(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029133
(43) 공개일자 2025년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001662
(22) 출원일자(국제) 2023년06월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/067249
(87) 국제공개번호 WO 2024/002938
국제공개일자 2024년01월04일
(30) 우선권주장
63/367,068 2022년06월27일 미국(US)

(71) 출원인
아스트라제네카 아베
스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제
(72) 발명자
커머, 프랭크 얼바인
미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
스미스, 폴 데이비드
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지셔 케임브리지 케임브리지 바이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1 아스트라제네카 유케이 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

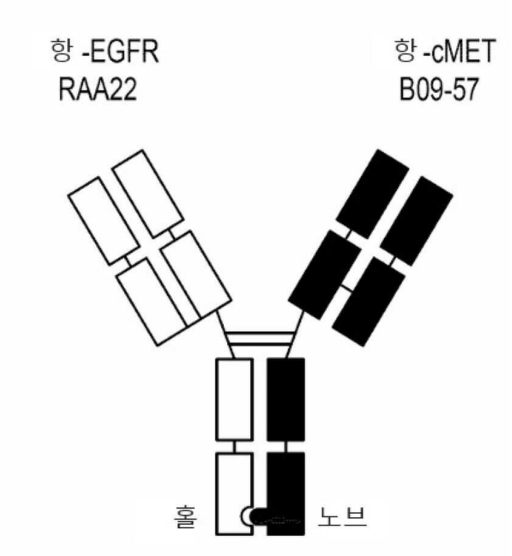
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 표피성장인자 수용체 티로신 키나제 억제제를 포함하는 조합물**

(57) 요 약

본 개시는 암(예를 들어, 비소세포폐암[NSCLC]) 치료에서 조합하여 사용하기 위한 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 티로신 키나제 억제제(TKI) 및 항-EGFR/cMET 항체 분자에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/517 (2013.01)
A61K 31/5377 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/68037 (2023.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C07K 2317/31 (2013.01)
(72) 발명자
플로치, 니콜라스
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지셔 케임브리지 케임브리지 바이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1 아스트라제네카 유케이 리미티드
그렌가, 이탈리아
미국 19850-5437 델라웨어 윌밍턴 피.오. 박스 15437 콩코드 파이크 1800 아스트라제네카 파마수티컬스 엘피
하트마이어, 라이언 제임스
미국 19850-5437 델라웨어 윌밍턴 피.오. 박스 15437 콩코드 파이크 1800 아스트라제네카 파마수티컬스 엘피

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 환자의 암 치료에 사용하기 위한 EGFR TKI로서, EGFR TKI는 항-EGFR/cMET 항체 분자와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, EGFR TKI.

청구항 2

인간 환자의 암 치료에 사용하기 위한 항-EGFR/cMET 항체 분자로서, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR TKI와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, 항-EGFR/cMET 항체 분자.

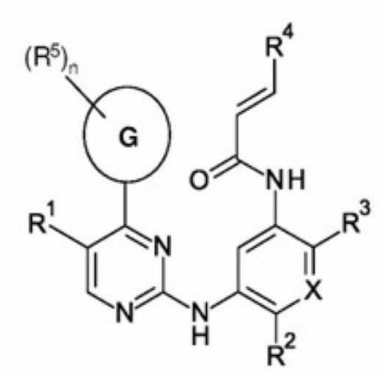
청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, EGFR TKI 및 항-EGFR/cMET 항체 분자의 투여는 개별적, 순차적 또는 동시적인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, EGFR TKI는 화학식 V의 화합물:

[화학식 V]



(상기 식에서,

G는 4,5,6,7-테트라히드로피라졸로[1,5-*a*]피리딘-3-일, 인돌-3-일, 인다졸-1-일, 3,4-디히드로-1H-[1,4]옥사지노[4,3-a]인돌-10-일, 6,7,8,9-테트라히드로피리도[1,2-a]인돌-10-일, 5,6-디히드로-4H-피롤로[3,2,1-ij]퀴놀린-1-일, 피롤로[3,2-b]피리딘-3-일 및 피라졸로[1,5-*a*]피리딘-3-일로부터 선택되고;

R^1은 수소, 플루오로, 클로로, 메틸 및 시아노로부터 선택되고;

R^2는 메톡시, 트리플루오로메톡시, 에톡시, 2,2,2-트리플루오로에톡시 및 메틸로부터 선택되고;

R^3은 (3*R*)-3-(디메틸아미노)피롤리딘-1-일, (3*S*)-3-(디메틸-아미노)피롤리딘-1-일, 3-(디메틸아미노)아제티딘-1-일, [2-(디메틸아미노)에틸]-(메틸)아미노, [2-(메틸아미노)에틸](메틸)아미노, 2-(디메틸아미노)에톡시, 2-(메틸아미노)에톡시, 5-메틸-2,5-디아자스피로[3.4]옥트-2-일, (3a*R*,6a*R*)-5-메틸헥사-히드로-피롤로[3,4-*b*]피롤-1(2*H*)-일, 1-메틸-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일, 4-메틸피페리진-1-일, 4-[2-(디메틸아미노)-2-옥소에틸]피페라진-1-일, 메틸[2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸]아미노, 메틸[2-(모르폴린-4-일)에틸]아미노, 1-아미노-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일 및 4-[(2*S*)-2-아미노프로파노일]피페라진-1-일로부터 선택되고;

R^4는 수소, 1-피페리디노메틸 및 N,N-디메틸아미노메틸로부터 선택되고;

R^5는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필, 2,2-디플루오로에틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 플루오로, 클로로 및 시클로프로필로부터 선택되고;

X는 CH 또는 N이고;

n은 0, 1, 또는 2임)

또는 이의 제약상 허용가능한 염인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, G는 인돌-3-일 및 인다졸-1-일로부터 선택되고; R^1은 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, 및 시아노로부터 선택되고; R^2는 메톡시 및 2,2,2-트리플루오로에톡시로부터 선택되고; R^3은 [2-(디메틸아미노)에틸]-(메틸)아미노, [2-(메틸아미노)에틸](메틸)아미노, 2-(디메틸아미노)에톡시 및 2-(메틸아미노)에톡시로부터 선택되고; R^4는 수소이고; R^5는 메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸 및 시클로프로필로부터 선택되고; X는 CH 또는 N이고; n은 0 또는 1이거나; 이의 제약상 허용가능한 염인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, AZD3759 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 레이저티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 아비버티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 알플루티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 아파티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, CX-101 또는 이의 제약상 허용가능한 염, HS-10296 또는 이의 제약상 허용가능한 염, BPI-7711 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 다코미티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 이코티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 제피티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염 및 엘로티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, AZD3759 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 알플루티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, HS-10296 또는 이의 제약상 허용가능한 염 및 레이저티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항-EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

   i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

   ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

   iii. 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

   i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

   ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

   iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3

을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항-EGFR 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및 서열번호 20의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항-cMET 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

   i. 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

   ii. 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

   iii. 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항-cMET 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3

을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, cMET 결합 도메인은 서열번호 38의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 분자는

a. 제1 중쇄(여기서, 제1 중쇄는 항-EGFR 결합 도메인의 VH 영역, 및 제1 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함);

b. 제1 경쇄(여기서, 제1 경쇄는 항-EGFR 결합 도메인의 VL 영역, 및 제1 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함);

c. 제2 중쇄(여기서, 제2 중쇄는 항-cMET 결합 도메인의 VH 영역, 및 제2 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함); 및

d. 제2 경쇄(여기서, 제2 경쇄는 항-cMET 결합 도메인의 VL 영역, 및 제2 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함)

를 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 및 제2 CH 영역은 서열번호 42의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%,

또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 하나 이상의 Fcγ 수용체에 대한 항체 분자의 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이를 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 17

제16항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산 및 위치 331에 세린을 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CH 영역은 서열번호 63에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제2 CH 영역은 서열번호 64에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CL 영역은 서열번호 65에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제2 CL 영역은 서열번호 47에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중쇄는 서열번호 59에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제2 중쇄는 서열번호 60에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제1 경쇄는 서열번호 61에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제2 경쇄는 서열번호 62에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

항-EGFR 결합 도메인은 10 nM 이상, 30 nM 이상, 40 nM 이상의 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합하고/하거나;

항-EGFR 결합 도메인은 10 내지 100 nM, 20 내지 80 nM, 30 내지 75 nM, 또는 35 내지 50 nM의 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 분자는 약물에 접합되는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

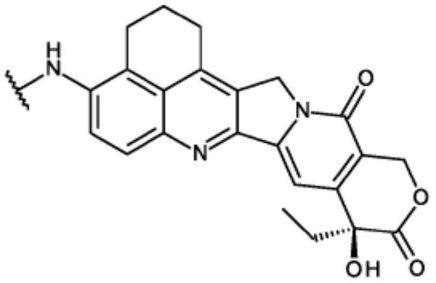
청구항 22

제21항에 있어서, 약물은 세포독소, 방사성 동위원소, 면역조절제, 사이토카인, 림포카인, 케모카인, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, siRNA, RNAi, 마이크로 RNA, 광활성 치료제, 항혈관신생제, 세포사멸 촉진제, 펩티드, 지질, 탄수화물, 킬레이트제, 또는 이들의 조합을 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 23

제22항에 있어서, 약물은 화학식 A*를 갖는 토포이소머라제 I 억제제인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자

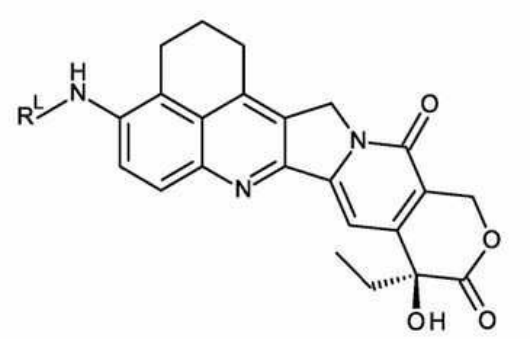
[화학식 A*]



청구항 24

제23항에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제는 화학식을 갖는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자

[화학식 I]

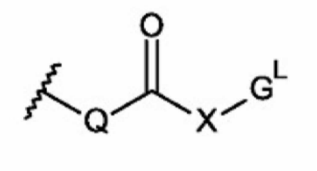


:

또는 이의 염 또는 용매화물(상기 식에서, R^L은 항체 분자에 연결하기 위한 링커이고, 선택적으로 상기 링커는 다음으로부터 선택됨:

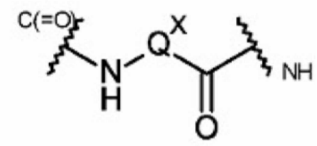
(ia):

[화학식 Ia]



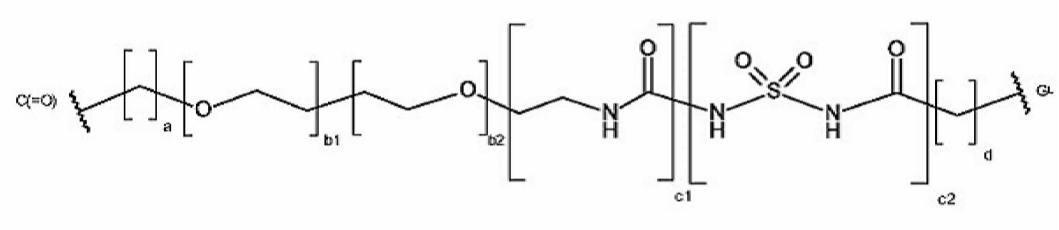
(상기 식에서,

Q는



이고, Q^X는 Q가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 트리펩티드 잔기 또는 테트라펩티드 잔기가 되도록 하는 것이고;

X는

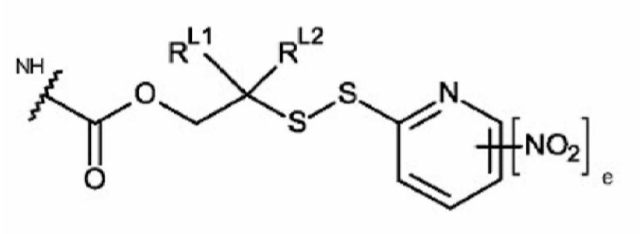


상기 식에서, a = 0 내지 5이고, b1 = 0 내지 16이고, b2 = 0 내지 16이고, c1 = 0 또는 1이고, c2 = 0 또는 1이고, d = 0 내지 5이고, 적어도 b1 또는 b2 = 0(즉, b1과 b2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고, 적어도 c1 또는 c2 = 0(즉, c1과 c2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고;

G^L은 항체 분자에 연결하기 위한 링커임); 또는

(ib):

[화학식 Ib]

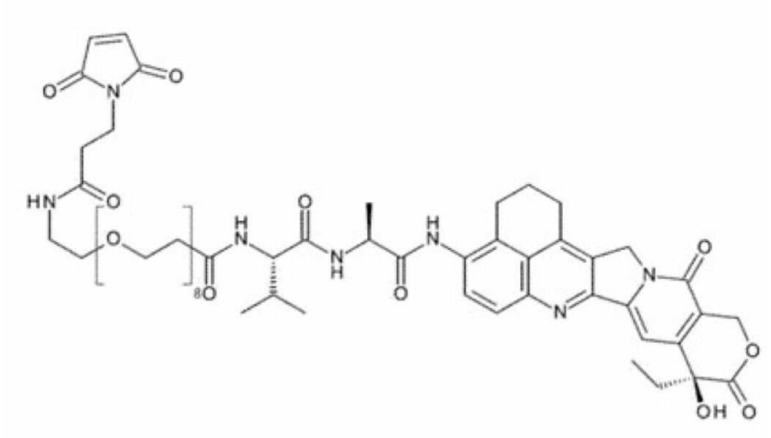


(상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

e는 0 또는 1임)).

청구항 25

제21항에 있어서, 항체는 다음 화학식을 갖는 토포이소머라제 I 억제제에 접합되는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자:



.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 비소세포폐암인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, 비소세포폐암은 EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암은 EGFR 유전자의 엑손 19의 하나 이상의 결실 및/또는 L858R 돌연변이를 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암은 EGFR 유전자의 T790M 돌연변이, 엑손 20의 돌연변이, 또는 둘 모두를 포함하는, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자는 EGFR TKI 나이브 인간 환자인, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 31

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자의 질환은 이전의 EGFR TKI 치료 중에 또는 후에 진행된, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 32

제33항에 있어서, EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염이고 인간 환자의 질환은 상이한 EGFR TKI를 사용한 이전의 치료 중에 또는 후에 진행된, EGFR TKI 또는 항-EGFR/cMET 항체 분자.

청구항 33

인간 환자에서 암 치료용 의약의 제조에서 EGFR TKI의 용도로서, EGFR TKI는 항-EGFR/cMET 항체 분자와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, EGFR TKI의 용도.

청구항 34

암 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 인간 환자에게 치료적 유효량의 EGFR TKI를 투여하는 단계를 포함하고, EGFR TKI는 치료적 유효량의 항-EGFR/cMET 항체 분자와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, 방법.

청구항 35

암 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 인간 환자에게 제1 양의 EGFR TKI 및 제2 양의 항-EGFR/cMET 항체 분자를 투여하는 단계를 포함하고, 제1 양과 제2 양은 함께 치료적 유효량에 포함되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, 방법.

청구항 36

EGFR/cMET 항체 분자와 EGFR TKI의 제약 조합물로서, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

를 포함하는, 제약 조합물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 모든 목적을 위해 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 가특허 출원 제63/367,068호(2022년 6월 27일 출원)의 35 U.S.C. §119(e)에 따른 이익을 주장한다.

[0003] **전자 제출된 서열 목록의 참조**

[0004] 본 출원은 컴퓨터 가독성 형태(CRF)로 본 출원과 함께 텍스트 파일명 "EGFCM-400-WO-PCT"(2023년 6월 05일 생성, 크기 75,711 바이트)로서 제출된 서열 목록을 참조로 포함하고 있다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 명세서는 암(예를 들어 비소세포폐암[NSCLC])의 치료에 사용하기 위한 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 티로신 키나제 억제제(TKI)에 관한 것이며, 여기서, EGFR TKI는 항-EGFR/cMET 항체 분자와 조합하여 사용하기 위한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 승인되었거나 임상 개발 중인 상피 성장 인자 수용체(EGFR)를 대상으로 하는 여러 약물이 있다. 예를 들어, 2종의 1세대(엘로티닙 및 제피티닙), 2종의 2세대(아파티닙 및 다코미티닙) 및 1종의 3세대(오시머티닙) 티로신 키나제 억제제(TKI)가 현재 EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암(NSCLC) 관리에 사용 가능하다. 이들 TKI는 모두 종양에 EGFR의 엑손 19의 인프레임 결실 및 엑손 21의 L858R 점 돌연변이가 있는 NSCLC 환자에게 효과적이다. 이 2가지 돌연변이는 전체 EGFR 돌연변이의 약 90%에 해당한다. 약 50%의 환자에서, 1세대 및 2세대 TKI에 대한 내성은 '게이트키퍼' 돌연변이 T790M의 획득에 의해 매개된다. 현재, 오시머티닙은 T790M 돌연변이의 존재 여부와 무관하게 엑손 19 결실 및 L858R 돌연변이에 대해 활성인 유일하게 등록된 EGFR TKI이다. 그러나, 오시머티닙으로 치료받은 환자조차도 주로 다른 내성 기전으로 인한 후천적 내성의 발생으로 인해 궁극적으로 질환이 진행된다. 따라서, 특히 3세대 EGFR TKI 치료 후 질환이 진행된 환자에 대한, 암의 새로운 치료법을 개발할 필요성이 여전히 남아 있다.

[0008] 전암유전자 MET의 유전자 산물인 cMET는 상피 세포 표면에 주로 발현되는 수용체 티로신 키나제이다. cMET 경로의 비정상적인 발현과 조절 장애는 특히 비소세포폐암, 결장직장암, 위장암, 두경부암, 췌장암, 신장암 및 간세포암을 포함한 다양한 인간 암에서 보고되었다(Organ, 2011; Birchmeier, 2003; Mo, 2017; Sierra, 2011). EGFR과 cMET 신호전달 경로 사이에 크로스토크와 직접적인 상호 작용이 있으며, 이 크로스토크가 임상에서 EGFR과 cMET 표적 치료에 대한 내성으로 기능적으로 변환된다는 것을 보여주는 방대한 양의 문헌이 증가하고 있다(McDermott, 2010; Moores, 2016; Suda, 2010).

[0009] 항체 약물 접합체(ADC)는 cMET 및 EGFR 발현 암 치료와 관련된 한계를 극복하는 수단으로 조사되었다. EGFR 대상 ADC인 데파툭시주맙 마포도틴(ABT-414)은 AbbVie가 교모세포종에 대해 3상 임상 개발을 진행 중이다(Phillips, 2016). ABT-414는 이전에 여러 추가 고형 종양 적응증에 대한 2상 시험에서 테스트되었다(ClinicalTrials.gov: NCT01741727). ADC는 이러한 적응증에서 허용 용량에서 제한된 효능을 나타냈으며, 치료받은 환자에서 우려되는 안구 독성이 자주 관찰되었다(Tolcher, 2014). 2세대 EGFR ADC인 ABBV-221은 임상 개발 중이었지만 안전성 문제로 인해 중단되었다(Phillips, 2018; Calvo, 2017). cMET 표적 ADC인 텔리소투주맙 베

도틴(ABBV-399)이 있으며, 이는 종양에서 높은 수준의 cMET가 발현되는 비소세포폐암(NSCLC) 환자를 위해, 단독요법으로 및 EGFR 억제제인 엘로티닙과 조합하여, 2상 임상 개발에 들어가고 있다(Angevin, 2017; Wang, 2017). cMET ADC + EGFR TKI 조합은 선택된 환자 모집단을 대상으로 한 1상 시험에서 임상 활성을 나타냈으며, 가장 빈번한 치료 관련 부작용으로 말초 신경병증 및 피부 발진이 나타났다(Angevin, 2017; Calvo, 2017).

[0010] EGFR과 cMET를 표적으로 하는 이중특이적 항체도 개발되어 단독요법으로서, 그리고 3세대 EGFR TKI와 조합하여 진행성 NSCLC 환자의 치료에서 임상적으로 연구되고 있다(ClinicalTrials.gov: NCT02609776).

[0011] 이중특이적 항체의 특성으로 인해 각 표적 간의 상호 작용을 미세 조정하여 분자의 전체 특성에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 허용 가능한 치료 창을 갖춘 ADC를 생성할 수 있다(Comer, 2018). 이 개념은 EGFR 및 cMET에 대해 시험관 내에서 테스트되었지만 연구자들은 위에서 언급한 EGFR 및 cMET ADC와 비교하여 안전성 또는 효능이 향상된다는 생체 내 개념 증명을 아직 입증하지 못했다(Sellmann, 2016).

[0012] 따라서 효능과 허용 가능한 안전성 프로파일을 모두 입증하는 EGFR 및 cMET 발현 암을 표적으로 하는 새로운 치료 전략이 필요하다.

발명의 내용

[0013] 본 발명자들은 EGFR에 낮은 친화도로 결합하는(예를 들어, 인간 EGFR에 10 nM 이상의 해리 상수(Kd)로 결합하는) 항-EGFR/cMET 항체 분자를 개발하면 암(예를 들어, NSCLC)의 효과적인 치료법으로서 알려진 EGFR TKI와 조합하여 사용할 수 있음을 알게 되었다.

[0014] 본원에서 입증된 바와 같이, 약물에 접합된 이러한 낮은 친화도의 EGFR 결합 도메인을 포함하는 항-EGFR/cMET 항체 분자(항체 약물 접합체("ADC"))는 피부 독성과 같은 정상 조직에서 감소된 정확한(on-target) 독성을 나타내므로 인간 EGFR과 더 높은 친화도로 결합하는 EGFR 항원 결합 도메인을 포함하는 접합체에 비해 향상된 안전성 프로파일을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[0015] 또한, 3세대 TKI인 오시머티닙과 조합하여 사용되는 이 낮은 친화도의 EGFR 결합 도메인을 포함하는 ADC는 오시머티닙에 대한 내성을 발달시킨 암 모델을 포함하여 다양한 EGFR 돌연변이 암 모델을 효과적으로 치료하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본원에 개시된 항체 분자와 EGFR TKI의 조합은 예를 들어 EGFR TKI에 대한 내성을 발달시킨 환자에서 EGFR 관련 암에 대한 안전하고 효과적인 치료법을 제공할 수 있다고 여겨진다.

[0016] 일 양태에서, 인간 환자의 암 치료에 사용하기 위한 EGFR TKI가 본원에 제공되며, 여기서 EGFR TKI는 항-EGFR/cMET 항체 분자와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

[0017] a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0018] i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0019] ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0020] iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0021] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[0022] b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0023] i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0024] ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0025] iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0026] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

[0027] 를 포함한다.

[0028] 다른 양태에서, 인간 환자의 암 치료에 사용하기 위한 항-EGFR/cMET 항체 분자가 본원에 제공되며, 여기서 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR TKI와 조합하여 투여되고, 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET

결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

[0029] a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0030] i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0031] ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0032] iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0033] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[0034] b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0035] i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0036] ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0037] iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0038] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

[0039] 를 포함한다.

[0040] 다른 양태에서, EGFR TKI와 조합하여 항-EGFR/cMET 항체 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자의 암 치료 방법이 본원에 제공되며, 여기서 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

[0041] a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0042] i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0043] ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0044] iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0045] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[0046] b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0047] i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0048] ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0049] iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0050] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

[0051] 를 포함한다.

[0052] 다른 양태에서, EGFR/cMET 항체 분자와 EGFR TKI의 제약 조합물이 본원에 제공되며, 여기서 항-EGFR/cMET 항체 분자는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하고, EGFR 결합 도메인은

[0053] a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0054] i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0055] ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0056] iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0057] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[0058] b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0059] i. 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0060] ii. 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0061] iii. 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0062] 또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

[0063] 를 포함한다.

[0064] 일부 경우에, EGFR TKI와 항-EGFR/cMET 항체 분자의 투여는 개별적, 순차적 또는 동시적이다.

[0065] 청구된 조합 치료에 사용하기에 적합한 EGFR TKI의 예가 설명되어 있다. 일부 경우에, EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염이다.

[0066] 일부 경우에, 항-EGFR 결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 일부 경우에, 항-EGFR 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및 서열번호 20의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0067] 일부 경우에, 항-cMET 결합 도메인은

[0068] a. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0069] i. 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0070] ii. 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0071] iii. 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0072] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[0073] b. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0074] i. 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0075] ii. 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0076] iii. 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0077] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체

[0078] 를 포함한다.

[0079] 일부 경우에, 항-cMET 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 일부 경우에, 항-cMET 결합 도메인은 서열번호 38의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0080] 일부 경우에, 항체 분자는 약물에 접합된다. 약물은 세포독소, 방사성 동위원소, 면역조절제, 사이토카인, 림포카인, 케모카인, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, siRNA, RNAi, 마이크로RNA, 광활성 치료제, 항혈관신생제, 세포사멸 촉진제, 펩티드, 지질, 탄수화물, 킬레이트제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 약물은 본원에 추가로 기재된 바와 같은 토포이소머라제

I 억제제이다.

[0081] 일부 경우에, 암은 비소세포폐암(NSCLC)이다. 일부 경우에, 비소세포폐암은 EGFR 돌연변이 양성 NSCLC이다. EGFR 돌연변이 양성 NSCLC에는 EGFR 유전자의 L858R 돌연변이와 같은 활성화 돌연변이 및/또는 엑손 19의 하나 이상의 결실을 포함하는 것들과 EGFR 유전자의 엑손 20의 삽입과 같은 EGFR TKI 내성과 관련된 돌연변이를 포함하는 것들이 포함된다. 본원에서 입증된 바와 같이, EGFR-cMET 접합체와 오시머티닙의 조합은 오시머티닙 내성으로 분류되는 것을 포함하여 다양한 EGFR 돌연변이 암에서 효능을 보였다.

도면의 간단한 설명

[0082] 이하, 본 개시내용의 원리를 예시하는 예 및 실험을 첨부된 도면을 참조하여 논의하기로 한다.

도 1a. RAA22/B09-57 DuetMab의 그래픽 묘사. 항-EGFR RAA22의 Fab, 항-cMET B09-57의 Fab, 홀 및 노브 중쇄가 제시되어 있다. 구조적 렌더링은 개별 도메인 구조의 합성이다.

도 1b. QD6/B09-57 DuetMab의 그래픽 묘사. 항-EGFR QD6의 Fab, 항-cMET B09-57의 Fab, 홀 및 노브 중쇄가 제시되어 있다. 구조적 렌더링은 개별 도메인 구조의 합성이다.

도 2. 항원 포획 포맷을 사용한 동시 결합 연구를 옥텟(Octet) 분석에 의해 수행하였다. 인간 cMET 항원이 로드된 센서를 먼저 항체와의 연속적인 결합 및 해리 상호 작용에 노출시킨 다음 인간 EGFR 항원과의 상호 작용에 노출시켰다. Ass=결합; Diss=해리; NI-NTA=니켈-니트릴로트리아세트산.

도 3a. EGFR 및 cMet 종 교차 반응성을 보여주는 ELISA 결과. 높은 친화도의 단일특이적 EGFR IgG인 QD6과 1가 이중특이적 EGFR/cMET DuetMAb인 QD6/B09는 인간, 시노몰구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 결합하였다. 낮아진 친화도의 단일특이적 EGFR IgG인 RAA22는 QD6에 비해 인간, 시노몰구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 더 약하게 결합했으며, 상응하는 1가 이중특이적 EGFR/c-Met DuetMAb인 RAA22/B09는 2가 모 IgG인 RAA22에 비해 인간 및 시노몰구스 원숭이 EGFR에 대해 여전히 더 약한 결합을 나타냈고, 마우스 EGFR에 대해 명목상 결합을 나타냈다. 단일특이적 c-Met IgG인 B09 및 모든 이중특이적 변이체는 인간 및 시노몰구스 원숭이 c-Met에 대해 필적할만한 결합을 나타내었지만 마우스 c-Met에 대해서는 검출 가능한 결합을 나타내지 않았다.

도 3b EGFR 및 cMet 계열 특이성을 보여주는 ELISA 결과. 테스트한 항체 중 어느 것도 임의의 EGFR HER 계열 단백질(HER2, HER3 또는 HER4) 또는 임의의 c-Met 계열 구성원(Ron(CD136) 또는 Semaphorin 3a)에 대해 주목할만한 결합을 나타내지 않았다.

도 4a. QD6/B09 DuetMab 및 해당 단일 아암 대조군 항체의 내재화 프로파일. 내재화 프로파일은 각 구축물에 대한 각각의 막 및 세포질 신호의 시간 경과를 통해 표시된다. QD6/B09 세트는 Opera 공초점 형광 현미경을 사용하여 획득하였다.

도 4b. RAA22/B09 DuetMab 및 해당 단일 아암 대조군 항체의 내재화 프로파일. 내재화 프로파일은 각 구축물에 대한 각각의 막 및 세포질 신호의 시간 경과를 통해 표시된다. 세트는 Zeiss 회전 디스크 공초점 형광 현미경을 사용하여 획득하였다.

QD6/B09 및 QD6/IgG에 대한 동일한 프로파일은 QD6/B09 DuetMab의 EGFR-아암에 의한 내재화 모드를 나타내는 반면, RAA22/B09 DuetMab은 효율적인 내재화를 위해 EGFR 및 c-MET 아암 둘 모두의 관여를 필요로 한다.

도 5a. 중간 및 높은 표적 c-MET 및 EGFR 세포 표면 수용체를 발현하는 세포에서 RAA22/B09-AZD1508 ADC의 내재화 프로파일. H1975 세포의 RAA22/B09-AF647 ADC에 대한 막, 세포질 및 총 신호가 제시되어 있다. 2의 대표적인 실험 하나가 제시되어 있다. H1975 세포는 전체 강도 및 세포 표면에서 항체의 해리를 나타내는 막 강도의 동시 감소를 나타낸다.

도 5b는 도 8a와 동일하지만 HCC827 세포에 관한 것이다. HCC827 세포는 실험 시간 경과에 걸쳐 안정적인 총 신호를 나타낸다. 막 신호의 감소는 항체 내재화에서 유래된다.

도 6a. HCC827 세포에서 RAA22/B09-AZD1508 ADC 단일 아암 대조군 항체의 내재화. RAA22/IgG 단일 아암의 강도 프로파일은 단일 아암 결합을 통한 EGFR에 대한 결합이 약하기 때문에 RAA22/B09보다 약 10배 낮다.

도 6b B09/IgG 단일 아암은 시간 경과에 따른 총 신호 및 막 신호의 동시 감소에 의해 신호된 바와 같이 세포막으로부터 해리된다.

도 7. 이중특이적 ADC의 세포독성 활성에 대한 개별 항체 아암의 상대 기여도 분석. NCI H1975 세포를 아암이

없는 과량의 모 항체로 전처리하여 EGFR 또는 cMET를 차단했다. 다음으로, EGFR-cMET ADC(RAA22/B09-AZ1508)를 67 nM 내지 0.0009 nM 범위의 최종 농도를 갖는 4X 연속 희석 계열의 세포에 추가했다. 처리된 세포를 37℃ 및 5% CO_2의 가습 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하였다. 대사 활성을 CellTiter-Glo 발광 생존력 분석(Promega)을 사용하여 결정하였다. 데이터는 미처리 대조군과 비교한 대사 활성 백분율로 도표화되었다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 최대 생존율(미처리 세포)과 최대 반응(최고 억제) 사이의 로지스틱 비선형 회귀 분석을 사용하여 IC50 값을 결정하였다.

도 8. 이중특이적 ADC의 활성에 대한 개별 항체 아암의 추가 평가. EGFR ADC(RAA22/R347-AZ1508) 및 항-cMET ADC(B09/R347-AZ1508)를 생성하기 위해 각 결합 아암을 비결합 이소형 대조군 아암(R347)과 쌍을 이루어 단일특이적 1가 ADC를 구축하였다. ADC를 67 nM 내지 0.0009 nM 범위의 최종 농도를 갖는 4X 연속 희석 계열의 NCI H1975 세포에 첨가하였다. 대사 활성 백분율을 도 7에 기재된 바와 같이 결정하였다.

도 9a. 면역결핍 마우스의 인간 암의 다수의 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서 고친화도(QD6/B09-AZ1508) 및 저친화도(RAA22/B09-AZ1508) EGFR-cMET ADC의 효능을 결정하기 위해 마우스 PDX 시험을 수행하였다. 각 화합물은 서로 다른 인간 종양을 나타내는 각 PDX 모델에 대해 단일 마우스에서 3 mg/kg의 단일 용량 수준으로 테스트되었다. 미처리 대조군 종양에 대한 종양 성장 퍼센트(%T/C)를 초기 부피보다 더 크게 자란 종양에 대해 계산하였고, 종양 퇴행 퍼센트를 초기 종양 부피에 비해 크기가 감소한 종양에 대해 계산하였다. 도 9a는 각 모델의 고친화도 ADC와 저친화도 ADC의 직접 비교를 보여준다.

도 9b는 고친화도 ADC에 대한 효능 순위에 따른 폭포 도표를 보여준다.

도 9c는 저친화도 ADC에 대한 효능 순위에 따른 폭포 도표를 보여준다.

