] 종양 크기 변화

		종양 부피(mm <sup>3</sup> )				생존	TGI%	P 값	
		0일 차	11일 차	21일 차	28일 차			체중	종양 부피
대조군	G1	99±3	702±77	1898±221	2745±204	4/5	NA	NA	NA
	G2	99±3	352±35	1138±101	1882±167	5/5	32.6	0.175	0.013
처리군	G3	99±3	158±20	478±57	1250±135	5/5	56.5	0.088	3.86E-04
	G4	99±3	128±24	367±36	940±121	5/5	68.2	0.021	9.16E-05
	G5	99±3	70±9	23±3	68±17	5/5	101.2	0.376	1.50E-06
	G6	99±4	51±5	25±2	101±15	5/5	99.9	0.287	1.62E-06
	G7	99±4	56±9	24±3	106±10	5/5	99.7	0.478	1.61E-06
	G8	99±4	80±17	54±24	181±36	5/5	96.9	0.965	2.29E-06
	G9	99±4	67±20	54±14	245±67	5/5	94.5	0.986	4.02E-06
	G10	99±4	41±3	38±6	234±35	5/5	94.9	0.735	2.62E-06
	G11	99±4	87±7	181±35	619±40	5/5	80.4	0.040	8.45E-06
	G12	99±3	101±29	166±31	640±110	5/5	79.6	0.418	2.74E-05
	G13	99±3	90±29	198±38	595±60	5/5	81.3	0.126	9.94E-06
	G14	99±4	104±13	316±49	743±56	5/5	75.7	0.014	1.51E-05
	G15	99±3	261±24	731±137	1097±226	5/5	62.3	0.109	1.16E-03

[0562] 모든 처리군(G3 내지 G15)의 종양 부피는 대조군(G1 및 G2)의 종양 부피보다 작았다. 처리군은 상이한 종양 억제 효과를 나타내었다. T-6F7-H-1H2-ADC(G5), H-3C8-T-6F7-ADC(G6) 및 H-2B2-T-6F7-ADC(G7)를 포함한 3개의 이종특이적 항체 ADC는 지속적이고 강력한 종양 억제 효과를 나타내었다.

[0563] 상응하는 단일클론 항체 ADC(G8-G11)와 G15를 제외한 대조 ADC(G12-G14)도 강력한 종양 억제 효과를 나타내었다. 동종형 대조군(G2)은 또한 강력한 종양 억제 효과를 나타내었는데, 이는 불안정한 링커 또는 동종형 대조군의 비특이적 결합으로 인한 것일 수 있으며, 이는 마우스에서 vc-MMAE의 방출을 초래하여 비특이적 사멸을 초래하였다.

[0564] 또 다른 실험에서는 B-NDG 마우스에 약  $5 \times 10^6$ 개의 NCI-H1975 세포를 피하 주사한 후 종양 부피가 약 300mm<sup>3</sup>까지 성장했을 때 마우스를 종양 크기에 따라 대조군과 상이한 처리군으로 나누었다(군당 5마리의 마우스). 처리군은 H-2B2-T-6F7 처리군(G2(3mg/kg) 및 G3(10mg/kg)), H-2B2-T-6F7-ADC 처리군(G4, 3mg/kg), 또는 MMAE 처리군(G5, 0.06mg/kg, G4와 등물 투여량)으로 무작위로 선택되었다. 대조군 마우스에는 PBS(G1)를 주사하였다. 투여 횟수는 주 1회(총 2회 투여)로 하였다. 종양 부피는 주 2회 측정되었으며, 마우스의 체중도 측정되었다.

[0565] 항체를 처리한 군의 종양 크기를 도 15 및 표 18에 나타내었으며, 대조군과 비교하여 상이한 수준으로 처리군의 종양 성장이 억제되었으며, 3mg/kg 용량의 항-HER2/TROP2 이종특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC는 10mg/kg 용량의 항-HER2/TROP2 이종특이적 항체 H-2B2-T-6F7에 비해 종양 억제 효과가 우수하였다. MMAE 처리군은 종양 성장이 제한적으로 억제되었으며, 이는 H-2B2-T-6F7-ADC의 생체내 효능이 HER2와 TROP2 항원의 결합에 달려 있음을 시사한다.

표 18

[0566] 종양 크기 변화

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )			생존	TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	11일 차	18일 차			
G1	307±5	899±29	2169±145	5/5	NA	NA
G2	308±11	833±57	1862±119	5/5	16.5	0.142

G3	307±9	685±18	1735±141	5/5	23.3	0.065
G4	308±10	373±47	201±20	5/5	105.7	9.18E-07
G5	307±6	710±43	1391±49	5/5	41.8	0.001

[0567] 또 다른 실험에서는, B-NDG 마우스에 약  $1 \times 10^6$  NCI-H1975 세포를 피하 주사하였고, 종양 부피가 약  $300\text{mm}^3$  까지 성장한 경우 마우스를 종양 크기에 따라 상이한 처리군으로 나누었다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

**표 19**

군 배정

[0568]

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	0.3mg/kg	i.v.	QW	2
G3	5	H-2B2-T-6F7-ADC	1mg/kg	i.v.	QW	2
G4	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G5	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	1mg/kg	i.v.	QW	2
G6	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	3mg/kg	i.v.	QW	2
G7	5	디시타맙 베도틴	1mg/kg	i.v.	QW	2
G8	5	디시타맙 베도틴	3mg/kg	i.v.	QW	2
G9	5	트라스투주맙 데록스테칸	1mg/kg	i.v.	QW	2
G10	5	트라스투주맙 데록스테칸	3mg/kg	i.v.	QW	2

[0569] 디시타맙 베도틴(Disitamab vedotin, RC48, RemeGen Co., Ltd., VH 서열번호: 83; VL 서열번호: 84)은 RemeGen에서 개발한 HER2에 대한 재조합 인간화 단일클론 항체와 MAAE 페이로드로 구성된 ADC이다. 2021년에 이 제품은 HER2 발현 국소 진행성/전이성 위암(위식도 접합부 암종) 치료용으로 중국에서 조건부 승인을 받았다.

[0570] 트라스투주맙 데록스테칸(Enhertu<sup>®</sup>, Daiichi Sankyo Company, Limited., VH 서열번호: 85; VL 서열번호: 86)은 테트라펩티드 링커를 통해 토포이소머라제 I 억제제 페이로드에 부착된 인간화 항-HER2 항체로 구성되는 ADC이다. 이 제품은 전이성 환경에서 이전에 2개 이상의 항-HER2 기반 요법을 받은 절제 불가능 또는 전이성 HER2 양성 유방암 성인 환자의 치료를 위해 2020년 미국에서 처음 출시되었다.

[0571] 종양 부피를 주 2회 측정하였고 결과를 도 16 및 표 20에 나타내었으며, 이는 동일한 투여량 및 투여 빈도에서 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 사시투주맙 고비테칸 유사체, 디시타맙 베도틴 또는 트라스투주맙 데록스테칸보다 더 높은 TGI%로 종양 성장을 억제하였음을 나타낸다. 또한, H-2B2-T-6F7-ADC의 종양 억제는 용량 증가에 따른 상관 경향을 나타내었다.

**표 20**

종양 크기 변화

[0572]

군	종양 부피( $\text{mm}^3$ )			생존	TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	11일 차	18일 차			
G1	308±12	1351±108	2391±225	5/5	NA	NA
G2	308±19	925±124	1678±289	5/5	34.2	0.087
G3	309±17	464±81	632±167	5/5	84.5	2.35E-04
G4	308±22	289±30	194±26	5/5	105.5	1.05E-05
G5	308±14	1546±196	2448±424	5/5	-2.7	0.909
G6	309±15	1216±190	2210±420	5/5	8.7	0.713
G7	309±16	1486±111	2553±167	5/5	-7.7	0.580
G8	309±16	633±65	869±183	5/5	73.1	0.001
G9	309±16	1214±206	2004±369	5/5	18.6	0.396
G10	309±20	1004±149	1660±313	5/5	35.1	0.094

[0573] 실시예 7. SK-OV-3 이종이식 모델의 항종양 활성

[0574] ADC는 난소암 모델에서 생체 내 종양 성장에 미치는 영향에 대해 시험되었다. 약  $5 \times 10^6$  SK-OV-3 세포를 B-NDG 마우스에 피하 주사하였다. 마우스의 종양이 약  $200\text{-}250\text{mm}^3$ 의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 배치하였다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 투여 빈도는 주 1회(총 3회 투여)로 하였다. 1차 및 2차 투여량은 모두 3mg/kg이었고, 마지막 투여량은 5mg/kg이었다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 21

군 배정

[0575]

군	마우스의 수	항체	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	i.v.	QW	3
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	i.v.	QW	3
G3	5	H-2B2-IgG1-ADC	i.v.	QW	3
G4	5	T-6F7-IgG1-SI-ADC	i.v.	QW	3
G5	5	트라스투주맙 데록스테칸 유사체	i.v.	QW	3
G6	5	DS-1062 유사체	i.v.	QW	3

[0576] 종양 부피를 주 2회 측정하였고, 그 결과를 도 17 및 표 22에 나타내었으며, 이는 난소암 모델에서 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 3mg/kg에서 가장 높은 종양 성장 억제 효과를 갖고 있었음을 나타낸다. 또한, 항-HER2 단일클론 항체 ADC H-2B2-IgG1-ADC는 양성 대조군 트라스투주맙 데록스테칸 유사체보다 더 양호한 효능을 획득하였고, 항-TROP2 단일클론 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC는 양성 대조군 DS-1062 유사체보다 더 양호한 효능을 획득하였다.

표 22

종양 크기 변화

[0577]

군	종양 부피( $\text{mm}^3$ )				TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	13일 차	23일 차	33일 차		
G1	230 ± 12	560 ± 36	746 ± 54	1097 ± 66	NA	NA
G2	230 ± 12	334 ± 21	232 ± 29	319 ± 56	89.7	8.09E-06
G3	230 ± 15	306 ± 16	246 ± 33	362 ± 34	84.7	2.56E-06
G4	230 ± 15	472 ± 26	490 ± 46	682 ± 73	47.8	0.003
G5	229 ± 15	361 ± 24	392 ± 32	583 ± 51	59.2	1.51E-04
G6	230 ± 15	623 ± 68	833 ± 78	1213 ± 115	-13.4	0.429

[0578] 또 다른 실험에서는 B-NDG 마우스에 약  $5 \times 10^6$ 개의 SK-OV-3 세포를 피하 주사하였고, 종양의 부피가 약  $200\text{-}250\text{mm}^3$ 까지 성장하였을 때 마우스를 종양 크기를 기준으로 대조군과 4개의 처리군으로 나누었다(군당 5마리의 마우스). H-2B2-T-6F7-ADC를 0.3mg/kg(G2), 1mg/kg(G3), 3mg/kg(G4) 또는 10mg/kg(G5)으로 정맥내(i.v.) 투여하기 위해 처리군 마우스를 무작위로 선택했다. 대조군 마우스에는 동량의 PBS(G1)를 주사하였다. 투여 횟수는 주 1회(총 2회 투여)로 하였다. 종양 부피를 주 2회 측정하였고 그 결과를 표 23에 나타내었으며, 이는 H-2B2-T-6F7-ADC가 용량 의존적 방식으로 지속적인 종양 억제 활성을 나타냄을 나타낸다.

표 23

종양 크기 변화

[0579]

군	종양 부피( $\text{mm}^3$ )				TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	11일 차	21일 차	35일 차		
G1	208 ± 8	497 ± 32	937 ± 61	1291 ± 115	NA	NA
G2	207 ± 10	482 ± 41	752 ± 51	1169 ± 69	11.2	0.392

G3	207±13	378±18	604±19	952±77	31.3	0.055
G4	207±12	321±32	433±47	568±70	66.7	0.001
G5	207±12	132±11	38±7	59±24	113.6	6.06E-06

[0580] 실시예 8. NCI-N87 모델의 항종양 활성

[0581] ADC는 위암 모델에서 생체 내 종양 성장에 미치는 영향을 시험하였다. 약  $5 \times 10^6$  NCI-N87 세포를 B-NDG 마우스에 피하 주사하였다. 마우스의 종양이 약 150mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 나누었다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 24

군 배정

[0582]

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	1
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	1mg/kg	i.v.	QW	1
G3	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	1
G4	5	H-2B2-IgG1-ADC	1mg/kg	i.v.	QW	1
G5	5	H-2B2-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	1
G6	5	T-6F7-IgG1-SI-ADC	1mg/kg	i.v.	QW	1
G7	5	T-6F7-IgG1-SI-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	1
G8	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	1mg/kg	i.v.	QW	1
G9	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	3mg/kg	i.v.	QW	1
G10	5	디시타맙 베도틴	1mg/kg	i.v.	QW	1
G11	5	디시타맙 베도틴	3mg/kg	i.v.	QW	1
G12	5	트라스투주맙 데록스테칸	1mg/kg	i.v.	QW	1
G13	5	트라스투주맙 데록스테칸	3mg/kg	i.v.	QW	1

[0583] 종양 부피를 주 2회 측정하였고 그 결과를 표 25에 나타내었으며, 이는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 위암 NCI-N87 모델 중 3mg/kg에서 가장 높은 종양 성장 억제력을 나타냄을 나타낸다. 항-TROP2 단일클론 항체 ADC 중에서 T-6F7-IgG1-SI-ADC는 1mg/kg 및 3mg/kg의 용량 모두에서 양성 대조군 사시투주맙 고비테칸 유사체보다 더 양호한 효능을 획득하였다. 항-HER2 단일클론 항체 ADC H-2B2-IgG1-ADC도 1mg/kg 및 3mg/kg의 용량에서 양성 대조군인 디시타맙 베도틴과 트라스투주맙 데록스테칸보다 더 양호한 효능을 획득하였다.