도 10. PDX 모델에서 용량 범위 발견 생체 내 효능 연구는 숙주 동물로부터 수확한 종양 단편을 옆구리에 한 쪽으로 이식한 무흉선 누드 마우스에서 수행되었다. 도면에 표시된 바와 같이, 높은 친화도의 EGFR-cMET ADC인 QD6/B09-AZ1508은 1 및 2 mg/kg의 용량 수준에서 테스트되었으며, EGFR에 대한 낮아진 친화도의 변이체인 RAA22/B09-AZ1508은 1, 2 및 3 mg/kg의 용량 수준에서 테스트되었다. 종양 부피 측정은 투여 개시 후 주 2회 이루어졌으며 시간 경과에 따른 종양 부피의 선 그래프로 도표화하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)를 나타내며 삽입 이미지는 모델의 초기 계대에서 채취한 종양 조직에서 각 모델에 대한 EGFR 및 cMET의 면역조직화학적 염색을 보여준다.

도 11a 피하 및 동소 췌장 PDX 모델에서 EGFR-cMET 이중특이적 ADC의 생체 내 효능. **a)** 피하 MEDI-PANC-08 PDX 모델에서 높은 친화도의 QD6/B09 ADC의 생체 내 효능, ● - 미처리, ■ - R347-AZ1508(3 mg/kg - Q1Wx4), ▲ - QD6/B09-1508(1 mg/kg - Q1Wx4), ▼ - QD6/B09-1508(2 mg/kg - Q1Wx4) 및 ⬣ - QD6/B09-1508(3 mg/kg - Q1Wx4). 치료일은 x축에 체크로 표시되며, 종양 부피는 주 2회 측정되었다.

도 11b 피하 MEDI-PANC-08 PDX 모델에서 낮은 친화도의 RAA2/B09 ADC의 생체 내 효능. ● - 미처리, ■ - R347-AZ1508(3 mg/kg - Q1Wx4), ▲ - RAA2/B09-1508(1 mg/kg - Q1Wx4), ▼ - RAA2/B09-1508(2 mg/kg - Q1Wx4) 및 ⬣ - RAA2/B09-1508(3 mg/kg - Q1Wx4). 치료일은 x축에 체크로 표시되며, 종양 부피는 주 2회 측정되었다.

도 11c 동소 MEDI-PANC-08^{LUC}(루시퍼라제 발현) PDX 모델의 루시퍼라제 이미징. IVIS Spectrum In vivo Imaging 시스템을 사용하여 마우스를 매주 이미지화했다. 이미지는 최대 신호(21일 대조군 Gp)와 배경 사이에 설정된 래디언스(radiance) 척도(평균 래디언스[p/s/cm2/sr])를 사용하여 모든 군 및 시점에 걸쳐 정규화된다.

도 11d 피하 MEDI-PANC-08 PDX 모델에서 낮은 친화도의 RAA2/B09 ADC의 생체 내 효능. ● - 미처리, ■ - 젬시타빈(75 mg/kg - Q3/4Dx5), ▲ - R347-AZ1508(3 mg/kg - Q1Wx4), ▼ - RAA2/B09-1508(2 mg/kg - Q1Wx4) 및 ⬣ - RAA2/B09-1508(3 mg/kg - Q1Wx4). 치료일은 화살표로 표시되며, 종양 부피는 주 2회 측정되었다. **도 11a**와 **도 11b**에 표시된 데이터는 군 평균 종양 부피(mm^3) ± SEM이고, **도 11d**에 표시된 데이터는 군 평균 래디언스 [$p/s/cm^2/sr$] ± SEM이다.

도 12a 마우스에서의 RAA22/B09-57-AZ1508에 대한 평균 농도-시간 프로파일 및 평균 NCA PK 매개변수. 표적 화합물 농도와 전체 항체 농도는 면역 포획 LC-MS/MS 분석으로 측정되었다.

도 12b 마우스에서의 QD6/B09-57-AZ1508에 대한 평균 농도-시간 프로파일 및 평균 NCA PK 매개변수. 표적 화합

물 농도와 전체 항체 농도는 면역 포획 LC-MS/MS 분석으로 측정되었다.

도 13a RAA22/B09-57-AZ1508에 대한 원숭이에서의 평균 농도-시간 프로파일 및 평균 NCA PK 매개변수.

도 13b QD6/B09-57-AZ1508에 대한 원숭이에서의 평균 농도-시간 프로파일 및 평균 NCA PK 매개변수.

20067312에서 3 mg/kg의 QD6/B09-57-AZ1508에 대한 PK 프로파일 및 NCA PK 매개변수는 제2 용량 후 PK 데이터를 기반으로 했다.

도 13c는 분자들의 PK 매개변수를 요약한 표이다

도 14 EGFR-cMET Maia Topoi ADC를 환자 유래 이종이식편(PDX) 시험으로 면역결핍 마우스에서 인간 암의 여러 유형을 나타내는 PDX 모델에서 평가하였다. 고유한 인간 종양을 나타내는 각 PDX 모델에 대해 단일 마우스에서 화합물을 10 mg/kg의 용량 수준으로 테스트하였다. 미처리 대조군 종양에 대한 종양 성장 퍼센트(%T/C)를 초기 부피보다 더 크게 자란 종양에 대해 계산하였다(종양 성장 억제(%TGI)는 다음 식에 따라 치료군(TX)과 대조군(C) 사이에서 0일에 대한 종양 성장 퍼센트로 정의되었다: %TGI = 1 - (TX최종 - TX최초) / (C최종 - C최초)). 종양 퇴행 퍼센트를 초기 종양 부피와 비교하여 크기 감소를 나타낸 종양에 대해 계산하였다(종양 퇴행 퍼센트는 0일의 종양 부피(최초 용량일)에 비해 치료된 동물에서 종양의 종양 감소 퍼센트로 정의되었고, 다음 식에 따라 연구 종점에서 계산되었다: %퇴행 = (TX최종 평균 - TX최초 평균)/(TX최초 평균) x 100).

도 15 EGFR-cMET Topoi TM ADC를 환자 유래 이종이식편(PDX) 시험으로 면역결핍 마우스에서 인간 암의 여러 유형을 나타내는 PDX 모델에서 평가하였다. 고유한 인간 종양을 나타내는 각 PDX 모델에 대해 단일 마우스에서 화합물을 5 mg/kg의 용량 수준으로 테스트하였다. 미처리 대조군 종양에 대한 종양 성장 퍼센트(%T/C)를 초기 부피보다 더 크게 자란 종양에 대해 계산하였다(종양 성장 억제(%TGI)는 다음 식에 따라 치료군(TX)과 대조군(C) 사이에서 0일에 대한 종양 성장 퍼센트로 정의되었다: %TGI = 1 - (TX최종 - TX최초) / (C최종 - C최초)). 종양 퇴행 퍼센트를 초기 종양 부피와 비교하여 크기 감소를 나타낸 종양에 대해 계산하였다(종양 퇴행 퍼센트는 0일의 종양 부피(최초 용량일)에 비해 치료된 동물에서 종양의 종양 감소 퍼센트로 정의되었고, 다음 식에 따라 연구 종점에서 계산되었다: %퇴행 = (TX최종 평균 - TX최초 평균)/(TX최초 평균) x 100).

도 16a PDX 모델 SQHN-02에서의 비교가능성에 대해 상이한 IgG Fc 형식(Maia 및 TM)을 갖는 2개의 상이한 EGFR-cMET ADC를 평가했다. ADC는 다음의 3가지 용량 수준에서 테스트되었다: 2.5, 5 및 10 mg/kg. 종양 성장을 미처리 대조군 동물과 비교하였다. 치료군과 대조군당 총 10마리의 동물을 치료했다.

도 16b PDX 모델 Panc-08에서의 비교가능성에 대해 상이한 IgG Fc 형식(Maia 및 TM)을 갖는 2개의 상이한 EGFR-cMET ADC를 평가했다. ADC는 다음의 3가지 용량 수준에서 테스트되었다: 2.5, 5 및 10 mg/kg. 종양 성장을 미처리 대조군 동물과 비교하였다. 치료군과 대조군당 총 10마리의 동물을 치료했다.

도 17은 위의 도 14로부터의 비소세포폐암 NSCLC PDX 모델의 결과를 도시하며, 공지된 경우 EGFR 돌연변이 상태 및 조직학을 강조한다.

도 18 EGFR-cMET 이중특이적 항체 INT-009(RAA22/B09-Maia 네이키드 mAb) 및 INT-009-SG3932 DAR8 ADC("MAIA ADC")의 약동학 프로파일을 5 mg/kg의 치료 용량으로 NOD-SCID 마우스에서 B09/RAA2-IgG1-TM 미러 mAb(INT-017) 및 TM-미러-SG3932 DAR6 ADC("TM ADC")와 비교하였다.

도 19a는 L858R EGFR 돌연변이를 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'LUN487'에서 ADC 효능의 결과를 보여준다.

도 19b는 L858R EGFR 돌연변이를 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'LUN487'에서 3세대 TKI 오시머티닙('Osi')과 조합한 ADC 효능의 결과를 보여준다.

도 19c는 L858R EGFR 돌연변이를 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'LUN439'에서 ADC 효능의 결과를 보여준다.

도 19d는 L858R EGFR 돌연변이를 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'LUN439'에서 3세대 TKI 오시머티닙('Osi')과 조합한 ADC 효능의 결과를 보여준다.

도 20a는 EGFR 엑손 20 삽입을 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'CTG-2992'에서 ADC 효능의 결과를 보여준다(1차 오시머티닙 내성)

도 20b는 EGFR 엑손 20 삽입을 포함하는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'CTG-2992'에서 3세대 TKI 오시머티닙과 조합한 ADC 효능의 결과를 보여준다(1차 오시머티닙 내성)

도 21a는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'CTG-2803'에서 ADC 효능의 결과를 보여준다(획득 오시머티닙 내성)

도 21b는 EGFR 돌연변이 PDX 모델 'CTG-2803'에서 3세대 TKI 오시머티닙과 조합한 ADC 효능의 결과를 보여준다(획득 오시머티닙 내성)

도 22a는 25 mg/kg 오시머티닙 치료에 대한 다수의 EGFRmut NSCLC 환자 유래 이종이식 모델 반응의 폭포 도표를 보여준다. x축은 연구 기간 동안 기준선으로부터 최선의 반응을 나타낸다. Y축 절편선은 기준선으로부터 30% 퇴행을 나타내며, 이는 반응을 정의한다

도 22b는 2 mg/kg EGFR-cMET TM ADC 치료에 대한 다수의 EGFRmut NSCLC 환자 유래 이종이식 모델 반응의 폭포 도표를 보여준다. x축은 연구 기간 동안 기준선으로부터 최선의 반응을 나타낸다. Y축 절편선은 기준선으로부터 30% 퇴행을 나타내며, 이는 반응을 정의한다

도 22c는 25 mg/kg 오시머티닙과 2 mg/kg EGFR-cMET TM ADC의 조합물 치료에 대한 다수의 EGFRmut NSCLC 환자 유래 이종이식 모델 반응의 폭포 도표를 보여준다. x축은 연구 기간 동안 기준선으로부터 최선의 반응을 나타낸다. Y축 절편선은 기준선으로부터 30% 퇴행을 나타내며, 이는 반응을 정의한다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하, 본 개시내용의 양태 및 예를 첨부된 도면을 참조하여 논의하기로 한다. 추가의 양태 및 개시내용은 당업자에게 명백할 것이다. 본문에 언급된 모든 문헌은 본원에 참조로 포함된다.

[0084] ***표적***

[0085] *EGFR*

[0086] 인간 EGFR(전암유전자 c-ErbB-1, 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-1 및 EC 2.7.10.1로도 알려짐)은 UniProt P00533에 의해 식별된 단백질이다. 인간 EGFR 유전자(ERBB, ERBB1 및 HER1로도 알려짐)에 의해 암호화된 mRNA의 대안적인 스플라이싱으로 4개의 이소형이 생성된다: 이소형 1(UniProt: P00533-1, v2(최종 서열 업데이트: 1997년 11월 1일)); 이소형 1에 대한 치환 F404L 및 L405S를 포함하고 이소형 1의 위치 406 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 2(UniProt: P00533-2, v1); 이소형 1의 위치 628 내지 705에 치환을 포함하고 이소형 1의 위치 706 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 3(UniProt: P00533-3, v1); 및 이소형 1에 대한 치환 C628S를 포함하고 이소형 1의 위치 629 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 4(UniProt: P00533-4).

[0087] EGFR의 구조와 기능은 예를 들어, 문헌[Ferguson, Annu Rev Biophys. (2008) 37: 353-373]에 검토되어 있다. EGFR은 표피 성장 인자 계열(EGF 계열) 구성원에 대한 수용체인 막관통 단백질이다. 수용체는 큰 세포외 영역, 단일 스패닝 막관통 도메인, 세포내 막근접 도메인, 티로신 키나제 도메인 및 C-말단 조절 영역을 포함한다. EGFR이 리간드에 결합하면 EGFR의 C-말단 조절 영역에 있는 여러 티로신 잔기(Y992, Y1045, Y1068, Y1148 및 Y1173)의 수용체 이량체화 및 자가인산화가 유도된다.

[0088] 비정상적인 EGFR 발현/활성은 신경계 장애 및 많은 암을 포함한 많은 질환과 관련이 있다.

[0089] 본 명세서에서 "EGFR"은 임의의 종의 EGFR을 지칭하며 임의의 종의 EGFR 이소형, 단편, 변이체 또는 동족체를 포함한다.

[0090] *cMET*

[0091] 인간 cMET(c-Met, 간세포 성장 인자 수용체(HGFR) 또는 티로신-단백질 키나제 Met로도 알려짐)는 UniProt P08581에 의해 식별된 단백질이다. 인간 *MET* 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 대안적인 스플라이싱으로 3개의 이소형이 생성된다: 이소형 1(UniProt: P08581-1, v4(최종 서열 업데이트: 2009년 7월 7일)); 이소형 1의 위치 755에 아미노산 서열 "STWWKEPLNIVSFLFCFAS"가 삽입된 이소형 2(UniProt: P08581-2); 및 이소형 1의 위치 755 내지 764에 상응하는 아미노산 서열이 "RHVNIALIQR"로 치환되고 이소형 1의 위치 765 내지 1390에 상응하는 아미노산 서열이 추가로 결여된, 가용성 met 변이체 4로도 알려진 이소형 3(UniProt: P08581-3).

[0092] cMET의 구조는 예를 들어 Gherardi, 2003에서 검토되어 있으며, 이는 본원에 그 전체가 참고로 포함된다. cMET는 디술피드 결합된 알파 사슬(50 kDa)과 베타 사슬(145 kDa)로 구성된 이종이량체이다. cMET는 간세포 성장 인자(HGF) 및 세포내 키나제 도메인에 대한 결합을 매개하는 N-말단 Sema 도메인을 포함한다. 세포 표면에서의 리간드 결합은 하류 신호전달 분자에 대한 도킹 부위를 제공하는 세포내 도메인에서의 cMET의 자가인산화 및 여러

신호전달 캐스케이드의 활성화를 유도한다.

[0093] cMET는 상피 세포 표면 상에서 정상 조직에서 발현된다. cMET 과발현은 많은 인간 종양 및 암에서 관찰되며, 이는 빈번하게는 전이성 표현형 및 불량한 예후와 관련된다. 높은 수준의 cMet 발현이 관찰된 암의 예로는 비소세포폐암(NSCLC), 췌장암, 결장직장암, 두경부 편평세포 암종, 유방암 및 식도-위암이 있다. 이들 암에서는 EGFR과 cMET의 공동발현이 종종 관찰된다.

[0094] ***항체 분자***

[0095] 본 개시내용은 항체 분자를 제공한다. 본 개시내용에 따른 항체 분자는 다른 폴리펩티드 및/또는 혈청 성분에 결합할 수 있는 항체와 같은 오염물이 없다는 의미에서 단리된 형태로 제공될 수 있다.

[0096] "항체 분자"라는 용어는 천연 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성하여 생성되는 면역글로불린을 설명한다. 항체 분자는 인간 항체 분자이거나 인간화 항체 분자일 수 있다. 항체 분자는 단일클론 항체 분자일 수 있다. 항체의 예로는 면역글로불린 G(IgG)와 같은 면역글로불린 이소형, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와 같은 이들의 이소형 서브클래스, 그리고 이의 단편이 있다.

[0097] 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "항체 분자"는 관련 표적 분자(들)에 대한 결합을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fv, scFv, Fab, scFab, $F(ab')_2$, Fab_2, 디아바디, 트리아바디, scFv-Fc, 미니바디 및 단일 도메인 항체(예를 들어, VhH) 등이 포함된다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "항체 분자"는 따라서 "항체 분자 또는 이의 단편"과 동일하다.

[0098] 항체 분자 및 이의 구축 및 사용 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005)]에 기재되어 있다. 단일클론 및 기타 항체 분자를 취하고 재조합 DNA 기술의 기법을 사용하여 원래 항체의 특이성을 보유하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생산하는 것이 가능한다. 이러한 기술은 하나의 항체 분자의 CDR 또는 가변 영역을 다른 항체 분자에 도입하는 것을 포함할 수 있다(EP-A-184187, GB 2188638A 및 EP-A-239400).

[0099] 단일클론 항체 기술과 관련된 오늘날의 기술을 고려하면 대부분의 항원에 대한 항체 분자를 제조할 수 있다. 항원 결합 도메인은 항체의 일부(예를 들어 Fab 단편) 또는 합성 항체 단편(예를 들어 단일 사슬 Fv 단편(ScFv))일 수 있다. 선택된 항원에 대한 적합한 단일클론 항체는 공지된 기술, 예를 들어 문헌["Monoclonal Antibodies: A manual of techniques ", H Zola (CRC Press, 1988)] 및 문헌["Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)]에 개시된 것들에 의해 제조될 수 있다. 키메라 항체는 문헌[Neuberger, 1988]에서 논의되어 있다.

[0100] 본 개시에 따른 항체 분자는 항원 결합 도메인(본원에서 "결합 도메인"이라고도 함)을 포함한다. "항원 결합 도메인" 또는 "결합 도메인"은 표적 항원의 전부 또는 일부에 결합하는 분자의 일부를 설명한다. 항원이 큰 경우, 항체는 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있는데, 이 부분을 에피토프라 한다. 항체 항원 결합 부위는 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 항체 항원 결합 부위는 선택적으로 경쇄 가변(VL) 영역 및 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다. 항원 결합 도메인의 VH 및 VL 영역은 함께 Fv 영역을 구성한다.

[0101] 항원 결합 도메인은 일반적으로 6개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하며, VH 영역의 3개: HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 VL 영역의 3개: LCDR1, LCDR2 및 LCDR3이다. 6개의 CDR은 함께, 표적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인의 일부인 항원 결합 도메인의 파라토프를 정의한다.

[0102] VH 영역 및 VL 영역은 CDR에 대한 스캐폴드를 제공하는 각 CDR의 양쪽에 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. N-말단에서 C-말단까지 VH 영역은 다음의 구조를 포함한다: N-말단-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-C-말단; VL 영역은 다음의 구조를 포함한다: N-말단-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-C-말단.

[0103] 항체 CDR 및 FR을 정의하는 데에는 문헌[Kabat, 1991], [Chothia, 1987]에 기재된 것들, 문헌[LeFranc, 2015]에 기재된 IMGT 넘버링 및 문헌[Retter, 2005]에 기재된 VBASE2와 같은 여러 가지 다른 관례가 있다. 본원에 기재된 항체 분자의 VH 영역 및 VL 영역의 CDR 및 FR은 Kabat(Kabat, 1991)에 따라 정의되었다.

[0104] 각각이 다른 표적에 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 분자는 "이중특이적 항체 분자"로 지칭될 수 있다. 대조적으로, 단일 표적(예를 들어, EGFR 또는 cMet)에만 결합하는 항체 분자를 "단일 특이적 항체 분자"라고 한다. 본 개시는 EGFR 결합 도메인 및 cMET 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 분

자에 관한 것이다.

[0105] *항-EGFR 결합 도메인*

[0106] EGFR과 결합하는 결합 도메인(항-EGFR 결합 도메인)은 일반적으로 EGFR에 결합할 수 있는 항체 분자의 CDR을 포함한다. 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항체 분자의 FR을 추가로 포함한다. 즉, 일부 경우에 EGFR과 결합하는 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항체 분자의 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0107] 일부 경우에 EGFR과 결합하는 결합 도메인은 본원에 기재된 EGFR 결합 항체 클론(즉, 항-EGFR 항체 클론 RAA22 또는 QD6)의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다. 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 RAA22의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0108] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 항-EGFR 항체 클론 RAA22 또는 QD6, 선택적으로 RAA22의 3개의 HCDR 또는 3개의 LCDR, 선택적으로 3개의 VH CDR 및 3개의 VL CDR을 포함한다. 항체 RAA22 및 QD6의 VH 및 VL 도메인 서열이 본원에 기재되어 있으며, 따라서 상기 항체의 3개의 VH 및 3개의 VL 도메인 CDR이 상기 서열로부터 결정될 수 있다.

[0109] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (1) 또는 (2)에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0110] (1) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0111] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0112] 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0113] 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0114] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체, 또는

[0115] (2) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0116] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0117] 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0118] 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0119] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0120] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (1)에 따른 VH 영역을 포함한다.

[0121] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위의 (1) 또는 (2)에 따른 VH 영역을 포함하고, 여기서 VH 영역은 아래 (3)에 따른 FR을 추가로 포함한다:

[0122] (3) 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 HFR1

[0123] 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HFR2

[0124] 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 HFR3

[0125] 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 HFR4,

[0126] 또는 HFR1, HFR2, HFR3, 또는 HFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0127] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위의 (1) 또는 (2)에 따른 CDR 및 위의 (3)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0128] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (4) 또는 (5)에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0129] (4) (1)에 따른 CDR 및 (3)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역,

[0130] (5) (2)에 따른 CDR 및 (3)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0131] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (4)에 따른 VH 영역을 포함한다.

[0132] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (6) 또는 (7)에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0133] (6) 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0134] (7) 서열번호 18의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0135] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (6)에 따른 VH 영역을 포함한다.

[0136] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (8) 또는 (9)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0137] (8) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0138] 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0139] 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0140] 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0141] 또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0142] (9) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0143] 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0144] 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0145] 서열번호 67의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0146] 또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0147] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (8)에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0148] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위의 (8) 또는 (9)에 따른 VL 영역을 포함하고, 여기서 VL 영역은 아래 (10)에 따른 FR을 추가로 포함한다:

[0149] (10) 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 LFR1

[0150] 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 LFR2

[0151] 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 LFR3

[0152] 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 LFR4,

[0153] 또는 LFR1, LFR2, LFR3, 또는 LFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0154] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위의 (8) 또는 (9)에 따른 CDR 및 위의 (10)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0155] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (11) 또는 (12)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0156] (11) (8)에 따른 CDR 및 (10)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0157] (12) (9)에 따른 CDR 및 (10)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0158] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (11)에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0159] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 아래 (13) 또는 (14)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0160] (13) 서열번호 20의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0161] (14) 서열번호 22의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0162] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 위의 (13)에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0163] 일부 경우에, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (8) 내지 (14) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다. 일부 경우에, 결합 도메인은 (1), (4) 및 (6) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 (8), (11) 및 (13) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다. 다른 경우에, 결합 도메인은 (2), (5) 및 (7) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 (9), (12) 및 (14) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0164] *항-cMET 결합 도메인*

[0165] cMET와 결합하는 결합 도메인(항-cMET 결합 도메인)은 일반적으로 cMET에 결합할 수 있는 항체 분자의 CDR을 포함한다. 일부 경우에, cMet와 결합하는 결합 도메인은 cMet에 결합할 수 있는 항체 분자의 FR을 추가로 포함한다. 즉, 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 cMet에 결합할 수 있는 항체 분자의 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0166] 일부 경우에, cMET와 결합하는 결합 도메인은 본원에 기술된 cMET 결합 항체 클론(즉, 항-cMET 항체 클론 B09-GL)의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0167] 일부 경우에, cMet와 결합하는 결합 도메인은 cMET 결합 항체 클론 B09-GL의 3개의 HCDR 또는 3개의 LCDR, 선택적으로 3개의 VH CDR 및 3개의 VL CDR을 포함한다. 항체 B09-GL의 VH 및 VL 도메인 서열이 본원에 기술되어 있으며, 따라서 상기 항체의 3개의 VH 도메인 CDR 및 3개의 VL 도메인 CDR이 상기 서열로부터 결정될 수 있다.

[0168] 일부 경우에, cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (15)에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0169] (15) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0170] 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

[0171] 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

[0172] 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

[0173] 또는 HCDR1, HCDR2, 또는 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0174] 일부 경우에, cMet와 결합하는 결합 도메인은 위의 (15)에 따른 VH 영역을 포함하고, 여기서 VH 영역은 아래 (16)에 따른 FR을 추가로 포함한다:

[0175] (16) 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 HFR1

[0176] 서열번호 31의 아미노산 서열을 갖는 HFR2

[0177] 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 HFR3

[0178] 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 HFR4,

[0179] 또는 HFR1, HFR2, HFR3, 또는 HFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0180] 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (17)에 따른 VH를 포함한다:

[0181] (17) (15)에 따른 CDR 및 (16)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0182] 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (18)에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0183] (18) 서열번호 38의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0184] 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (19)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0185] (19) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0186] 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

[0187] 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

[0188] 서열번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

[0189] 또는 LCDR1, LCDR2, 또는 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0190] 일부 경우에, cMet와 결합하는 결합 도메인은 위의 (19)에 따른 VL 영역을 포함하고, 여기서 VL 영역은 아래 (20)에 따른 FR을 추가로 포함한다:

[0191] (20) 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 LFR1

[0192] 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 LFR2

[0193] 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 LFR3

[0194] 서열번호 37의 아미노산 서열을 갖는 LFR4,

[0195] 또는 LFR1, LFR2, LFR3, 또는 LFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0196] 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (21)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0197] (21) (19)에 따른 CDR 및 (20)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0198] 일부 경우에 cMet와 결합하는 결합 도메인은 아래 (22)에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0199] (22) 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0200] 일부 경우에, cMET와 결합하는 결합 도메인은 위의 (15) 내지 (18) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (19) 내지 (22) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0201] *CDR 치환*

[0202] 본 개시에 따른 경우에, 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)이 다른 아미노산으로 치환된다.

[0203] 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기준으로 한 부류로 나눌 수 있다:

[0204] 1) 비극성, 지방족: 글리신(G), 메티오닌(M), 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I);

[0205] 2) 극성, 비하전: 시스테인(C), 세린(S), 트레오닌(T), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 프롤린(P);

[0206] 3) 산성(음전하): 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0207] 4) 염기성(양전하): 히스티딘(H), 리신(K), 아르기닌(R);

[0208] 5) 방향족: 트립토판(W), 티로신(Y), 페닐알라닌(F).

[0209] 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 이러한 부류 중 하나의 구성원을 같은 부류의 다른 구성원으로 교환하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 산성 아미노산 글루탐산(E)을 산성 아미노산 아스파르트산(D)으로 치환하는 것일 수 있다.

[0210] 일부 경우에 치환(들)은 기능적으로 보존적일 수 있다. 즉, 일부 경우에 치환은 동등한 비치환 항원 결합 도메인과 비교하여 치환을 포함하는 항원 결합 도메인의 하나 이상의 기능적 특성(예를 들어 결합 친화도)에 영향을 미치지 않을 수 있다(또는 실질적으로 영향을 미치지 않을 수 있다).

[0211] *불변 영역*

[0212] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 면역글로불린 중쇄 불변(CH) 영역을 포함한다. 일부 경우에 CH는 IgG(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예: IgA1, IgA2), IgD, IgE 또는 IgM의 중쇄 불변 서열이거나 이로부터 유래된다.

[0213] 일부 경우에 CH 영역은 인간 면역글로불린 G1 불변(IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; 서열번호 42) 또는 이의 단편이다.

[0214] 일부 경우에, CH 영역은 서열번호 42, 43, 44, 45, 46, 63 또는 64의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에, CH 영역은 서열번호 63 또는 64의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0215] 일부 경우에, 항체 분자는 본원에 기재된 VH 영역 및 본원에 기재된 CH 영역을 포함하거나 이로 구성된 중쇄를 포함한다.

[0216] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 면역글로불린 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 경우에, CL 영역은 서열번호 47 또는 서열번호 48에 기재된 카파 CL 영역이거나 이로부터 유래된다. 일부 경우에, CL 영역은 서열번호 49 또는 서열번호 65에 기재된 람다 CL 영역이거나 이로부터 유래된다. 일부 경우에, 항체 분자는 서열번호 47 또는 48에 기재된 카파 CL 영역이거나 이로부터 유래된 제1 CL 영역; 및 서열번호 49 또는 65에 기재된 람다 CL 영역이거나 이로부터 유래된 제2 CL 영역을 포함한다.

[0217] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는

[0218] 제1 중쇄(여기서, 제1 중쇄는 항-EGFR 결합 도메인의 VH 영역, 및 제1 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함);

[0219] 제1 경쇄(여기서, 제1 경쇄는 항-EGFR 결합 도메인의 VL 영역, 및 제1 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함);

[0220] 제2 중쇄(여기서, 제2 중쇄는 항-cMET 결합 도메인의 VH 영역, 및 제2 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함); 및

[0221] 제2 경쇄(여기서, 제2 경쇄는 항-cMET 결합 도메인의 VL 영역, 및 제2 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함).

[0222] 제1 및 제2 CH 영역은 동일하거나 상이할 수 있다. 즉, 제1 및 제2 CH 영역은 동종이량체 또는 이종이량체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 비대칭 이중특이적 항체 분자는 아래에 더 자세히 기재되는 바와 같이 서로 다른 제1 및 제2 CH 영역을 갖는다. 제1 및 제2 CL 영역은 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 경우에, 제1 CL 영역은 서열번호 47 또는 48에 기재된 카파 CL 영역이거나 이로부터 유래되고; 제2 CL 영역은 서열번호 49 또는 65에 기재된 람다 CL 영역이거나 이로부터 유래된다.

[0223] 항체 분자가 제1 VH 영역과 제1 CH 영역을 포함하는 경우, 이들 영역은 함께 항체 분자의 제1 중쇄를 형성한다는 것, 즉 제1 VH 영역과 제1 CH 영역이 서로 연결된다는 것이 이해될 것이다. 유사하게, 제2 VH 영역 및 제2 CH 영역은 항체 분자의 제2 중쇄를 형성하고; 제1 VL 영역 및 제1 CL 영역은 항체 분자의 제1 경쇄를 형성하고; 제2 VL 영역 및 제2 CL 영역은 항체 분자의 제2 경쇄를 형성한다.

[0224] 일부 경우에, 항체 분자는 서열번호 50에 기재된 B-09-GL 중쇄, 서열번호 53에 기재된 QD6 중쇄, 서열번호 56에 기재된 RAA22 중쇄, 서열번호 59에 기재된 중쇄, 또는 서열번호 60에 기재된 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다.

[0225] 일부 경우에, 항체 분자는 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하며,

[0226] (i) 제1 중쇄는 서열번호 56에 기재된 B-09-GL 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

[0227] (ii) 제2 중쇄는 서열번호 50에 기재된 RAA22 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0228] 일부 경우에, 항체 분자는 제1 중쇄 및 제2 중쇄를 포함하며,

[0229] (i) 제1 중쇄는 서열번호 59에 기재된 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

[0230] (ii) 제2 중쇄는 서열번호 60에 기재된 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0231] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 본원에 기재된 VL 영역 및 본원에 기재된 CL 영역을 포함하거나 이로 구성된 경쇄를 포함한다.

[0232] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 서열번호 52에 기재된 B-09-GL 경쇄, 서열번호 55에 기재된 QD6 경쇄, 서열번호 58에 기재된 RAA22 경쇄, 서열번호 61에 기재된 경쇄, 또는 서열번호 62에 기재된 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0233] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함하며,

[0234] (i) 제1 경쇄는 서열번호 58에 기재된 RAA22 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

[0235] (ii) 제2 경쇄는 서열번호 52에 기재된 B-09-GL 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다

[0236] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함하며,

[0237] (i) 제1 경쇄는 서열번호 61에 기재된 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

[0238] (ii) 제2 경쇄는 서열번호 62에 기재된 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0239] 본원에 기재된 항체 분자의 CH, CL, 중쇄 및/또는 경쇄는 예를 들어 아래에 더 자세히 기재된 바와 같이 Fc 이펙터 기능을 폐지 또는 감소시키고/거나, 이종이량체 항체 분자의 형성을 촉진하고/거나, 동족 중쇄 및 경쇄 쌍 결합의 효능을 증가시키고/거나 접합체 형성을 보조하기 위한 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 CH, CL, 중쇄 및 경쇄는 각각 변형된 CH, CL, 중쇄 및 경쇄로 지칭될 수 있다.

[0240] 항체 분자는 하나 이상의 Fcɣ 수용체, 예컨대 FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIII 및/또는 보체에 대한 항체 분자의 결합을 감소시키거나 폐지하기 위해 중쇄(들)의 CH 영역(들)에 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 Fc 이펙터 기능을 폐지하거나 감소시킨다. 하나 이상의 Fcɣ 수용체 및 보체에 대한 항체 분자의 결합을 감소시키거나 폐지하기 위한 돌연변이가 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Organesyan, 2008]에 기재된 L234F/L235E/P331S의 "삼중 돌연변이" 또는 "TM"을 포함한다. 항체 이펙터 기능을 조절하는 것으로 알려진 다른 돌연변이는 예를 들어 문헌[Wang, 2018]에 기재되어 있다.

[0241] 따라서, 일부 경우에 제1 및/또는 제2 중쇄는 위치 234에 페닐알라닌(F), 위치 235에 글루탐산(E), 및 위치 331에 세린(S)을 포함하며, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다. 예를 들어, 제1 및 제2 중쇄 중 하나 또는 둘 다는 서열번호 42에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CH 영역을 포함할 수 있고 위치 234에 페닐알라닌(F), 위치 235에 글루탐산(E), 및 위치 331에 세린(S)을 포함할 수 있으며, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다. 실시예(예: 실시예 12)에서 입

증된 바와 같이, 중쇄에 TM을 포함시키는 것은 예시된 항체 분자 및 ADC의 약동학적 특성을 개선시키는 것으로 입증되었다.

[0242] 삼중 돌연변이를 포함하는 CH 영역의 예는 서열번호 63 및 64이다. 따라서, 일부 경우에, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 서열번호 63에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CH 영역을 포함하고, 다른 중쇄는 서열번호 64에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CH 영역을 포함하고, CH 영역 중 하나 또는 둘 다는 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산, 및 위치 331에 세린을 포함하고, 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0243] 삼중 돌연변이를 함유하는 CH 영역을 포함하는 중쇄의 예는 서열번호 59 및 60이다. 따라서, 일부 경우에, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 서열번호 59에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖고, 다른 중쇄는 서열번호 60에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지며, 중쇄 중 하나 또는 둘 다는 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산, 및 위치 331에 세린을 포함하고, 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0244] 항체 분자의 VL 및 CL 영역, VH 영역 및 CH1 영역은 함께 Fab 영역을 구성한다. 항체 분자의 나머지 부분은 Fc 영역을 구성한다.

[0245] 달리 명시하지 않는 한, 본원에 기재된 아미노산 서열, 치환, 결실 및 삽입의 위치를 포함하는 불변 도메인의 아미노산 잔기 위치는 EU 넘버링에 따라 넘버링된다(Edelman, 2007).

[0246] *이중특이적 형식*

[0247] 이중특이적 항체 분자는 임의의 적합한 형식으로 제공될 수 있다. 본원에 기재된 이중특이적 항체 분자에 적합한 형식 및 이를 생산하는 방법은 문헌[Kontermann, MAbs 2012, 4(2):182-197] 및 문헌[Kontermann and Brinkmann 2015, 20(7): 838-847]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 전체가 참조로 본원에 포함된다. 특히 문헌[Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-19]의 도 2를 참조한다.

[0248] 이중특이적 항체 분자는 화학적 접합에 의해 기존 항체로부터 생성될 수도 있다. 예를 들어, 2개의 IgG 분자 또는 2개의 Fab' 단편은 예를 들어, 문헌[Graziano and Guptill, Methods Mol Biol. 2004; 283:71-85]에 기재된 바와 같이, 동종 또는 이종 이작용성 커플링 시약을 사용하여 커플링될 수 있다.

[0249] 일부 경우에, 이중특이적 항체 분자는 면역글로불린 G 유사(IgG 유사) 이중특이적 항체 분자일 수 있다. IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 하나의 항원에 특이적인 Fv 영역, Fab 영역 또는 sVD, 또 다른 항원에 특이적인 Fv/Fab/sVD, 및 Fc 영역을 포함할 수 있다. IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 대칭적이거나 비대칭적일 수 있다. 일부 경우에, 이중특이적 항체 분자는 비대칭적이다.

[0250] 대칭적 IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 일반적으로 예를 들어, scFv 단편 또는 가변 단일 도메인 형태로, IgG 분자의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단에 융합된 항원 결합 도메인을 함유한다. 이러한 대칭적 IgG 유사 이중특이적 항체 분자의 특징적인 특성은 이들이 두 개의 동일한 중쇄를 함유한다는 것이다. 또한, 대칭적 IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 일반적으로 각 에피토프에 대해 2가이다. 본원에서 사용되는 수가(valency)는 단일 에피토프와 결합할 수 있는 항체 분자 내 항원 결합 영역의 수를 지칭한다. 단일클론 단일특이적 IgG 항체 분자는 단일 에피토프에 대해 2가이다. 이는 두 개의 항원 결합 도메인을 함유하며, 각 도메인은 단일 표적 분자의 에피토프에 결합할 수 있다. 대칭적 IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 각 에피토프에 대해 2가이다. 이는 일반적으로 4개의 항원 결합 도메인을 함유하며, 그 중 2개는 표적 분자의 제1 에피토프에 결합할 수 있고 그 중 2개는 표적 분자의 제2 에피토프에 결합할 수 있다.

[0251] 대칭적 IgG 유사 이중특이적 항체 분자의 예에는 DVD-IgG, IgG-scFv, scFv-IgG, $scFv_4$-Ig, IgG-scFab, scFab-IgG, IgG-sVD, sVD-IgG, 투인원(2 in 1)-IgG, mAb^2, tandemab 공통 LC가 포함된다. 이는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 화학적 가교, 체세포 혼성화 또는 산화환원 방법에 의해 형성될 수 있다.

[0252] 대조적으로 비대칭 IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 일반적으로 각 표적에 대해 1가이다. 예를 들어, 문헌[Klein, 2012]에 기재된 바와 같이, 1가 이중특이적 IgG의 개념은 (i) 수용체 동종이량체화를 유발하지 않고, (ii) 잠재적으로 각 항원에 대한 결합력 상실로 인해 비표적 조직에 대해 감소된 독성을 갖고, (iii) 두 항원이 모두 표적 세포에서 선택적으로 제한되거나 풍부하게 발현될 때 더 나은 선택성을 갖는다는 점에서 고유한 치료

적 틈새를 갖는 것으로 여겨진다. 따라서, 일부 경우에, 항체 분자는 비대칭 IgG 유사 이중특이적 항체 분자이다.

[0253] 비대칭 IgG 유사 이중특이적 항체 분자는 2개의 개별 중쇄의 이종이량체화 및 동족 경쇄 및 중쇄의 정확한 쌍 결합을 포함한다. 중쇄의 이종이량체화는 노브-인투-홀(knob-into-hole), CH3의 정전기 조정, CH3 가닥 교환 조작 도메인 및 류신 지퍼와 같은 여러 기술에 의해 처리될 수 있다. 정확한 경쇄 및 중쇄의 쌍 결합은 일반적인 경쇄, CH1과 CL 간의 도메인 교차, 링커를 통한 중쇄와 경쇄의 커플링, 두 개의 별도 단일클론으로부터 중쇄-경쇄 이량체의 시험관 내 조립, 전체 Fab 도메인의 계면 조작 또는 CH1/CL 계면의 이황화물 조작의 사용과 함께 이러한 중쇄 이종이량체화 기술 중 하나를 사용하여 보장될 수 있다.

[0254] 비대칭 IgG 유사 이중특이적 항체 분자의 예에는 DuetMab, kih IgG, kih IgG 공통 LC, CrossMab, kih IgG-scFab, mAb-Fv, 전하 쌍 및 SEED-바디가 포함된다.

[0255] 일부 경우에, 항체 분자는 이종이량체 항체 분자의 형성을 촉진하는 CH1, CH2 및 CH3 도메인 중 하나 이상에 하나 이상의 변형을 포함한다. 예를 들어, 위에 기재된 DuetMab 항체 분자는 이종이량체 항체 분자의 형성을 촉진하는 CH1, CH2 및 CH3 도메인 중 하나 이상에 하나 이상의 변형을 추가로 포함할 수 있다. 이는 중쇄 이종이량체화를 촉진하는 CH3 도메인의 단일 아미노산 치환에 기초한 노브 인투 홀(KiH) 전략을 포함할 수 있으며 이는 문헌[Ridgway, 1996]에 기재되어 있다. 작은 아미노산을 갖는 노브 변이체 중쇄 CH3은 더 큰 아미노산으로 대체되었고, 큰 아미노산을 갖는 홀 변이체는 더 작은 아미노산으로 대체되었다. 중쇄 사이의 회합을 안정화하기 위해 추가적인 변형이 도입될 수도 있다.

[0256] 이종이량체화를 향상시키기 위한 CH3 변형은 예를 들어 하나의 중쇄 상에 Y407V/T366S/L368A 및 다른 중쇄 상에 T366W를 포함하고; 하나의 중쇄 상에 S354C/T366W 및 다른 중쇄 상에 Y349C/Y407V/T366S/L368A를 포함하고, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0257] 이종이량체화를 향상시키기 위한 CH3 변형의 다른 예는 예를 들어 문헌[Brinkmann and Kontermann, 2017 MABS 9(2), 182-212](본원에 참조로 구체적으로 포함됨)의 표 1에 기재되어 있다.

[0258] 일부 경우에, 항체 분자는 이종이량체를 형성하는 제1 및 제2 중쇄를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 위치 354에 시스테인(C) 잔기와 위치 366에 트립토판(W) 잔기를 포함하고, 다른 중쇄는 위치 349에 시스테인(C) 잔기, 위치 407에 발린(V) 잔기, 위치 366에 세린(S) 및 위치 368에 알라닌(A)을 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다. 예를 들어, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 서열번호 42에 기재된 서열을 가질 수 있고 위치 354에 시스테인(C) 잔기와 위치 366에 트립토판(W) 잔기를 추가로 포함할 수 있고, 다른 중쇄는 서열번호 42에 기재된 서열을 갖고 위치 349에 시스테인(C) 잔기, 위치 407에 발린(V) 잔기, 위치 366에 세린(S) 및 위치 368에 알라닌(A)을 추가로 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0259] 일부 경우에, 항체 분자는

[0260] (i) 제1 변형된 CH3 영역을 포함하는 제1 중쇄(여기서, 제1 변형된 CH3 영역은 위치 354에 시스테인(C) 잔기와 위치 366에 트립토판(W) 잔기를 포함함); 및

[0261] (ii) 제2 변형된 CH3 영역을 포함하는 제2 중쇄(여기서, 제2 변형된 CH3 영역은 위치 349에 시스테인(C) 잔기, 위치 407에 발린(V) 잔기, 위치 366에 세린(S) 및 위치 368에 알라닌(A)을 포함하고,

[0262] 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0263] 비대칭 IgG 유사 이중특이적 항체 분자의 특정 예시 형식은 "DuetMab"으로 지칭된다. DuetMab 항체 분자는 2개의 별개의 중쇄의 이종이량체화를 위한 KIH 기술을 사용하고, CH1-CL 계면 중 하나의 천연 이황화 결합을 조작된 이황화 결합으로 대체하여 동족 중쇄 및 경쇄 쌍 결합의 효율성을 증가시킨다. DuetMab과 관련된 개시내용은 예를 들어, 미국 특허 제9,527,927호 및 Mazor, 2015에서 찾아볼 수 있고, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0264] 일부 경우에, 항체 분자는

[0265] (a) 변형된 CH 영역(여기서, 변형된 중쇄는 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함); 및

[0266] (b) 변형된 상응하는 CL 영역(여기서, 변형된 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함)을 포함하고,

[0267] 여기서,

[0268] (i) 제1 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제1 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하거나;

[0269] (ii) 제2 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제2 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함한다.

[0270] 일부 경우에, 천연 비-시스테인 아미노산이 시스테인 아미노산으로 치환되어 발생하는 변형된 CH 영역의 치환된 시스테인, 및 천연 비-시스테인 아미노산이 시스테인 아미노산으로 치환되어 발생하는 변형된 상응하는 CL 영역의 치환된 시스테인은 이황화 결합을 형성할 수 있다.

[0271] 일부 경우에, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인으로의 치환을 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0272] 일부 경우에, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환 및 위치 219에서 천연 시스테인 아미노산의 비-시스테인 아미노산, 예를 들어, 발린으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인으로의 치환 및 위치 214에서 천연 시스테인 아미노산의 비-시스테인 아미노산, 예를 들어, 발린으로의 치환을 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0273] 일부 경우에, 항체 분자는 제2 CH 영역 및 제2 상응하는 경쇄를 포함하며, 여기서 제2 CH 영역 및 제2 상응하는 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하지 않고, 천연 시스테인의 비-시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하지 않는다.

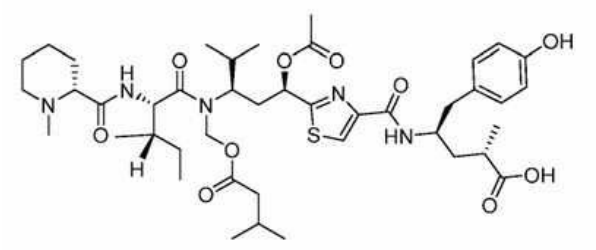
[0274] ***접합체***

[0275] 항체 분자는 약물에 접합될 수 있다. 이 경우, 항체 분자는 "접합체" 또는 "항체 약물 접합체"로 지칭될 수 있다. 이러한 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 질환의 치료 및/또는 진단에 적용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 약물은 "페이로드" 또는 "탄두"로 지칭될 수 있다.

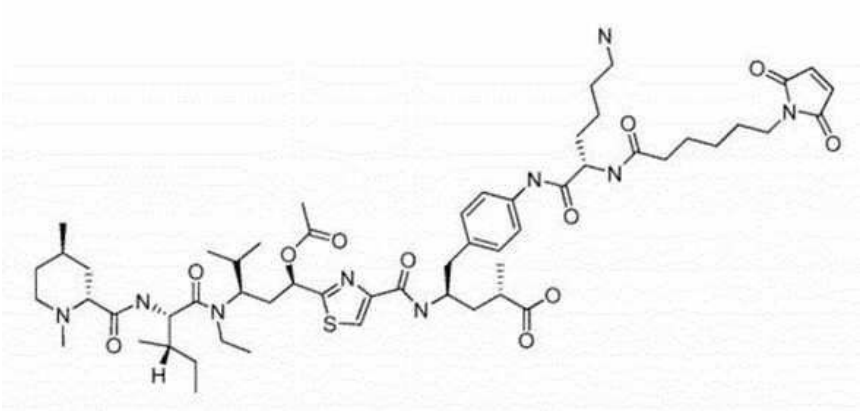
[0276] 일부 경우에, 약물은 세포독소, 방사성 동위원소, 면역조절제, 사이토카인, 림포카인, 케모카인, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, siRNA, RNAi, 마이크로RNA, 광활성 치료제, 항혈관신생제, 세포사멸 촉진제, 펩티드, 지질, 탄수화물, 킬레이트제, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0277] 세포독소는 표적이 되는 세포의 사멸을 포함할 수 있는 화합물이다. 전형적으로, 항체 약물 접합체의 맥락에서, 세포독소는 항체 분자에 의해 표적화되는 세포로 전달되고, 여기서 이는 세포 내로 방출되어 세포 사멸을 유도한다. 항체 약물 접합체에서 세포독소의 사용은 예를 들어 문헌[Chalouni and Doll 2018 J Exp Clin Cancer Res. 37(1):20]에 기재되어 있다. 일부 경우에, 세포독소는 튜불라이신, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 토포이소머라제 억제제 또는 피롤로벤조디아제핀(PBD)이다.

[0278] 특별한 경우에, 세포독소는 튜불라이신이거나 이를 포함한다. 튜불라이신은 이소류신과 세 가지 다른 복합 비천연 아미노산 Mep(R-N-메피페콜산), Tuv(튜부발린) 및 Tut(튜불리로신) 또는 Tup(튜부페닐알라닌)을 포함하는 세포증식억제 테트라펩티드의 한 부류이다. 튜불라이신은 매우 강력한 세포독성 분자이며 다약제 내성 세포주에 대해 강력하다(Domling, 2005). 이들 화합물은 낮은 피코몰 범위 내의 IC50 값으로 암 세포주의 패널에 대해 시험하여 높은 세포독성을 보이므로, 이들은 항암 치료제로서 관심의 대상이 된다. 예를 들어, 제WO 01/2012019123호 참조. 튜불라이신 접합체는 예를 들어, 미국 특허 제7,776,814호에 개시되어 있다. 일부 경우에, 튜불라이신은 다음의 화학 구조를 갖는 튜불라이신 A이다:

[0279] 

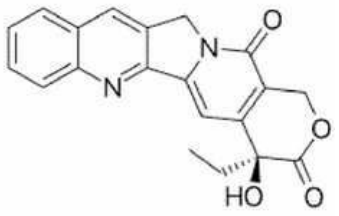
[0280] 일부 경우에, 튜불라이신은 "AZ1508"으로도 지칭되는 튜불라이신 1508이고, 제WO 2015157594호에 더욱 자세히 기재되어 있다. 튜불라이신 1508은 다음의 화학 구조를 갖는다:

[0281] 

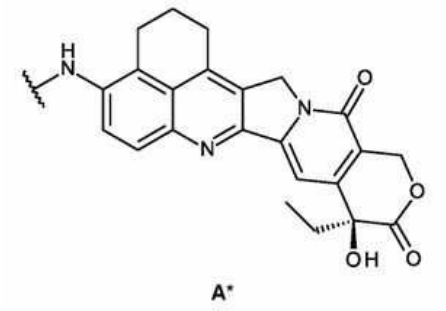
[0282] 일부 경우에, 세포독소는 토포이소머라제 억제제이거나 이를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 '토포이소머라제 억제제'는 DNA 슈퍼코일링을 조절하여 DNA 복제 및 전사에 중요한 역할을 하는 효소인 토포이소머라제 효소(토포이소머라제 I 및 II) 중 하나 이상의 활성을 억제하는 세포독성제를 지칭한다. 따라서, 세포독소로서 토포이소머라제 억제제를 포함하는 항체 약물 접합체는 DNA와 관련된 정상적인 과정을 방해하여 세포 사멸을 초래할 것으로 예상된다. 토포이소머라제 억제제를 함유하는 접합체는 다양한 종양 함유 세포주에 대해 효과적일 뿐만 아니라 임상 시험에서 항암 활성을 갖는 것으로 입증되었다. 예를 들어, 문헌[Ogitani, 2016a]; [Ogitani, 2016b]; [Cardillo, 2015]; 및 [Bardia, 2017] 참조.

[0283] 일부 경우에, 항체 분자는 토포이소머라제 I 억제제에 접합된다. 토포이소머라제 I 억제제의 대표적인 예는 캄프토테신 및 이의 유사체 토포테칸, 이리노테칸, 벨로테칸, 엑사테칸, 루로테칸 및 시노테칸을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 토포이소머라제 II 억제제의 대표적인 예는 암사크린, 다우노루비신, 독소루비신, 에피포도필로톡신, 엘립티신, 에피루비신, 에토포시드, 라족산 및 테니포시드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0284] 캄프토테신 화학 구조의 예는 다음과 같다:

[0285] .

[0286] 적합한 토포이소머라제 I 억제제의 일반적인 예는 다음 화합물로 표시된다:

[0287] 
A*

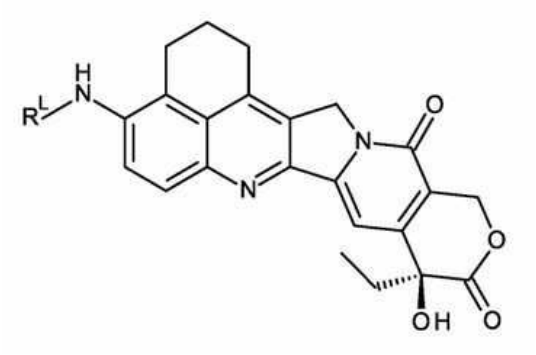
[0288] 상기 화합물은 A*로 표시된다.

[0289] 일부 경우에, 화합물(예를 들어 A*)은 본원에 기재된 항체 분자("리간드 단위" 또는 대안적으로 "세포 결합제"(CBA)로 지칭될 수 있음)에 연결하기 위한 링커와 함께 제공된다. 적합하게는, 링커는 절단 가능한 방식으로 아미노 잔기, 예를 들어 본원에 기재된 항체 분자의 아미노산에 부착(예를 들어 접합)된다.

[0290] 접합체에 사용되는 링커의 설계 및 선택은 당업계에 알려져 있으며 예를 들어 문헌[Beck, 2017]에 기재되어 있다. 본원에서 사용되는 링커는 문헌[Beck, 2017]에 기재된 링커 중 임의의 것일 수 있다.

[0291] 더욱 특별하게는, 적합한 토포이소머라제 I 억제제의 예는 화학식 "I"의 하기 화합물:

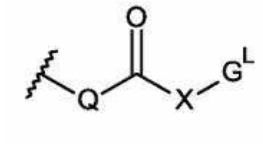
[0292] [화학식 I]

[0293] 

[0294] 및 이의 염 및 용매화물로 표시되고, 여기서 R^L은 본원에 기재된 항체 분자에 연결하기 위한 링커이고, 여기서 상기 링커는 선택적으로 다음으로부터 선택된다:

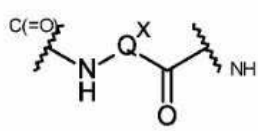
[0295] (ia):

[0296] [화학식 Ia]

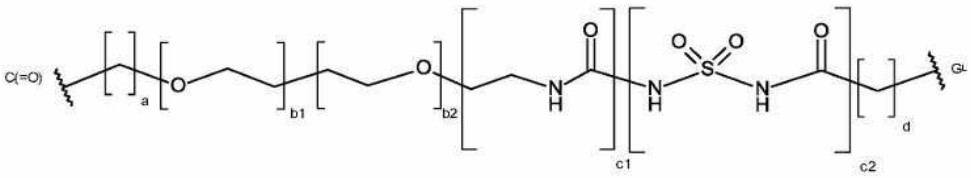
[0297] 

[0298] (상기 식에서,

[0299] Q는

[0300]  이고, Q^X는 Q가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 트리펩티드 잔기 또는 테트라펩티드 잔기가 되도록 하는 것이고;

[0301] X는

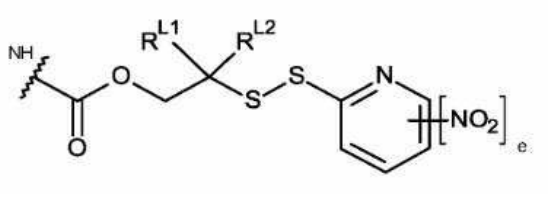
[0302] 

[0303] 상기 식에서, a = 0 내지 5이고, b1 = 0 내지 16이고, b2 = 0 내지 16이고, c1 = 0 또는 1이고, c2 = 0 또는 1이고, d = 0 내지 5이고, 적어도 b1 또는 b2 = 0(즉, b1과 b2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고, 적어도 c1 또는 c2 = 0(즉, c1과 c2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고;

[0304] G^L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위 또는 세포 결합제)에 연결하기 위한 링커임); 또는

[0305] (ib):

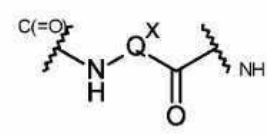
[0306] [화학식 Ib]



[0307]

[0308] (상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0309] e는 0 또는 1임).



[0310] 화학식 에서, 위첨자 표시 $^{C(=O)}$ 및 ^{NH}는 원자가 결합되는 기를 나타낸다. 예를 들어, NH 기는 (예시된 모이어티의 일부가 아닌) 카보닐에 결합되는 것으로 표시되고, 카보닐은 (예시된 모이어티의 일부가 아닌) NH기에 결합되는 것으로 표시된다.

[0311] 1종 초과의 상기 작용제(들)(예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제)가 항체 분자에 접합될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0312] 예를 들어, 본 개시내용의 접합체(예를 들어, 항체-약물 접합체)는 일반식 IV의 접합체:

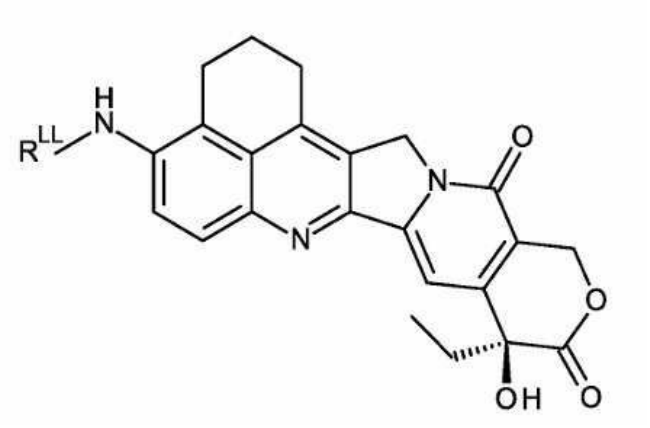
[0313] [화학식 IV]

[0314] $L - (D^L)_p$

[0315] 또는 이의 제약상 허용가능한 염 또는 용매화물일 수 있고, 여기서 L은 본원에 기재된 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위 또는 CBA)이고, D^L은 링커를 갖는 약물(예를 들어, 약물 링커 단위)이고, p는 1 내지 20의 정수이다.

[0316] 일부 경우에, D^L은 화학식 III의 링커를 갖는 토포이소머라제 I 억제제이다:

[0317] [화학식 III]

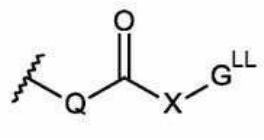


[0318] .

[0319] R^{LL}은 본원에 기재된 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 링커는 선택적으로 다음으로부터 선택된다:

[0320] (ia'):

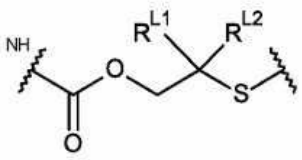
[0321] [화학식 Ia']

[0322] 

[0323] (Q 및 X는 상기에 정의된 바와 같고, G^{LL}은 본원에 기재된 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위 또는 CBA)에 연결된 링커임); 및

[0324] (ib'):

[0325] [화학식 Ib']

[0326] 

[0327] (R^{L1} 및 R^{L2}는 위에 정의된 바와 같음).

[0328] 약물 로딩은 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위)당 토포이소머라제 I 억제제(들)(예를 들어, 약물 단위)의 수인 p로 표시된다. 약물 로딩의 범위는 리간드 단위당 1 내지 20의 약물 단위(D)일 수 있다. 조성물의 경우, p는 조성물에서 접합체의 평균 약물 로딩을 나타내고, p의 범위는 1 내지 20이다. 약물이 토포이소머라제 억제제인 일부 경우에, p 범위는 2 내지 8, 선택적으로 4 내지 8, 예컨대 5 내지 7, 또는 5.5 내지 6.5에서 선택된다. 실시예에 기재된 바와 같이, 토포이소머라제 I 억제제 SG3932를 포함하는 ADC는 6 +/- 6%의 평균 DAR로 생산되었다.

[0329] 따라서, 본 개시내용은 적어도 하나의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 상기 예시된 A*와 같은 약물 단위)에 공유 연결된 본원에 기재된 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위 또는 CBA)를 포함하는 접합체를 포함한다. 상기 억제제는 선택적으로 R^{L} 및/또는 R^{LL}로서 상기 기재된 링커와 같은 링커(예를 들어, 링커 단위)에 의해 항체 분자에 연결된다. 즉, 본 개시내용은 선택적으로 링커(예를 들어, 약물-링커 단위)를 통해 부착된 하나 이상의 토포이소머라제 I 억제제를 갖는 본원에 기재된 항체 분자(예를 들어, 리간드 단위 또는 CBA)를 포함한다. 상기에서 보다 충분히 기재된 항체 분자(리간드 단위 또는 CBA를 나타냄)는 표적 모이어티에 결합하는 표적화제이다. 더욱 특별하게는, 이 항체 분자는 예를 들어 약물 단위가 전달되는 표적 세포 상의 EGFR 및 cMET에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 예를 들어 다양한 암 및 기타 장애(예를 들어, EGFR 및 cMET를 발현하는 세포, 예컨대 암성 세포의 존재와 관련된 암/장애)를 ADC로 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0330] Q^{X}

[0331] 일례에서, Q는 아미노산 잔기이다. 아미노산은 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산일 수 있다. 예를 들어, Q는 Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg 및 Trp로부터 선택될 수 있고, Cit는 시트룰린이다.

[0332] 일례에서, Q는 디펩티드 잔기를 포함한다. 디펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에, 디펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텝신 불안정성 링커인 경우, 다이펩타이드는 카텝신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 따라서 디펩티드는 카텝신에 대한 인식 부위이다.

[0333] 일례에서, Q는

[0334] ^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$,

[0335] ^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$,

[0336] ^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$,

[0337] ^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$,

[0338] ^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$,

[0339] ^{NH}-Phe-Cit-$^{C=O}$,

[0340] ^{NH}-Leu-Cit-$^{C=O}$,

[0341] ^{NH}-Ile-Cit-$^{C=O}$,

[0342] ^{NH}-Phe-Arg-$^{C=O}$,

[0343] ^{NH}-Trp-Cit-$^{C=O}$, 및

[0344] ^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$로부터 선택되며,

[0345] 여기서, Cit는 시트룰린이다.

[0346] 일례에서, Q는

[0347] ^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$,

[0348] ^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$,

[0349] ^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$,

[0350] ^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$, 및

[0351] ^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$로부터 선택된다.

[0352] 일례에서, Q는 ^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$, ^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$ 또는 ^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$로부터 선택된다.

[0353] 기타 적합한 디펩티드 조합물은

[0354] ^{NH}-Gly-Gly-$^{C=O}$,

[0355] ^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$

[0356] ^{NH}-Pro-Pro-$^{C=O}$, 및

[0357] ^{NH}-Val-Glu-$^{C=O}$를 포함한다.

[0358] 본원에 참조로 포함되는 문헌[Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869]에 기재된 것을 포함하여 다른 디펩티드 조합물이 사용될 수 있다.

[0359] 일부 경우에, Q는 트리펩티드 잔기이다. 트리펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에, 트리펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텝신 불안정성 링커인 경우, 트리펩티드는 카텝신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 따라서 트리펩티드는 카텝신에 대한 인식 부위이다. 특히 관심 대상인 트리펩티드 링커는 다음과 같다:

[0360] ^{NH}-Glu-Val-Ala-$^{C=O}$

[0361] ^{NH}-Glu-Val-Cit-$^{C=O}$

[0362] ^{NH}-αGlu-Val-Ala-$^{C=O}$

[0363] ^{NH}-αGlu-Val-Cit-$^{C=O}$

[0364] 일부 경우에, Q는 테트라펩티드 잔기이다. 테트라펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에, 테트라펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텝신 불안정성 링커인 경우, 테트라펩티드는 카텝신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 따라서 테트라펩티드는 카텝신에 대한 인식 부위이다. 특히 관심 대상인 테트라펩티드 링커는 다음과 같다:

[0365] ^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$; 및

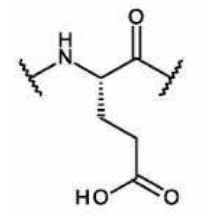
[0366] ^{NH}-Gly-Phe-Gly-Gly$^{C=O}$.

[0367] 일부 경우에, 테트라펩티드는 다음과 같다:

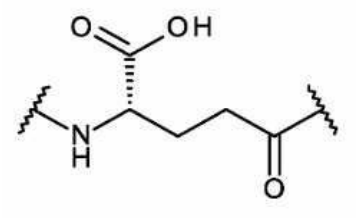
[0368] ^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$.

[0369] 펩티드 잔기의 상기 표현에서, ^{NH}-는 N-말단을 나타내고, -$^{C=O}$는 잔기의 C-말단을 나타낸다. C-말단은 A*의 NH에 결합한다.

[0370] Glu는 글루탐산의 잔기를 나타낸다. 즉:

[0371] 

[0372] αGlu는 α-사슬을 통해 결합될 때의 글루탐산의 잔기를 나타낸다. 즉:

[0373] 

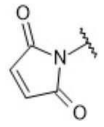
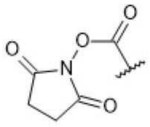
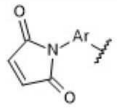
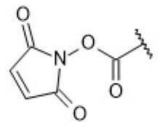
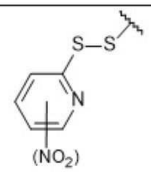
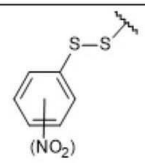
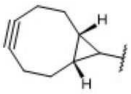
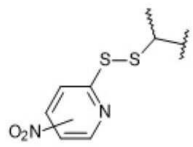
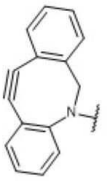
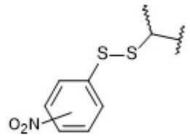
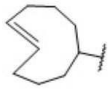
[0374] 일례에서, 아미노산 측쇄는 적절한 경우 화학적으로 보호된다. 측쇄 보호기는 상기 논의된 바와 같은 기일 수 있다. 보호된 아미노산 서열은 효소에 의해 절단될 수 있다. 예를 들어, Boc 측쇄-보호된 Lys 잔기를 포함하는 디펩티드 서열은 카텝신에 의해 절단될 수 있다.

[0375] 아미노산의 측쇄에 대한 보호기는 당업계에 잘 알려져 있고 Novabiochem 카탈로그에 기재되어 있으며, 전술된 바와 같다.