표 25

종양 크기 변화

[0584]

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )				TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	11일 차	21일 차	32일 차		
G1	142±3	269±18	297±21	409±40	NA	NA
G2	143±4	141±6	103±7	133±14	103.7	1.87E-04
G3	142±3	92±5	42±6	48±6	135.2	2.10E-05
G4	142±4	153±6	118±11	181±20	85.6	0.001
G5	142±6	91±14	50±11	64±18	129.6	4.99E-05
G6	143±5	206±22	197±22	269±32	52.6	0.026
G7	142±4	120±4	84±5	124±13	106.8	1.50E-04
G8	143±4	222±14	237±25	337±31	27.1	0.196
G9	143±5	193±11	232±17	313±20	36.3	0.063
G10	142±5	207±19	210±22	335±55	27.7	0.310
G11	143±4	122±11	98±15	116±11	110.1	1.10E-04
G12	143±6	162±7	147±7	250±13	59.7	0.006



G13	143±6	105±9	89±11	116±20	109.9	1.87E-04
-----	-------	-------	-------	--------	-------	----------

[0585] 실시예 9. BT474 모델의 항종양 활성

[0586] ADC는 유방암 모델에서 생체 내 종양 성장에 미치는 영향을 시험하였다. 약  $1 \times 10^7$  BT-474 세포를 B-NDG 마우스에 피하 주사하였다. 마우스의 종양이 약 200mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 나누었다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 26

[0587] 군 배정

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	6	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	6	동종형-대조군-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G3	6	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G4	6	H-2B2-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G5	6	T-6F7-IgG1-SI-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G6	6	사시투주맙 고비테칸 유사체	3mg/kg	i.v.	QW	2
G7	6	디시타맙 베도틴	3mg/kg	i.v.	QW	2
G8	6	트라스투주맙 데록스테칸	3mg/kg	i.v.	QW	2

[0588] 종양 부피는 주 2회 측정하였고 그 결과를 도 18에 나타내었으며, 이는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 HER2-고발현 유방암 BT-474 모델(23일 차 TGI%=122.0%)에서 3mg/kg에서 가장 높은 종양 성장 억제력을 갖고 있음을 나타낸다. 항-TROP2 단일클론 항체 ADC 중에서 T-6F7-IgG1-SI-ADC는 양성 대조군 사시투주맙 고비테칸 유사체보다 더 양호한 효능을 획득하였다(각각 TGI%=68.7% 및 51.4%). 항-HER2 단일클론 항체 ADC H-2B2-IgG1-ADC는 또한 양성 대조군인 디시타맙 베도틴 및 트라스투주맙 데록스테칸보다 더 양호한 효능을 획득하였다(각각 TGI%=121.9%, 94.4% 및 92.9%).

[0589] 실시예 10. NCI-H292 모델의 항종양 활성

[0590] NCI-H292 폐암 모델에서 ADC가 종양 성장에 미치는 영향을 시험하였다. 약  $5 \times 10^6$  NCI-H292 세포를 B-NDG 마우스에 피하 주사하였다. 마우스의 종양이 약 300mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 나누었다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 27

[0591] 군 배정

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	1
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	1mg/kg	i.v.	QW	1
G3	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G4	5	H-2B2-T-6F7-ADC	10mg/kg	i.v.	QW	1
G5	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	1mg/kg	i.v.	QW	1
G6	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	3mg/kg	i.v.	QW	2
G7	5	사시투주맙 고비테칸 유사체	10mg/kg	i.v.	QW	1
G8	5	트라스투주맙 데록스테칸	1mg/kg	i.v.	QW	1
G9	5	트라스투주맙 데록스테칸	3mg/kg	i.v.	QW	2
G10	5	트라스투주맙 데록스테칸	10mg/kg	i.v.	QW	1

[0592] 종양 부피는 주 2회 측정되었으며 그 결과는 표 28에 나타나 있으며, 이는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 용량 의존적 방식으로 종양 성장을 억제하고, 각각 1mg/kg, 3mg/kg 및 10mg/kg에서 처리군의 가장 높은 TGI%를 획득하였음을 나타낸다. 결과는 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC H-2B2-T-6F7-ADC가 HER2 저발현 종양 치료에 대한 치료 잠재력을 갖고 있음을 나타낸다.

표 28

[0593] 종양 크기 변화

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )				TGI%	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	11일 차	21일 차	32일 차		
G1	311±14	918±88	1492±144	1914±205	NA	NA
G2	311±20	656±67	1097±157	1484±104	26.9	0.098
G3	311±25	452±48	546±81	925±76	61.7	0.005
G4	311±19	140±21	323±38	605±17	81.6	2.20E-04
G5	311±19	710±51	1291±149	1629±161	17.8	0.305
G6	311±17	574±46	801±14	1132±43	48.8	0.006
G7	311±20	487±51	833±39	1118±37	49.7	0.005
G8	311±14	743±68	1286±71	1927±156	-0.7	0.963
G9	311±18	529±45	714±11	1141±84	48.2	0.016
G10	310±18	252±31	549±31	899±42	63.3	0.001

[0594] 실시예 11. 인간 췌장 환자 유래 이중이식(PDX) 모델의 생체 내 효능

[0595] ADC는 두 가지 인간 췌장 PDX(PDX001 및 PDX002) 모델에서 그 효과를 시험하였다. 환자 유래 췌장 종양 단편의 면역형광 염색을 수행하였고 이미지를 HALO 3.2 버전을 통해 분석하였다. 그 결과, PDX001의 HER2 양성 세포 및 TROP2 양성 세포는 각각 84.72% 및 89.09%로 나타났다. PDX002에서는, HER2 양성 세포와 TROP2 양성 세포가 각각 86.34%, 89.17%로 나타났다.

[0596] PDX001에서는, B-NDG 마우스는 환자 유래 췌장 종양 단편(2mm x 2mm x 2mm)을 우측 측복부에 이식하였다. 마우스의 종양이 약 300-400mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 배치하였다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 29

[0597] 군 배정

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	6	PBS	-	i.v.	QW	1
G2	6	H-2B2-T-6F7-ADC	5mg/kg	i.v.	QW	1
G3	6	H-2B2-IgG1-ADC	5mg/kg	i.v.	QW	1
G4	6	T-6F7-IgG1-SI-ADC	5mg/kg	i.v.	QW	1
G5	6	사시투주맙 고비테칸 유사체	5mg/kg	i.v.	QW	1
G6	6	디시타맙 베도틴	5mg/kg	i.v.	QW	1
G7	6	트라스투주맙 데록스테칸	5mg/kg	i.v.	QW	1

[0598] 종양 부피를 주 2회 측정하였고, 결과를 도 19에 나타내었으며, 이는 H-2B2-T-6F7-ADC(G2), H-2B2-IgG1-ADC(G3) 및 T-6F7-IgG1-SI-ADC(G4)를 사용한 처리가 HER2/TROP2 동시-발현 인간 췌장 PDX 모델에서 유의한 종양 성장 억제를 초래하였고, 제38일(군 배정 후 38일 차)에 TGI%는 각각 100.5%, 88.2% 및 66.4%였다.

[0599] PDX002 모델에서, 마우스의 종양이 약 250-300mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양 크기에 따라 대조군과 상이한 처리군으로 나누었다(군당 5마리). 처리군은 3mg/kg H-2B2-T-6F7-ADC 처리(G2), H-2B2-IgG1-ADC 처리(G3), T-6F7-IgG1-SI-ADC 처리(G4), 사시투주맙 고비테칸 유사체 처리(G5), 디시타맙 베도틴 처리(G6) 또는 트

라스투주맵 데록스테칸 처리(G7)로 무작위로 선택되었다. 대조군 마우스에는 PBS(G1)를 주사하였다. 투여횟수는 주 1회(총 1회 투여)로 하였다.

[0600] ADC로 처리된 군의 종양 크기는 도 20에 나타내었다. 위의 생체 내 발견과 일치하게, H-2B2-T-6F7-ADC(G2), H-2B2-IgG1-ADC(G3) 및 T-6F7-IgG1-SI-ADC(G4)는 21일 차(군 배정 후 21일)에 각각 107.5%, 91.9% 및 88.2%의 TGI%로 실질적인 항종양 활성을 나타내었다.

[0601] 실시예 12. 독성학 연구

[0602] B-NDG 마우스의 독성학 연구

[0603] 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC의 독성을 B-NDG 마우스에서 결정하였다. 구체적으로, 생리 식염수(G1) 또는 H-2B2-T-6F7-ADC를 10 mg/kg(G2), 30 mg/kg(G3), 50 mg/kg(G4), 70 mg/kg(G5) 또는 100 mg/kg(G6)으로 정맥 주사하여 마우스를 6개 군(군당 12마리 마우스)으로 나누어 투여하였다. 투여 빈도는 주 1회(총 1회 투여)로 하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

표 30

군 배정

[0604]

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	12	식염수	-	i.v.	단일 용량	1
G2	12	H-2B2-T-6F7-ADC	10mg/kg	i.v.	단일 용량	1
G3	12	H-2B2-T-6F7-ADC	30mg/kg	i.v.	단일 용량	1
G4	12	H-2B2-T-6F7-ADC	50mg/kg	i.v.	단일 용량	1
G5	12	H-2B2-T-6F7-ADC	70mg/kg	i.v.	단일 용량	1
G6	12	H-2B2-T-6F7-ADC	100mg/kg	i.v.	단일 용량	1

[0605] 체중은 1주 차에는 매일 측정하였고, 이후 4주 후 실험이 종료될 때까지 주 2회 측정하였다. 도 21a 내지 도 21b에 나타난 바와 같이, G5군과 G6군 마우스는 유의한 체중 감소를 나타냈으며, 상이한 처리군 마우스의 체중은 대조군 마우스와 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. 100mg/kg의 H-2B2-T-6F7-ADC를 투여받은 G6 군에서 한 마리의 마우스 사망이 발생하였다.

[0606] C57BL/6 마우스 및 hHER2/TROP2 마우스의 독성학 연구

[0607] 이전 실험과 유사하게, C57BL/6 마우스 및 hHER2/TROP2 마우스에서 항-HER2/TROP2 이중특이적 항체 ADC의 독성을 결정하였다.

[0608] hHER2/TROP2 마우스는 HER2 인간화 마우스와 TROP2 인간화 마우스를 교배하여 생성되었다. HER2 인간화 마우스는 키메라 HER2 단백질(서열번호: 87)을 발현하도록 조작되었으며, 여기서 마우스 HER2 단백질의 세포외 및 막관통 영역은 상응하는 인간 HER2 세포외 및 막관통 영역으로 대체되었다. TROP2 인간화 마우스는 인간 TROP2 단백질(서열번호: 88)을 발현하도록 조작되었으며, 여기서 마우스 TROP2 유전자의 코딩 영역은 상응하는 인간 TROP2 코딩 영역으로 대체되었다. HER2 인간화 마우스 및 TROP2 인간화 마우스에 관한 상세한 설명은 CN202110959814.8 및 CN202111119814.3에서 찾아볼 수 있으며; 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0609] hHER2/TROP2 마우스 및 C57BL/6 마우스는 생리 식염수, H-2B2-T-6F7-ADC(10mg/kg, 30mg/kg, 90mg/kg) 또는 MMAE(0.19mg/kg, 0.57mg/kg, 1.14mg/kg 및 1.71mg/kg, 각각 10mg/kg, 30mg/kg, 60mg/kg 및 90mg/kg에서 등물량의 H-2B2-T-6F7-ADC)와 함께 정맥내 주사로 투여된 체중에 따라 다른 군(군당 6마리)에 두었다. 투여 빈도는 주 1회(총 1회 투여)로 하였다. 투여 계획 및 7일 차 생존에 대한 자세한 내용은 아래 표에 나와 있다.

표 31

군 배정

[0610]

군	마우스의 수	마우스	항체	투여량(mg/kg)	빈도	생존
G1	6	C57BL/6 마우스	식염수	-	QW	6/6
G2	6	C57BL/6 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	10mg/kg	QW	6/6

G3	6	C57BL/6 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	30mg/kg	QW	6/6
G4	6	C57BL/6 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	90mg/kg	QW	6/6
G5	6	C57BL/6 마우스	MMAE	0.19mg/kg	QW	6/6
G6	6	C57BL/6 마우스	MMAE	0.57mg/kg	QW	6/6
G7	6	C57BL/6 마우스	MMAE	1.14mg/kg	QW	5/6
G8	6	C57BL/6 마우스	MMAE	1.71mg/kg	QW	5/6
G9	6	hHER2/TROP2 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	10mg/kg	QW	6/6
G10	6	hHER2/TROP2 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	30mg/kg	QW	6/6
G11	6	hHER2/TROP2 마우스	H-2B2-T-6F7-ADC	90mg/kg	QW	5/6

[0611] 체중은 1주일 후 실험이 종료될 때까지 매일 측정하였다. 그 결과, G1-G6 및 G9-G10 군의 모든 마우스가 생존한 것으로 나타났다. 그러나 처리군 G7, G8 및 G11에서는 일부 독성이 나타났다.

[0612] **실시예 13. 인간 결장직장암 PDX 모델의 생체내 효능**

[0613] 인간 결장직장암 환자 유래 이종이식 모델에서 ADC의 효과를 시험하였다. 환자 유래 결장직장 종양 단편의 면역형광 염색을 수행하였고 이미지를 HALO 3.2 버전을 통해 분석했다. 결과는 인간 결장직장 종양 조직에서 HER2 양성 세포와 TROP2 양성 세포의 백분율이 각각 13.28%와 15.30%인 것으로 나타났다. B-NDG 마우스의 우측 측복부에 환자 유래 결장직장 종양 단편(2mm x 2mm x 2mm)을 이식하였다. 마우스의 종양이 약 250-300mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 배치하였다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

**표 32**

군 배정

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	6mg/kg	i.v.	QW	2
G3	5	사시투주맙 고비테칸	10mg/kg	i.v.	BIW	4
G4	5	디시타맙 베도틴	6mg/kg	i.v.	QW	2
G5	5	트라스투주맙 데록스테칸	6mg/kg	i.v.	QW	2

[0615] 종양 부피는 주 2회 측정하였고 그 결과를 표 33 및 도 22에 나타내었다. PBS(G1) 및 사시투주맙 고비테칸(G3) 과 비교하여 H-2B2-T-6F7-ADC(G2), 디시타맙 베도틴(G4) 및 트라스투주맙 데록스테칸(G5)은 유의한 항종양 효과를 나타냈으며, H-2B2-T-6F7-ADC는 39일 차에 96.4%의 높은 TGI%로 종양 성장을 억제하였다. 또한, H-2B2-T-6F7-ADC 처리군 및 트라스투주맙 데록스테칸 처리군은 군 배정 후 49일 동안 지속되었고(49일 차), H-2B2-T-6F7-ADC는 HER2-낮은 발현을 갖는 인간 결장직장 PDX 모델에서 트라스투주맙 데록스테칸 치료군보다 더 양호한 종양 억제를 나타내었다.

**표 33**

종양 크기 변화

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )				생존 (39일 차)	TGI% (39일 차)	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	14일 차	28일 차	39일 차			
G1	270 ± 17	933 ± 141	1938 ± 287	2040 ± 88	3/5	NA	NA
G2	270 ± 20	151 ± 54	181 ± 109	333 ± 172	5/5	96.4	3.71E-04
G3	270 ± 18	682 ± 57	1726 ± 151	2520 ± 379	5/5	-27.1	0.383
G4	270 ± 19	291 ± 74	600 ± 154	1022 ± 249	5/5	57.5	0.024
G5	270 ± 24	133 ± 10	212 ± 33	544 ± 77	5/5	84.5	1.67E-05

[0617] **실시예 14. 인간 폐암 PDX 모델의 생체내 효능**

[0618] 인간 폐암 환자 유래 이중이식 모델에서 ADC의 효과를 시험하였다. 환자 유래 폐 종양 단편의 면역형광 염색을 수행하였고 HALO 3.2 버전을 통해 이미지를 분석하였다. 결과는 인간 폐 종양 조직에서 HER2 양성 세포 및 TROP2 양성 세포의 비율이 각각 67.05% 및 72.04%인 것으로 나타났다. B-NDG 마우스의 우측 측복부에 환자 유래 폐 종양 단편(2mm x 2mm x 2mm)을 이식하였다. 마우스의 종양이 약 250-300mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 배치하였다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

**표 34**

군 배정

[0619]

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G3	5	H-2B2-T-6F7-ADC	6mg/kg	i.v.	QW	2
G4	5	H-2B2-IgG1-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G5	5	T-6F7-IgG1-SI-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G6	5	사시투주맵 고비테칸	10mg/kg	i.v.	BIW	4
G7	5	디시타맵 베도틴	6mg/kg	i.v.	QW	2
G8	5	트라스투주맵 데록스테칸	6mg/kg	i.v.	QW	2

[0620] 종양 부피는 주 2회 측정하였고 그 결과를 표 35 및 도 23에 나타내었다. 3mg/kg의 H-2B2-T-6F7-ADC(G2)는 모 단일클론 항체 H-2B2-IgG1-ADC(G4) 및 T-6F7-IgG1-SI-ADC(G5)보다 더 양호한 항종양 활성을 획득하였다. 추가 적으로,

[0621] H-2B2-IgG1-ADC는 HER2 저발현 인간 폐 PDX 모델에서 양성 대조군 디시타맵 베도틴 및 6mg/kg 투여량의 트라스 투주맵 데록스테칸보다 3mg/kg의 투여량에서도 유의한 종양 성장 억제를 나타내었다.

**표 35**

종양 크기 변화

[0622]

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )			TGI% (28일 차)	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	14일 차	28일 차		
G1	270±8	1221±97	3309±451	NA	NA
G2	270±15	337±22	372±116	96.7	2.06E-04
G3	270±15	208±17	95±11	105.8	8.40E-05
G4	270±11	572±79	1238±214	68.2	0.003
G5	270±10	558±64	1291±199	66.4	0.003
G6	270±14	568±31	1639±122	55.0	0.005
G7	270±13	555±54	865±207	80.4	0.001
G8	270±13	420±11	1051±167	74.3	0.001

[0623] 마우스 종양 부피 및 생존율을 28일 차 이후에도 계속 모니터링하였다. 63일 차의 실험 종료 시점에서, G1-G8 군(G3 제외)의 모든 마우스는 과도한 종양 부피로 인해 안락사되었고, 군 G3에서는 모든 마우스가 평균 종양 부 피 514±172mm<sup>3</sup>로 생존하여 H-2B2-T-6F7-ADC는 강력한 치료 잠재력을 갖고 있음을 나타내었다.

[0624] 실시예 15. 인간 위암 PDX 모델의 생체 내 효능

[0625] ADC는 인간 위암 환자 유래 이중이식 모델에서 효과가 시험되었다. 환자 유래 위종양 단편에 대한 면역형광염색 을 실시한 결과, HER2 양성 세포와 TROP2 양성 세포의 백분율은 각각 0.08%, 0.34%로 나타났다. B-NDG 마우스의 우측 측복부에 환자 유래 위 종양 단편(2mm x 2mm x 2mm)을 이식하였다. 마우스의 종양이 약 150-200mm<sup>3</sup>의 부피 에 도달했을 때, 마우스를 종양의 부피에 따라 무작위로 상이한 군으로 배치하였다. 이어서, 정맥내(i.v.) 투여

를 통해 마우스에 PBS 또는 ADC를 주사하였다. 자세한 투여 계획은 아래 표와 같다.

**표 36**

군 배정

군	마우스의 수	항체	투여량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.v.	QW	2
G2	5	H-2B2-T-6F7-ADC	3mg/kg	i.v.	QW	2
G3	5	H-2B2-T-6F7-ADC	6mg/kg	i.v.	QW	2
G4	5	사시투주맵 고비테칸	10mg/kg	i.v.	BIW	4
G5	5	디시타맵 베도틴	6mg/kg	i.v.	QW	2
G6	5	트라스투주맵 데록스테칸	6mg/kg	i.v.	QW	2

종양 부피는 주 2회 측정하였고 그 결과를 표 37 및 도 24에 나타내었다. 실험 결과는 H-2B2-T-6F7-ADC가 HER2 저발현 인간 위 PDX 모델에서 6mg/kg 투여량의 양성 대조군 디시타맵 베도틴 및 트라스투주맵 데록스테칸보다 더 양호한 항종양 활성을 획득하였음을 나타내었다.

**표 37**

종양 크기 변화

군	종양 부피(mm <sup>3</sup> )			TGI% (28일 차)	다음의 P 값 종양 부피
	0일 차	14일 차	28일 차		
G1	165 ± 13	635 ± 63	1202 ± 163	NA	NA
G2	166 ± 13	177 ± 35	381 ± 116	79.3	0.004
G3	165 ± 15	101 ± 20	180 ± 36	98.6	2.42E-04
G4	166 ± 20	282 ± 20	554 ± 69	62.5	0.005
G5	166 ± 18	160 ± 39	341 ± 56	83.2	0.001
G6	166 ± 14	263 ± 44	655 ± 126	52.8	0.031

**실시예 16. 항-HER2/TROP2 ADC에 대한 시험관 내 혈장 안정성 시험**

H-2B2-T-6F7-ADC, 인간 혈장, 원숭이 혈장 및 0.5% BSA PBS 용액을 각각 0.22 μm 필터를 통해 여과하여 멸균하였다. H-2B2-T-6F7-ADC를 멸균 혈장 또는 PBS 중 0.5% BSA의 용액에 최종 농도 0.1mg/ml로 첨가하였고, 반응 용액을 37 ° C의 인큐베이터에서 배양하였으며; 배양일을 0일 차로 기록하였고, LC-MS(액체 크로마토그래프-질량 분광계)에 의한 유리 MMAE의 검출을 위해 각각 1, 2, 6, 8, 11 및 14일 차에 샘플을 채취하였다. 전체 항체 MMAE에 대한 유리 MMAE의 비율(이하, MMAE 방출률(%)이라 함)을 계산하였다.

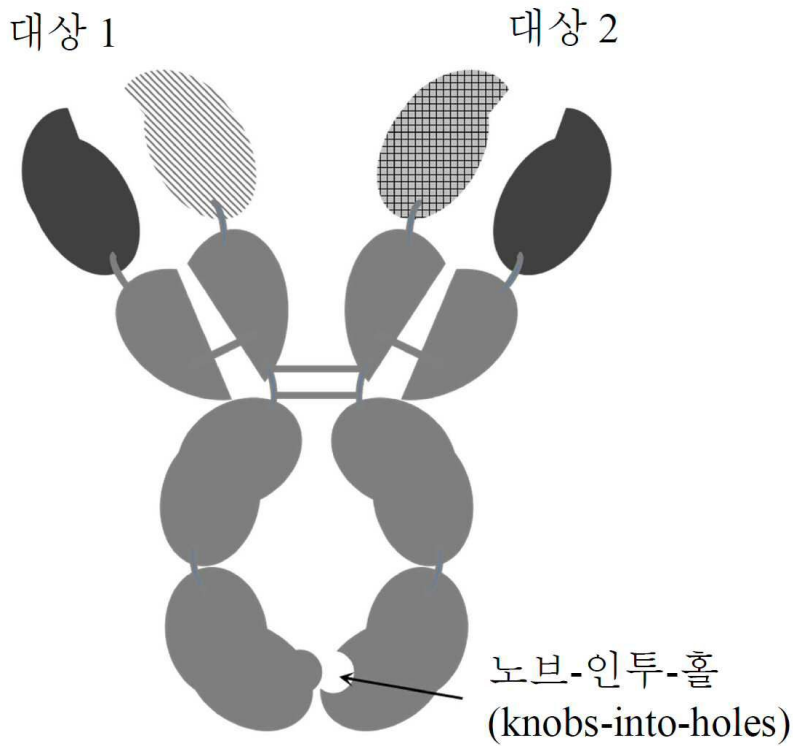
결과는 도 25에 나타내었으며, 이는 H-2B2-T-6F7-ADC가 PBS 중 0.5% BSA 용액뿐만 아니라 인간 혈장과 원숭이 혈장 모두에서 상당히 안정하였으며 유리 MMAE의 방출 속도는 최대 1.0% 이하임을 나타낸다.