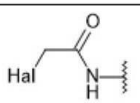
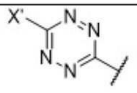
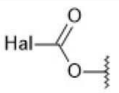
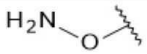
[0376] $G^{\downarrow}$

[0377] G^{L}은 하기로부터 선택될 수 있다:

[0378]

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 (NO_2 기는 선택적임)	(G^{L9})	
(G^{L3-2})	 (NO_2 기는 선택적임)	(G^{L10})	
(G^{L3-3})	 (NO_2 기는 선택적임)	(G^{L11})	
(G^{L3-4})	 (NO_2 기는 선택적임)	(G^{L12})	

[0379]

(G^{L4})	 (Hal = I, Br, Cl)	(G^{L13})	
(G^{L5})		(G^{L14})	

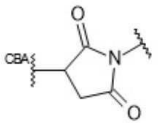
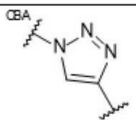
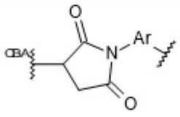
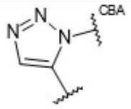
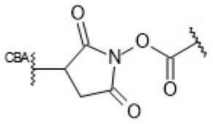
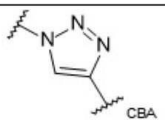
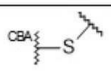
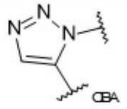
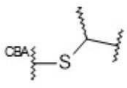
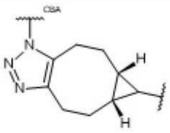
[0380] (상기 표에서, Ar은 C_{5-6} 아릴렌기, 예를 들어, 페닐렌을 나타내고, X'은 C_{1-4} 알킬을 나타냄).

[0381] 일부 경우에, G^{L}은 G^{L1-1} 및 G^{L1-2}로부터 선택된다. 이러한 예 중 일부에서, G^{L}은 G^{L1-1}이다.

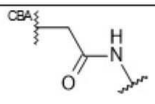
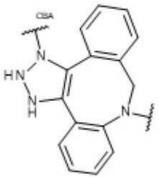
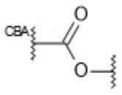
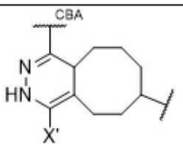
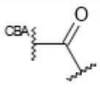
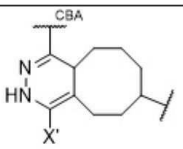
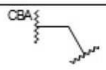
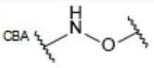
[0382] G^{LL}

[0383] G^{LL}은 하기로부터 선택될 수 있다:

[0384]

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	

[0385]

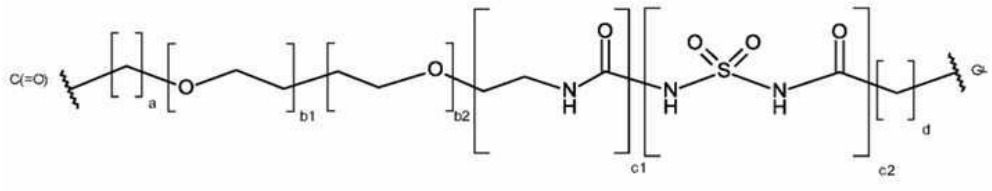
(G^{LL-4})		(G^{LL11})	
(G^{LL5})		(G^{LL12})	
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

[0386] (상기 표에서, Ar은 C_{5-6} 아릴렌기, 예를 들어, 페닐렌을 나타내고, X'은 C_{1-4} 알킬을 나타냄. CBA는 세포 결합제 또는 리간드 단위를 나타냄).

[0387] 일부 경우에, G^{LL}은 G^{LL1-1} 및 G^{LL1-2}로부터 선택된다. 이러한 예 중 일부에서, G^{LL}은 G^{LL1-1}이다.

[0388] *X*

[0389] X는 선택적으로 다음과 같다:



[0390]

[0391] (a = 0 내지 5이고, b1 = 0 내지 16이고, b2 = 0 내지 16이고, c = 0 또는 1이고, d = 0 내지 5이고, 적어도 b1 또는 b2 = 0이고, 적어도 c1 또는 c2 = 0임).

[0392] a는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, a는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, a는 0 또는 1이다. 추가 예에서, a는 0이다.

[0393] b1은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16일 수 있다. 일부 경우에, b1은 0 내지 12이다. 이러한 예 중 일부에서, b1은 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5 또는 8일 수 있다.

[0394] b2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16일 수 있다. 일부 경우에, b2는 0 내지 12이다. 이러한 예 중 일부에서, b2는 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5 또는 8일 수 있다. 일부 경우에, b1과 b2 중 하나만 0이 아닐 수 있다.

[0395] c1은 0 또는 1일 수 있다. c2는 0 또는 1일 수 있다. 일부 경우에, c1과 c2 중 하나만 0이 아닐 수 있다.

[0396] d는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, d는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, d는 1 또는 2이다. 추가 예에서, d는 2이다. 추가 예에서, d는 5이다.

[0397] X의 일부 경우에, a는 0이고, b1은 0이고, c1은 1이고, c2는 0이고, d는 2이고, b2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X의 일부 경우에, a는 1이고, b2는 0이고, c1은 0이고, c2는 0이고, d는 0이고, b1은 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b1은 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X의 일부 경우에, a는 0이고, b1은 0이고, c1은 0이고, c2는 0이고, d는 1이고, b2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X의 일부 경우에, b1은 0이고, b2는 0이고, c1은 0이고, c2는 0이고, a와 d 중 하나는 0이다. a와 d 중 다른 하나는 1 내지 5이다. 이러한 예 중 일부에서, a와 d 중 다른 하나는 1이다. 이러한 예 중 다른 예에서, a와 d 중 다른 하나는 5이다. X의 일부 경우에, a는 1이고, b2는 0이고, c1은 0이고, c2는 1이고, d는 2이고, b1은 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다.

[0398] 일부 경우에, R^{L}은 화학식 Ib의 R^{L}이다. 일부 경우에, R^{LL}은 화학식 Ib'의 R^{LL}이다.

[0399] R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성할 수 있다.

[0400] 일부 경우에, R^{L1} 및 R^{L2}는 둘 다 H이다. 일부 경우에, R^{L1}은 H이고 R^{L2}는 메틸이다. 일부 경우에, R^{L1} 및 R^{L2} 둘 다는 메틸이다.

[0401] 일부 경우에, R^{L1} 및 R^{L2}는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로파일렌기를 형성한다. 일부 경우에, R^{L1} 및 R^{L2}는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로부틸렌기를 형성한다.

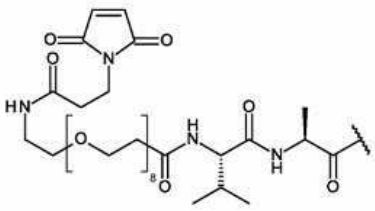
[0402] Ib 기의 일부 경우에, e는 0이다. 다른 예에서, e는 1이고, 니트로기는 고리의 임의의 이용 가능한 위치에 있을 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, 이는 오르토 위치에 있다. 이러한 예 중 다른 예에서, 이는 파라 위치에 있다.

[0403] 본원에 기재된 화합물이 단일 거울상이성체 또는 거울상이성체 풍부 형태로 제공되는 일부 경우에, 거울상이성체 풍부 형태는 60:40, 70:30; 80:20 또는 90:10 초과의 거울상이성체비를 갖는다. 추가 예에서, 거울상이성체비는 95:5, 97:3 또는 99:1보다 크다.

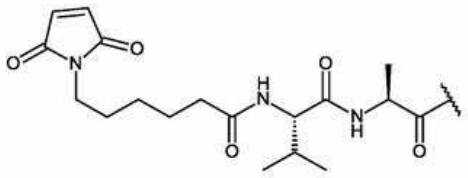
[0404] 일부 경우에, R^L은 하기로부터 선택된다:

[0405]

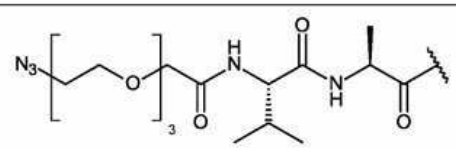
(i)



(ii)

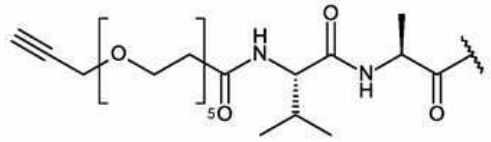


(iii)

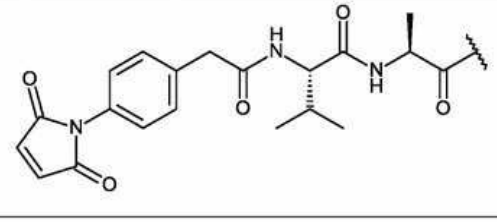


[0406]

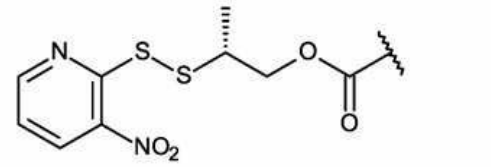
(iv)



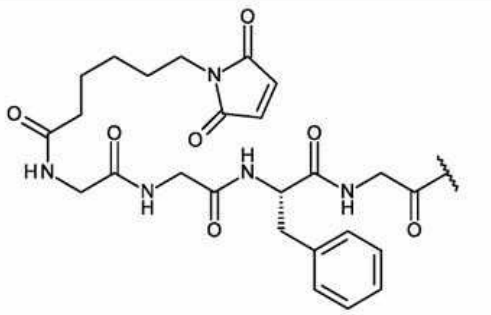
(v)



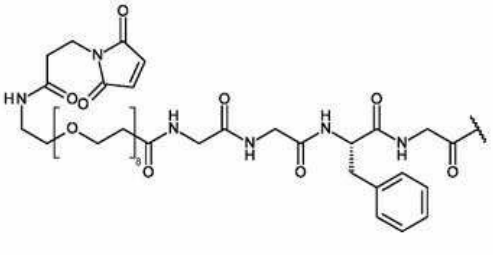
(vi)

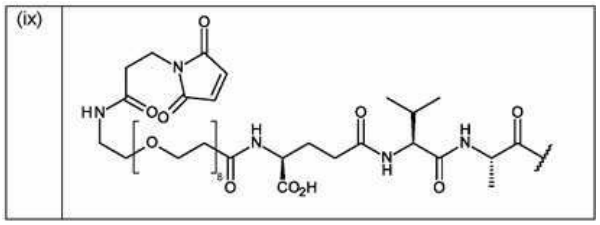


(vii)



(viii)

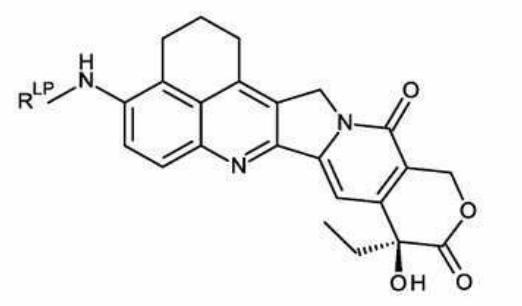


[0407] 

[0408] 일부 경우에, R^{LL}은 상기 R^{L}기로부터 유래된 기이다.

[0409] 일부 경우에, 화학식 I의 화합물은 화학식 I^{P}의 화합물:

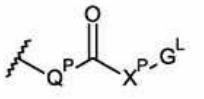
[0410] [화학식 I^{P}]

[0411] 

[0412] 및 이의 염 및 용매화물이고, 여기서 R^{LP}는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결하기 위한 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

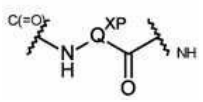
[0413] (ia):

[0414] [화학식 Ia^{P}]

[0415] 

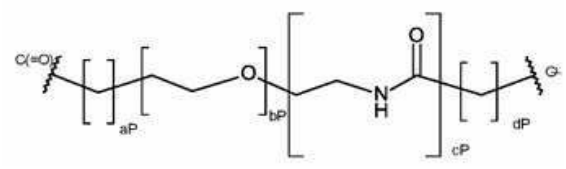
[0416] (상기 식에서,

[0417] Q^{P}는

[0418] 

[0419] 이고, Q^{XP}는 Q^{P}가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 또는 트리펩티드 잔기가 되도록 하는 것이고;

[0420] X^{P}는

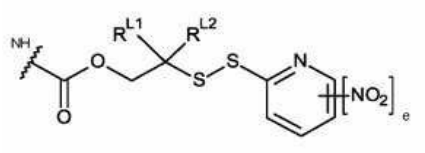
[0421] 

[0422] 이고, aP = 0 내지 5이고, bP = 0 내지 16이고, cP = 0 또는 1이고, dP = 0 내지 5이고;

[0423] G^{L}은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커임);

[0424] (ib):

[0425] [화학식 Ib]

[0426] 

[0427] (상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0428] e는 0 또는 1임).

[0429] aP는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, aP는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, aP는 0 또는 1이다. 추가 예에서, aP는 0이다.

[0430] bP는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16일 수 있다. 일부 경우에, b는 0 내지 12이다. 이러한 예 중 일부에서, bP는 0 내지 8이고, 0, 2, 4, 또는 8일 수 있다.

[0431] cP는 0 또는 1일 수 있다.

[0432] dP는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, dP는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, dP는 1 또는 2이다. 추가 예에서, dP는 2이다.

[0433] X^P의 일부 경우에, aP는 0이고, cP는 1이고, dP는 2이고, bP는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, bP는 0, 4, 또는 8이다.

[0434] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 Q^X에 대한 예는 (예를 들어, 적절한 경우) Q^{XP}에 적용될 수 있다.

[0435] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 G^L, R^{L1}, R^{L2}, 및 e에 대한 예는 화학식 I^P의 화합물에 적용될 수 있다.

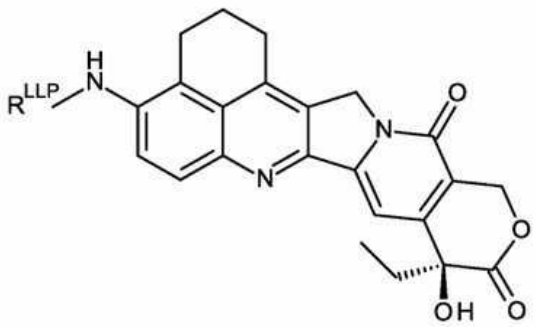
[0436] 일부 경우에, 화학식 IV의 접합체는 화학식 IV^P의 접합체:

[0437] [화학식 IV^P]

[0438] $L-(D^{LP})_p$

[0439] 또는 이의 제약상 허용가능한 염 또는 용매화물이고, 여기서 L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)이고, D^{LP}는 화학식 III^P의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 약물 링커 단위):

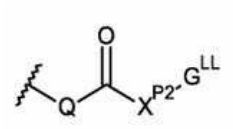
[0440] [화학식 III^P]

[0441]  이고;

[0442] R^{LLP}는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

[0443] (ia'):

[0444] [화학식 Ia^{P}']

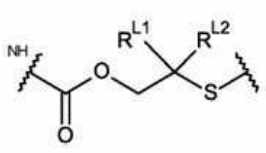


[0445]

[0446] (Q^{P} 및 X^{P}는 상기에 정의된 바와 같고, G^{LL}은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커임); 및

[0447] (ib'):

[0448] [화학식 Ib']



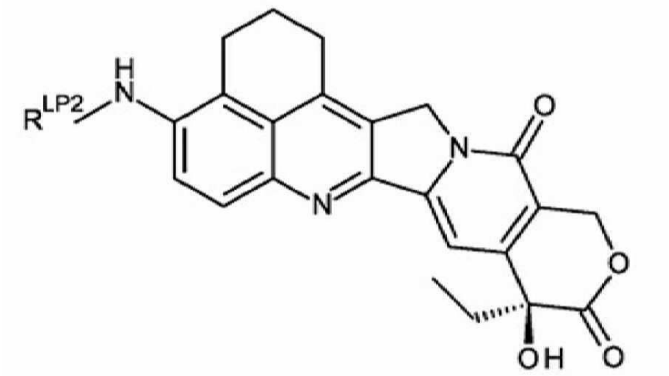
[0449]

[0450] (R^{L1} 및 R^{L2}는 위에 정의된 바와 같고;

[0451] p는 1 내지 20의 정수임).

[0452] 일부 경우에, 화학식 I의 화합물은 화학식 I^{P2}의 화합물:

[0453] [화학식 I^{P2}]

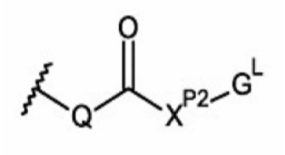


[0454]

[0455] 및 이의 염 및 용매화물이고, 여기서 R^{LP2}는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결하기 위한 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

[0456] (ia):

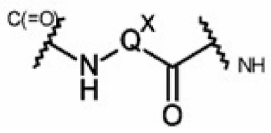
[0457] [화학식 Ia^{P2}]



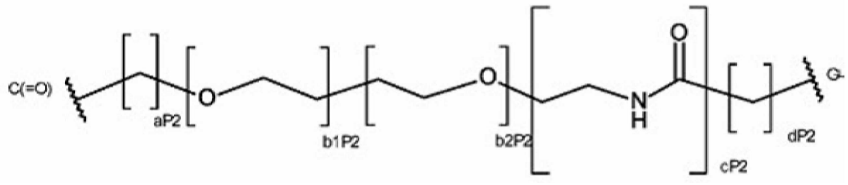
[0458]

[0459] (상기 식에서,

[0460] Q는

[0461]  이고, Q^X는 Q가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 트리펩티드 잔기 또는 테트라펩티드 잔기가 되도록 하는 것이고;

[0462] X^{P2}는

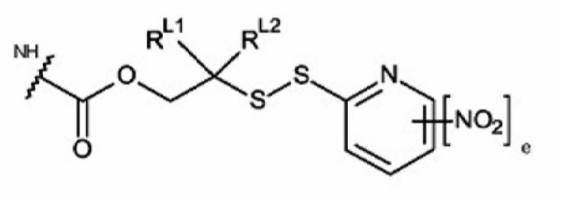
[0463] 

[0464] 이때 aP2 = 0 내지 5이고, b1P2 = 0 내지 16이고, b2P2 = 0 내지 16이고, cP2 = 0 또는 1이고, dP2 = 0 내지 5이고, 적어도 b1P2 또는 b2P2 = 0(즉, b1과 b2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고;

[0465] G^L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커임);

[0466] (ib):

[0467] [화학식 Ib]

[0468] 

[0469] (상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0470] e는 0 또는 1임).

[0471] aP2는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, aP2는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, aP2는 0 또는 1이다. 추가 예에서, aP2는 0이다.

[0472] b1P2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16일 수 있다. 일부 경우에, b1P2는 0 내지 12이다. 이러한 구현예 중 일부 경우에, b1P2는 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8일 수 있다.

[0473] b2P2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16일 수 있다. 일부 경우에, b2P2는 0 내지 12이다. 이러한 구현예 중 일부 경우에, b2P2는 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8일 수 있다.

[0474] 일부 경우에, b1P2과 b2P2 중 하나만 0이 아닐 수 있다.

[0475] cP2는 0 또는 1일 수 있다.

[0476] dP2는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 경우에, dP2는 0 내지 3이다. 이러한 예 중 일부에서, dP2는 1 또는 2이다. 추가 예에서, dP2는 2이다. 추가 예에서, dP2는 5이다.

[0477] X^{P2}의 일부 경우에, aP2는 0이고, b1P2는 0이고, cP2는 1이고, dP2는 2이고, b2P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b2P2은 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 경우에, aP2는 1이고, b2P2는 0이고, cP2는 0이고, dP2는 0이고, b1P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b1P2은 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 경우에, aP2는 0이고, b1P2는 0이고, cP2는 0이고, dP2는 1이고, b2P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 예 중 일부에서, b2P2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 경우에, b1P2는 0이고, b2P2는 0이고, cP2는 0이고, aP2와 dP2 중 하나는 0이다. aP2와 d 중 다른 하나는 1 내지 5이다. 이러한 예 중 일부에서, aP2와 d

중 다른 하나는 1이다. 이러한 예 중 다른 예에서, aP2와 dP2 중 다른 하나는 5이다.

[0478] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 Q^X에 대한 예는 (예를 들어, 적절한 경우) 화학식 Ia^{P2}의 Q^X에 적용될 수 있다.

[0479] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 G^L, R^{L1}, R^{L2}, 및 e에 대한 예는 화학식 I^{P2}의 화합물에 적용될 수 있다.

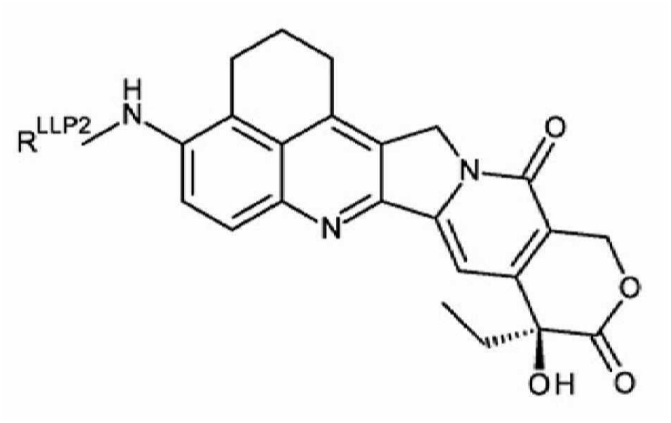
[0480] 일부 경우에, 화학식 IV의 접합체는 화학식 IV^{P2}의 접합체:

[0481] [화학식 IV^{P2}]

[0482] $L-(D^{LP2})_p$

[0483] 또는 이의 제약상 허용가능한 염 또는 용매화물이고, 여기서 L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)이고, D^{LP2}는 화학식 III^{P2}의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 약물 링커 단위):

[0484] [화학식 III^{P2}]

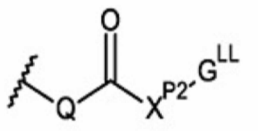


[0485] 이고;

[0486] R^{LLP2}는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

[0487] (ia'):

[0488] [화학식 Ia^{P2}']

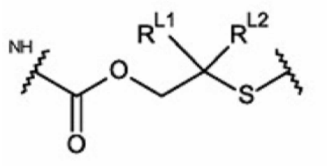


[0489]

[0490] (Q 및 X^{P2}는 상기에 정의된 바와 같고, G^{LL}은 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결된 링커임); 및

[0491] (ib'):

[0492] [화학식 Ib']

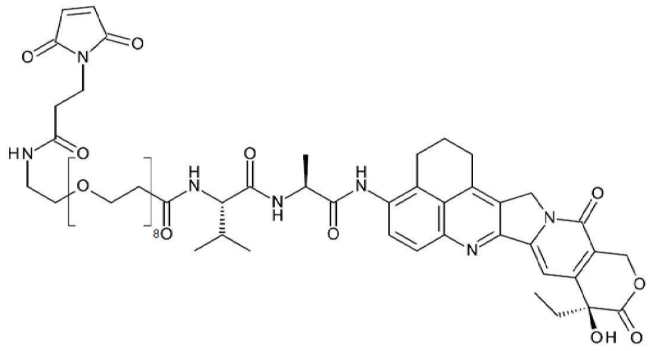


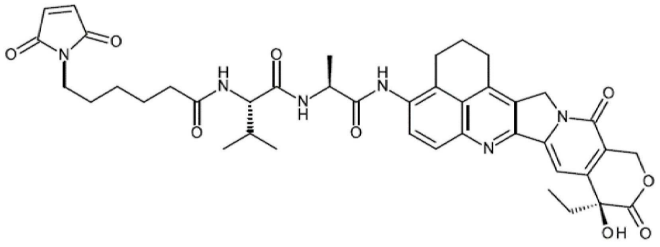
[0493]

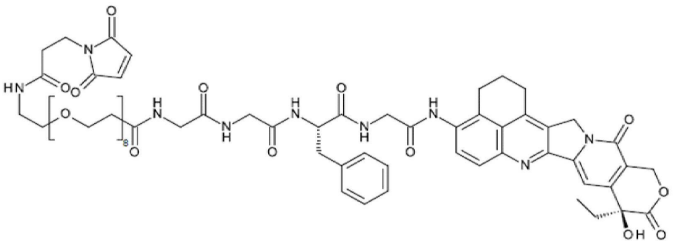
[0494] (R^{L1} 및 R^{L2}는 위에 정의된 바와 같고;

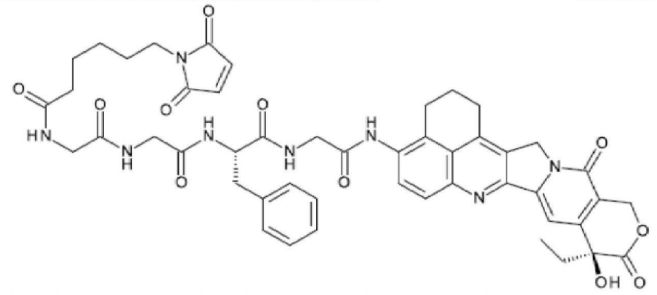
[0495] p는 1 내지 20의 정수임).

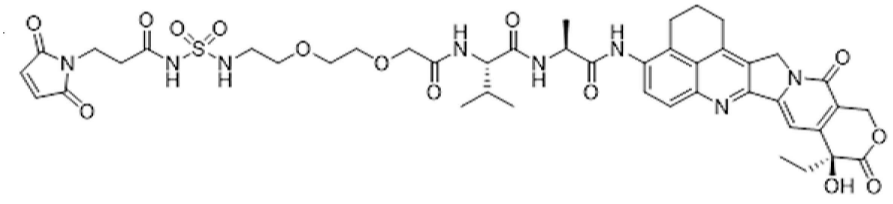
[0496] 특히 적합한 토포이소머라제 I 억제제는 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:

[0497]  (SG3932);

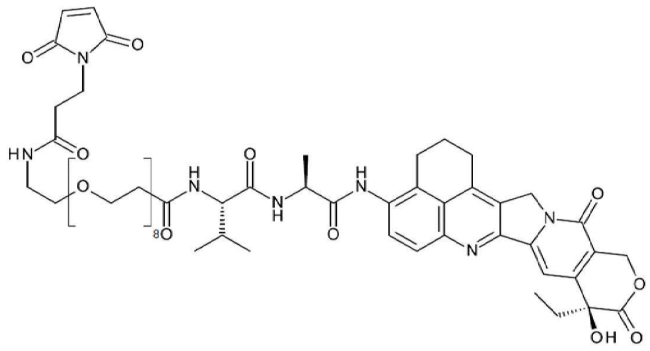
[0498]  (SG4010);

[0499]  (SG4057);

[0500]  (SG4052); 및/또는

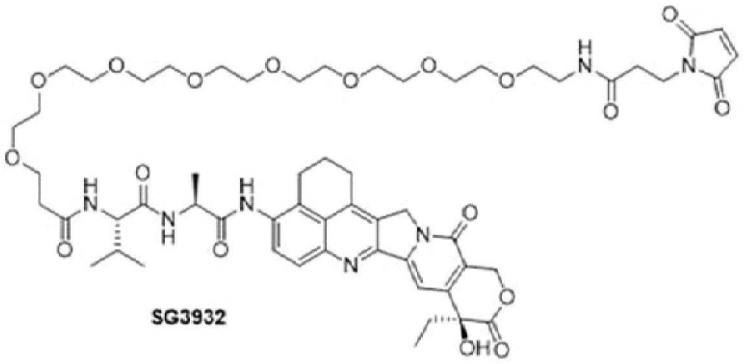
[0501] .

[0502] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 하기 화학식을 갖는 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, SG3932)에 접합된다:



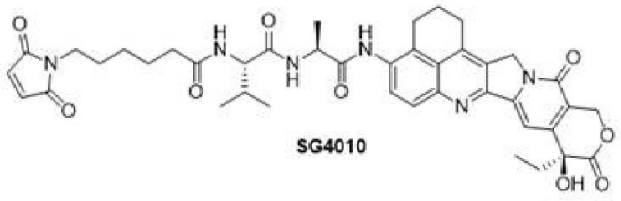
[0503] (SG3932).

[0504] 의심의 여지를 없애기 위해 숫자 '8'은 괄호 안의 구조가 8번 반복됨을 나타낸다. 따라서, SG3932의 또 다른 표현은 다음과 같다:



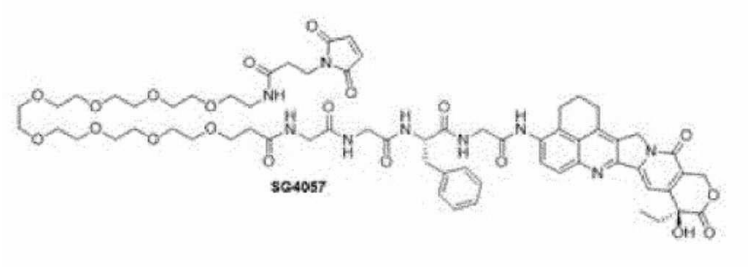
[0505] .

[0506] SG4010의 또 다른 표현은 다음과 같다:



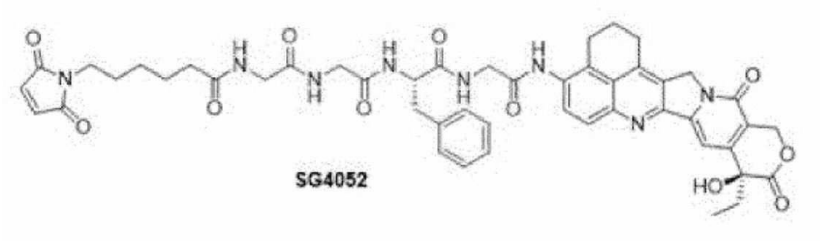
[0507] .

[0508] SG4057의 또 다른 표현은 다음과 같다:



[0509] .

[0510] SG4052의 또 다른 표현은 다음과 같다:

[0511] 

.

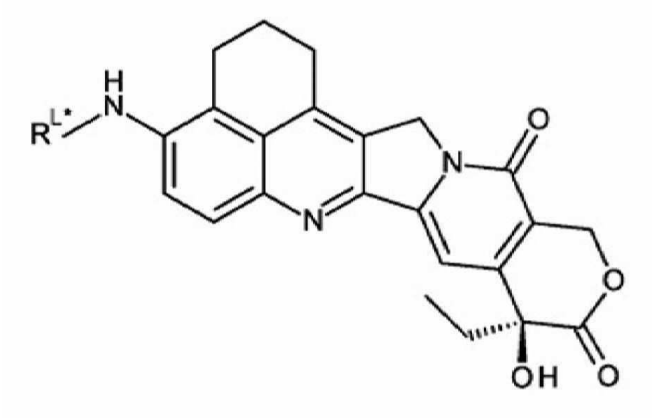
[0512] 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 상기 토포이소머라제 I 억제제(들)에 접합될 수 있다.

[0513] *토포이소머라제 I 억제제의 합성*

[0514] 완성을 위하여, 예시적인 토포이소머라제 I 억제제(들)의 제조를 위한 특정 일반 합성 경로를 이제 설명한다.

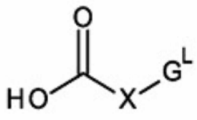
[0515] R^L이 화학식 Ia의 R^L인 화학식 I의 화합물은 화학식 2의 화합물:

[0516] [화학식 2]

[0517] 

[0518] (상기 식에서, R^{L*}은 -QH임)로부터, 화학식 3의 화합물:

[0519] [화학식 3]

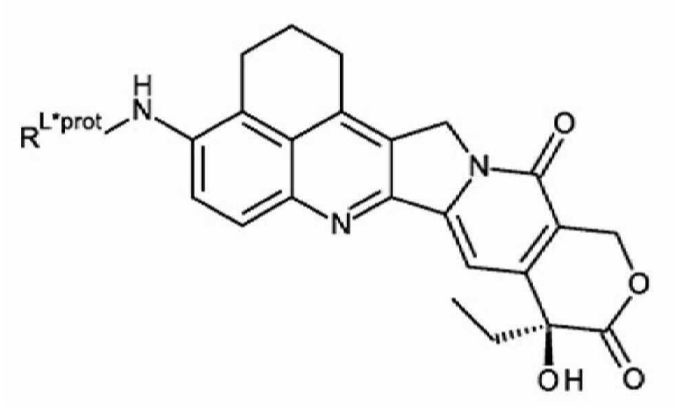
[0520] 

[0521] 또는 이의 활성화 버전을 연결함으로써 합성될 수 있다.

[0522] 이러한 반응은 아미드 커플링 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0523] 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물을 탈보호함으로써 합성될 수 있다:

[0524] [화학식 4]

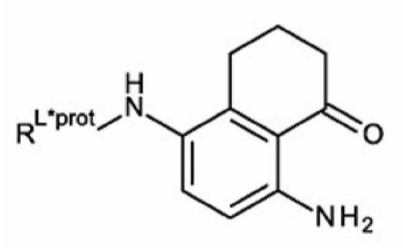


[0525]

[0526] (상기 식에서, R^{L*prot}는 -Q-$Prot^{N}$이고, $Prot^{N}$은 아민 보호기임).