**기타 실시양태**

본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 설명되었으나, 전술한 설명은 첨부되는 청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하려는 것이 아니라는 점을 이해하여야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 다음 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

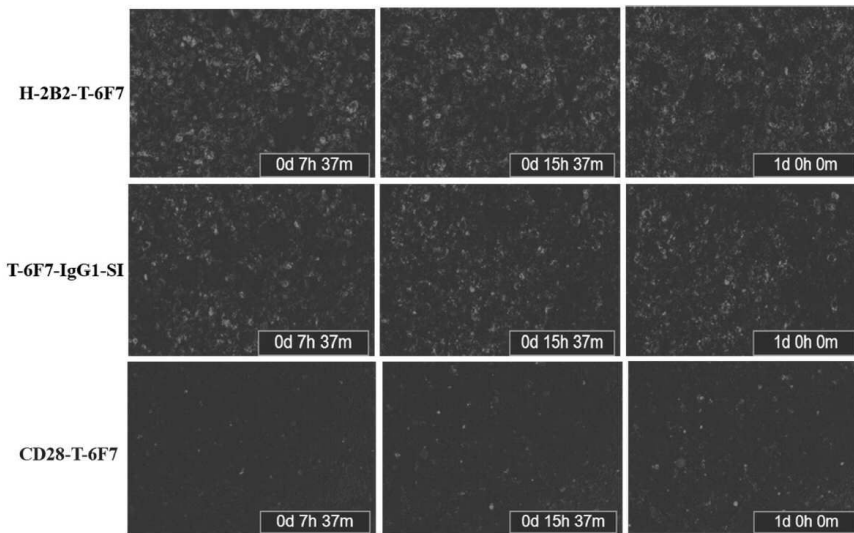
도면1



도면2

항체	NCI-N87		
	8시간	16시간	24시간
동종형 대조군	57632	93854	158699
트라스투주맙 유사체	2884434	5384491	7215002
사시투주맙 유사체	1974395	3382836	4278047
H-2B2-IgG1	4632887	8131793	1.13E+07
H-3C8-IgG1	7346094	1.22E+07	1.63E+07
H-1H2-IgG1	5150890	9140307	1.26E+07
T-6F7-IgG1-SI	3497961	7016642	9101610
H-2B2-CD28	483864	2586718	4572333
H-3C8-CD28	3030699	8611865	1.17E+07
CD28-H-1H2	918841	4082744	6293248
CD28-T-6F7	85759	232552.6	436094
H-2B2-T-6F7	5967678	1.25E+07	1.70E+07
H-3C8-T-6F7	6824880	1.23E+07	1.68E+07
T-6F7-H-1H2	4412660	9359578	1.30E+07
H-1H2-T-6F7	6010682	1.38E+07	1.79E+07

도면3

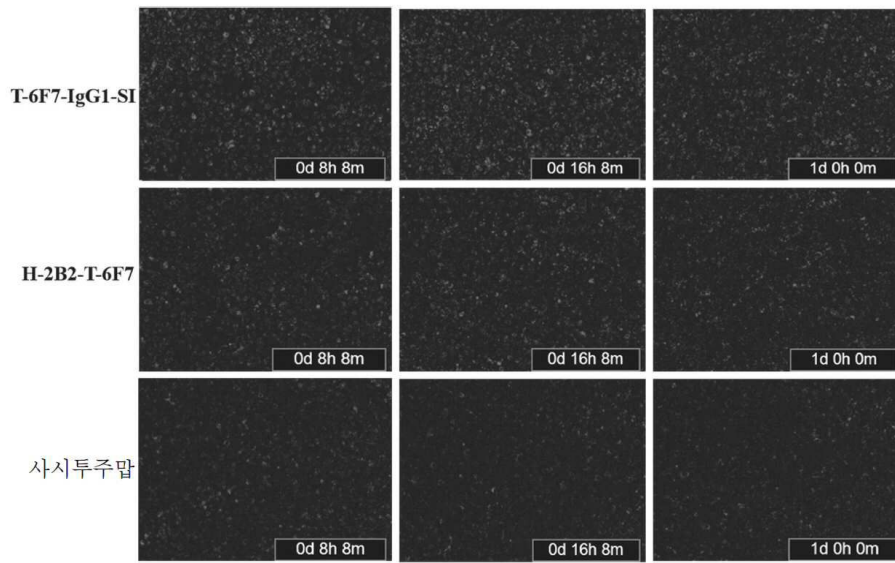


도면4

항체	NCI-H292		
	8시간	16시간	24시간
동종형 대조군	223005	247905	214310
트라스투주맙 유사체	295895	338663	315231
사시투주맙 유사체	743533	705831	645196
H-2B2-IgG1	243514	318710	347336
H-3C8-IgG1	337763	408426	377375
H-1H2-IgG1	298504	372993	350599
T-6F7-IgG1-SI	2634529	2627292	2426588
H-2B2-CD28	338839	313975	259500
H-3C8-CD28	334354	365161	336414
CD28-H-1H2	304927	365330	347106
CD28-T-6F7	318732	388145	357796
H-2B2-T-6F7	1325852	1377931	1216676
H-3C8-T-6F7	1149936	1130128	986298
T-6F7-H-1H2	856261	922485	814115
H-1H2-T-6F7	724068	903573	977152



도면5



도면6a

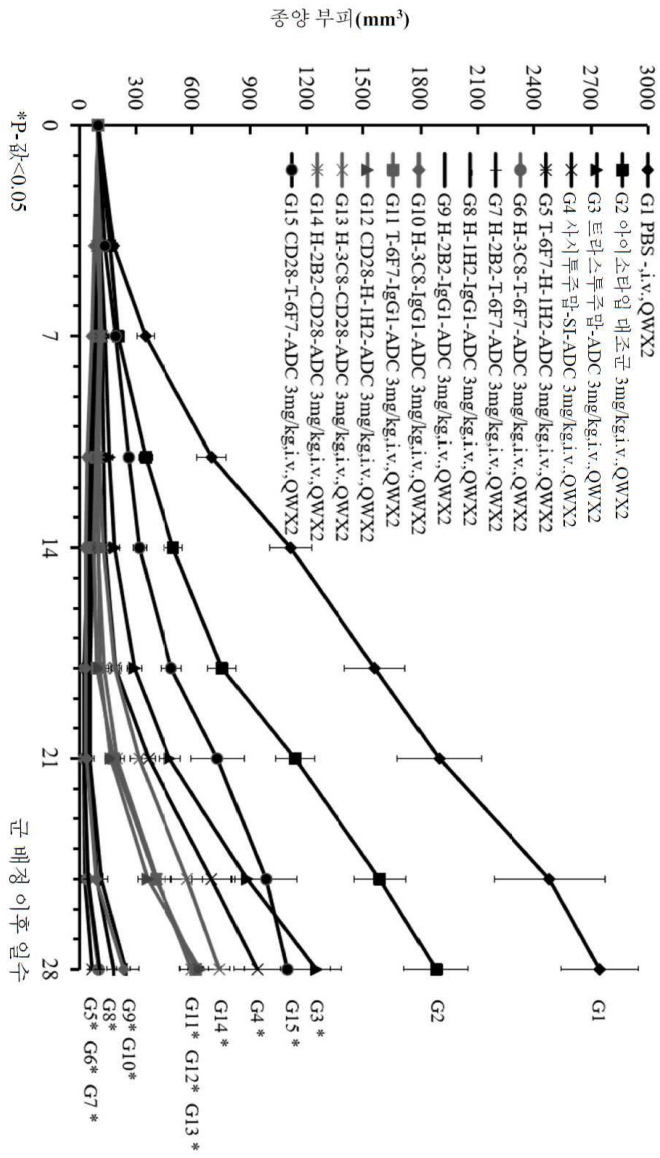
항체	처리	SEC 순도 (%)	HIC(분)	CE-SDS(NIR)			CE-SDS(R)				cIEF		
				순도(%)	HL(%)	HHL(%)	순도(%)	LC(%)	HC(%)	NGHC(%)	산성 피크 (%)	주요 피크(%)	염기성 피크(%)
H-1H2-T-6F7	0일	87.22	9.841	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.4	69.3	5
	4°C 7일	87.96	9.821	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17.6	71.3	5.1
	25°C 7일	86.64	9.874	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.4	84.4	-
	40°C 7일	89.06	9.876	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22.9	66	6.5
	동결 1	89.12	9.884	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.7	77	4.6
H-2B2-T-6F7	동결 10	88.41	9.887	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.7	73.7	4.7
	pH3.5 0시간	93.36	9.858	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19.2	73.9	3.1
	pH3.5 6시간	97.04	9.858	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25	70.5	3.9
	0일	88.00	9.39	53.1	5.6	24.8	99.2	30.2	69	0.8	13.7	63.1	9.1
	4°C 7일	87.79	9.38	59.0	5.7	22.8	99.2	30.2	69	0.8	11.8	66.1	9.2
H-2B2-T-6F7	25°C 7일	86.96	9.37	56.8	5.5	23.9	99.2	30.2	69	0.8	14	66.1	10.1
	40°C 7일	87.49	9.36	58.6	5.1	22.8	98.9	30.3	68.6	0.9	18	59.2	10.4
	동결 1	87.78	9.30	58.8	5.5	22.7	99.2	30.3	68.9	0.8	13.7	64.9	10.2
	동결 10	85.40	9.29	65.4	5.7	19.6	99.1	30.2	68.9	0.8	14.2	58.9	9.3
	pH3.5 0시간	97.41	9.38	61.9	4.4	21.3	99.1	30.5	68.6	0.8	21.4	68.6	8.1
T-6F7-H-1H2	pH3.5 6시간	97.78	9.37	65.6	4.0	19.8	100	31.1	68.9	-	15.6	66.7	14.3
	0일	95.19	9.81	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.2	72.8	5.9
	4°C 7일	95.04	9.78	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.4	79	4.5
	25°C 7일	95.14	9.78	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15	73.7	5.8
	40°C 7일	94.32	9.76	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17.2	70	6.5
H-3C8-T-6F7	동결 1	94.75	9.71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12	76	5.5
	동결 10	94.97	9.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.6	75.5	5.8
	pH3.5 0시간	100	9.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.2	81	5.9
	pH3.5 6시간	100	9.83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29.5	63.9	6.4
	0일	90.684	10.28	74.6	8.6	14.3	96.6	25.8	70.8	3.3	42.7	50.8	5.7
H-3C8-T-6F7	4°C 7일	90.852	10.28	73.9	9.1	14.1	99.4	31.7	67.7	0.6	41.7	50.2	5.2
	25°C 7일	90.884	10.28	67.1	8.6	16.9	99.9	32.1	67.8	0.1	39.3	53.0	6.0
	40°C 7일	90.993	10.27	61.6	8	20.5	100	31.7	68.3	ND	41.7	48.5	6.0
	동결 1	89.609	10.30	62.3	9.6	19.6	ND	ND	ND	ND	42.1	51.4	5.5
	동결 5	90.607	10.25	55.9	9.5	21.9	ND	ND	ND	ND	39.3	51.3	5.4
동결 10	90.501	10.25	57.9	9.7	21.4	ND	ND	ND	ND	37.5	51.1	5.5	

도면6b

	pH3.5 0시간	91.326	10.27	55	8.4	23.2	ND	ND	ND	ND	ND	27.1	64.2	8.7
	pH3.5 6시간	88.564	10.27	67.7	7.9	19.4	ND	ND	ND	ND	ND	19.2	74.3	6.5

참고: ND: 감지되지 않음. 동결 1: 1회 동결-해동; 동결 10: 동결-해동 10회 반복.

도면7



항-HER2 항체에 대한 Kabat(카바트) CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
H-1H2	DYGMIS	7	GLNWNNGDSTG YVDSVKG	8	DIGFSSGH NWFDP	9	RASQSVSSYL A	1	DASNRA T	2	QQRSNW PPT	3
H-2B2	DYGMIS	10	GINWNGDSTGY ADSVKG	11	DEGPATG WNWFDP	12	RASQSVSSYL A	1	DASNRA T	2	QQRSNW PPT	3
H-3E5	SYWMS	13	NIKGDESEKYY VDSVKG	14	ENNYGFD H	15	RASQSVSSYL A	1	DASNRA T	2	QQRSNW PPT	3
H-3C6	SYTMN	16	SISRFSYTYAD SVKG	17	DLHDSGDS VY	18	RASQSVSSYL A	1	DASNRA T	2	QQRSNW PPT	3
H-3C8	DHGMIS	19	GINWNGDSTGY ADSVKG	20	DOGMATG YNWFDP	21	RASQSVSSYL A	1	DASNRA T	2	QQRSNW PPT	3

도면8

항-HER2 항체에 대한 Chothia(코티아) CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
H-1H2	GFTFD DY	22	NWNGDS	23	DIGFSSGH NWFDL	24	RASQSVSSYL A	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
H-2B2	GFTFD DY	25	NWNGDS	26	DEGPATG WNWEDL	27	RASQSVSSYL A	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
H-3E5	GFTSS Y	28	KGDESE	29	ENNYVGFH H	30	RASQSVSSYL A	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
H-3C6	GFTSS Y	31	SREISY	32	DLHDSGDS VY	33	RASQSVSSYL A	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
H-3C8	GFTFD DH	34	NWNGGS	35	DOGMATG YNWFDP	36	RASQSVSSYL A	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6

도면9

Ab	설명	아미노산 서열	서열 번호:
H-1H2 ("1H2")	중쇄 가변 영역	EVQLVQSGGGVYRPPGSLRLSCAASGFTFDYGMVWRQAPGKGLEWVSGLNWNGDSTGYV DSYKGRFTISRDNAKNSLYLEMNISLRAEDTAFYYCARDIGFSSGHNWFDPWGQGPVTVSS	38
H-1H2 ("1H2")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLITYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDEFAVYYCCQQRSNWPTFGQGTKVEIK	37
H-2B2 ("2B2")	중쇄 가변 영역	EVQLVQSGGGVYRPPGSLRLSCAASGFTFDYGMVWRQAPGKGLEWVSGLNWNGDSTGYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISLRAEDTALYYCARDEGPATGWNWFDPWGQGITLVTVSS	39
H-2B2 ("2B2")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLITYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDEFAVYYCCQQRSNWPTFGQGTKVEIK	37
H-3E5 ("3E5")	중쇄 가변 영역	EVQLVQSGGGVYRPPGSLRLSCAASGFTFSSYWMVWRQAPGKGLEWVANIKGDESEKYYVD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISLRAEDTAVYYCARENNTYVGFPHWGQGITLVTVSS	40
H-3E5 ("3E5")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLITYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDEFAVYYCCQQRSNWPTFGQGTKVEIK	37
H-3C6 ("3C6")	중쇄 가변 영역	QVQLVQSGGGVYRPPGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWRQAPGKGLEWVSSISRFISYIYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNISLRAEDTAVYYCARDLHDSGDSVYWGQGITLVTVSS	41
H-3C6 ("3C6")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLITYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDEFAVYYCCQQRSNWPTFGQGTKVEIK	37
H-3C8 ("3C8")	중쇄 가변 영역	QVQLVQSGGGVYRPPGSLRLSCVASGFTFDHGMVWRQAPGKGLEWVSGINWNGDSTGYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISLRAEDTALYYCVRDQGMATGYNWFDPWGLITLVTVSS	42
H-3C8 ("3C8")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLITYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDEFAVYYCCQQRSNWPTFGQGTKVEIK	37

도면10

### 항-TROP2 항체에 대한 카바이트 CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
T-3A4	SSSYW WG	43	SIFYNGNTY YNPSLKS	44	HDEYNW NYGAFDI	45	RASQSVSSY LA	1	DASNRA T	2	QQRSN WPPT	3
T-4B9	STGYW WG	46	NVEFYNGDT YVNPSSLKS	47	HDEYTT YGAFDI	48	RASQSVSSY LA	1	DASNRA T	2	QQRSN WPPT	3
T-6F7	SGYWW WG	49	SIYIGTTY YVPSLKS	50	QPTVAG HDAFDI	51	RASQSVSSY LA	1	DASNRA T	2	QQRSN WPPT	3

도면11



### 항-TROP2 항체에 대한 코티아-CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
T-3A4	GGSSISS SY	52	FYNGN	53	HDEYNWN YGAFDI	54	RASQSVSS YLA	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
T-4B9	GVSITST GY	55	FYNGD	56	HDEYTT YGAFDI	57	RASQSVSS YLA	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6
T-6F7	GGSIDSS GY	58	YYIGT	59	QPIVVAGH DAFDI	60	RASQSVSS YLA	4	DASNRA T	5	QQRSNW PPT	6

도면12

도면13

Ab	설명	아미노산 서열	SEQ ID NO:
T-3A4 ("3A4")	중쇄 가변 영역	QVQLVQSGPGLVNPSETLSLTCTVYSGGSISSSSYYWGWIHQPPGKGLEWIGSHFYNGNTYYNPILKSR VTISGDISKNQFSLKLSVTAADTSVYYCARHDEYNWNYGAFDIWGQGTLVTVSS	61
T-3A4 ("3A4")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPAREFGSGSGT DFILTISSLEPEDEAVYYCCQQRSNWPTIFGQGTKVEIK	37
T-4B9 ("4B9")	중쇄 가변 영역	QVQLVQSGPGLVNPSETLSLTCTVYSGVSIITSTGYWGWIRQPPGKGLEWIGNVFYNQDPTYYNPILKLS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTALYYCARHDEYTYTYGAFDIWGQGTMTVTVSS	62
T-4B9 ("4B9")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPAREFGSGSGT DFILTISSLEPEDEAVYYCCQQRSNWPTIFGQGTKVEIK	37
T-6F7 ("6F7")	중쇄 가변 영역	EVQLVQSGPGLVNPSETLSLTCTVYSGSIDSQYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYIGITTYIYPSLKS RVTISVDTSKNRFSLEKLSVTAADTAVYYCARQPTVAGHDAPFDIWGQGTMTVTVSS	63
T-6F7 ("6F7")	중쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPAREFGSGSGT DFILTISSLEPEDEAVYYCCQQRSNWPTIFGQGTKVEIK	37

도면 14a

단백질	아미노산 서열	SEQ ID NO:
인간 HER2 중쇄	MEAALCRWGLLALLPPGAASTQVCTGIDMKLRLPASPETHLDMRLRHL YQGCCOYVQGNLELTYLPTNASLSFLQD IQEVQGYVLAHNQVRQVPLQRRLRVRTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPV TGASPGGLRELQLRSLTEILKGGV LIQRNPQLCYQDITLWKDIFHKNNQLAL TLIDITNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP LPIDCCHEQC AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGIELHCPALVTYNTDIFESMPNPEGRYTFGASCVTACPPNYLSTD VGSCTLYCPLNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREYRAVTSANIQEFAGCKIFGSLAFLPESFDGD PASNTAPLQPEQLQVFEITLEITGYL YISA WPDSL PDL SVFQNI QYTRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGRLREIGS GLALJHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANREDECEVEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVCNCSQFLRGQ ECVEECRVLQGLPREYVVARHCLPCHPEQQRQNGSVTCFGEADQCACAHYKDPFCVARCPSGVKPDLSYMPVW KFPDEEGACQPCPINCSTHSCVIDLDDKGCPEAFQRASPLTSHSAYVGHLLVYVVGVLGVLHRRQQRKRYTMRRLLQE TELVEPLTPSGAMPNQAMRLKETEIRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENYKIPYAIKVLRENTSPKANKEULDEA YVMAGYGSPPYSRLLGHCLSTVQLVTQLMPYGCILLDHYRENRRGLGSQDLINWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDL AARNVLVKSPNHVKITIDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTWELMTFGAKP YDGIAPAREIPDLLKGERLQPPICITDVMIMVKCWAMDSECRPRERELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPA SPLD STFYRSLIEDDMDGLVDAAEYLVPOQGFPCPDPAAGAGAMVHHRHSSSTRSGGDLTLGLPSEEEAARSP LAP S EGAGSDVEDGDLGMAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPVPLPSEITDGYVAPLTCSPQPEYVYNQPDVRRQPPSPREGP LPAARPA GATLERKTLSPGKNGVVKDYFAFGGA VENPEYLT PQQGAAPQHPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGA PPSIFKGTPTAENPEYLGLDVYV	64
트라스투주맙 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGHNKIDTYIHWWVRQAPGKGLEWVARLYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGDDGFYAMDYVWGGQTLVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTEPAVLIQSSGLYSLSSVYTVPPSSLTGTQTYICNVNHHKPSNTRKVDKKVEPKSCKDHTCP PCPAPPELLGSPVFLPPPKKDTLMISRITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNARAKTKPREEQYNSTYRYVVS VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPOVYITLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK	65
트라스투주맙 중쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRASQDVTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFITLTISSLQ PEDFAIYYCQOHYITPPITGGQTKVEIKRIYVAAPSVFPPSDEQLKSGTASVYCLINNFYPREAKYQWKVDNALQS GNSQESYVEQDSKDSITSLSTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66
트라스투주맙 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIDYTMHWVROAPRGKGLEWADVNPNSGGSYNQRHFKGRFTLTVYDRRS KNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFYTDYWGQGITLVYSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTEPAVLIQSSGLYSLSSVYTVPPSSLTGTQTYICNVNHHKPSNTRKVDKKVEPKSCKDHTCP PCPAPPELLGSPVFLPPPKKDTLMISRITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNARAKTKPREEQYNSTYRYVVS VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPOVYITLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK	67

도면 14b

페르투주립 경채	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDYSIGVAWVYQOKPKGAPKLLIYASAYRYTGVPSRFSGSGSDTDFTLTISLQ PEDFAIYYCQQYYIYPTYTGQGTKEIKRIVAAPVHPPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQSEYTEQDSKSDTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	68
인간 TROP2	MARGPGLAPPPLRLPLLLVLAAVTGHITAAQDNCTCPINKMITYCSPDGFGRGCRALGSGMAVDCSTLTSKCLL KARMSAPKNARITLVRSEHAIYNDVGLYDPCDPEGRERAROCNOITSVCVNSVGRITDKGDLSLRCDDELVRT HHHLLDLRHRPTAGAFENHSDLDALRRLFRERYLHPKFAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGVDIGDAAYYFERD IKGESLFOGRGGLDLRVRGEPLOVERILYYLDEHPPKSMKRLTAGLIAVTVVYVALVAGMAVLYITNRRKSGKYK KVEIKEIGELRKEPSL	69
사시투주립 고비테칸 중채	QYQLOQSSGSELKPKPGASVYKVSCKASGYTFINYGMINWYKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYTDDEKGRFAHSLDI SVSTAYLQISSLKADDIAYVECARGFQSSYVYFDVWQGGSLYVYSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGTAALGCLYK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVYTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRYEPPKSCDKTHT CPPCPAPEILLGGPSVHLPFKPKDITMISRPEVITCVYVDVSHEDPEVKENWYVDVEVHNAKTKPREEOYNSITYRV VSVLYLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSPGK	70
사시투주립 고비테칸 경채	DIQLTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDYSIGVAWVYQOKPKGAPKLLIYASAYRYTGVPSRFSGSGSDTDFTLTISLQ PEDFAIYYCQQHYIITPLTFGAGTKVEIKRIVAAPVHPPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQSEYTEQDSKSDTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	71
DS-1062 중채	QYQLOVQSGAEYKPKPGASVYKVSCKASGYTFITAGMQVWRQAPGQGLKWMGWINTHSGVPKYAEDEFKGRVITISADI STSTAYLQISSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYVYFDVWQGGTLVYVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGTAALGCLYK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVYTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRYEPPKSCDKTHT CPPCPAPEILLGGPSVHLPFKPKDITMISRPEVITCVYVDVSHEDPEVKENWYVDVEVHNAKTKPREEOYNSITYRV VSVLYLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSPGK	72
DS-1062 경채	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDYSIGVAWVYQOKPKGAPKLLIYASAYRYTGVPSRFSGSGSDTDFTLTISLQ PEDFAIYYCQQHYIITPLTFGQGTKEIKRIVAAPVHPPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQSEYTEQDSKSDTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	73
펠리핀 원숭이 HER2	MELAAWYRWGLLALLPFGATGTQVCTGIDMKLRDLPASPEIHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQ DIQEVQGYVYLLAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNNDPLNNTTPTVAGSPGGILREIQRLSTHEILKGG VLIQRNPNOLCYODITLWKIDFHKNNOALALIDINRSRACHGSPVCKGSRWGESSEDCQSLIRIVCAGGCARCKG PLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHNHSGELCHPALVYNTDITHEMNPNEGRTYTFGASCVTACPYNYLST DYGSCTLYCPLHNOEYTAEDGTQRCEKCSKPCARVYGLGMEHLREYRAVTSANIOEFAAGCKIIFGLAFIPESFDG DPAASNTAPLQPEQLRVEITLEETIGYLYSAMPDSLPLDSLQNLQYIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGRLSLELQ SGLALHHNTRLCFVHTYVWQDLFRNHQALLHTANRPEDECYGEGLACHQLCARGHCWGPQPTQCVCNCSQELRG QECVEECGYLQGLPREYVYVWQDLFRNHQALLHTANRPEDECYGEGLACHQLCARGHCWGPQPTQCVCNCSQELRG WKPEDEEGTCCQSCPNCTHSCVLDLDDKGPAPFQASPLTISIAVYVGLLVVGLVYHGLIKRRQOKIRKYTMRRLLQ	74