[0527] 화학식 4의 화합물은 Friedlander 반응을 이용하여 화학식 5의 화합물:

[0528] [화학식 5]

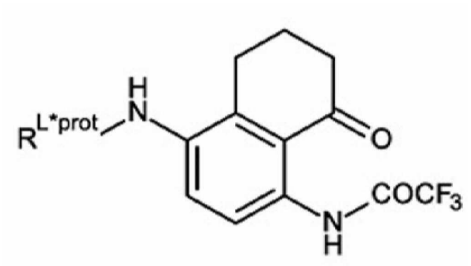


[0529]

[0530] 을 화합물 A3과 커플링함으로써 합성될 수 있다.

[0531] 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물:

[0532] [화학식 6]



[0533]

[0534] 로부터 트리플루오로아세트아미드 보호기를 제거하여 합성될 수 있다.

[0535] 화학식 6의 화합물은 R^{L*prot}-OH를 화합물 I7에 커플링시킴으로써 합성될 수 있다.

[0536] R^{L}이 화학식 Ia 또는 Ib의 R^{L}인 화학식 I의 화합물은 화합물 R^{L}-OH 또는 이의 활성화된 형태의 커플링에 의해 화합물 I11로부터 합성될 수 있다.

[0537] 아민 보호기:

[0538] 아민 보호기는 당업자에게 잘 알려져 있다. 특히 문헌[Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), pages 696-871]의 적합한 보호기에 대한 개시내용을 참조한다.

[0539] 약물 로딩(p)은 항체 분자당 약물(예를 들어, 튜불라이신 또는 토포이소머라제 억제제)의 평균 개수이다. 본 개시내용의 조성물에서, 약물 로딩은 항체 분자당 1 내지 20개의 약물(D) 범위이다. 예를 들어, 약물 로딩은 항체

분자당 1 내지 10개의 약물(D) 범위일 수 있으며, 즉 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 약물이 항체 분자에 공유적으로 부착된다. 접합체의 조성물은 1 내지 10개의 다양한 약물과 접합된 항체 분자 모음을 포함한다. 본 개시내용의 화합물이 리신에 결합되는 경우, 약물 로딩은 항체 분자당 1 내지 80개의 약물(D) 범위일 수 있지만, 상한은 40, 20, 10 또는 8이 바람직할 수 있다. 접합체의 조성물은 1 내지 80, 1 내지 40, 1 내지 20, 1 내지 10, 또는 1 내지 8개의 다양한 약물과 접합된 항체 분자 모음을 포함한다.

[0540] 접합 반응으로부터의 접합체 제제에서 항체당 약물의 평균 개수는 UV, 역상 HPLC, HIC, 질량 분광분석법, ELISA 분석 및 전기영동과 같은 통상의 수단에 의해 특성화될 수 있다. 또한 p의 측면에서 접합체의 정량적 분포가 결정될 수 있다. ELISA에 의해 접합체의 특정 제제에서 p의 평균값을 결정할 수 있다(Hamblett, 2004; Sanderson, 2005). 그러나, p(약물) 값의 분포는 항체-항원 결합 및 ELISA의 검출 한계에 의해 식별 가능하지 않다. 또한, 접합체의 검출을 위한 ELISA 분석은 약물 모이어티가 중쇄 또는 경쇄 단편 또는 특정 아미노산 잔기와 같은 항체 분자에 부착되는 부위를 판단하지 못한다. 일부 경우에, p가 다른 약물 로딩을 갖는 접합체로부터의 특정한 값인 경우, 균질한 접합체의 분리, 정제 및 특성화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다. 이러한 기술은 또한 다른 유형의 접합체에도 적용될 수 있다.

[0541] 일부 접합체의 경우에, p는 항체 분자 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자는 단 하나 또는 수 개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 이를 통해 링커가 부착될 수 있는 단 하나 또는 수 개의 충분히 반응성인 티올기를 가질 수 있다.

[0542] 일반적으로, 이론적 최대치보다 적은 수의 약물이 접합 반응 중에 항체 분자에 접합된다. 항체 분자는 예를 들어, 링커(L)와 반응하지 않는 다수의 리신 잔기를 함유할 수 있다. 가장 반응성이 큰 리신기만 아민-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 또한, 가장 반응성이 큰 시스테인 티올기만이 티올-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 일반적으로, 항체 분자는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 유리 및 반응성 시스테인 티올기를 함유하더라도 많이 함유하지는 않는다. 접합체의 항체 분자 내 대부분의 시스테인 티올 잔기는 이황화 브릿지로서 존재하며, 부분적 또는 완전한 환원 조건 하에서 디티오트레이톨(DTT) 또는 TCEP와 같은 환원제에 의해 환원되어야 한다. 접합체의 로딩(약물/항체 비율)은 하기를 포함하는 여러 다른 방식으로 제어될 수 있다: (i) 항체에 대한 약물 링커의 몰 과량 제한, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도 제한, 및 (iii) 시스테인 티올 변형에 대한 부분적 또는 제한적 환원 조건.

[0543] 특정 항체 분자는 환원성 쇄간 이황화, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체 분자는 DTT(디티오트레이톨)와 같은 환원제를 이용한 처리에 의해 링커 시약과의 접합에 대해 반응성이 될 수 있다. 각 시스테인 브릿지는 따라서 이론적으로 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 이 과정은 "고전적 접합"이라고도 하며 항체 분자의 특정 부위로 조작된 시스테인에서 접합이 일어나는 방법과 구별된다. 리신을 2-이미노티올란(트라우트 시약(Traut's reagent))과 반응시킴으로써 추가의 친핵기를 항체에 도입하여, 아민을 티올로 전환할 수 있다.

[0544] 고전적 접합에 의해 항체의 부분적인 환원에 이어 원하는 링커-약물과의 반응에 의해 본래의 시스테인 잔기에 무작위로 접합된 약물이 있는 ADC를 제조한다. 예를 들어, pH 8.0의 DTT 약 3몰 당량을 첨가하고 약 37℃에서 약 2시간 동안 배양하여 5 mg/mL 농도의 항체를 부분적으로 환원시킬 수 있다. 그런 다음, 이러한 환원 반응물을 얼음에서 냉각시킬 수 있고, 과량의 DTT를 예를 들어 정용여과를 통해 제거할 수 있다. 그런 다음, 링커-약물을 약 1:10의 링커-약물/티올 몰 비율로 첨가할 수 있다. 이러한 접합 반응을 약 10% v/v의 DMSO의 존재 하에 수행할 수 있다. 접합 후, 과량의 유리 시스테인(링커-약물에 대해 약 2배의 몰 비율)을 첨가하여 반응하지 않은 링커-약물을 퀜치시켜 시스테인-링커-약물 부가물을 생성할 수 있다. 그런 다음, 반응 혼합물을 (예컨대, 소수성 상호 작용 크로마토그래피로) 정제하고, PBS로 완충액 교환할 수 있다. 약물 부하 분포는 다른 곳에 기재된 바와 같이 소수성 상호 작용 크로마토그래피와 환원된 역상 크로마토그래피와 같은 표준적인 방법을 이용하여 결정할 수 있다.

[0545] *N*-알킬 말레이미드를 포함하는 항체 분자 쇄간 이황화 브릿지의 환원에 의해 생성된 용매에 접근 가능한 티올에서 직접 접합을 사용하여 접합체를 제조하는 방법이 공지되어 있다. 다른 방법은 *N*-하이드록시숙신이미드 에스테르를 사용하여 리신의 1차 아민에 약물을 접합시킨다. 이러한 방법은 예를 들어, 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌[Gebleux and Casi, Pharmacol Ther (2016) 167: 48-59]에 검토되어 있다.

[0546] 위에 기재된 고전적 접합 방법과 개별적으로 또는 추가적으로, 약물 부하 및 접합 부위를 조절하는 방법인 부위 특이적인 접합을 사용하는 것도 가능하다. 이는 예를 들어 특정 잔기의 시스테인 조작, 생물학적 직교 반응성을 갖춘 비천연 아미노산으로의 잔기 대체 또는 효소 결찰 접근법을 통해 달성될 수 있다. 부위 특이적 접합의 한 방법은 문헌[Dimasi, 2017](전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있으며, 특정 위치에서 항체 분자에 시스

테인을 삽입하는 것을 포함한다.

[0547] 시스테인 아미노산은 항체 분자 내의 반응성 부위에서 조작될 수 있고, 이것은 사슬간 또는 분자간 이황화 결합을 형성하지 않는다(Junutula, 2008; Dornan, 2009; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). 조작된 시스테인 티올은 말레이미드 또는 알파-할로 아미드와 같은 티올-반응성 친전자성기를 갖는 링커 또는 본원에 기재된 약물-링커와 반응하여 시스테인 조작된 항체 분자 및 약물과 접합체를 형성할 수 있다. 따라서, 약물의 위치가 설계, 제어 및 공지될 수 있다. 조작된 시스테인 티올기는 일반적으로 티올-반응성 링커 시약 또는 약물-링커 시약과 높은 수율로 반응하기 때문에 약물 로딩이 제어될 수 있다. IgG 항체의 조작으로 중쇄 또는 경쇄 상의 단일 부위에서의 치환에 의해 시스테인 아미노산을 도입하는 것은 대칭 항체 상에 2개의 새로운 시스테인을 제공한다. 필요한 경우, 접합 생성물의 거의 균질성을 유지하면서 2에 가까운 약물 로딩을 달성할 수 있다.

[0548] 일부 경우에, 본 개시내용의 접합체의 항체 분자는 CH 영역을 포함하고 약물은 CH 영역의 위치 239와 240 사이에 삽입된 시스테인 아미노산에서 화학적으로 접합되며, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다. 따라서 항체 분자와 약물 사이의 연결은 이러한 삽입된 시스테인 아미노산과 링커의 말단 말레이미드기를 통해 이루어질 수 있다.

[0549] CH 영역의 위치 239와 240 사이에 삽입된 시스테인 아미노산을 포함하는 CH 영역의 예는 서열번호 43 및 서열번호 45이다. CH 영역의 위치 239와 240 사이에 삽입된 시스테인 아미노산을 포함하는 CH 영역을 포함하는 중쇄의 예는 서열번호 50, 53 및 56이다.

[0550] 다른 경우에, 접합체의 항체 분자는 CH 영역에 삽입된 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않는다. 특별한 경우에, 접합체의 항체 분자는 CH 영역(예를 들어 위치 239와 240 사이, 여기서 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따름)에 삽입된 시스테인 아미노산을 포함하지 않는다. 실시예(예를 들어, 실시예 12)에서 입증된 바와 같이, 약물-링커를 천연 시스테인에 접합시키기 위해 고전적 접합이 사용되는 경우, 삽입된 시스테인은 필요하지 않다.

[0551] CH 영역에 삽입된 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않는 CH 영역의 예는 서열번호 44, 46, 63 및 64이다. CH 영역에 삽입된 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않는 CH 영역을 포함하는 중쇄의 예는 서열번호 51, 54, 57, 59 및 60이다.

[0552] 항체 분자의 1개 초과의 친핵성 또는 친전자성기가 약물-링커 중간체, 또는 링커 시약에 이은 약물 시약과 반응하는 경우, 생성된 생성물은 예를 들어, 1, 2, 3개 등의 항체에 부착된 약물의 분포를 갖는 접합체 화합물의 혼합물이다. 중합체 역상(PLRP) 및 소수성 상호 작용(HIC)과 같은 액체 크로마토그래피 방법은 약물 로딩값에 의해 혼합물에서 화합물을 분리시킬 수 있다. 단일 약물 로딩값(p)을 갖는 접합체의 제제가 분리될 수 있지만, 약물이 링커를 통해 항체 분자 상의 상이한 부위에서 부착될 수 있기 때문에 이들 단일 로딩값의 접합체는 여전히 불균질한 혼합물일 수 있다.

[0553] 따라서, 본 개시내용의 접합체 조성물은 항체가 하나 이상의 약물 모이어티(예를 들어, 튜불라이신 또는 토포이소머라제 억제제)를 갖고 약물 모이어티가 다양한 아미노산 잔기에서 항체 분자에 부착될 수 있는 경우에 항체-약물 접합체 화합물의 혼합물을 포함한다.

[0554] 일부 경우에, 항체 분자당 튜불라이신 약물 모이어티의 평균 수는 1 내지 8의 범위이다. 일부 경우에, 범위는 1 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 3, 선택적으로 1 내지 2, 1.5 내지 2, 1.8 내지 2, 예컨대 1.9 내지 2에서 선택된다.

[0555] 이미 전술한 바와 같이, 일부 경우에 ADC의 항체 분자는 하나 이상의 Fcɣ 수용체에 대한 항체 분자의 결합을 감소시키거나 폐지하기 위해 중쇄(들)의 CH 영역(들)에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 ADC의 제1 및/또는 제2 중쇄는 위치 234에 페닐알라닌(F), 위치 235에 글루탐산(E), 및 위치 331에 세린(S)을 포함할 수 있으며, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0556] ***항체 분자 및 접합체의 기능적 특성***

[0557] 본원에 기재된 항체 분자 및 접합체는 특정 기능적 특성을 참조하여 특성화될 수 있다.

[0558] *결합 친화도*

[0559] 본원에 기재된 항체 분자 및 접합체는 EGFR에 대해 특정 친화도를 갖는 EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인 및/또는 c-Met에 대해 특정 친화도를 갖는 c-Met와 결합하는 항원 결합 도메인을 특징으로 할 수 있다. 인간, 마우

스 또는 시노몰구스 EGFR 또는 c-Met와 같은 동족 항원에 대한 항체 분자의 결합 친화도는 예를 들어 Biacore를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도는 예를 들어 EGFR과 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 c-Met와 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 분자의 일부로서, 항체 분자를 사용하여 결정될 수 있다. 대안적으로, 결합 친화도는 EGFR 또는 c-Met에 대해 단일특이적인 항체 분자를 사용하여 결정될 수 있다. 일부 경우에 실시예 2.1에 기재된 바와 같이 BIACore를 사용하여 결합 친화도를 결정한다.

[0560] 결합 친화도는 일반적으로 Kd(항원 결합 도메인과 이의 항원 사이의 평형 해리 상수)로 측정된다. 잘 알려진 바와 같이, Kd 값이 낮을수록 항원 결합 도메인의 결합 친화도가 높다. 예를 들어, 10 nM의 Kd로 표적에 결합하는 항원 결합 도메인은 100 nM의 Kd로 동일한 표적에 결합하는 항원 결합 도메인보다 더 높은 친화도로 상기 표적에 결합하는 것으로 간주된다.

[0561] 인간 EGFR에 대한 언급은 서열번호 68에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것과 같이 EGFR의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 마우스 EGFR에 대한 언급은 SinoBiological에서 카탈로그 번호 51091-M08H로 입수 가능한 분자로부터 생산된 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 시노몰구스 EGFR에 대한 언급은 서열번호 69에 기재된 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 인간 c-Met에 대한 언급은 서열번호 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 마우스 c-Met에 대한 언급은 서열번호 90에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 SinoBiological에서 카탈로그 번호 50622-M08H로 입수할 수 있는 분자로부터 생산된 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 시노몰구스 c-Met에 대한 언급은 서열번호 71에 기재된 아미노산 서열을 지칭할 수 있다.

[0562] *EGFR 친화도*

[0563] 본원에 기재된 항체 분자 및 접합체는 낮은 친화도로 EGFR에 결합하는 결합 도메인을 포함할 수 있다. EGFR은 정상 조직, 예를 들어, 피부에서 낮은 수준으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 낮은 친화도로 EGFR에 결합하는 항체 분자 및 접합체는 유리하게는 정상 조직에서는 감소된 정확한 독성을 나타내면서도 여전히 높은 수준의 EGFR을 발현하는 종양을 표적화할 수 있어 개선된 안전성 프로파일을 가져올 것으로 예상된다. 더욱이, 본원에서 입증된 바와 같이, 이러한 낮은 친화도의 EGFR 결합 도메인을 포함하는 접합체는 더 높은 친화도의 EGFR 결합 도메인을 포함하는 접합체에 비해 암 치료에 더 효과적이다.

[0564] EGFR에 결합하는 결합 도메인은 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM 또는 40 nM 이상의 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 10 내지 100 nM, 20 내지 100 nM, 30 내지 100 nM, 40 내지 100 nM, 10 내지 80 nM, 20 내지 80 nM, 30 내지 80 nM, 40 내지 80 nM, 10 내지 70 nM, 20 내지 70 nM, 30 내지 70 nM, 40 내지 70 nM, 10 내지 60 nM, 20 내지 60 nM, 30 내지 60 nM, 40 내지 60 nM, 10 내지 50 nM, 20 내지 50 nM, 30 내지 50 nM, 또는 40 내지 50 nM의 Kd로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.

[0565] EGFR에 결합하는 결합 도메인은 각각 서열번호 53 및 55에 기재된 항체 분자 QD6의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 결합 도메인의 친화도보다 낮은 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.

[0566] 예를 들어, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 각각 서열번호 53 및 55에 기재된 항체 분자 QD6의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배 또는 7배 더 높은 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 각각 서열번호 53 및 55에 기재된 항체 QD6의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 항원 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd보다 2배 내지 10배, 3배 내지 10배, 4배 내지 10배, 5배 내지 10배, 6배 내지 10배, 7배 내지 10배, 2배 내지 9배, 3배 내지 9배, 4배 내지 9배, 5배 내지 9배, 6배 내지 9배, 7배 내지 9배, 2배 내지 8배, 3배 내지 8배, 4배 내지 8배, 5배 내지 8배, 6배 내지 8배, 7배 내지 8배 더 높은 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.

[0567] EGFR에 결합하는 결합 도메인은 각각 서열번호 16 및 20에 기재된 항체 분자 RAA22의 가변 중쇄 영역 서열 및 가변 경쇄 영역 서열을 포함하는 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 친화도와 유사한 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 각각 서열번호 16 및 20에 기재된 항체 분자 RAA22의 가변 중쇄 영역 서열 및 가변 경쇄 영역 서열을 포함하는 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd와 5배 미만, 4배 미만, 3배 미만, 2배 미만, 1배 미만 또는 0.5배 미만의 차이가 있는 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.

[0568] EGFR에 결합하는 결합 도메인은 시노몰구스 EGFR에도 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 700 nM 미만, 600 nM 미만, 500 nM 미만, 400 nM 미만, 300 nM 미만, 또는 250 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 시노몰구스 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR에 결합하는 항원 결합 도메인은 100 내지 700 nM, 100 내지 600 nM, 100 내지 500 nM, 100 내지 400 nM, 100 내지 300 nM, 150 내지 250 nM, 100 내지 200 nM의 Kd를 갖는 친화도로 시노몰구스 EGFR에 결합할 수 있다. EGFR에 결합하는 항원 결합 도메인은 결합 도메인이 인간 EGFR에 결합하는 Kd보다 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배 더 높은 Kd 이하인 Kd로 시노몰구스 EGFR에 결합할 수 있다.

[0569] EGFR에 결합하는 결합 도메인은 마우스 EGFR에도 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 1 μM 미만, 900 nM 미만, 800 nM 미만, 700 nM 미만, 600 nM 미만, 또는 650 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 마우스 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 100 nM 내지 1 μM, 200 내지 900 nM, 300 내지 800 nM, 400 내지 700 nM, 400 내지 600 nM, 또는 450 내지 550 nM의 Kd로 마우스 EGFR에 결합할 수 있다.

[0570] 일부 경우에, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 인간 EGFR 및 시노몰구스 EGFR과 결합할 수 있다. 이러한 교차 반응성은 전임상 개발 동안 시노몰구스 원숭이에서 항체 분자 및 접합체의 투여 및 안전성 테스트를 수행할 수 있게 하므로 유리하다. 일부 경우에, EGFR에 결합하는 결합 도메인은 인간 EGFR, 시노몰구스 EGFR 및 마우스 EGFR과 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR과 결합하는 결합 도메인은 위에 제시된 Kd 값으로 인간 EGFR, 시노몰구스 EGFR 및 마우스 EGFR(예를 들어 10 내지 100 nM의 Kd로 인간 EGFR, 100 내지 700 nM의 Kd로 시노몰구스 EGFR 및 100 nM 내지 1 μM의 Kd로 마우스 EGFR)과 결합할 수 있다.

[0571] *cMET 친화도*

[0572] cMet에 결합하는 결합 도메인은 20 nM, 15 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM 또는 2.5 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 인간 cMet에 결합할 수 있다. 대안적으로, cMet에 결합하는 항원 결합 도메인은 1 내지 20 nM, 1 내지 15 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 9 nM, 1 내지 8 nM, 1 내지 7 nM, 1 내지 6 nM, 1 내지 5 nM, 1 내지 4 nM, 1 내지 3 nM, 1 내지 2.5 nM, 또는 2 내지 2.5 nM의 Kd를 갖는 친화도로 인간 c-Met에 결합할 수 있다.

[0573] cMET에 결합하는 결합 도메인은 시노몰구스 cMET에 결합할 수 있다. 예를 들어, cMet에 결합하는 결합 도메인은 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM 또는 2.5 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 시노몰구스 cMet에 결합할 수 있다. 대안적으로, cMet에 결합하는 결합 도메인은 1 내지 20 nM, 1 내지 15 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 9 nM, 1 내지 8 nM, 1 내지 7 nM, 1 내지 6 nM, 1 내지 5 nM, 1 내지 4 nM, 1 내지 3 nM, 1 내지 2.5 nM, 또는 2 내지 2.5 nM의 Kd를 갖는 친화도로 시노몰구스 cMet에 결합할 수 있다. cMet에 결합하는 결합 도메인은, 항원 결합 도메인이 인간 c-Met에 결합하는 Kd보다 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 더 높은 Kd 이하인 Kd를 갖는 친화도로 시노몰구스 cMet에 결합할 수 있다.

[0574] 일부 경우에, cMET에 결합하는 결합 도메인은 인간 cMET 및 시노몰구스 cMET와 결합할 수 있다. 이러한 교차 반응성은 전임상 개발 동안 시노몰구스 원숭이에서 항체 분자의 투여 및 안전성 테스트를 수행할 수 있게 하므로 유리하다. 예를 들어, cMET와 결합하는 결합 도메인은 위에 제시된 Kd 값으로 인간 cMET 및 시노몰구스 cMET(예를 들어, 1 내지 20 nM의 Kd로 인간 cMET 및 1 내지 20 nM의 Kd로 시노몰구스 cMET)와 결합할 수 있다.

[0575] *특이적 결합*

[0576] 본원에 기재된 결합 도메인은 각각의 표적(즉, EGFR 및 cMET)과 특이적으로 결합할 수 있다. "특이적"이라는 용어는 항원 결합 도메인이 이의 특이적 결합 파트너(들), 여기서는 EGFR 또는 cMet 이외의 분자에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는 상황을 지칭할 수 있다. 이러한 분자는 "비표적 분자"로 지칭된다. "특이적"이라는 용어는 항체 분자가 다수의 항원에 의해 운반되는 특정 에피토프, 예컨대, EGFR 또는 cMet 상의 에피토프에 특이적인 경우에도 적용 가능하며, 이 경우 항체 분자는 에피토프를 운반하는 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다.

[0577] 일부 경우에, 항체 분자는 비표적 분자에 대한 결합 정도가 예를 들어 ELISA, SPR, 바이오층 간섭측정(BLI), 마이크로규모 열영동(MicroScale Thermophoresis, MST) 또는 방사성면역측정법(RIA)에 의해 측정한 표적에 대한 항체 결합의 약 10% 미만인 경우, 비표적 분자에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는 것으로 간주된다. 대안적으로, 결합 특이성은 결합 친화도의 관점에서 반영될 수 있으며, 여기서 본원에 기재된 항체 분자는 다른 비표적 분자에 대한 친화도보다 적어도 0.1 자릿수 더 큰 친화도로 EGFR 및/또는 c-Met에 결합한다. 일부 경우

에, 본 개시내용의 항체 분자는 또 다른 비표적 분자에 대한 친화도보다 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 또는 2.0 자릿수 초과 중 하나인 친화도로 EGFR 및/또는 cMet에 결합한다.

[0578] EGFR은 다음의 밀접하게 관련된 4개의 수용체 티로신 키나제의 서브패밀리인 ErbB 수용체 계열의 구성원이다: EGFR, HER2, HER3 및 HER4. RAA22 항원 결합 도메인은 HER2, HER3 및 HER4에 대한 결합을 나타내지 않았는데, 이는 이 항원 결합 도메인이 EGFR과 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 예에서, EGFR과 결합하는 항원 결합 도메인은 HER2, HER3 또는 HER4에 결합하지 않거나 이에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는다.

[0579] cMET는 Ron 및 Sema 4a를 포함하는 수용체 티로신 키나제의 서브패밀리의 구성원이다. B09-GL 항원 결합 도메인은 Ron 및 Sema 4a에 대한 결합을 나타내지 않았는데, 이는 이 항원 결합 도메인이 cMET와 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 예에서, cMet와 결합하는 결합 도메인은 Ron, Sema 4a에 결합하지 않거나 이에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는다.

[0580] *동시 관여*

[0581] 본원에 기재된 항체 분자와 접합체는 두 결합 도메인이 각각의 EGFR 및 cMET 표적을 동시에 관여시키는 능력을 특징으로 할 수 있다. EGFR 및 cMet을 동시에 관여시키는 능력을 갖는 항체 분자 및 접합체는 유리할 것으로 예상되는데, 이는 다수의 종양이 EGFR 및 c-Met 둘 다를 공동 발현하는 것으로 알려져 있으므로 본 개시내용의 항체 분자에 의해 표적화될 수 있기 때문이다. 따라서, 일부 경우에 항체 분자는 EGFR 및 cMet를 동시에 관여시킬 수 있다.

[0582] 동시 관여는 예를 들어 대략 동일한 양의 EGFR 및 cMet를 발현하는 세포주 및 EGFR 및 cMet 항원 결합 도메인을 갖는 항체 분자를 포함하는 접합체를 사용하는 시험관 내 세포독성 분석에 의해 결정할 수 있다. 접합체의 개별 항원 결합 도메인이 독립적으로 약물을 전달하는 기능을 하는 경우, 이 세포주에서 두 표적 중 하나를 차단하면 접합체의 활성이 약간만 감소하여 IC50이 2배 이하로 변화할 것으로 예상되는데, 표적들이 비슷한 수준으로 존재하기 때문이다. EGFR 및 cMet 표적은 예를 들어 EGFR 또는 cMet 상의 동일한 영역과 결합하지만 세포독성을 유도할 수 있는 약물은 결여된 단일특이적 항체 분자를 사용하여 이 분석에서 차단할 수 있다. 예를 들어, 단일특이적 항체 분자는 테스트되는 접합체와 같이 EGFR과 결합하는 동일한 항원 결합 도메인, 또는 c-Met와 결합하는 동일한 항원 결합 도메인을 함유할 수 있다. 반면에, 접합체가 세포 내로 접합체를 효과적으로 전달하기 위해 동시 관여를 필요로 하는 경우, 두 표적 중 하나를 차단하는 것이 접합체의 활성에 더 큰 영향을 미칠 가능성이 높다. 즉, 이 분석법을 사용할 때 두 표적 중 하나를 차단한 후 IC50이 적어도 2배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배만큼 변화하는 경우 항체 분자는 두 표적을 동시에 관여시킬 수 있는 것으로 간주된다.

[0583] 동시 관여를 결정하는 추가 방법은 시험관 내 세포독성 분석에서 이중특이적 EGFR-cMet 접합체의 활성을 1가, 단일특이적 대조군 접합체와 비교하는 것이다. 대조군 접합체는 EGFR 또는 c-Met에 대한 하나의 항원 결합 도메인과 하나의 비결합 이소형 항체 대조군 항원 결합 도메인을 포함한다. 이중특이적 접합체 내의 각 항원 결합 도메인이 독립적으로 기능하는 경우, 예상되는 결과는 각각의 단일특이적 대조군 접합체가 이중특이적 접합체보다 약간 덜 강력할 뿐이며 그 차이는 가산적일 것이다. 대안적으로, 이중특이적 접합체의 2개의 항원 결합 도메인이 동시 결합에 의해 상승적으로 기능하는 경우, 단일특이적 대조군 항체와 비교하여 이중특이적 접합체의 활성 차이가 더 클 것으로 예상할 수 있다. 즉, 단일특이적 대조군 접합체를 사용하여 관찰된 IC50의 변화의 합보다 더 큰 IC50의 변화가 이중특이적 접합체로 인해 발생하는 경우, 항체 분자는 두 표적을 동시에 관여시킬 수 있는 것으로 간주된다.

[0584] 동시 관여를 측정하는 이러한 방법에 대한 자세한 내용은 실시예에서 확인할 수 있다.

[0585] *항체 내재화*

[0586] 본원에 기재된 항체 분자 및 접합체는 효율적인 내재화를 매개하는 능력을 특징으로 할 수 있다. 이는 접합체에 특히 유용한데, 접합체가 세포 내로 내재화되고 리소좀으로 전달되도록 보장하기 때문이며, 리소좀에서 항체 분자는 이후에 분해되고 약물이 세포 내로 방출되어 세포 효과, 예를 들어, 세포독성을 발휘한다.

[0587] 세포에 의한 항체 분자의 내재화는, 살아있는 세포를 항체 분자와 접촉시키고 내재화를 위한 충분한 시간 후에 항체 분자를 검출함으로써 분석할 수 있다. 내재화는 항체 분자의 국소화를 검출함으로써 결정할 수 있다. 항체 분자가 세포 표면에 남아 있는 경우(예를 들어 세포 표면에서 검출되고/되거나 세포 내부에서 검출되지 않음), 항체 분자는 내재화되지 않은 것으로 결정된다. 항체 분자가 세포 내부에서 검출되는 경우(예를 들어, 세포질

또는 세포 소기관에 국소화됨), 항체 분자는 내재화된 것으로 결정된다.

[0588] 항체 분자가 효율적인 내재화를 매개할 수 있는지를 시각화하기 위한 예시적인 방법은 산성 pH에서 형광성을 나타내는 pH 민감성 염료로 항체 분자를 표지화하고 이들 표지된 항체 분자를 세포에 첨가하는 단계를 포함한다. 세포 내로의 내재화는 형광을 모니터링하여 검출할 수 있다. 관찰된 형광이 특정 기간, 예를 들어 48시간에 걸쳐 표지된 비결합 대조군 항체 분자의 형광보다 큰 경우, 항체 분자는 내재화 및 리소좀으로의 전달을 매개할 수 있는 것으로 간주된다. 항체 내재화를 시각화하는 이 방법에 대한 자세한 내용은 실시예에서 확인할 수 있다.

[0589] 본원에 기재된 항체 분자는 EGFR 또는 cMet 단일특이적 대조군과 비교할 때 더 효율적인 내재화를 매개하는 능력을 특징으로 할 수 있다. 이러한 특성을 나타내는 항체 분자 및 접합체는 두 표적을 공동 발현하는 종양 세포에 대해 더 큰 선택성을 나타낼 것으로 예상되고 유의한 수준의 공동 발현을 나타내지 않는 정상 조직에서 항체 분자의 영향을 최소화할 수 있기 때문에 유리할 것으로 예상된다.

[0590] *시험관 내 활성*

[0591] 본원에 기재된 항체 분자는 세포독성 활성, 즉 세포를 살상하는 능력을 특징으로 할 수 있다. 세포독성 활성은 예를 들어 CellTiter-Glo®(Promega) 분석과 같은 시험관 내 세포 생존능 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 일부 경우에, 세포는 EGFR과 cMet를 모두 발현하는 세포이다.

[0592] 항체 분자의 효능은 IC50 값으로 표현될 수 있다. IC50은 항체 분자의 중간 억제 농도이다. 기능성 분석에서, IC50은 최대치의 50%까지 생물학적 반응을 감소시키는 농도이다. IC50은 당해 분야에 공지된 다수의 수단에 의해 계산할 수 있다.

[0593] 일부 경우에, 세포독성 활성을 갖는 본원에 기재된 항체 분자는 시험관 내 세포 생존능 분석을 사용하여 측정할 때 4000 pM 미만, 3500 pM 미만, 3000 pM 미만, 2500 pM 미만, 2000 pM 미만, 1500 pM 미만, 1000 pM 미만, 500 pM 미만, 400 pM 미만, 30 0pM 미만, 250 pM 미만, 200 pM 미만, 150 pM 미만 또는 100 pM 미만의 IC50을 갖는다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 60 내지 500 pM의 IC50을 가질 수 있다.

[0594] 일부 경우에, 본원에 기재된 항체 분자는 EGFR 및 cMet 중 하나 또는 다른 하나를 낮은 수준으로 발현하는 세포에 비해, 상당한 양의 EGFR 및 cMet를 모두 발현하는 세포, 예를 들어, 종양 세포의 사멸을 증가시킬 수 있다. 상당한 양의 EGFR과 cMet를 모두 발현하는 세포는 세포 표면의 상대 수용체 밀도를 측정하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 15,000보다 큰 세포 표면의 상대 수용체 밀도로 EGFR 및 cMet를 발현하는 세포는 상당한 양의 EGFR 및 cMet를 모두 발현하는 세포와 15,000 이하의 세포 표면의 낮은 상대 수용체 밀도로 EGFR 및 c-Met 중 하나를 발현하는 세포로 간주될 수 있다. 상대 EGFR 및 cMet 밀도는 예를 들어 실시예에 기재된 Quantum MESF 정량적 FACS 분석 키트를 사용하여 측정할 수 있다.