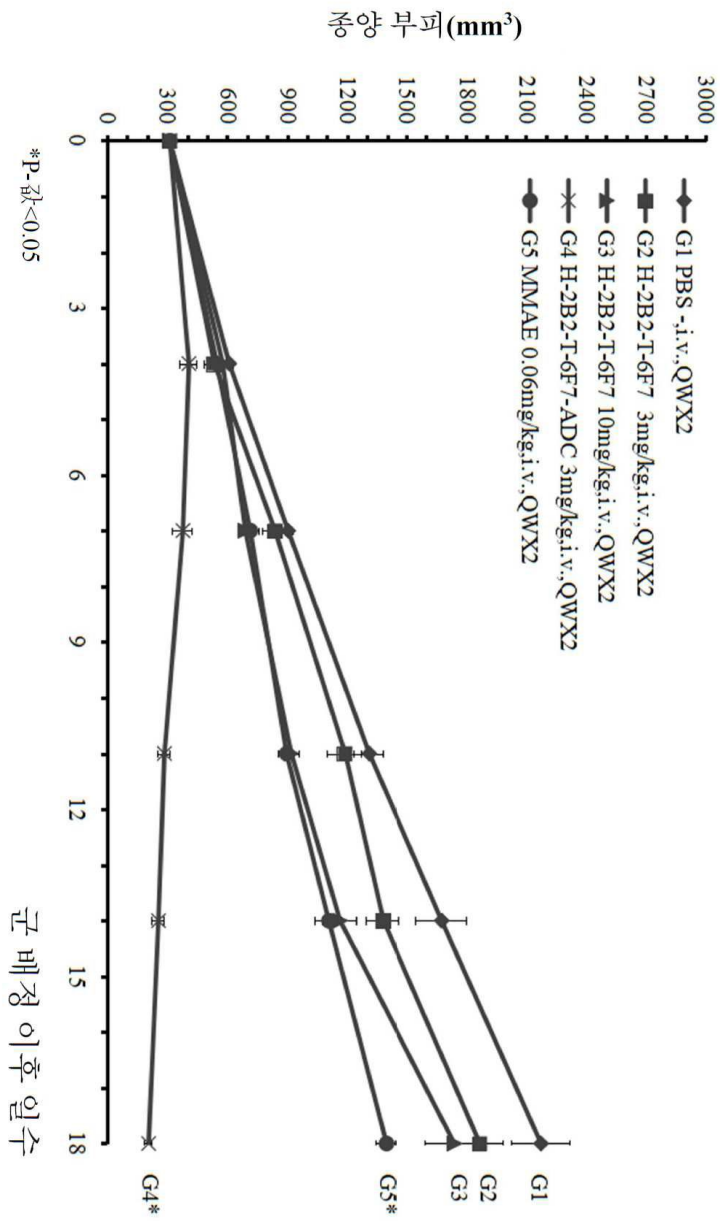
	RYRLHPKVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGDYDIGDAAYYTERDVKGESLFGGRGGLDLRVRGEPLOVERTLIY YLDEIPPKFSMKR	
개 TROP2	QGNCTCATNKMTLGRADPGGRGRCHLPGSDAPLDCSTLTSKCLLKARARAKSGRALVRPGEHALDNDGLYDP DCDRDGRFKAROCNQTISVCWCVNSVGVRRITDKGDRSLRCDELVRTHHLLDLRHRPARAFNRSELDLRLFRE RYLLRPREVAAVHYERTIQIELRQNASDKAPGDVDLADAAYYFERDVKGESLPPGRGGLDLRVRGEPLOVERTLIY LDEKPPQFSMKRLI	78
무스 부스 TROP2	MARGLDLAPLLLLLLAMAATRECTAQSNCTCPTNKMTVCDITNGRGGVCCQCRAMGSQVTVDCSTLTSKCLLKARMS ARSGRSIYMBSEHAILDNDGLYDPECIDKGRFKAROCNQTISVCWCVNSVGVRRITDKGDRSLRCDEYVRTHLLJE LHRRPTDRAFNHSIDLSELRLRLEQERYKLHPSEL SAVHYEPTIQIELRQNASQGLRVDIADAAYYFERDIKGESLF MGRGLDYQVRGEPHVERTLIY LDEKPPQFSMKRLI TAGVIAVIAVAVYVAGVVVLYTKRRKSGRYKKVEL KELGEMRSEPSL	79
경쇄 불면 영역	RIVAAPSVFPPSDEOLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLISKAD YEKHKVYAACEVTHQGLSSPVTKSNRKGEC	80
노브(knob) 불면영역을 공반하는 중쇄 불면 영역	ASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTHPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QIYICNVNHRKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHICPPCPABELLGGPSVLEPPKPKDILMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREMITKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	81
홀(hole) 불면영역을 공반하는 중쇄 불면 영역	ASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTHPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QIYICNVNHRKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHICPPCPABELLGGPSVLEPPKPKDILMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSREEMTKNOYSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	82
디시타입 배도핀 중쇄	EYQLVQSGALEYKKGATVYKISCKYSGYTTFTDYIHWVQQAPGKGLEVMGRVNPDDHGDSTYNAQKPKDKATTADKS TDTAYMELSSLRSEDLAVYFCARNYLFDHWGOQGLTVYSSASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPEV TVSWNSGALTSGVHTHPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQIYICNVNHRKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHICPPCPAP ELLGGPSVLEPPKPKDILMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOYSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	83
디시타입 배도핀 경쇄	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTGAVAVYQQKPKGAPKLLIYWASIRHTGVPSRFSGSGSGLDFTLTISSL QPEDEFAITYCHQFAITYTGGGTAKVEIKRITVAAPSVFPPSDEOLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLISKADYEKHKVYAACEVTHQGLSSPVTKSNRKGEC	84

도면 14d

<p>트라스투주 립 데복스테인 중쇄</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDITIHVVRRQAPRGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADISKN TAYIQMNSLRAREDIAVYYCSRWGDDGFYAMDYWGQGITLVYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY PPEPTVSWNSGALTSVHITPAVLQSSGLYSLSSVATVPSSSLGTQIYICNVNHRKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHICP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSITRYVVS YLITLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPLEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTIPVLDSDSGFHLYSKLIVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>85</p>
<p>트라스투주 립 데복스테인 경쇄</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASEL YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFHEPPSDEQLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKYQWKVDNALQS GNSQESYTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>86</p>
<p>키메라 HER2 단백질</p>	<p>MELAAWCRWGFLLALLSPGAAGTQVCTGIDMKILRLPASPETHLDMILRHLYQGCQVYVQGNLELTYLPTNASLSFLQ DIOEVOGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGG VLIQRNPQLCYQDITLWKDIHKNNQLALTLIDTNRSKACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRIVCAGGCARCKG PLPTDCCHEQC AAGCTGPKHSDCLAELHNSHGICELHCPALVTYNTDTEFSMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLST DVGSC TLVCP LHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVARVTSANIQEFAGCKIIFGSLAFLEPSEFDG DPASNTAPLQPEQLQVEEITLLEITGYLYISAWPDSLPDLVTFQNLQYTRGRILHNGAYSLLTQGLGISWLGLRSLRELG SGLALIHNTHLCFVHTVPMWDOLFRNPHQALLHTANRBEDECYGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVCNCSQELRG QECVEECRYLQGLPREYVYVNRHCLPCHPEQOPQNGSVTCEGPEADQVACAHYKDPPECVARCPSGVKPKDLSYMPI WKFPEEGACQPCINCTHSCVDLDDKGCFAEQRASPLTSHSAVVGLLVVYLVYVYFGLIKRRRQKIRKVTMRLLQ EHELVEPLTPSGAVPNQAQMRILKETEELRKLKYLGSAGFTVYKGMWIPDGENVKIPVAIKYLRENTSPKANKEILDE AYVMAGVSPYVSKLLGICLSTVQLVTLQMPYGCILLDHYREHRGRLSQDILLNWCVQIAKGMSTLEEVRLVHRD LAARNVLYKSPNHVKIITDFGLARLLDIDDETEYHADGGKVPKRWMALESILRRRETHQSDVWSYGYTVWELMTFGAK PYDGIAPAREIPDLLEKGERLPOPICTIDVYMDMVKCWMDISECRPRFRELVEFSRMARDPORFVIONEDLGPSSPM DSTFYRSLLEDDDMGELVDAEELYVPOQGFHSPDALGTSTAHRRHRSSARSGGGELTILGLPSEEEPRRSP LAPSE GAGSDVFDGDLAVGVTKGLQSLSPHLSPLORYSSEDTLPLPEITDGYVAPLACSPQPEYVYVNOPEVRPQSP LTPEGPP PPRPA GATILERP KTLSPGKNGVYKDVFAFGVA VENPEYIAPRAGTASQPHHSPATSPAFDNLVYWDQNSSFEQGPSPS TFEGTPTAENPEYI GLDVPY</p>	<p>87</p>
<p>인간 TR0P2 단백질</p>	<p>MARGPGLAPPRLRLLILLVLAAYVGHHTAAQDNCTCPNTNKMTVCSPDGGPGRQCQRALGSGMAVDCSTLTSKCLLL KARMSAPKNARITLVRPSEHALVDNDGTYDPCDPEGRFKARQCNQITVWCVNSVGVRRITDKGDLILRCDDELVRT HHLLLDLRHRPTAGAFNHSDDLAEELRLFRERYRLHPKTVAAVHYEQPTQIELRQNTSOKAAAGVDIDDAAYFYERD IKGESLFGRGGLDLRVRGEPLQVERTLITYLDEIPPKFSMKRLTAGLAAVVVVVALVAGMAVLYITNRRKSGKYK KVEIKELGELRKEPSSL</p>	<p>88</p>

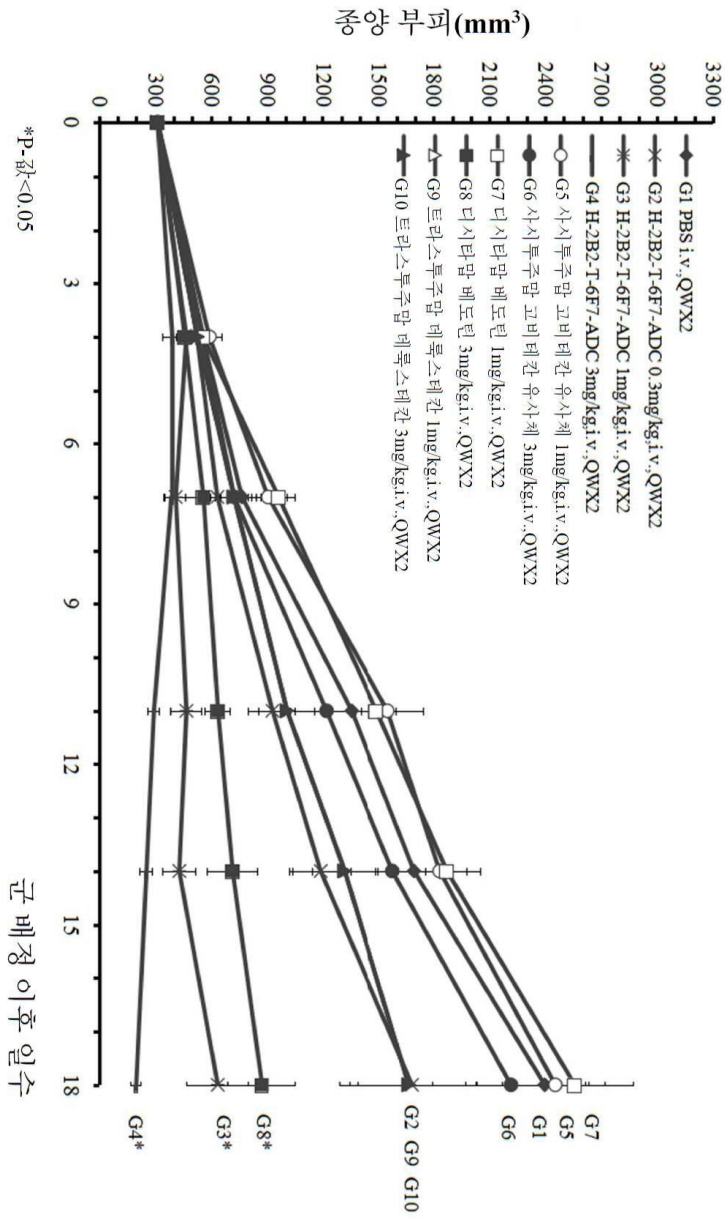
도면14e

도면15

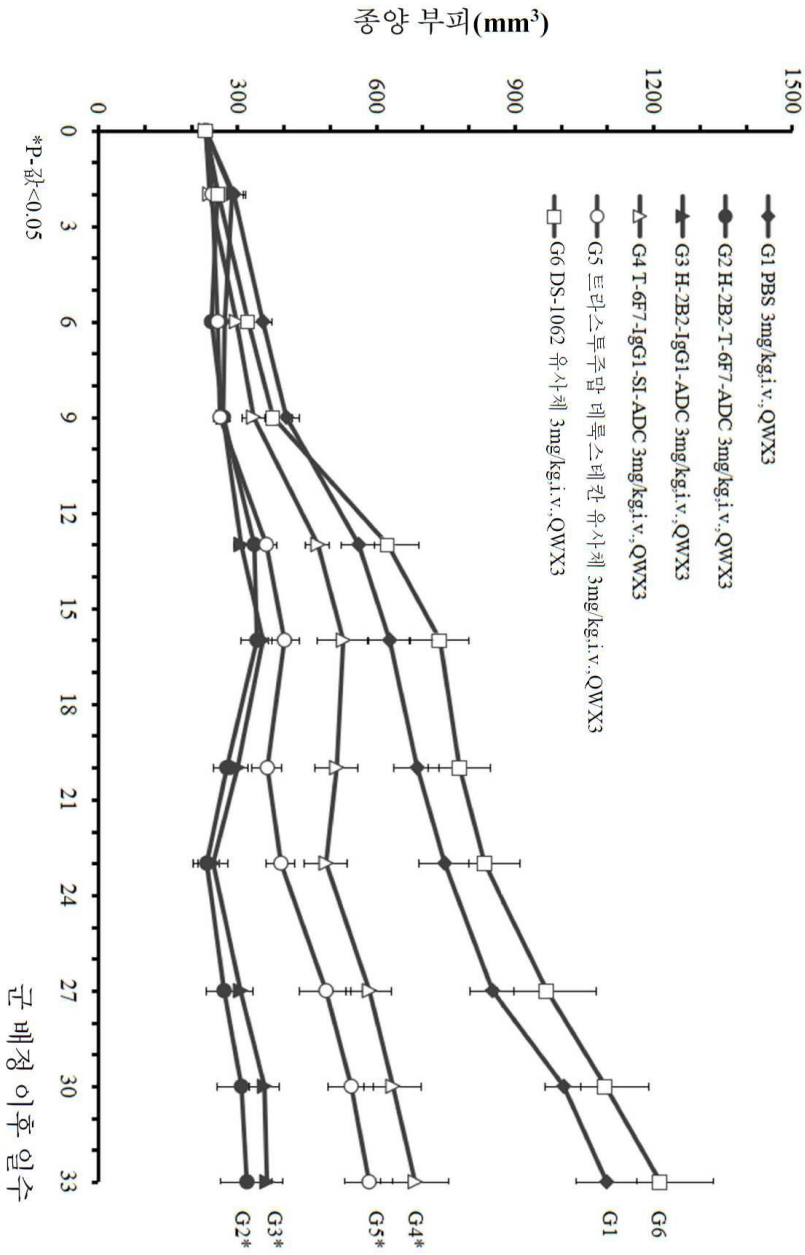




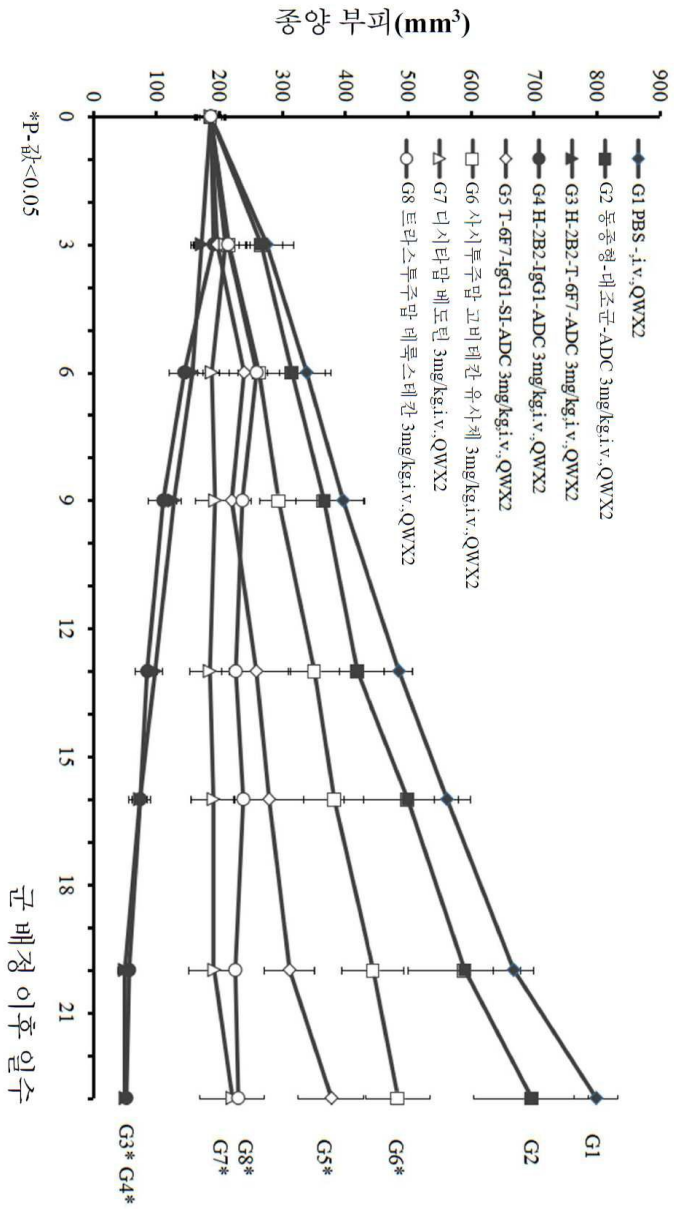
도면16



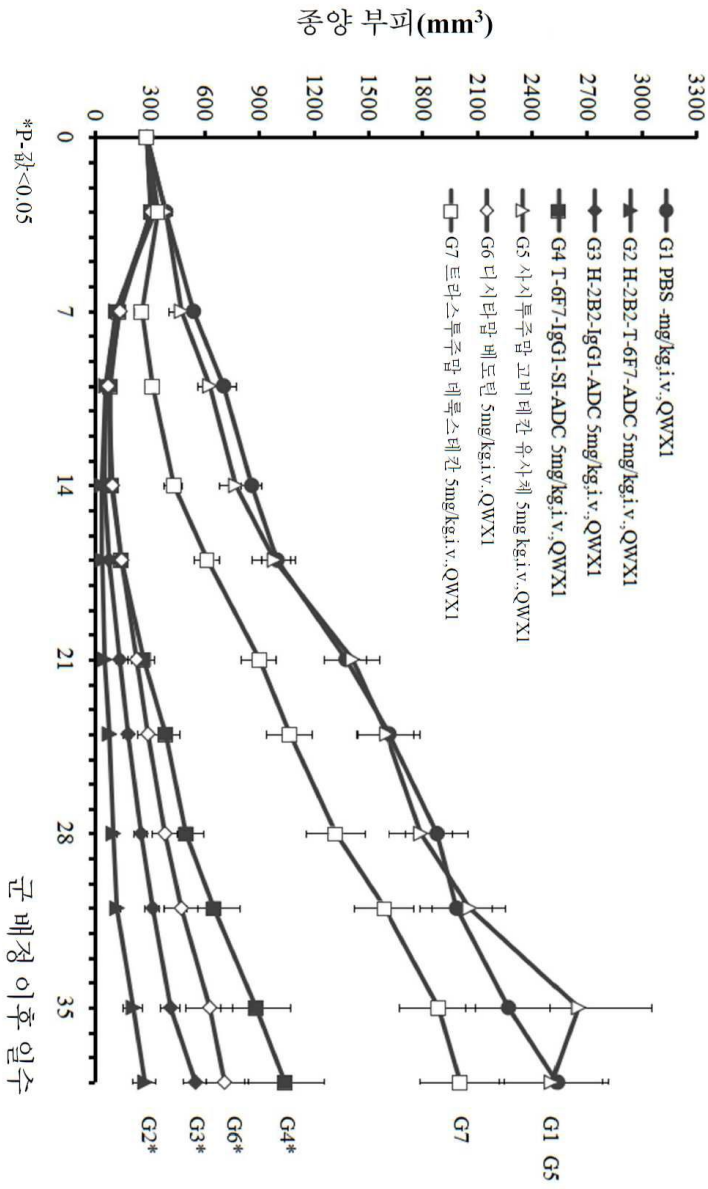
도면17



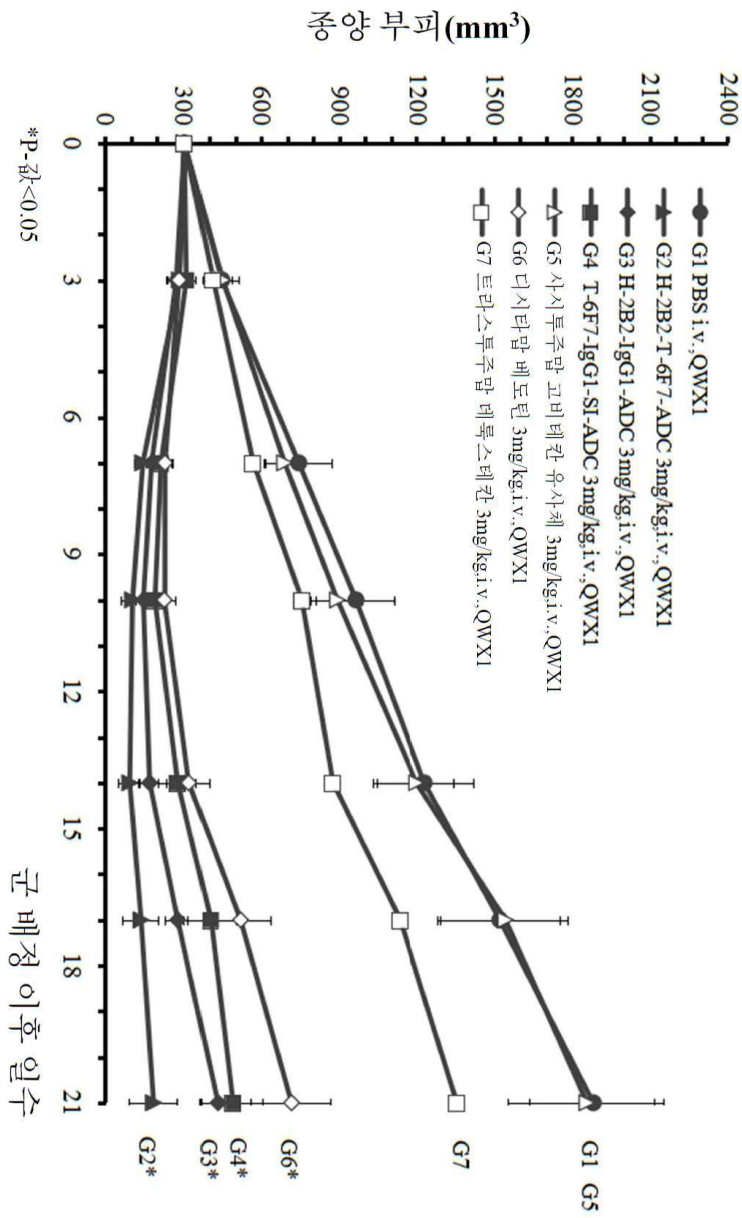
도면18



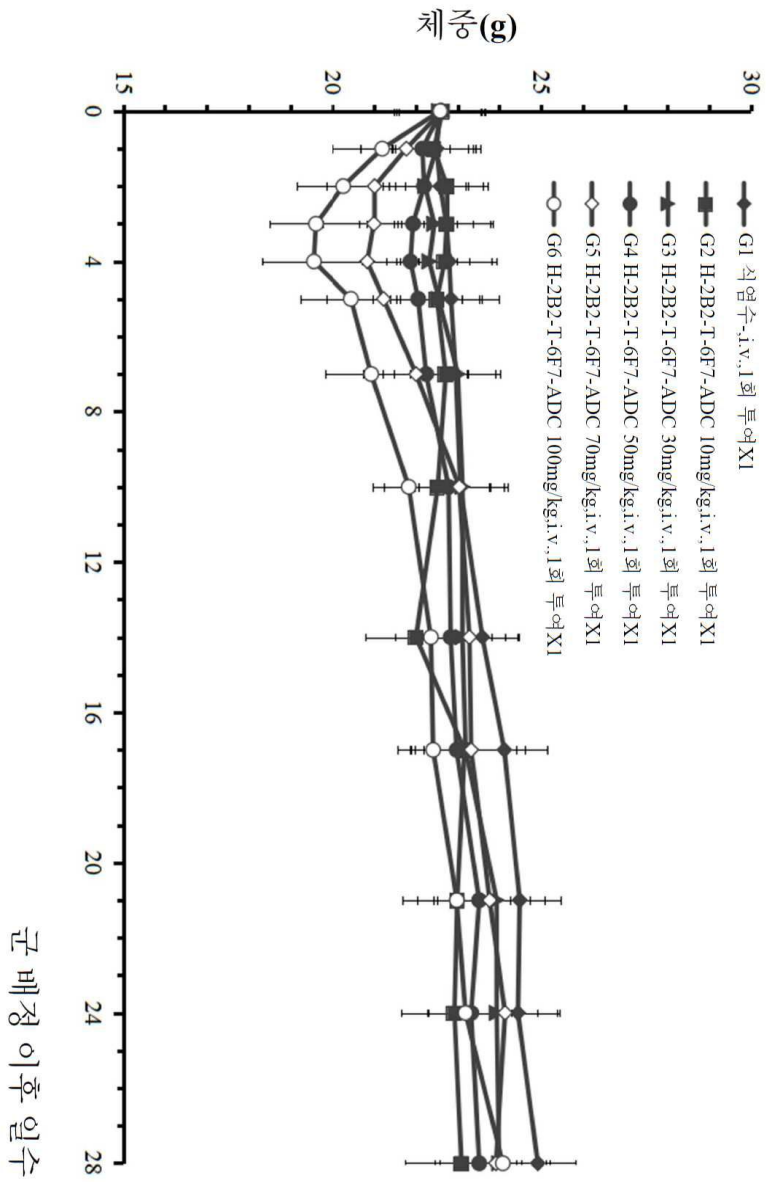
도면19