[0595] 상당한 양의 EGFR 및 cMet 둘 다를 발현하는 세포의 예에는 NCI H596, HCC 827 GR Pool, A549, NCI H1792, NCI H1975, NCI H292 및 NCI H358 세포주가 포함될 수 있다. 낮은 상대 수용체 밀도로 EGFR 및 cMet 중 하나를 발현하는 세포의 예에는 A427, NCI H23 및 NCI H661(Ag 음성) 세포주가 포함될 수 있다. 이들 세포주는 ATCC를 통해 이용 가능하다.

[0596] ***EGFR 티로신 키나제 억제제***

[0597] EGFR TKI는 아래 설명된 바와 같이 1세대, 2세대, 또는 3세대 EGFR TKI로 특징지어질 수 있다.

[0598] 1세대 EGFR TKI는 T790M 돌연변이 보유 EGFR을 유의미하게 억제하지 않는 활성화 돌연변이 보유 EGFR의 가역적 억제제이다. 1세대 TKI의 예로는 제피티닙 및 엘로티닙이 포함된다.

[0599] 2세대 EGFR TKI는 T790M 돌연변이 보유 EGFR을 유의미하게 억제하지 않는 활성화 돌연변이 보유 EGFR의 비가역적 억제제이다. 2세대 TKI의 예로는 아파티닙 및 다코미티닙이 포함된다.

[0600] 3세대 EGFR TKI는 T790M 돌연변이 보유 EGFR을 또한 유의미하게 억제하고 야생형 EGFR을 유의미하게 억제하지 않는 활성화 돌연변이 보유 EGFR의 억제제이다. 3세대 TKI의 예에는 화학식 V의 화합물, 오시머티닙, AZD3759(조리페르티닙), 레이저티닙, 나자르티닙(EGF816), CO1686(로실레티닙), HM61713, ASP8273(나쿠오티닙), PF-06747775(마벨러티닙), 아비티닙(아비버티닙), 알플루티닙(AST2818) 및 CX-101(올라페르티닙; RX-518), 알모너티닙(HS-10296; 아우몰레르티닙) 및 BPI-7711(레지베르티닙)이 포함된다.

[0601] 일 양태에서, EGFR TKI는 1세대 EGFR TKI이다. 추가 예에서, 1세대 EGFR TKI는 제피티닙 또는 이의 제약상 허용

가능한 염, 이코티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염 및 엘로티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

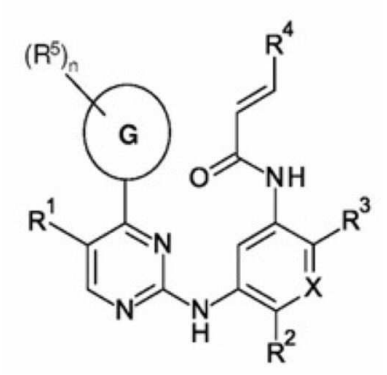
[0602] 일 양태에서, EGFR TKI는 2세대 EGFR TKI이다. 추가 양태에서, 2세대 EGFR TKI는 다코미티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염 및 아파티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염으로부터 선택된다.

[0603] 일 양태에서, EGFR TKI는 3세대 EGFR TKI이다. 추가 양태에서, 3세대 EGFR TKI는 하기 정의된 바와 같은 화학식 V의 화합물이다. 추가 양태에서, 3세대 EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, AZD3759 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 레이저티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 아비버티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 알플루티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염, CX-101 또는 이의 제약상 허용가능한 염, HS-10296 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 및 BPI-7711 또는 이의 제약상 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 양태에서, 3세대 EGFR TKI는 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염이다.

[0604] *화학식 V의 화합물*

[0605] 일 양태에서, EGFR TKI는 하기 화학식 **V**의 화합물:

[0606] [화학식 V]

[0607] 

[0608] (상기 식에서,

[0609] **G**는 4,5,6,7-테트라히드로피라졸로[1,5-*a*]피리딘-3-일, 인돌-3-일, 인다졸-1-일, 3,4-디히드로-1H-[1,4]옥사지노[4,3-a]인돌-10-일, 6,7,8,9-테트라히드로피리도[1,2-a]인돌-10-일, 5,6-디히드로-4H-피롤로[3,2,1-ij]퀴놀린-1-일, 피롤로[3,2-b]피리딘-3-일 및 피라졸로[1,5-*a*]피리딘-3-일로부터 선택되고;

[0610] R^1은 수소, 플루오로, 클로로, 메틸 및 시아노로부터 선택되고;

[0611] R^2는 메톡시, 트리플루오로메톡시, 에톡시, 2,2,2-트리플루오로에톡시 및 메틸로부터 선택되고;

[0612] R^3은 (3*R*)-3-(디메틸아미노)피롤리딘-1-일, (3*S*)-3-(디메틸-아미노)피롤리딘-1-일, 3-(디메틸아미노)아제티딘-1-일, [2-(디메틸아미노)에틸]-(메틸)아미노, [2-(메틸아미노)에틸](메틸)아미노, 2-(디메틸아미노)에톡시, 2-(메틸아미노)에톡시, 5-메틸-2,5-디아자스피로[3.4]옥트-2-일, (3a*R*,6a*R*)-5-메틸헥사-히드로-피롤로[3,4-*b*]피롤-1(2*H*)-일, 1-메틸-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일, 4-메틸피페리진-1-일, 4-[2-(디메틸아미노)-2-옥소에틸]피페라진-1-일, 메틸[2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸]아미노, 메틸[2-(모르폴린-4-일)에틸]아미노, 1-아미노-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일 및 4-[(2*S*)-2-아미노프로파노일]피페라진-1-일로부터 선택되고;

[0613] R^4는 수소, 1-피페리디노메틸 및 N,N-디메틸아미노메틸로부터 선택되고;

[0614] R^5는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필, 2,2-디플루오로에틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 플루오로, 클로로 및 시클로프로필로부터 선택되고;

[0615] **X**는 CH 또는 N이고;

[0616] **n**은 0, 1, 또는 2임)

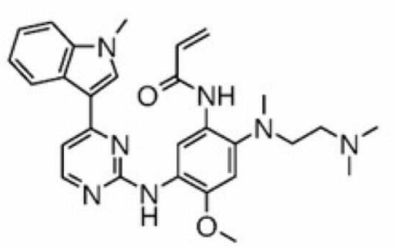
[0617] 또는 이의 제약상 허용가능한 염이다.

[0618] 추가 양태에서, G는 인돌-3-일 및 인다졸-1-일로부터 선택되고; R^1은 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, 및 시아노로부터 선택되고; R^2는 메톡시 및 2,2,2-트리플루오로에톡시로부터 선택되고; R^3은 [2-(디메틸아미노)에틸]-(메틸)아미노, [2-(메틸아미노)에틸](메틸)아미노, 2-(디메틸아미노)에톡시 및 2-(메틸아미노)에톡시로부터 선택되고; R^4는 수소이고; R^5는 메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸 및 시클로프로필로부터 선택되고; X는 CH 또는 N이고; n은 0 또는 1인, 상기 정의된 바와 같은 화학식 V의 화합물, 또는 이의 제약상 허용가능한 염이 제공된다.

[0619] 화학식 V의 화합물의 예로는 WO 2013/014448, WO 2015/175632, WO 2016/054987, WO 2016/015453, WO 2016/094821, WO 2016/070816, 및 WO 2016/173438에 기재된 것들이 포함된다.

[0620] *오시머티닙 및 이의 제약 조성물*

[0621] 오시머티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:

[0622] 

[0623] 오시머티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: *N*-(2-{2-디메틸아미노 에틸-메틸아미노}-4-메톡시-5-{[4-(1-메틸인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노}페닐)프로프-2-엔아미드. 오시머티닙은 WO 2013/014448에 기재되어 있다. 오시머티닙은 AZD9291로도 알려져 있다.

[0624] 오시머티닙은 다음과 같은 메실레이트 염의 형태로 발견될 수 있다: *N*-(2-{2-디메틸아미노 에틸-메틸아미노}-4-메톡시-5-{[4-(1-메틸인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노}페닐)프로프-2-엔아미드 메실레이트 염. 오시머티닙 메실레이트는 TAGRISSO™로도 알려져 있다.

[0625] 현재 오시머티닙 메실레이트는 전이성 EGFR T790M 돌연변이 양성 NSCLC 환자의 치료용, 80 mg 용량(유리 염기로 표현된 것으로, 95.4 mg의 오시머티닙 메실레이트와 등가임)의 경구 1일 1회 정제 제형으로서 승인되어 있다. 용량 조절이 필요한 경우, 40 mg 경구 1일 1회 정제 제형(유리 염기로 표현된 것으로, 47.7 mg의 오시머티닙 메실레이트와 등가임)을 사용할 수 있다. 정제 코어는 제약적 희석제(예컨대, 만니톨 및 미세결정질 셀룰로스), 붕해제(예컨대, 저치환도 하이드록시프로필 셀룰로스), 및 활택제(예컨대, 나트륨 스테아릴 푸마레이트)를 포함한다. 정제 제형은 WO 2015/101791에 기재되어 있다.

[0626] 따라서 일 양태에서, 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 메실레이트 염, 즉 N-(2-{2-디메틸아미노 에틸-메틸아미노}-4-메톡시-5-{[4-(1-메틸인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노}페닐)프로프-2-엔아미드 메실레이트 염의 형태이다.

[0627] 일 양태에서, 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 양태에서, 오시머티닙 메실레이트는 1일 1회 투여된다.

[0628] 일 양태에서, 오시머티닙의 총 1일 용량은 약 80 mg이다. 일 양태에서, 오시머티닙 메실레이트의 총 1일 용량은 약 95.4 mg이다.

[0629] 일 양태에서, 오시머티닙의 총 1일 용량은 약 40 mg이다. 추가 양태에서, 오시머티닙 메실레이트의 총 1일 용량은 약 47.7 mg이다.

[0630] 일 양태에서, 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 정제 형태이다.

[0631] 일 양태에서, 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 하나 이상의 제약상 허용가능한 부형제(예를 들어 희석제 또는 담체)를 포함하는 제약 조성물의 형태로 투여된다. 추가 양태에서, 조성물은 하나 이상의 제약적 희석제(예컨대 만니톨 및 미정질 셀룰로스), 하나 이상의 제약적 붕해제(예컨대 저치환도 하이드록시프로필 셀룰로스), 또는 하나 이상의 제약적 활택제(예컨대 소듐 스테아릴 푸마레이트)를 포함한다.

[0632] 일 양태에서, 조성물은 정제 형태이고, 정제 코어는 (a) 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염 2~70부;

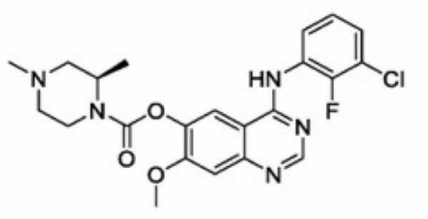
(b) 둘 이상의 제약적 희석제 5~96부; (c) 하나 이상의 제약적 붕해제 2~15부; 및 (d) 하나 이상의 제약적 활택제 0.5~3부를 포함하며, 모든 부는 중량 기준이고, 부의 합인 (a)+(b)+(c)+(d)는 100이다.

[0633] 일 양태에서, 조성물은 정제 형태이고, 정제 코어는 (a) 오시머티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염 7~25부; (b) 둘 이상의 제약적 희석제 55~85부(제약적 희석제는 미정질 셀룰로오스 및 만니톨을 포함함); (c) 제약적 붕해제 2~8부(제약적 붕해제는 저치환도 히드록시프로필 셀룰로오스를 포함함); (d) 제약적 활택제 1.5~2.5부(제약적 활택제는 소듐 스테아릴 푸마레이트를 포함함)를 포함하며, 모든 부는 중량 기준이고, 부의 합인 (a)+(b)+(c)+(d)는 100이다.

[0634] 일 양태에서, 조성물은 정제 형태이고, 정제 코어는 (a) 오시머티닙 메실레이트 약 19부; (b) 만니톨 약 59부; (c) 미정질 셀룰로오스 약 15부; (d) 저치환도 히드록시프로필 셀룰로오스 약 5부; 및 (e) 소듐 스테아릴 푸마레이트 약 2부를 포함하며, 모든 부는 중량 기준이고, 부의 합인 (a)+(b)+(c)+(d)+(e)는 100이다.

[0635] *AZD3759(조리페르티닙)*

[0636] AZD3759는 하기 화학 구조를 갖는다:

[0637] 

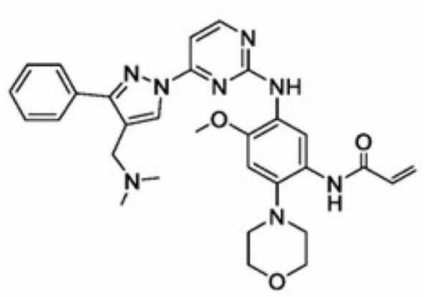
[0638] AZD3759의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: 4-[(3-클로로-2-플루오로페닐)아미노]-7-메톡시-6-퀴나졸리닐(2*R*)-2,4-디메틸-1-피페라진카르복실레이트. AZD3759는 WO 2014/135876에 기재되어 있다.

[0639] 일 양태에서, AZD3759 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 2회 투여된다. 추가 양태에서, AZD3759는 1일 2회 투여된다.

[0640] 일 양태에서, AZD3759의 총 1일 용량은 약 400 mg이다. 추가 양태에서, 약 200 mg의 AZD3759가 1일 2회 투여된다.

[0641] *레이저티닙*

[0642] 레이저티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:

[0643] 

[0644] 레이저티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: *N*-{5-[(4-{4-[(디메틸아미노)메틸]-3-페닐-1H-피라졸-1-일}-2-피리미디닐)아미노]-4-메톡시-2-(4-모르폴리닐)페닐}아크릴아미드. 레이저티닙은 WO 2016/060443에 기재되어 있다. 레이저티닙은 YH25448 및 GNS-1480이라는 명칭으로도 알려져 있다.

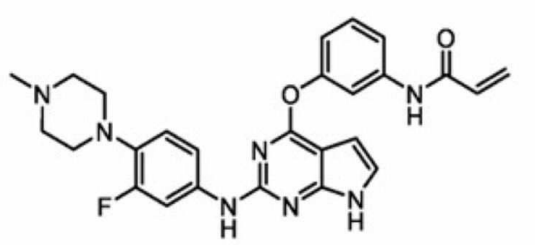
[0645] 일 양태에서, 레이저티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 양태에서, 레이저티닙은 1일 1회 투여된다.

[0646] 일 양태에서, 레이저티닙의 총 1일 용량은 약 20~320 mg이다.

[0647] 일 양태에서, 레이저티닙의 총 1일 용량은 약 240 mg이다.

[0648] *아비티닙*

[0649] 아비티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:



[0650]

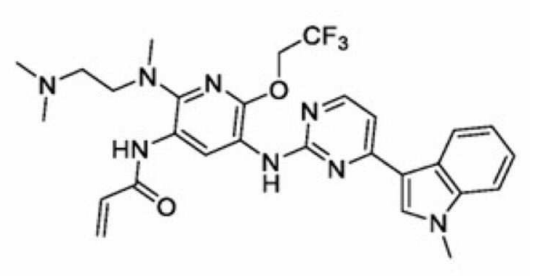
[0651] 아비티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-(3-((2-((3-플루오로-4-(4-메틸피페라진-1-일)페닐)아미노)-7H-피롤로(2,3-d)피리미딘-4-일)옥시)페닐)프로프-2-엔아미드. 아비티닙은 US2014038940에 개시되어 있다. 아비티닙은 아비버티닙으로도 알려져 있다.

[0652] 일 양태에서, 아비티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 2회 투여된다. 추가 양태에서, 아비티닙 말레에이트는 1일 2회 투여된다.

[0653] 일 양태에서, 아비티닙 말레에이트의 총 1일 용량은 약 600 mg이다.

[0654] *알플루티닙*

[0655] 알플루티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:



[0656]

[0657] 알플루티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-{2-{[2-(디메틸아미노)에틸](메틸)아미노}-6-(2,2,2-트리플루오로에톡시)-5-{[4-(1-메틸-1H-인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노}피리딘-3-일}아크릴아미드. 알플루티닙은 WO 2016/15453에 개시되어 있다. 알플루티닙은 AST2818로도 알려져 있다.

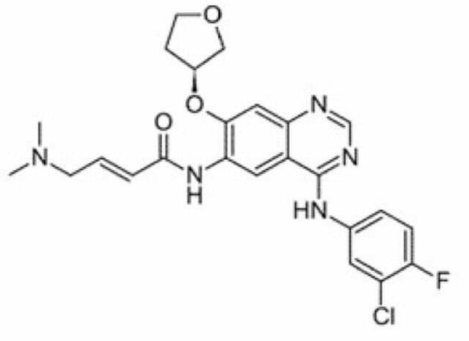
[0658] 일 양태에서, 알플루티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 양태에서, 알플루티닙 메실레이트는 1일 1회 투여된다.

[0659] 일 양태에서, 알플루티닙 메실레이트의 총 1일 용량은 약 80 mg이다.

[0660] 일 양태에서, 알플루티닙 메실레이트의 총 1일 용량은 약 40 mg이다.

[0661] *아파티닙*

[0662] 아파티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:



[0663]

[0664] 아파티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: *N*-[4-(3-클로로-4-플루오로아닐리노)-7-[(3S)-옥

솔란-3-일]옥시퀴나졸린-6-일]-4-(디메틸아미노)부트-2-엔아미드. 아파티닙은 WO 02/50043에 개시되어 있다. 아파티닙은 길로트리프로도 알려져 있다.

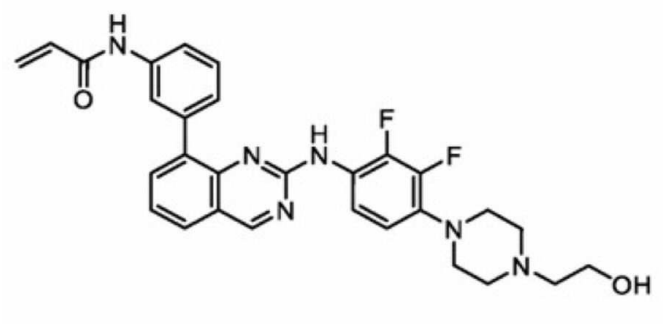
[0665] 일 양태에서, 아파티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 양태에서, 아파티닙 디말레에이트는 1일 1회 투여된다.

[0666] 일 양태에서, 아파티닙 디말레에이트의 총 1일 용량은 약 40 mg이다.

[0667] 일 양태에서, 아파티닙 디말레에이트의 총 1일 용량은 약 30 mg이다.

[0668] *CX-101(올라페르티닙; RX-518)*

[0669] CX-101은 하기 화학 구조를 갖는다:

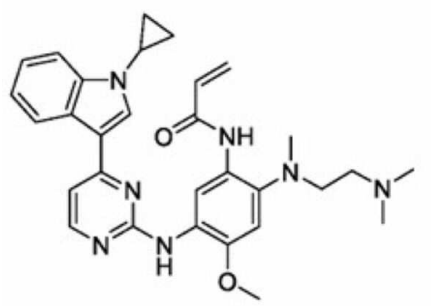


[0670]

[0671] CX-101의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-(3-(2-((2,3-디플루오로-4-(4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일)페닐)아미노)퀴나졸린-8-일)페닐)아크릴아미드. CX-101은 WO 2015/027222에 개시되어 있다. CX-101은 RX-518로도 알려져 있다.

[0672] *HS-10296(알모너티닙; 아우몰레르티닙)*

[0673] Hs-10296(알모너티닙; 아우몰레르티닙)은 하기 화학 구조를 갖는다:



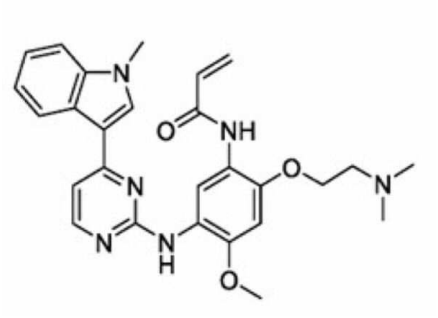
[0674]

[0675] HS-10296의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-[5-[[4-(1-시클로프로필인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노]-2-[2-(디메틸아미노)에틸-메틸-아미노]-4-메톡시-페닐]프로프-2-엔아미드. HS-10296은 WO 2016/054987에 개시되어 있다.

[0676] 일 양태에서, HS-10296의 총 1일 용량은 약 110 mg이다.

[0677] *BPI-7711(레지베르티닙)*

[0678] BPI-7711은 하기 화학 구조를 갖는다:



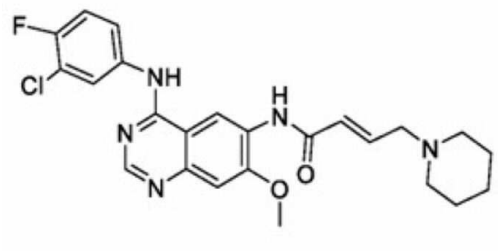
[0679]

[0680] BPI-7711의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-[2-[2-(디메틸아미노)에톡시]-4-메톡시-5-[[4-(1-메틸인돌-3-일)피리미딘-2-일]아미노]페닐]프로프-2-엔아미드. BPI-7711은 WO 2016/94821에 개시되어 있다.

[0681] 일 양태에서, BPI-7711의 총 1일 용량은 약 180 mg이다.

[0682] *다코미티닙*

[0683] 다코미티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:



[0684]

[0685] 다코미티닙의 유리 형태는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: (2*E*)-*N*-{4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-메톡시퀴나졸린-6-일}-4-(피페리딘-1-일)부트-2-엔아미드. 다코미티닙은 WO 2005/107758에 기재되어 있다. 다코미티닙은 PF-00299804라는 명칭으로도 알려져 있다.

[0686] 다코미티닙은 다코미티닙 일수화물, 즉 (2E)-N-{4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-메톡시퀴나졸린-6-일}-4-(피페리딘-1-일)부트-2-엔아미드 일수화물의 형태로 발견될 수 있다.

[0687] 일 양태에서, 다코미티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 양태에서, 다코미티닙 일수화물은 1일 1회 투여된다.

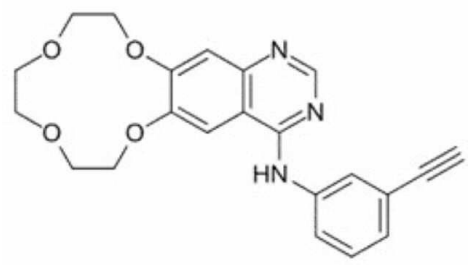
[0688] 일 양태에서, 다코미티닙 일수화물의 총 1일 용량은 약 45 mg이다.

[0689] 일 양태에서, 다코미티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 정제 형태이다.

[0690] 일 양태에서, 다코미티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 하나 이상의 제약상 허용가능한 부형제를 포함하는 제약 조성물의 형태로 투여된다. 추가 양태에서, 하나 이상의 제약상 허용가능한 부형제는 락토스 일수화물, 미정질 셀룰로오스, 소듐 전분 글리콜레이트, 및 마그네슘 스테아레이트를 포함한다.

[0691] *이코티닙*

[0692] 이코티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:



[0693] .

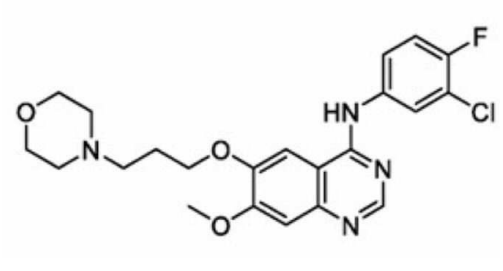
[0694] 이코티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: *N*-(3-에티닐페닐)-2,5,8,11-테트라옥사-15,17-디아자트리시클로[10.8.0.0^{14,19}]이코사-1(12),13,15,17,19-펜타엔-18-아민. 이코티닙은 WO 2013064128에 개시되어 있다. 이코티닙은 콘마나로도 알려져 있다.

[0695] 예에서, 이코티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 3회 투여된다. 추가 경우에, 이코티닙 염산염은 1일 3회 투여된다.

[0696] 예에서, 이코티닙 염산염의 총 1일 용량은 약 375 mg이다.

[0697] *제피티닙*

[0698] 제피티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:

[0699] 

.

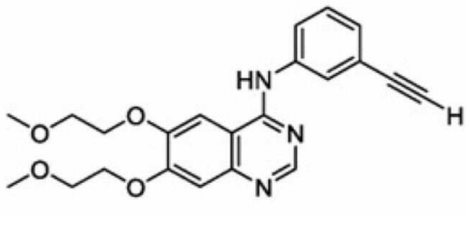
[0700] 제피티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-메톡시-6-(3-모르폴린-4-일프로폭시)퀴나졸린-4-아민. 제피티닙은 WO 1996/033980에 개시되어 있다. 제피티닙은 IRESSA™로도 알려져 있다.

[0701] 예에서, 제피티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 경우에, 제피티닙은 1일 1회 투여된다.

[0702] 예에서, 제피티닙의 총 1일 용량은 약 250 mg이다.

[0703] *엘로티닙*

[0704] 엘로티닙은 하기 화학 구조를 갖는다:

[0705] 

.

[0706] 엘로티닙의 유리 염기는 다음과 같은 화학명으로 알려져 있다: N-(3-에티닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시) 퀴나졸린-4-아민. 엘로티닙은 WO 1996/030347에 개시되어 있다. 엘로티닙은 TARCEVA™로도 알려져 있다.

[0707] 예에서, 엘로티닙 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 1일 1회 투여된다. 추가 경우에, 엘로티닙은 1일 1회 투여된다.

[0708] 예에서, 엘로티닙의 총 1일 용량은 약 150 mg이다.

[0709] 예에서, 엘로티닙의 총 1일 용량은 약 100 mg이다.

[0710] ***조합 치료***

[0711] 위에서 설명된 바와 같이, EGFR 및 cMet의 공동 발현은 많은 암 유형과 연관되어 있으며, 두 분자 모두를 표적으로 하는 항체 분자, 특히 이러한 항체 분자를 포함하는 접합체는 여러 적응증에 걸쳐 광범위한 임상적 이익을 얻을 수 있는 기회를 제공한다. 따라서 본원에 기재된 EGFR TKI 및 항체 분자의 조합은 치료적 용도, 특히 암 치료에 유용할 것으로 기대된다.

[0712] 본원에 기재된 EGFR TKI 및/또는 항체 분자는 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에 사용될 수 있다. 본 개시의

관련 양태는 다음을 제공한다;

[0713] (i) 암 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 EGFR TKI로서, 방법에서 본원에 기재된 항체 분자와 조합하여 투여되는, EGFR TKI,

[0714] (ii) 암 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 항체 분자로서, 방법에서 본원에 기재된 EGFR TKI와 조합하여 투여되는, 항체 분자,

[0715] (iii) 암 치료용 의약의 제조에서 본원에 기재된 EGFR TKI의 용도로서, 치료에서 EGFR TKI는 본원에 기재된 항체 분자와 조합하여 투여되는, 용도;

[0716] (iv) 암 치료용 의약의 제조에서 본원에 기재된 항체 분자의 용도로서, 치료에서 항체 분자는 본원에 기재된 EGFR TKI와 조합하여 투여되는, 용도;

[0717] (v) 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 개체에게 치료적 유효량의 본원에 기재된 EGFR TKI와 조합하여 치료적 유효량의 본원에 기재된 항체 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 방법;

[0718] (vi) 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 개체에게 제1 양의 EGFR TKI 및 제2 양의 항-EGFR/cMET 항체 분자를 투여하는 단계를 포함하고, 제1 양 및 제2 양은 함께 치료적 유효량에 포함되는, 방법.

[0719] 또한, 본원에 기재된 EGFR/cMET 항체 분자 및 본원에 기재된 EGFR TKI의 제약 조합물이 본원에 제공된다. 제약 조합물은 치료적 유효량의 본원에 기재된 EGFR/cMET 항체 분자 및 치료적 유효량의 본원에 기재된 EGFR TKI 및 하나 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 지칭하며, 여기서 각 활성 성분은 조합하여 환자에게 제공되는 것으로 의도된다.

[0720] 본원에서 사용되는 바와 같이 "조합 치료"는 i) 본원에 기재된 항체 분자(이는 본원에 기재된 바와 같이 약물에 접합될 수 있음); 및 ii) 본원에 기재된 EGFR TKI를 개체에게 투여하는 것을 지칭한다.

[0721] 개체는 환자일 수 있다. 일부 경우에, 환자는 인간 환자이다.

[0722] 치료는 일부 원하는 치료 효과, 예를 들어 병태 진행의 억제 또는 지연을 달성하는 임의의 치료 또는 요법일 수 있으며, 진행 속도의 감소, 진행 속도의 중단, 병태의 개선, 병태의 치유 또는 관해(부분적 또는 전체적), 병태의 하나 이상의 증상 및/또는 징후의 예방, 개선, 지연, 완화 또는 정지, 또는 치료가 없을 경우에 예상되는 것 이상으로 개체 또는 환자의 생존 연장을 포함한다.

[0723] *투여*

[0724] 항체 분자, 접합체 및 EGFR TKI는 통상 활성 작용제에 더하여 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있는 제약 조성물의 형태로 투여될 것이다.

[0725] 제약 조성물은 항체 분자, 접합체 또는 EGFR TKI 이외에 제약상 허용가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 잘 알려진 기타 물질을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용가능한"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 대상체(예를 들어, 인간)의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하며, 합리적인 이득/위험비에 상응하는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여량 형태에 관한 것이다. 각각의 담체, 부형제 등은 또한 제형의 다른 성분과 양립 가능하다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 주입, 주사 또는 아래에서 논의되는 임의의 기타 적합한 경로일 수 있는 투여의 경로에 따라 달라질 것이다.

[0726] 투여는 "치료적 유효량"으로 이루어질 수 있으며, 이는 개체에게 이익을 나타내기에 충분하다. 투여되는 실제량, 및 투여 속도와 시간 추이는 치료하려는 것의 성질 및 중증도, 치료되는 특정 개체, 개체의 임상적 상태, 장애의 원인, 조성물의 전달 부위, 항체 분자의 유형, 투여 방법, 투여 계획 및 의학 종사자에게 공지된 다른 인자에 따라 좌우될 것이다. 치료 처방, 예를 들어 투여량 등의 결정은 일반의 및 다른 의사의 책임에 속하며, 치료하려는 질환의 진행 및/또는 증상의 중증도에 따라 좌우될 수 있다. EGFR TKI의 적절한 용량은 당업계에 알려져 있으며, 예시적인 용량은 EGFR TKI 섹션에서 상기 기재되어 있다. 항체 분자의 적절한 용량은 당업계에 잘 알려져 있다(문헌[Ledermann, 1991]; 및 [Bagshawe, 1991]). 투여되는 항체 분자에 적절한 본원에, 또는 문헌[Physician's Desk Reference (2003)]에서 표시된 특정 투여량을 사용할 수 있다. 항체 분자의 적합한 용량 또는 치료적 유효량은 동물 모델에서의 생체 내 활성 및 시험관 내 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다. 마우스 및 다른 시험 동물에서의 유효량을 인간에 외삽하는 방법이 공지되어 있다. 정확한 용량은 치료할 영역의 크기와 위치, 그리고 항체 분자의 정확한 특성을 포함한 여러 요인에 따라 달라질 것이다. 항체 분자는 예를 들

어 매일, 주 1회, 2주마다 1회 또는 월 1회 투여될 수 있다. 일부 경우에, EGFR TKI는 제1 양으로 투여되고 항-EGFR/cMET 항체 분자는 제2 양으로 투여되며, 제1 양과 제2 양은 함께 치료적 유효량에 포함된다.

[0727] EGFR TKI는 항체 분자의 투여와 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로 개체에게 투여될 수 있다. EGFR TKI가 항체 분자와 동시에 투여되는 경우, 항체 분자 및 EGFR TKI는 조합 제제로서 개체에게 투여될 수 있다.

[0728] 조합 치료(즉, 항체 분자와 EGFR TKI)는 제3 치료와 조합하여 투여될 수 있으며, 상기 제3 치료는 조합 치료와 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로 개체에게 투여된다. 제3 치료는 화학요법, 방사선요법, 다른 (상이한) 항체 분자 또는 다른 (상이한) EGFR TKI를 포함할 수 있다.

[0729] *암*

[0730] 본원에 기재된 조합 치료를 사용하여 치료할 암은 다음으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다: 폐암(예컨대, 비소세포폐암(NSCLC)), 췌장암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 위암, 두경부암, 난소암 또는 교모세포종.

[0731] 암은 EGFR과 cMet를 모두 발현하는 암일 수 있다. 암의 세포는 세포 표면에서 EGFR과 cMet를 발현할 수 있다.. 일례에서, 종양은 EGFR과 cMet를 공동 발현하는 것으로 결정되었을 수 있다. 표적의 발현을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 면역조직화학을 포함한다.

[0732] 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료를 사용하여 치료할 암은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다: 폐암(예컨대, 비소세포폐암(NSCLC)), 췌장암, 결장암, 결장직장암 및 두경부 편평 세포 암종(SCCHN 또는 SQHN). 일례에서, 치료할 암은 비소세포폐암(NSCLC)이다. 일례에서, 암은 두경부 편평 세포 암종(SCCHN)이다.

[0733] 일부 경우에, 암은 야생형 EGFR 암, EGFR 돌연변이 암, 야생형 cMET 암 또는 cMET 돌연변이 암이다. EGFR 및 cMET 돌연변이 암을 검출하는 방법은 잘 알려져 있다.

[0734] 일부 경우에, 치료할 암은 EGFR 돌연변이 암(또한 "EGFR 돌연변이 양성"이라고도 함), 예를 들어 EGFR 돌연변이 NSCLC이다. 암과 관련될 수 있는 EGFR 활성화 돌연변이와 같은 대표적인 EGFR 돌연변이에는 점 돌연변이, 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 역전 또는 유전자 증폭이 포함되며, 이는 티로신 키나제 활성 증가, 수용체 동종이량체 및 이종이량체 형성, 리간드 결합 강화 등과 같이 EGFR의 적어도 하나의 생물학적 활성을 증가시킨다. 돌연변이는 EGFR 유전자의 임의의 일부 또는 EGFR 유전자와 관련된 조절 영역에 위치할 수 있으며 엑손 18, 19, 20 또는 21의 돌연변이를 포함한다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 L858R 돌연변이, 엑손 19의 하나 이상의 결실, 또는 엑손 20의 하나 이상의 삽입, T790M 돌연변이 또는 이들의 조합을 갖는 암이다.

[0735] NSCLC에서 EGFR 유전자의 특정 돌연변이는 EGFR TKI에 대한 높은 반응률과 관련이 있다. 엑손 21의 단일 점 돌연변이인 류신-858에서 아르기닌으로의 돌연변이(L858R)와 엑손 19의 적어도 3개의 아미노산 잔기의 가변적 결실은 함께 종종 '고전적' *EGFR* 활성화 돌연변이라고 하며 NSCLC에서 관찰된 모든 *EGFR* 키나제 도메인 돌연변이의 대부분(85 내지 90%)을 나타낸다(Vyse and Huang, 2019). 보고된 EGFR 엑손 19 결실의 예로는 delE746-A750, delE746-T751, delL747-E749, delL747-P753, delL747-T751이 있다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 L858R 돌연변이 및/또는 엑손 19의 하나 이상의 결실을 가진 암(예를 들어, EGFR 돌연변이 양성 NSCLC)이다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 엑손 19의 하나 이상의 결실 및/또는 L858R 돌연변이를 갖는 암(예를 들어, EGFR 돌연변이 양성 NSCLC)이다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 L858R 돌연변이 및 엑손 19의 하나 이상의 결실을 가진 암(예를 들어, EGFR 돌연변이 양성 NSCLC)이다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 엑손 19의 하나 이상의 결실을 가진 암(예를 들어, EGFR 돌연변이 양성 NSCLC)이다. 일부 경우에, EGFR 돌연변이 암은 EGFR 유전자의 L858R 돌연변이를 갖는 암(예를 들어, EGFR 돌연변이 양성 NSCLC)이다.

[0736] EGFR 돌연변이를 갖는 NSCLC 환자의 대부분은 처음에 EGFR TKI 요법에 반응하지만, 1세대 EGFR TKI로 치료한 거의 모든 환자는 약 10개월의 무진행 기간 후에 내성을 획득한다. 아미노산 위치 790에서 트레오닌을 메티오닌으로 대체하는 2차 점 돌연변이(T790M)는 표적 키나제의 약물 내성 변이체를 생성하는 분자 기전이다. T790M 돌연변이는 1세대 및 2세대 EGFR TKI에 대한 획득 내성을 가진 폐암 환자의 약 절반에서 나타나며, TKI에 대한 친화도에 비해 아데노신 트리포스페이트에 대한 수용체의 친화도를 증가시킴으로써 작용하는 것으로 보고되었다(Suda, 2009).

[0737] 모든 활성화 EGFR 돌연변이가 본질적으로 EGFR 억제제에 민감한 것은 아니다. 엑손 20의 인프레임 염기쌍 삽입도 EGFR의 구성적 활성화를 초래하지만, 고전적 활성화 EGFR 돌연변이와 달리 EGFR 엑손 20 삽입은 현재 임상적으로 사용 가능한 EGFR 억제제에 대한 새로운 내성과 관련이 있다. EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이 NSCLC 환자에서

엘로티닙, 게피티닙 및 2세대 EGFR 억제제 아파티닙에 대한 3 내지 8%의 낮은 반응률이 보고되었으며, 따라서 효과적인 치료 옵션이 제한적이다(Vyse and Huang, 2019). 보고된 EGFR 엑손 20 삽입의 예로는 D761-E762 insX, A764-Y764 insX, Y764-V765 insX, V765-M766 insX, A767-S768 insX, S768-V769 insX, V769-D770 insX, D770-N771 insX, N771-P772 insX, P772-H773 insX, H773-V774 insX, V774-C775 insX가 있으며, 여기서 insX는 1 내지 7개 아미노산의 인프레임 삽입을 나타낸다.

[0738] 본원에서 입증된 바와 같이, 본원에 기재된 항-EGFR/cMET 접합체와 오시머티닙(3세대 EGFR TKI)을 포함하는 조합 치료는 L858R 돌연변이, 엑손 20 삽입 및 T790M 돌연변이가 있는 엑손 19 결실을 함유하는 것들을 포함한, 다양한 돌연변이 EGFR 암 모델에서 효과적인 종양 억제를 보였다. 따라서 본원에 기재된 조합 치료는 인간의 다양한 EGFR 돌연변이 암을 치료하는 데 효과적일 것으로 예상된다.

[0739] 일부 경우에, 치료를 받는 환자는 이전의 EGFR TKI와 같은 이전의 항암 요법으로 과거에 치료를 받았다. 일부 경우에, 인간 환자의 질환은 이전 EGFR TKI 치료 중 또는 이후에 진행되었다. 즉, 환자가 이전 EGFR TKI 치료에 대해 내성을 획득하였거나 이에 대해 내성이 있다. 일부 경우에, 치료를 받는 환자는 엘로티닙, 제피티닙, 라파티닙, 반데타닙, 아파티닙, 오시머티닙, 포지오티닙, 크리오티닙, 카보잔티닙, 카프마티닙, 악시티닙, 렌바티닙, 닌테다닙, 레고라페닙, 파조파닙, 소라페닙 및/또는 수니티닙 치료에 내성이 있거나 내성을 획득하였다. 일부 경우에, 인간 환자의 질환은 이전의 다른 EGFR TKI에 의한 치료 중 또는 이후에 진행되었다. 즉, 치료 중인 암은 오시머티닙 내성 암으로 분류된다. 상기 기재된 바와 같이, EGFR TKI 내성과 관련된 돌연변이에는 T790M 돌연변이와 엑손 20의 삽입이 포함된다. 다른 경우에, 치료를 받는 환자는 EGFR TKI 나이브 인간 환자(즉, 과거에 EGFR TKI로 치료를 받은 적이 없음)이다.

[0740] *치료 효과*

[0741] 암과 관련하여, 치료에는 완전한 암 관해를 포함한 암 성장 억제 및/또는 암 전이 억제, 그리고 암 재발 억제가 포함될 수 있다. 암 성장은 일반적으로 암 내에서 더욱 발달된 형태로의 변화를 나타내는 여러 지표 중 임의의 하나를 지칭한다. 따라서, 암 성장 억제를 측정하기 위한 지표에는 암 세포 생존의 감소, 종양 부피 또는 형태의 감소(예를 들어 컴퓨터 단층 촬영(CT), 초음파 촬영 또는 기타 이미징 방법을 사용하여 결정됨), 종양 성장 지연, 종양 혈관계의 파괴, 지연된 과민성 피부 검사의 성능 향상, 항암 면역 세포 또는 기타 항암 면역 반응의 활성 증가 및 종양 특이적 항원 수준의 감소가 포함된다. 개체의 암성 종양에 대한 면역 반응을 활성화하거나 강화하는 것은 암 성장, 특히 대상체에 이미 존재하는 암의 성장에 저항하는 개체의 능력을 향상시키고/시키거나 개체의 암 성장 경향을 감소시킬 수 있다.

[0742] 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다.

[0743] 암의 발생 또는 진행을 억제하는 주어진 조합 치료의 능력은 예를 들어 생체 내 모델을 사용하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 생체 내 모델은 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서 종양 성장을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 이 예시적인 방법의 추가 세부 사항은 실시예에 기재되어 있다.

[0744] 암 발달의 억제는 항체 분자 투여 후 더 느린 종양 성장의 관찰 또는 종양 크기의 감소, 예를 들어 종양 성장 억제(%TGI)를 측정함으로써 추론될 수 있다. %TGI는 항체 분자를 투여한 대상체에 대해 0일에 측정된 종양 크기를 연구 시간 종료 시 측정된 종양 크기와 비교하고, 이를 대조군 항체 분자가 투여된 대상체에 대해 동일한 기간에 걸친 종양 성장과 비교하여 측정할 수 있다. 이러한 방식으로, %TGI는 다음 식에 따라 치료군(TX)과 대조군(C) 간의 0일차에 대한 종양 성장 백분율로 정의할 수 있다: $\%TGI = (1 - (TX_{최종} - TX_{최초}) / (C_{최종} - C_{최초})) \times 100$.

[0745] 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 %TGI를 갖는다.

[0746] 암 발생의 억제는 항체 분자를 이용한 치료에 반응하여 암 증상의 지연 또는 예방된 발병 및/또는 감소된 중증도를 관찰함으로써 추론할 수 있다. 암 진행의 억제는 항체 분자를 이용한 치료에 반응하여 침습 및/또는 전이의 지연, 예방 및/또는 감소를 관찰함으로써 추론할 수 있다.

[0747] 본원에 기재된 조합 치료는, 치료(또는 적절한 대조군을 이용한 치료)가 없는 경우의 암의 발생/진행의 100% 미만, 예를 들어 99% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 1% 이하까지 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는, 치료(또는 적절

한 대조군을 이용한 치료)가 없는 경우의 암의 발생/진행 수준의 1배 미만, 예를 들어 ≤0.99배, ≤0.95배, ≤0.9배, ≤0.85배, ≤0.8배, ≤0.85배, ≤0.75배, ≤0.7배, ≤0.65배, ≤0.6배, ≤0.55배, ≤0.5배, ≤0.45배, ≤0.4배, ≤0.35배, ≤0.3배, ≤0.25배, ≤0.2배, ≤0.15배, ≤0.1배까지 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다.

[0748] 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는 개별적으로 투여된 단일 작용제(즉, 항체 분자 또는 EGFR TKI)의 사용보다 더 큰 정도로 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다. 본원에 기재된 조합 치료는, 항체 분자, 접합체 또는 EGFR TKI 단독으로 치료한 암의 발생/진행의 100% 미만, 예를 들어 99% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 1% 이하까지 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는, 항체 분자, 접합체 또는 EGFR TKI 단독으로 치료한 암의 발생/진행 수준의 1배 미만, 예를 들어 ≤0.99배, ≤0.95배, ≤0.9배, ≤0.85배, ≤0.8배, ≤0.85배, ≤0.75배, ≤0.7배, ≤0.65배, ≤0.6배, ≤0.55배, ≤0.5배, ≤0.45배, ≤0.4배, ≤0.35배, ≤0.3배, ≤0.25배, ≤0.2배, ≤0.15배, ≤0.1배까지 암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 조합 치료는 암의 발생 또는 진행을 억제하는 데 상승 효과를 발휘한다.

[0749] * * *

[0750] 구체적인 형태로 표현되거나 개시된 기능을 수행하기 위한 수단 또는 개시된 결과를 얻기 위한 방법 또는 공정의 관점에서 적절히 표현된, 전술한 설명, 또는 다음의 청구범위, 또는 첨부된 도면에 개시된 특징은, 개별적으로 또는 이러한 특징들의 임의의 조합으로, 본 개시내용을 이의 다양한 형태로 실현하는 데 이용될 수 있다.

[0751] 본 개시내용을 전술한 예와 함께 설명하였지만, 본 개시내용을 고려할 때, 여러 동등한 수정 및 변경은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 전술한 본 개시내용의 예시적인 예는 설명적이며, 제한하는 것이 아닌 것으로 간주된다. 기술된 예에 대한 다양한 변형이 본 개시내용의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다.

[0752] 의심을 피하기 위하여, 본원에 제공된 임의의 이론적 설명은 독자의 이해를 개선하기 위한 목적으로 제공된다. 본 발명자들은 이러한 이론적 설명 중 임의의 것에 의해 구애되기를 바라지 않는다.

[0753] 본원에서 사용되는 임의의 섹션 표제는 단지 구성적 목적을 위한 것으로, 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0754] 이어지는 청구범위를 포함한 본 명세서 전반에 걸쳐, 맥락상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 "포함한다", "포함하는"과 같은 변형들은 언급된 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 포함하나, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 배제하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0755] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 맥락상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함함을 인식해야 한다. 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값에서부터, 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로서 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 예는 그 하나의 특정 값에서부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값들이 근사치로서 표현될 때, 선행어 "약"의 사용에 의해, 이 특정 값이 또 다른 예를 형성함이 이해될 것이다. 수치 값과 관련하여 용어 "약"은 선택적이고, 예를 들어, +/- 10%를 의미한다.

[0756] **실시예**

[0757] ***실시예 1 - RAA22/B09 DuetMab 설계 및 구축***

[0758] 이 실시예는 EGFR과 cMet 둘 모두와 결합할 수 있는 이중특이적 항체 분자의 생성을 설명한다.

[0759] *1.1 항-cMET 항체 0021U3-B09의 단리 및 확인*

[0760] cMET-특이적 scFv 항체는 기본적으로 기재된 바와 같이 재조합 포유동물 발현 비오티닐화 단량체 인간 cMET(MedImmune)에 대한 일련의 반복된 패닝 선택 주기에서 대규모 나이브 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리하였다(Vaughan, 1996). 선택 출력의 라운드 2로부터의 scFv를 박테리아 주변세포질에서 발현시키고 HGF:cMET HTRF®(균질 시간 분해 형광) 리간드 수용체 억제 결합 분석에서 인간 cMET 수용체와 HGF 리간드의 결합을 억제하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 강력한 억제 효과를 나타내는 상위 히트를 선택하고 DNA 서열 분석을 수행하였다. 그런 다음 고유한 유전자를 인간 면역글로불린 G2(IgG2) 항체로 전환시켜 기본적으로 기재된 바와 같이 포유동물 세포에서 생산하였다(Persic; 1997). 그런 다음 HGF:cMET HTRF® 결합 분석에서의 억제 효

과를 기초로 정제된 항체의 순위를 매겼다. 추가 특성화를 위해 가장 강력한 항체인 0021U3-B09를 선택하였다.

[0761] *1.2 항-cMET 항체 0021U3-B09의 최적화.*

[0762] 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위해, 0021U3-B09의 가변 프레임워크 영역에 있는 비-Vernier 프레임워크 잔기(Foote and Winter 1992)를 특이적으로 표적화하고 가장 가까운 인간 생식계열 서열과 일치하도록 변경했다. VH 영역에서는 기준 인간 생식계열 서열 IGHV1-8*01과 일치하도록 7개의 아미노산 잔기가 돌연변이되었다. VL 영역에서는 기준 인간 생식계열 서열 IGKV1-5*03과 일치하도록 3개의 잔기가 돌연변이되었다. VH 및 VL 영역의 모든 잔기는 활성 손실 없이 성공적으로 생식계열 잔기로 변경되었다. 0021U3-B09는 기본적으로 기재된 바와 같은 혼성화 기반 돌연변이 유발 방법을 사용하여 친화도 최적화되었다(Kunkel 1985). 0021U3-B09 서열로부터 유래된 대규모 scFv 라이브러리는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 VH 상보성 결정 영역 3(CDR3)의 올리고뉴클레오티드 특이적 돌연변이 유발에 의해 생성되었다. 라이브러리에 친화도 기반 용액 상 선택을 적용하여 인간 및 시노몰구스 cMET 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 변이체를 선택하였다. CDR 표적화 선택 출력으로부터의 조 scFv 함유 주변세포질 추출물을 HGF:cMET HTRF® 결합 분석에서 개선된 억제 활성에 대해 스크리닝하였다. 모 0021U3-B09에 비해 상당히 개선된 억제 효과를 나타내는 변이체를 DNA 서열 분석하고 고유한 유전자를 인간 IgG2로 전환시켰다. 그런 다음, 정제된 항체를 억제 효과를 기초로 하여 순위를 매겼다. 추가 특성화를 위해 가장 강력한 항체인 B09-57를 선택하였다.

[0763] *1.3 항-EGFR 항체 Tdev-0004의 단리 및 확인.*

[0764] EGFR-특이적 scFv 항체는 기본적으로 기재된 바와 같이 재조합 포유동물 발현 비오티닐화 단량체 인간 EGFR(MedImmune)에 대한 일련의 반복된 패닝 선택 주기에서 대규모 나이브 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리하였다(Vaughan, 1996). 선택 출력의 라운드 3으로부터의 scFv 디스플레이 파지를 ELISA에서 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 교차 반응성을 보이는 상위 히트를 선택하고 DNA 서열 분석을 수행하였다. 그런 다음 고유한 유전자를 인간 면역글로불린 G1(IgG1) 항체로 전환시켜 기본적으로 기재된 바와 같이 포유동물 세포에서 생산하였다(Persic, 1997). 그런 다음 정제된 항체를 유세포 분석에 의해 EGFR 발현 세포주 A431과의 결합을 기준으로 순위를 매겼다. 특이적 세포 결합을 나타내는 항체 Tdev-0004를 추가 특성화를 위해 선택하였다.

[0765] *1.4 항-EGFR 항체 Tdev-0004의 최적화.*

[0766] 변이체 RAA22 및 QD6은 항-EGFR Tdev-0004 mAb를 최적화하여 유도되었다. Tdev-0004의 VL 프레임워크는 기준 인간 생식계열 서열 IGLV2-11*01/IGLJ2와 100% 일치했으나 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGLV2-11*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p 참조), VH 프레임워크는 가장 가까운 인간 생식계열 IGHV1-69*01/JH4와 79%의 상동성을 가졌다 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGHV1-69*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p 참조). 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위해, VH 영역은 처음에 13개의 비-생식계열 프레임워크 잔기를 모두 돌연변이시켜 완전히 생식계열화했다. 생식계열화 시, 완전히 생식계열화된 변이체와 시노몰구스 EGFR의 결합은 상당히 손상되었다. 시노몰구스 EGFR과의 결합을 복원하기 위해 4개의 비-생식계열 잔기 K68, I73, R76 및 T78을 선택적으로 역돌연변이시켰다. 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링 체계(Kabat and Wu 1991)에 따라 넘버링된다. 결과적으로 H4라는 이름의 부분적으로 생식계열화된 변이체를 친화도 최적화를 위한 주형 서열로 사용하였다. 변이체 H4는 제조업체의 지침에 따라 QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent)를 사용하여 6개 CDR 모두의 간소한 돌연변이 유발에 의해 친화도 최적화되었다. 단일 아미노산 돌연변이 유발된 VH 및 VL 라이브러리를 박테리아에서 Fab 단편으로 발현시키고 ELISA에서 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 향상된 결합에 대해 스크리닝하였다. 모 H4에 비해 개선된 결합을 나타내는 변이체를 DNA 서열 분석하고 고유한 유전자를 인간 IgG1로 전환시켰다. 변이체 RAA22는 CDRH3의 단일 돌연변이로 확인되었다. 친화도를 더욱 향상시키기 위해 개별 양성 돌연변이를 조합하여 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 결합이 향상된 변이체에 대해 스크리닝된 조합 라이브러리를 생성하였다. 변이체 QD6은 CDRL2, CDRL3 및 CDRH3에서 4개의 조합된 돌연변이로 확인되었다.

[0767] *1.5 1가 이중특이적 항-EGFR/cMET DuetMab 항체의 생성.*

[0768] 항-cMET mAb B09-57 및 항-EGFR mAb RAA22 및 QD6의 가변 도메인은 DuetMab 플랫폼의 백본에서 1가 이중특이적 항-EGFR/cMET 항체의 구축을 위해 활용되었다(Mazor, 2015). 구체적으로, 항-cMET B09-57의 VH 유전자를

"노브" 돌연변이(T366W) 및 대안적인 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V)를 운반하는 인간 감마-1 불변 중쇄에 삽입하였다. B09-57의 VL 유전자는 "노브" 중쇄와 쌍을 형성하도록 설계된 상응하는 대안적인 쇄간 시스테인 돌연변이(S121C 및 C214V)를 운반하는 인간 카파 불변 도메인에 인 프레임(in frame)으로 삽입되었다. 유사하게, 항-EGFR RAA22 및 친화도 최적화된 QD6의 VH 유전자는 "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V)를 운반하는 인간 감마-1 불변 중쇄에 삽입되었으며, RAA22 및 B09-57의 VL 유전자는 "홀" 중쇄와 쌍을 이루도록 설계된 인간 람다 불변 도메인에 프레임으로 삽입되었다. 또한, "노브" 및 "홀" 중쇄의 CH3 도메인에 있는 2개의 잔기가 시스테인으로 돌연변이되어("노브"의 S354C 및 "홀"의 Y349C) 안정화된 이황화 브릿지를 형성했다. Fc 도메인은 말레이미드 함유 세포독성 약물의 부위 특이적 접합을 가능하게 하도록 설계된 세린 239(C239i/"Maia") 뒤에 시스테인 삽입을 전달하도록 추가로 조작되었다(Dimasi, 2017). 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링 체계(Kabat and Wu 1991)에 따라 넘버링된다. 조립된 1가 이중특이적 항-EGFR/cMET DuetMab 항체를 RAA22/B09-57 및 QD6/B09-57로 명명하였다(**도 1**). DuetMab 항체는 이전에 기재된 바와 같이(Mazor, 2017) 포유동물 세포에서 생산하였다.

[0769] 본 실시예에 따라 생산된 DuetMab의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 다음 표에 제공된다:

	RAA22/B09-57	QD6/B09-57
EGFR 중쇄	56	53
c-Met 중쇄	50	50
EGFR 경쇄	58	55
c-Met 경쇄	52	52

[0770]

[0771] ***실시예 2 - 생화학적 및 생물물리학적 특성***

[0772] 이 실시예에서는 RAA22, QD6 및 B09-57 단클론 항체와 RAA22/B09-57 및 QD6/B09-57 이중특이적 항체 분자(각각 EGFR 및 c-Met에 대한 결합 친화도 및 두 항원과 동시에 결합하는 능력 포함)의 다양한 생화학적 및 생물물리학적 특성을 테스트한다.

[0773] *2.1 EGFR 및 cMET에 대한 DuetMab 및 모 mAb의 결합 친화도.*

[0774] 재조합 인간, 시노몰구스 원숭이 및 뮤린 EGFR 및 cMET 항원에 대한 EGFR-cMET DuetMAb의 동역학 속도 상수(kon 및 koff) 및 평형 해리 상수(K_D)는 BIAcore T200 기기(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)에서 항체 포획 분석을 사용하여 SPR에 의해 25℃에서 결정하였다. 마우스 항-인간 IgG를 약 2000의 공명 단위(RU)의 최종 표면 밀도를 갖는 CM4 센서 칩에 고정하였다. 동일한 고정 프로토콜을 사용하여 이 센서 칩에 기준 유동 셀 표면도 준비하였다. 시험 및 대조 항목 항체는 기기 완충액(HBS-EP 완충액; 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA 및 0.005% P-20) 중 정제된 EGFR(0.27~200 nM 인간, 0.4~900 nM 시노 및 4~1000 nM 뮤린) 또는 cMET 단백질(0.27~66 nM 인간 및 0.27~22 nM 시노)의 3배 연속 희석물과 함께, 기기 완충액 중 5~20 nM로 제조하였다. 동역학 측정을 위해 순차적 접근법을 활용하였다. 먼저 항체를 포획 표면 위에 10 μL/분의 유속으로 주입했다. 포획된 항체의 결합이 안정화되면 단일 농도의 분석물을 포획 표면과 기준 표면 모두에 75 μL/분의 유속으로 주입했다. 결과적인 결합 반응 곡선은 결합 단계 데이터를 산출했다. 분석물 주입 후, 해리 단계 데이터 수집을 위해 흐름을 15분 동안 기기 완충액으로 다시 전환한 다음, 10 mM 글리신(pH 1.5)을 1분간 펄스로 제공하여 칩 상에 항체 포획 표면을 재생성하였다. 시험 및 대조 항목 항체에 대한 결합 반응은 각 분석물 농도의 2 반복구 주입으로 기록되었다. 또한 주입 시리즈 전반에 걸쳐 여러 번의 완충액 주입이 산재되어 있었다. 주입 아티팩트 및/또는 비특이적 결합 상호 작용에 대해 원시 데이터 세트를 수정하기 위해 기준 셀 반응과 함께 선택 완충액 주입을 사용했는데, 이는 일반적으로 "이중 참조"라고 한다. 수정된 결합 데이터는 전반적으로 1:1 결합 모델(Biacore T200 평가 소프트웨어 2.0, GE Healthcare, Pittsburgh, PA)에 맞춰졌다. 계산된 동역학 매개변수(k_{on} 및 k_{off})와 k_{off}/k_{on}으로 결정된 K_D가 **표 1**에 제시되어 있다.

표 1

EGFR 및 cMET 항원에 대한 DuetMab 및 모 IgG의 동역학

항체	항원	K_{on} (M^{-1} s^{-1})	K_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
RAA22 IgG	인간 EGFR	4.41×10^{4}	2.06×10^{-3}	46.6
	시노몰구스 원숭이 EGFR	3.54×10^{4}	6.01×10^{-3}	169.8
	마우스 EGFR	4.03×10^{4}	1.90×10^{-2}	488.0
	인간 cMET			
	시노몰구스 원숭이 cMET	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		
	마우스 cMET			
QD6 IgG	인간 EGFR	1.48×10^{5}	2.92×10^{-4}	2.0
	시노몰구스 원숭이 EGFR	1.14×10^{5}	2.88×10^{-4}	2.5
	마우스 EGFR	1.67×10^{5}	7.35×10^{-4}	4.4
	인간 cMET			
	시노몰구스 원숭이 cMET	ND		
	마우스 cMET			
B09-57 IgG	인간 EGFR			
	시노몰구스 원숭이 EGFR	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		
	마우스 EGFR			
	인간 cMET	5.63×10^{5}	8.82×10^{-4}	1.6
	시노몰구스 원숭이 cMET	1.04×10^{6}	1.94×10^{-3}	1.9
	마우스 cMET	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		
RAA22/B09-57 DuetMab	인간 EGFR	4.47×10^{4}	2.01×10^{-3}	45.0
	시노몰구스 원숭이 EGFR	2.78×10^{4}	5.48×10^{-3}	197.0
	마우스 EGFR	3.54×10^{4}	2.06×10^{-2}	575.4
	인간 cMET	4.43×10^{5}	9.86×10^{-4}	2.2
	시노몰구스 원숭이 cMET	9.74×10^{5}	2.12×10^{-3}	2.2
	마우스 cMET	ND		
QD6/B09-57 DuetMab	인간 EGFR	6.35×10^{4}	3.74×10^{-4}	5.9
	시노몰구스 원숭이 EGFR	2.10×10^{5}	5.85×10^{-4}	2.8
	마우스 EGFR	1.26×10^{5}	7.80×10^{-4}	6.2
	인간 cMET	4.25×10^{5}	6.96×10^{-4}	1.6
	시노몰구스 원숭이 cMET	9.58×10^{5}	2.06×10^{-3}	2.2
	마우스 cMET	ND		

*ND: 미결정. EGFR 및 cMET의 가용성 단량체 형태에 대한 동역학 측정은 BIACore 기기를 사용하여 수행하였다. K_D는 데이터의 비선형 적합으로부터 k_{off}/k_{on}의 비율로 계산하였다.

[0775]

[0776] 상기 데이터에서 볼 수 있듯이, 이중특이적 항체 분자 QD6/B09-57은 높은 친화도(약 2 nM kD)로 인간 c-Met 및 높은 친화도(약 6 nM kD)로 인간 EGFR과 결합하는 반면, 이중특이적 항체 분자 RAA22/B09-57은 유사하게 높은 친화도(약 2 nM kD)로 인간 c-Met와 결합하지만 QD6/B09-57에 비해 감소된 친화도(약 45 nM kD)로 인간 EGFR과 결합한다.

[0777] *2.2 EGFR 및 cMET에 대한 DuetMab의 동시 결합.*

[0778] 재조합 인간 EGFR 및 cMET 단백질에 대한 동시 결합 연구는 기본적으로 기재된 바와 같이 Octet384 기기에서 생물층 간섭계로 측정하였다(Mazor, 2015). 간략하게는, 분석 완충액[PBS pH 7.2, 3 mg/mL 소 혈청 알부민(BSA), 0.05% (v/v) Tween 20] 중 5 μg/mL의 His 태그가 붙은 cMET 항원을 처음에 NI-NTA 바이오센서에 포획하였다. 임의의 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척 단계에 이어, 각각의 로드된 바이오센서에 먼저 66 nM의 항체를 사용하고 그 다음에는 500 nM의 EGFR 항원을 사용하여 연속적인 결합 및 해리 상호 작용을 시켰다. 결합 및 해리 곡선은 Octet384 소프트웨어 v.9.0을 사용하여 데이터의 비선형 적합으로부터 계산하였다. **도 2**에 도시

된 바와 같이, DuetMab은 두 항원 모두에 대한 동시 결합을 입증한 반면, 모 항-cMET IgG는 cMET에만 특이적 결합을 나타냈고, 2개의 항-EGFR IgG는 cMET 로드된 센서에 대한 결합을 나타내지 않았다.

[0779] *2.3 EGFR 및 c-Met 특이성*

[0780] EGFR 및 cMET 종 파라로그 및 밀접하게 관련된 계열 구성원에 대한 특이성을 ELISA에 의해 결정하였다. 간략하게는, 항원 용액을 PBS 중에 1 μg/mL로 제조하고 50 μL를 절반 영역 ELISA 분석 플레이트에 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 0.005% Tween-20을 함유하는 PBS(PBS-T) 중 1% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 웰을 PBS-T로 4회 세척하였다. **도 3**에 제시된 바와 같이, 사용된 1차 항체는 다음과 같았다: R374(비결합 IgG1 이소형 대조군 항체), B09(항-cMET 항체), QD6(항-EGFR 항체), RAA22(항-EGFR 항체), QD6/B09(이중특이적 EGFR/c-MET DuetMAb), RAA22/B09(이중특이적 EGFR/c-MET DuetMAb), PaniX(항-EGFR 항체), MetMab(항-cMET 항체) 및 Mab11311(항-HER4 항체). HER4 결합 mAb 대조군인 MAB1131(이 시리즈는 1 μg/mL에서 시작함)을 제외하고 10 μg/mL에서 시작하여 0.002 μg/mL에서 끝나는 1:3 희석 시리즈로 PBS-T에 희석된 표시된 1차 항체 50 μL와 함께 웰을 인큐베이션하였다. 웰을 PBS-T로 4회 세척한 후, PBS-T에서 1:5000으로 희석된 염소 항-인간 Fab HRP-표지된 2차 항체 50 μl를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50 μl의 TMB 기질 용액을 모든 웰에 첨가하고 양성 대조군 웰에서 강한 신호가 관찰될 때까지 실온에서 5~30분 동안 인큐베이션하였다. 50 μl의 TMB 정지 용액을 모든 웰에 첨가하고 SpectraMax M5 마이크로플레이트 판독기에서 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. 데이터는 SoftMax Pro 5 소프트웨어에서 분석되었고, GraphPad Prism 7 그래프 소프트웨어를 사용하여 도표화하였다.

[0781] 종 교차 반응성을 결정하기 위해, ELISA 분석을 위에서 설명한 대로 수행하였다. **도 3a**에 도시된 바와 같이, 고친화도 EGFR IgG, QD6 및 1가 이중특이적 EGFR/cMET DuetMAb, QD6/B09는 인간, 시노몰구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 결합하여 ELISA 분석에서 강력한 신호를 제공했다. 대조적으로, 낮아진 친화도의 EGFR IgG, RAA22는 QD6에 비해 인간, 시노몰구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 더 약하게 결합했다. 마우스 EGFR에 대한 결합은 약했지만 검출 가능했다. 상응하는 1가 이중특이적 EGFR/cMET DuetMAb, RAA22/B09는 2가 모 IgG, RAA22에 비해 인간 및 시노몰구스 원숭이 EGFR에 대해 여전히 더 약한 결합 및 마우스 EGFR에 대한 명목상 결합을 보여주었다. cMET IgG, B09 및 모든 이중특이적 변이체는 인간 및 시노몰구스 원숭이 cMET에 대해 필적할만한 결합을 보여주었다. 마우스 cMET에 대한 임의의 항체의 검출가능한 결합은 없었다. 이러한 결과는 BIAcore 기기에서 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 결정된 결합 동역학과 일치한다(위의 표 1).

[0782] **도 3b**에 도시된 바와 같이, 모 IgG 또는 유도체 이중특이적 항체 중 어느 것도 EGFR HER 계열 단백질, HER2, HER3 또는 HER4 중 어느 것과도 주목할만한 결합을 나타내지 않았다. 유사하게, 어떠한 항체도 cMET 계열 구성원인 Ron(CD136) 또는 Semaphorin 3a에 대해 유의한 결합을 나타내지 않았다.