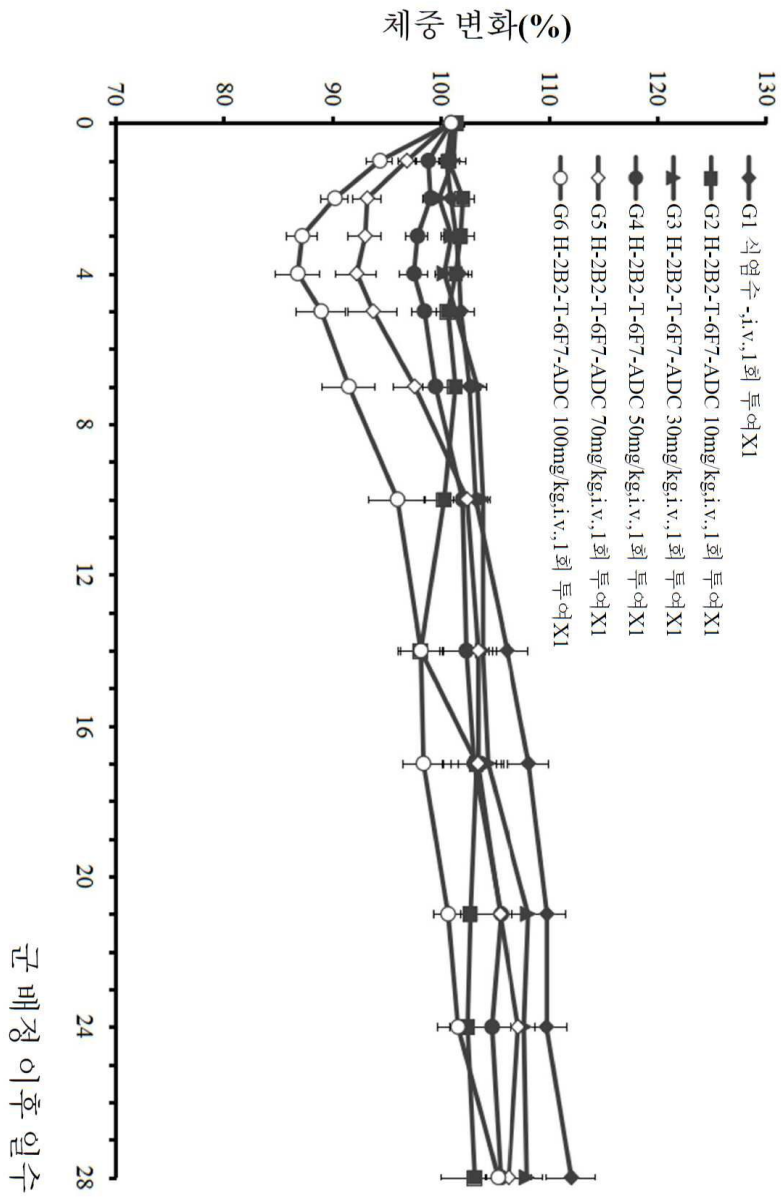
도면20



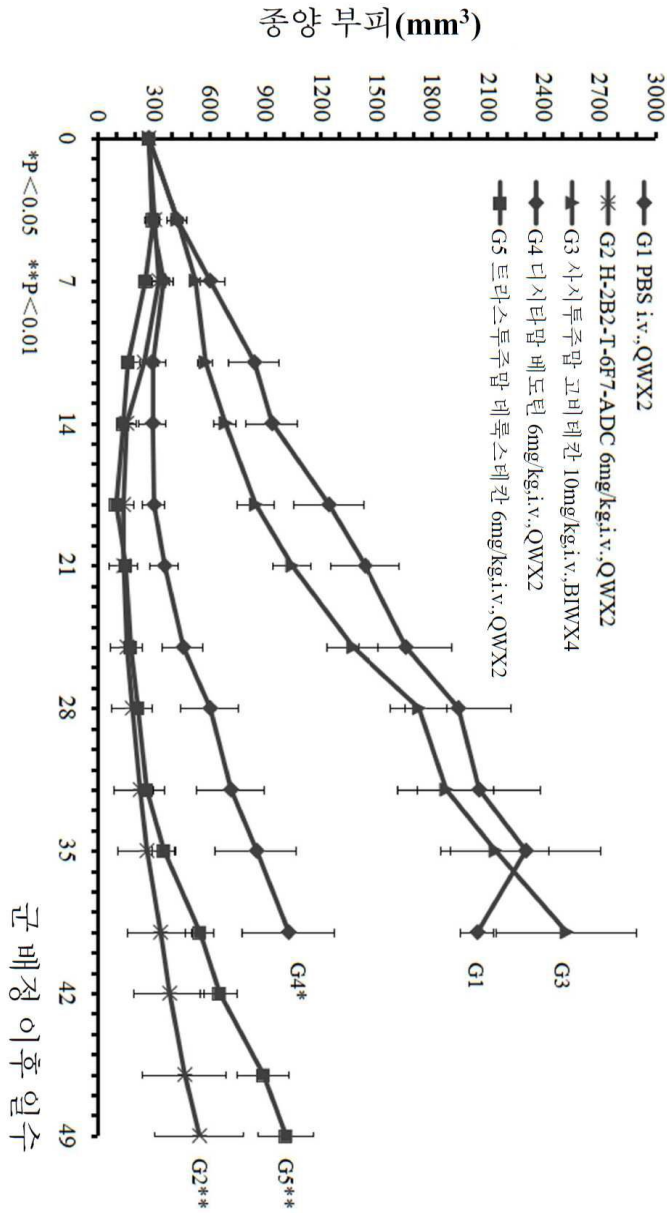
도면21a



도면21b

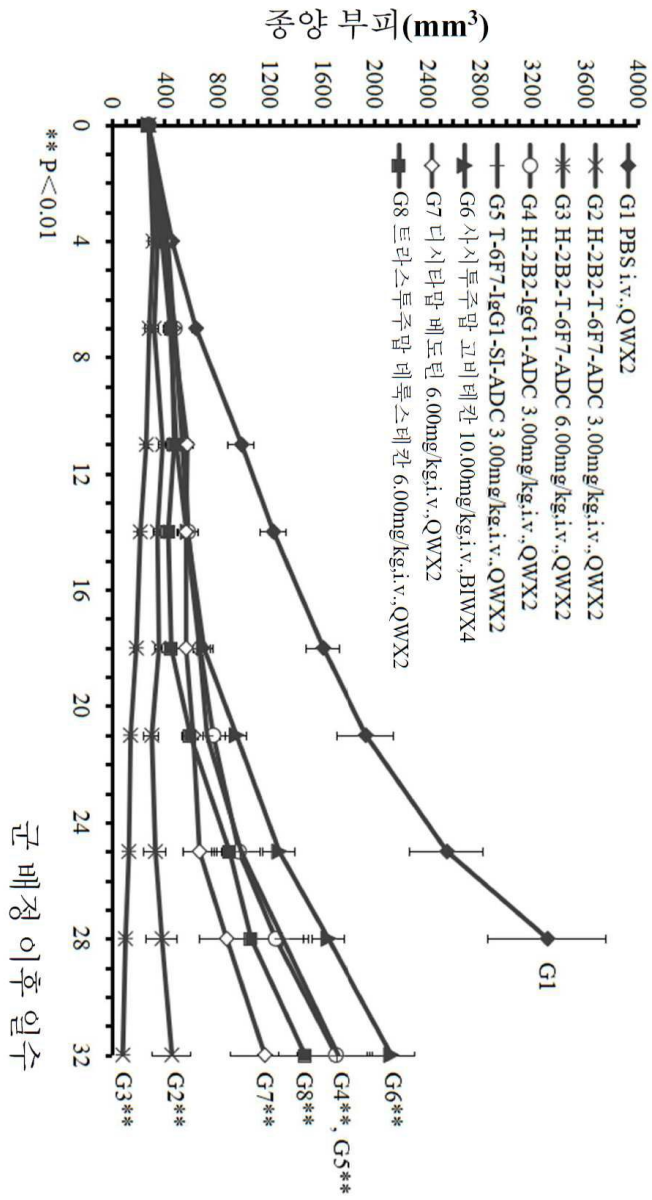


도면22

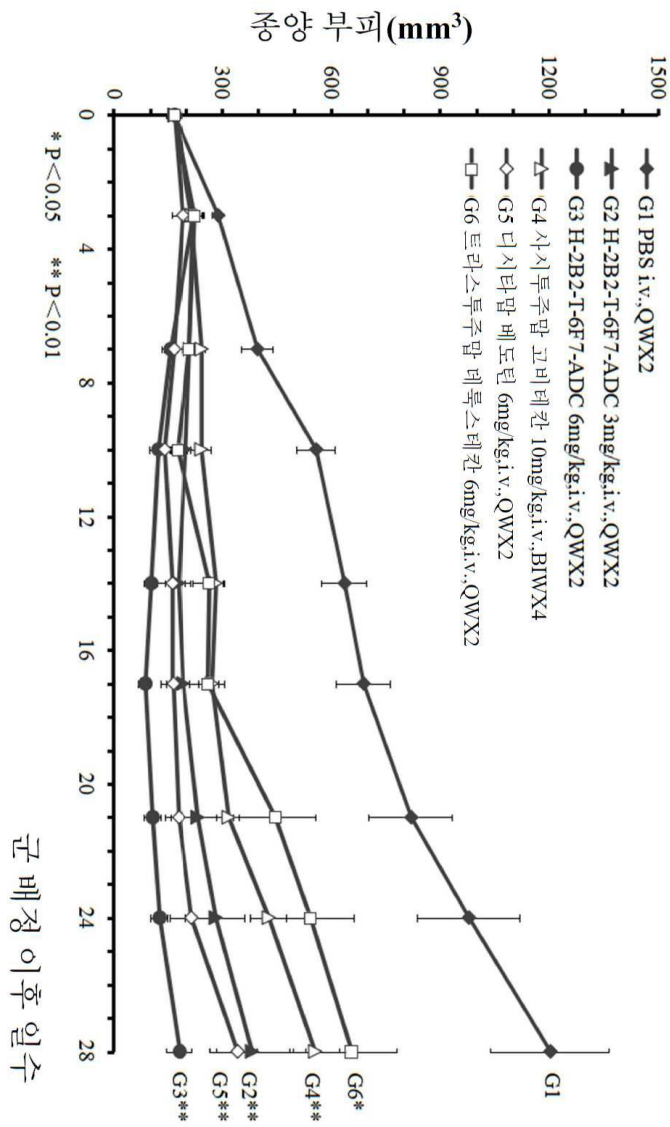




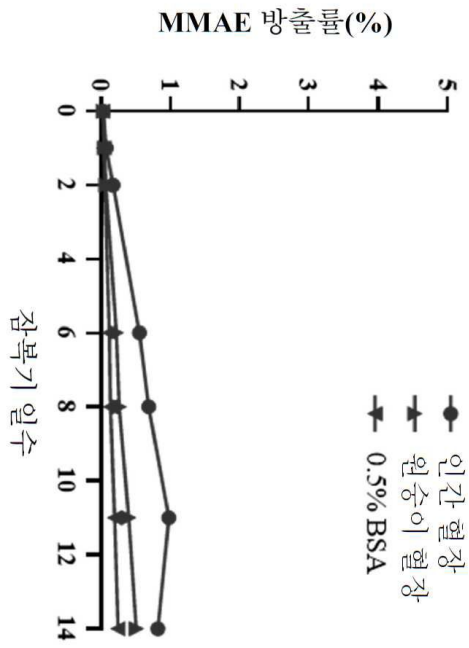
도면23



도면24



도면25



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.