[0783] 이러한 결과는 모 IgG와 생성된 이중특이적 항체가 밀접하게 관련된 계열 종에 대한 검출 가능한 결합 없이 동족 표적에 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다.

[0784] *2.4 이중특이적 항체의 내재화*

[0785] AlexaFluor647(AF647) 1차 표지된 DuetMab: RAA22/B09 및 QD6/B09 항체의 내재화 동역학을 EGFR 및 c-MET 발현 세포주인 H1975를 사용하여 시험관 내에서 평가하였다. 각 항체는 세포에 미리 결합되었고 세포 표면에서 세포질로의 항체 전위는 생세포 공초점 형광 현미경을 사용하여 모니터링되었다. 두 항체는 모두 내재화 조건을 적용하기 전(T=0) 세포 표면에 주로 국소화되었고 1시간 후에는 세포질 영역으로 전위되었다(데이터 미도시). 내재화의 시간 경과에 따라 5분마다 동역학 이미지를 촬영하고 정량적 알고리즘을 사용하여 처리하여 내재화 동역학 상수 및 반감기를 결정하였다. 반감기가 각각 37.5 ± 10.6분 및 43.2 ± 15.5분으로, QD6/B09 및 RAA22/B09에 대한 내재화 동역학은 유사하였다.

[0786] 항체 내재화 방식을 평가하고 DuetMab의 전체 내재화에 대한 각 아암의 기여도를 조사하기 위해, 본 발명자들은 듀엣 QD6/B09에 대해 단일 아암 특이적 대조군 항체 분자인 QD6/IgG 및 B09/IgG, 그리고 EGFR과 c-MET를 모두 발현하는 H1975 세포에서 듀엣 RAA22/B09에 대해 RAA22/IgG 및 B09/IgG의 내재화를 평가했다. 오직 하나의 아암만이 표적 수용체에 특이적이기 때문에, 대조군 항체는 내재화 모드로서 이중 수용체 표적화 및 가교를 제거하는 하나의 수용체를 통해서만 내재화할 수 있다.

[0787] QD6/B09(**도 4a**) 및 RAA22/B09(**도 4b**)의 내재화 프로파일은 내재화에 대한 전형적인 프로파일인 세포질에서의 각각의 mAb-AF647 신호 증가와 함께 막 mAb-Fl647 신호의 일치하는 감소의 매우 유사한 패턴을 나타냈다. 그러나 이들의 단일 아암 구축물은 매우 상이한 내재화 프로파일을 보여주었다. 단일 아암 QD6/IgG는 QD6/B09 DuetMab

(**도 4a**, 왼쪽 및 중간)과 거의 동일한 내재화 시간 경과를 나타냈으며, 이는 QD6/B09 듀엣의 내재화가 B09-아암의 최소한의 기여와 함께 분자의 EGFR-아암에 의해 대부분 유도되었음을 나타낸다. 실제로, B09/IgG 구축물은 매우 낮은 수준의 내재화를 보여주었다(**도 4b**, 오른쪽). 막 신호의 빠르고 광범위한 감소는 세포질 신호의 매우 완만한 증가에 해당하며, 이는 아마도 세포 표면의 c-MET 수용체로부터 미리 결합된 B09/IgG의 광범위한 해리로 인한 것 같다. 이후 항체의 해리로 인해 B09/IgG가 보통 정도로 내재화되었다. 이러한 결과는 QD6/B09 듀엣의 내재화가 B09-아암의 최소한의 기여와 함께 분자의 EGFR-아암에 의해 대부분 유도되었음을 보여주었다.

[0788] 대조적으로, RAA22/B09 DuetMab은 단일 아암 대조군 항체와 비교할 때 매우 상이한 내재화 프로파일을 보여주었다. **도 4b**에서 볼 수 있듯이, 세포질 강도 값은 RAA22-IgG 및 B09-IgG보다 RAA22/B09 DuetMab에 대해 각각 10.98배 및 4.70배 더 높았다. B09/IgG의 비효율적인 내재화는 뚜렷한 해리에 기인할 수 있지만 RAA22/IgG는 빠른 내재화를 거쳤다. 그러나 EGFR-아암의 낮은 친화도로 인해 RAA22/IgG 분자의 수는 RAA22-B09 DuetMab에 비해 10.98배 적었다(형광 강도 기준). 단일 아암 구축물과 대조적으로 세포질에 유입되는 듀엣 RAA22/B09 mAb의 양이 현저히 증가한 것은 두 항체 아암이 내재화를 유도하기 위해 표적 수용체와 관여되어야 함을 입증했다. 이 발견은 QD6/B09 및 RAA22/B09 DuetMab이 서로 다른 내재화 메커니즘을 가지고 있음을 보여주며, QD6/B09는 주로 EGFR-아암에 의해 유도되지만 RAA22/B09는 관여를 위해 EGFR 및 c-MET 아암이 모두 필요하다.

[0789] 표적 수용체에 대한 EGFR 및 c-MET 아암의 결합은 H1975 세포에서 RAA22/B09 수용체 내재화를 촉진했기 때문에 본 발명자들은 증가된 수의 EGFR 및 c-MET 수용체가 내재화 특성에 영향을 미치는지를 조사하였다. 웨스턴 블롯에 의해 결정된 각각의 수용체 수준은 H1975 세포에서 EGFR의 경우 약 33,000, c-MET의 경우 약 50,000, HCC827 세포에서 EGFR의 경우 약 790,000, c-MET의 경우 약 523,000이었다. H1975(중간 수용체) 및 HCC827(높은 수용체) 세포에서 RAA22/B09의 내재화 프로파일은 HCC827 세포에서 현저하게 증가된 내재화를 보여준다(**도 5**).

[0790] EGFR 및 c-MET RAA22/B09의 전체 수준이 각각 23.9배 및 10.4배 증가한 것에 상응하여 예상된 바와 같이, HCC827 세포에 대한 결합은 H1975보다 평균 8.9배 더 높았다(T=0, $3.1x10^7$ MFI 대 $3.5x10^6$ MFI). 내재화 수준(최고 세포질 강도로 판단)은 HCC827 세포에서 21.7배 더 높았으며, 이는 높은 수준의 표적 수용체를 발현하는 세포에서 유의하게 더 높은 농도의 항체가 세포질로 유입됨을 시사한다. 중요한 것은 현저하게 다른 강도 외에도 내재화 프로파일(시간 경과에 따른 막 및 세포질 신호)도 HCC827과 H1975 세포 간에 크게 구별된다는 점이다. 고발현 HCC827 세포에서, RAA22/B09-AF647 막 신호의 감소는 RAA22-B09 세포질 신호의 상호 증가와 합치하였으며, 시간 경과에 따라 전체 RAA22/B09 신호는 유지되었는데, 이는 두 수용체 모두와의 강력한 이중 아암 항체 상호 작용 및 후속 내재화를 나타낸다. H1975 세포에서는 전체 강도와 막 강도가 동시에 감소했는데, 이는 미리 결합된 항체의 일부가 세포 표면에서 해리되어 세포 내부로 내재화되지 못했을 수 있다는 것을 나타낸다. 단일 아암 관여가 효과적인 결합을 제공하지 않고 해리되기 쉬운 HCC827 세포에서 RAA22/IgG 및 B09/IgG의 내재화에 대해 해리를 나타내는 유사한 프로파일이 관찰되었다(**도 6a** 및 **도 6b**). 이 데이터는 RAA22/B09가 H1975 세포에서 내재화될 때 수용체 상호 작용의 혼합 모드(단일 아암 및 이중 아암 관여)가 존재함을 시사했다. 종합하면, 이러한 데이터는 표적 세포 수용체 발현 수준이 RAA22/B09 내재화의 정도와 효율을 결정하는 중요한 결정 요인임을 시사한다.

[0791] ***실시예 3 - ADC의 시험관 내 효능***

[0792] 이 실시예에서는 EGFR/cMET 이중특이적 ADC의 시험관 내 효능을 암 세포주 패널에서 측정하였다.

[0793] *3.1 부위 특이적인 접합*

[0794] RAA22/B09 항체 분자에 대한 튜불라이신 약물의 접합은 기본적으로 문헌[Thompson, 2016] 및 US20150291657A1에 이전에 기재된 대로 수행하였다.

[0795] *3.2 ADC 세포독성 활성 결정 방법*

[0796] ADC 세포독성 활성을 다음과 같이 여러 세포주에서 테스트하였다. 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 권장 배양 배지에 100 μL의 부피로 96웰 플레이트의 웰당 10,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 테스트할 항체의 각 용량의 3X 농도를 배양 배지에서 항체 스톡을 연속적으로 희석하여 준비하였다. 최종 항체 농도가 60 nM 내지 0.0009 nM 범위가 되도록 각 테스트 항목 50 마이크로리터를 세포에 3 반복구로 추가하였다. 처리된 세포를 가습 인큐베이터에서 37℃에서 72시간 동안 배양하였다. 대사 활성을 제조업체의 지침에 따라 Promega의 CellTiter-Glo 발광 생존력 분석을 사용하여 결정하였다. 데이터는 미처리 대조군과 비교한 대사 활성 백분율로 도표화되었다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 최대 생존율(미처리 세포)과 최대 반응(최고 억제) 사이

의 로지스틱 비선형 회귀 분석을 사용하여 IC_{50} 값을 결정하였다.

[0797] *3.3 결과 - 세포주 패널의 시험관 내 ADC 활성*

[0798] EGFR/cMET 이중특이적 ADC의 시험관 내 효능을 CellTiter-Glo 발광 생존력 분석을 사용하여 암 세포주 패널에서 측정하였다. **표 3**에 나타난 바와 같이, 더 높은 친화도의 QD6/B09-AZ1508과 낮아진 친화도의 RAA22/B09-AZ1508은 모두 다양한 표적 발현 수준에서 세포주 전체에 걸쳐 광범위한 활성을 나타냈다.

표 3

EGFR-cMET DuetMAb ADC의 시험관 내 활성

[0799]

세포주	상대 EGFR 밀도	상대 cMET 밀도	고친화도 ADC QD6/B09-AZ1508		낮아진 EGFR 친화도의 ADC RAA22/B09-AZ1508	
			IC50 (pM)	최대 %억제	IC50 (pM)	최대 %억제
HCC 827 모	1, 513, 899	236, 933	96	79%	132	55%
NCI H596	938,023	28,353	274	54%	3,237	67%
HCC 827 GR 풀	760, 040	523, 298	33	66%	168	59%
A549	88, 385	16, 483	118	45%	667	36%
NCI H1792	63,820	20,658	81	80%	200	81%
NCI H1975	33, 086	50, 339	178	65%	255	65%
NCI H292	96,538	16,497	91	79%	271	62%
A427	20,236	9,734	6,959	12%	40,220	58%
NCI H358	15,065	16,429	168	29%	3,017	30%
NCI H23	9,843	21,669	>60,000	약 5%	8,096	46%
NCI H661 (Ag 음성)	ND ~ 9,906	ND ~ 8, 114	>60,000	0	>66,667	10%

[0800] 전반적으로, EGFR에 대해 낮아진 친화도를 갖는 ADC는, 상당한 양의 EGFR 및 cMET 둘 다를 공동 발현하는 광범위한 세포주에서 다소 감소하기는 하지만 비슷한 효능을 나타냈다. 일반적으로, 두 ADC 모두 하나의 표적 또는 나머지 표적이 세포 표면에서 약 15,000 이하의 낮은 상대 수용체 밀도를 가질 경우 감소된 효능을 나타냈다. 이 효과는 낮아진 수준의 cMET에 더 민감한 것으로 보이는 낮아진 친화도의 변이체에서 더욱 두드러졌다.

[0801] ***실시예 4 - ADC의 이중특이적 관여***

[0802] 최적의 ADC 전달을 위해 낮아진 친화도의 EGFR-cMET 항체의 이중특이적 관여가 필요하다는 가설을 추가로 테스트하기 위해, 본 발명자들은 이중특이적 ADC의 활성에 대한 개별 항체 아암의 상대 기여도를 결정하기 위해 시험관 내 실험을 수행하였다. 첫 번째 실험에서, 과량의, 아암이 없는 모 항체를 사용하여 EGFR 또는 cMET를 차단한 다음, 시험관 내 세포독성 분석에서 이중특이적 EGFR-cMET ADC의 활성을 측정하였다. 이 실험을 위해, 중간 수준의 EGFR과 cMET를 대략 동일한 양으로 발현하는 세포주를 사용하였다. 이중특이적 ADC의 개별 아암이 ADC를 전달하기 위해 독립적으로 기능하는 경우, 이 세포주에서 두 표적 중 하나를 차단하면 ADC의 활성이 약간만 감소하여 IC_{50}이 2배 이하로 변화할 것으로 예상되는데, 표적들이 유사한 수준으로 존재하기 때문이다. 반면에, ADC가 세포 내로 ADC를 효과적으로 전달하기 위해 이중 표적 관여를 필요로 하는 경우, 두 표적 중 하나를 차단하면 이중특이적 ADC의 활성에 더 큰 영향을 미칠 가능성이 높다. 관련 실험에서, 이중특이적 EGFR-cMET

ADC의 활성을 EGFR 또는 cMET에 대한 하나의 결합 아암과 하나의 비결합 이소형 항체 대조 아암으로 구성된 1가의 단일특이적 대조군 항체와 비교하였다. 마찬가지로, 각 아암이 독립적으로 기능하는 경우, 예상되는 결과는 각각의 단일특이적 대조군 ADC가 이중특이적 ADC보다 약간 덜 강력할 뿐이며 그 차이는 가산적일 것이다. 대안적으로, 이중특이적 ADC의 두 개의 아암이 상승적으로 기능하는 경우, 단일특이적 대조군 항체와 비교하여 이중특이적 ADC의 활성 차이가 더 클 것으로 예상할 수 있다.

[0803] *4.1 방법*

[0804] ADC의 세포독성 활성을 NCI-H1975 세포주에서 다음과 같이 테스트하였다. 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 권장 배양 배지에, 차단 실험의 경우 50 μL, 1가 ADC 실험의 경우 100 μL의 부피로 96웰 플레이트의 웰당 10,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 아암이 없는 mAb 차단 실험의 경우, EGFR IgG(RAA22) 또는 cMET IgG(B09)의 300 μg/mL 용액 50 μL를 웰에 추가하고 가습 인큐베이터에서 37℃에서 1시간 동안 사전 인큐베이션하였다. 테스트할 항체의 각 용량의 3X 농도를 배양 배지에서 항체 스톡을 4X로 연속적으로 희석하여 준비하였다. 50 마이크로리터의 배지 단독, 이소형 대조군 IgG ADC(R347-AZ1508) 또는 EGFR-cMET ADC(RAA22/B09-AZ1508)를 세포에 3 반복구로 추가하여 최종 항체 농도가 67 nM에서 0.0009 nM의 범위가 되도록 하였다. 1가 ADC 실험의 경우, 이소형 대조군 ADC(R347-AZ1508), 1가 EGFR ADC(RAA22/R347-AZ1508), 1가 항-cMET ADC(B09/R347-AZ1508), 1가 ADC의 등몰 조합, 또는 EGFR-cMET ADC(RAA22/B09-AZ1508)의 3X 스톡 50 μL를 60 nM에서 시작하여 0.009 nM에서 끝나는 4X 희석 시리즈로 3 반복구로 추가하였다. 처리된 세포를 가습 인큐베이터에서 37℃에서 72시간 동안 배양하였다. 대사 활성을 제조업체의 지침에 따라 Promega의 CellTiter-Glo 발광 생존력 분석을 사용하여 결정하였다. 데이터는 미처리 대조군과 비교한 대사 활성 백분율로 도표화되었다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 최대 생존율(미처리 세포)과 최대 반응(최고 억제) 사이의 로지스틱 비선형 회귀 분석을 사용하여 IC_{50} 값을 결정하였다.

[0805] *4.2 결과 및 결론 - 이중 표적화에 대한 시험관 내 개념 증명(mAb 차단 실험 및 1가 ADC)*

[0806] 위에서 개략한 바와 같이, 이중특이적 ADC의 세포독성 활성에 대한 개별 항체 아암의 상대 기여도를 조사하기 위해 시험관 내 실험을 수행하였다. **도 7**의 대표적인 실험에 나타난 바와 같이, NCI H1975 세포를 cMET IgG RAA22로 전처리하자 EGFR-cMET ADC(RAA22/B09-AZ1508)의 IC_{50}이 대략 60 pM에서 약 60배 차이의 3,480 pM로 변동되었다. 항-cMET IgG B09로 처리하자 IC_{50}이 11배가 넘는 차이의 680 pM로 변동되었다. 마찬가지로, NCI H1975 세포를 1가 단일특이적 EGFR ADC(RAA22/R347-AZ1508)로 처리한 경우, IC_{50}은 약 20,500 pM로, 이중특이적 EGFR-cMET ADC의 경우 316 pM인 것에 비해 약 65배 정도 차이가 났다(**도 8**). 1가 단일특이적 항-cMET ADC(B09/R347-AZ1508)의 IC_{50}은 2,772 pM로, 이중특이적 항체 대비 약 13배의 차이가 났다.

[0807] 종합적으로, 이러한 데이터는 두 표적을 공동 발현하는 종양 세포에 대한 EGFR-cMET ADC의 효율적인 표적화가 주로 ADC의 이중특이적 관여에 의해 유도된다는 것을 시사한다. 더욱이, 이러한 결과는 cMET 아암이 아암이 없는 항체에 의해 차단될 경우 효능의 극적인 감소 및 1가 EGFR 대조군 ADC인 RAA22/R347-AZ1508의 약한 세포독성에 의해 입증된 바와 같이, EGFR 친화도가 감소된 결합 아암이 cMET 결합이 없는 경우 효율적인 ADC 전달을 촉진하기에는 불충분함을 보여준다. 이를 종합하면, 이러한 결과는 이중특이적 ADC(RAA22/B09-AZ1508)의 EGFR 결합 아암의 감소된 친화도가 EGFR 및 cMET 공동 발현 종양에 대한 ADC 전달을 촉진하는 한편, 표적들 중 하나만을 주로 발현하는 세포에 대한 감소된 세포독성을 나타낼 것이라는 가설과 일치한다. 이 효과는 EGFR만 관여에 이용할 수 있을 경우 가장 두드러지며, 이는 유의한 수준의 EGFR을 발현하지만 상대적으로 cMET를 거의 발현하지 않는 피부와 같은 정상 기관에서 EGFR에 의한 독성을 완화하는 데 영향을 미친다.

[0808] ***실시예 5 - 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서의 ADC 생체 내 약리학***

[0809] 인간 암의 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델은 종양 세포주 기반 종양 이종이식편에 대한 잘 확립된 대안이 되었다. PDX 모델은 면역결핍 마우스에 직접 이식된 환자의 원발성 종양 조직에서 확립되어 마우스에서 생체 내 전파된 종양을 생성한다. 이렇게 유래된 종양은 연구 마우스를 이식하는 데 사용할 수 있는 저계대 PDX 종양 조직 은행을 설립하기 위해 시험관 내에서 배양하지 않고 추가 마우스에서 후속적으로 전파된다. PDX 모델의 주요 특징 중 하나는 이들이 대체로 조직학적 및 게놈 이질성을 유지하고 상응하는 원래 환자 종양의 유전자 발현 프로파일을 보존한다는 점이다. 시험관 내 성장에 적응된 종양 세포의 클론 집단을 사용하는 종양 세포주 기반 이종이식편 모델과 비교하여, PDX 모델의 특성은 실제 인간 종양의 특징을 보다 정확하게 복제하여 전임상 마우스 모델의 예측값을 개선하고자 한 것이다. 실제로, 다수의 연구에 따르면 표준 치료 치료법에 대한 PDX 모델의 반응 및 내성 프로파일은 주어진 종양 프로파일을 가진 인간 대상체의 임상 데이터와 밀접하게 연관되어 있는 것

으로 나타났다.

[0810] PDX 모델이 제공하는 개선에도 불구하고, PDX 모델에 적용하는 경우에도 표준 생체 내 약리학 연구 설계에는 한계가 있다. 각 종양 모델에 대해 일반적인 연구에서는 모델 내 통계를 뒷받침할 만큼 치료군당 충분한 마우스를 사용하여 하나 이상의 양성 또는 음성 대조군 화합물과 함께 여러 용량 수준에서 약물 치료를 테스트한다. 이러한 연구 설계에 사용되는 상대적으로 많은 수의 마우스와 PDX 모델의 높은 비용으로 인해, 주어진 화합물에 대해 실제로 테스트할 수 있는 종양 모델의 수가 제한될 수 있다. 전통적인 연구 설계에 대한 대체/보완적 접근법은 인간 임상 시험 설계의 스타일을 따른 모집단 기반 접근법인 마우스 PDX 시험이다. 이 접근법에서, 각 화합물에 대해, 단일 마우스는 일반적으로 각 모델에 대한 선택적 치료 대조군과 함께 이전 용량 범위 발견 연구에서 확립된 단일 용량 수준으로 치료된다. 각 모델에 필요한 마우스 수가 적기 때문에 각각 고유한 인간 종양을 대표하는 많은 PDX 모델을 테스트할 수 있다. 모델 내 통계에 의존하는 대신, 테스트된 종양 모델의 전체 모집단에 걸쳐 반응을 평가한다. 이 접근법은 다양한 범위의 표적 발현, 분자 표현형, 종양 하위 유형 또는 기타 임상적으로 관련된 관심 특징에 걸쳐 반응률을 보다 정확하게 추정할 수 있다. 또한, PDX 시험에서 테스트할 수 있는 다수의 고유한 모델을 통해 보다 의미 있는 탐색적 유전체학, 전사체학 또는 발현 프로파일링 연구를 통해 반응 또는 내성 상관 관계에 대한 조기 검색을 시작할 수 있다. 여기에 개략된 예시적인 연구를 위해, 표적 발현 수준이나 분자 표현형에 관계없이 START Discovery에서 사용 가능한 모든 NSCLC 모델을 테스트하는 "모든 대상" 접근법을 사용하였다.

[0811] *5.1 방법*

[0812] 마우스 PDX 시험은 South Texas Accelerated Research Therapeutics(START, San Antonio, TX)에서 수행되었다. START는 AAALAC International(Association for the Assessment and Accreditation of Labortory Animal Care International)의 인증을 받았으며 동물 관리 및 복지에 관한 AstraZeneca 글로벌 표준을 준수한다. 모든 모델은 START에서 개발되었다. 환자 유래 이종이식편(START-PDX) 모델은 생존 가능한 인간 종양 조직 또는 체액으로부터 확립되었으며 종양 이질성을 유지하기 위해 제한된 횟수로 동물에서 연속적으로 계대되었다. 무흉선 누드(Crl:NU(NCr)-Foxn1nu)/CB-17 Scid(CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrl) 마우스의 옆구리에 숙주 동물로부터 수확한 종양 단편을 한 쪽으로 이식했으며, 각각은 특정 계대 로트에서 이식하였다. 연구 전 종양 부피는 예상 시작일로부터 대략 1주일 전부터 기록되었다. 종양이 적절한 종양 부피 개시(TVI) 범위(125~250 mm^3)에 도달하면, 동물을 치료군과 대조군으로 무작위 배정하고 정맥(IV) 투여를 시작했다(0일). 연구 전반에 걸쳐 동물을 개별적으로 추적했다. 최초 투여는 0일에 시작하였다. 모든 군의 동물에게 중량 기준(그램당 0.01 ml; 10 ml/kg) I.V. 투여하였다. 약물 처리된 동물에게 총 4회 용량으로 7일마다 투여하였다. 0일부터, 종양 크기를 디지털 캘리퍼로 측정하고, 각 치료 동물과 대조군 동물에 대해 추정 종양 부피를 기록했다. 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산하였다: TV= $폭^2$ x 길이 x 0.52. 최종 용량 후 1주일 동안 종양 성장 관찰이 계속되었다. 각 동물은 종양 부피(TV) 종점(종양 부피 ≥$1cm^3$) 달성 또는 연구 시간 종점인 28일 중 먼저 도래하는 시점에 희생되었다. 종양이 느리게 성장하는 일부 PDX 모델의 경우 관찰 기간이 연장되었다. 종양 성장 억제(%TGI)는 다음 식에 따라 치료군(TX)과 대조군(C) 간의 0일차에 대한 종양 성장 백분율로 정의되었다: $\%TGI = 1 - (TX_{최종} - TX_{최초}) / (C_{최종} - C_{최초})$. 종양 퇴행 퍼센트는 0일의 종양 부피(최초 용량일)에 비해 치료된 동물에서 종양의 종양 감소 퍼센트로 정의되었고, 다음 식에 따라 연구 종점에서 계산되었다: $\%퇴행 = (TX_{최종\ 평균} - TX_{최초\ 평균})/(TX_{최초\ 평균}) \times 100$.

[0813] *5.2 결과 및 결론*

[0814] **도 9**에 나타낸 바와 같이, 높은 친화도의 EGFR-cMET ADC인 QD6/B09-AZ1508과 EGFR에 대해 낮아진 친화도의 변이체인 RAA22/B09-AZ1508은 모두 테스트된 다수의 PDX 모델에서 종양 성장 억제 또는 퇴행을 유도했다. 놀랍게도, 낮아진 친화도의 ADC는 더 높은 친화도의 ADC와 비교하여 관찰된 반응의 수와 깊이가 증가하는 전반적인 경향을 보여주었다. 이러한 활성 경향은 낮은 cMET 발현과 어느 정도 상관 관계가 있는 낮아진 친화도의 ADC에 가장 적게 반응하는 PDX 모델의 경우 약간 반전되었다. 이러한 관찰은 낮아진 친화도의 EGFR-cMET ADC의 활성이 부분적으로 cMET 발현 수준에 의해 좌우되었을 가능성을 높인다. 두 이중특이적 항체 모두의 EGFR 결합 아암은 동일한 마우스 EGFR 교차 반응성 항체로부터 유래되었다(**실시예 1** 참조). 마우스 EGFR에 대한 QD6/B09 항체의 고유 결합 친화도는 대략 6 nM인 반면, RAA22/B09 이중특이적 항체의 친화도는 대략 575 nM이었다. 낮아진 EGFR 친화도의 활성의 예상치 못한 개선은 피부와 같은 정상 조직에서 EGFR 싱크의 영향이 감소하여 ADC의 전체 순환 노출이 더 높아졌기 때문일 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 데이터는 EGFR-cMET 이중특이적 항체의 EGFR에 대한 친화도의 감소가 생성된 ADC의 생체 내 효능을 손상시키지 않았지만, 친화도가 더 높은 ADC와 비교하여 예

기치 않게 활성을 향상시켰음을 입증한다.

[0815] *5.3 다양한 용량의 PDX 연구*

[0816] PDX 모델에서 ADC의 다양한 용량을 테스트하기 위해 추가 실험을 수행하였다. 이 실험은 실시예 5.1에 설명된 대로 수행되었다. 단, ≥2 cm^3의 종양 부피에 도달한 개별 마우스는 연구에서 제외하고 평균이 부피 종점에 도달하거나 연구가 63일의 시간 종점에 도달할 때까지 최종 측정값을 군 평균에 포함시켰다. 예시된 연구의 경우, 높은 친화도의 EGFR-cMET ADC인 QD6/B09-AZ1508은 1 및 2 mg/kg의 용량 수준에서 테스트되었으며, EGFR에 대한 낮아진 친화도의 변이체인 RAA22/B09-AZ1508은 1, 2 및 3 mg/kg의 용량 수준에서 테스트되었다.

[0817] **도 10**에서 입증된 바와 같이, 높은 친화도의 EGFR-cMET ADC인 QD6/B09-AZ1508과 EGFR에 대해 낮아진 친화도의 변이체인 RAA22/B09-AZ1508은 모두 테스트된 용량에서 PDX 모델에서 종양 성장 억제 활성을 유도했다. 실시예 5.2에 기재되고 **도 9**에 도시된 결과에 따르면, 낮아진 친화도의 ADC는 일반적으로 고친화도의 ADC보다 더 효과적이었다. 테스트한 4개 모델 모두에서, 낮아진 친화도의 ADC는 2 또는 3 mg/kg 용량 수준에서 퇴행을 유도했으며, 이는 낮아진 친화도의 ADC가 적당한 용량에서 효과적임을 입증했다. 이들 데이터는 EGFR에 대한 EGFR-cMET 이중특이적 항체의 친화도를 감소시키는 것이 생성된 ADC의 생체 내 효능을 감소시키지 않고 오히려 더 높은 친화도의 ADC에 비해 생체 내 효능을 개선시켰다는 추가 증거를 제공한다.

[0818] ***실시예 6 - 동소 췌장 PDX 모델에서 ADC 효능***

[0819] 피하 생체 내 종양 모델은 항암제의 효능을 조사하기 위한 중심이다. 그러나 이 종양 이식 부위에는 생체 내 결과를 해석할 때 고려해야 할 여러 가지 제한 사항이 수반된다. 이러한 결함에는 종양의 혈관화, 및 종양의 성장과 반응에 있어 조직 특이적 간질의 부족이 포함된다. 이러한 과제를 해결하기 위해 본 발명자들은 췌장 PDX 모델 MEDI-PANC-08의 피하 모델과 동소 모델 모두에서 고친화도 및 저친화도 EGFR-cMET 이중특이적 항체-약물 접합체의 생체 내 효능을 비교했다. 이 종양의 성장을 동소적으로 추적하기 위해 이미징을 사용하여 성장을 추적할 수 있는 PDX 변이체(MEDI-PANC-08^{LUC})를 발현하는 루시퍼라제를 개발했다.

[0820] *6.1 방법*

[0821] 모든 실험은 실험실 동물의 인도적 치료 및 관리에 대한 MedImmune의 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee) 지침에 따라 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) 인증 시설에서 수행되었다. 이환율 및 사망률에 대해 동물을 매일 모니터링하였다.

[0822] 피하 PDX 모델

[0823] 본 연구에 사용된 MEDI-PANC-08 췌장 PDX 모델은 내부 MedImmune PDX 라이브러리에서 유래하였다. PDX 종양은 처음에 종자 NSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에서 전파되어 효능 연구에 도입하기에 충분한 종양 물질을 생성했다. 종양이 800~1200 mm^3에 도달하면 마우스를 CO_2 질식에 의해 인도적으로 안락사시켰다. 종양을 멸균 조건에서 분리하고 약 2 mm^3의 조각으로 자르고 11게이지 투관침 바늘을 사용하여 개별 NSG 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식했다. 크기가 약 150~250 mm3에 도달하면 마우스를 치료군으로 무작위화하고(종양 부피 기준) ADC(Q1Wx4)로 치료했다. 2개의 EGFR-cMET 이중특이적 ADC QD6/B09(높은 친화도) 및 RAA2/B09(낮은 친화도)를 1, 2 및 3 mg/kg에서 조사하였다. 이소형 대조군 ADC(R347-AZ1508)도 3 mg/kg에서 테스트되었다. 모든 항체-약물 접합체를 사용 직전에 완충액(25 mM 히스티딘, 7% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0)에 희석하고 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다. 종양 및 체중 측정을 주 2회 수집하고, 종양 부피를 공식 (LxW2)/2를 이용해서 계산하였고, 식에서 L 및 W는 각각 길이 및 폭 치수를 나타낸다.

[0824] 동소 PDX 모델

[0825] 루시퍼라제 발현 PDX 모델(MEDI-PANC-08^{LUC})을 NSG 시드 마우스의 피하에서 성장시키고 800~1200 mm^3의 부피에서 종양을 수확하여 약 2 mm^3의 단편으로 절단하였다. 이어서 종양 단편을 NSG 마우스의 췌장에 봉합하였다(0일). IVIS Spectrum In vivo Imaging 시스템을 사용하여 루시퍼라제 신호를 매주 결정하였다. 간략하게는, 이미징 10분 전에, DPBS에 용해된 루시페린(15 mg/ml) 200 ul를 복강 내(i.p.) 주사하였다. 마우스를 3% 이소플루란 하에 마취시키고, 오른쪽으로 눕히고 발광을 측정하였다. 종양 이식 후 14일째, 발광 신호가 명확하게 검출될 때, 마우스를 발광에 기초하여 각각의 군으로 무작위화하였다. 마우스를 이소형 대조군(R347-AZ1508, 3 mg/kg -

Q1Wx4), 젬시타빈(75 mg/kg, Q2Dx5) 및 RAA2/B09 ADC(2 및 3 mg/kg - Q1Wx4)로 처리하였다. 발광을 매주 측정하였다. 연구 종점에는 체중 감소, 신체 상태 악화 및 무기력이 포함되었다. 데이터는 Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer)를 사용하여 분석되었으며 시간에 대한 평균 래디언스[p/s/cm2/sr]로 도표화되었다.

[0826] *6.2 결과 및 논의*

[0827] EGFR-cMET 이중특이적 ADC에 대한 적절한 EGFR 친화도 조합의 선택을 돕기 위해, MEDI-PANC-08 췌장 PDX 모델을 사용한 생체 내 효능 연구에서 고친화도 및 저친화도 EGFR-cMET 이중특이적 ADC를 비교하였다. **도 11a** 및 **도 11b**에 도시된 바와 같이, 2개의 분자 사이에 서로 다른 차이가 관찰되었다. 고친화도 QD6/B09 ADC는 테스트된 3가지 용량 수준 모두에서 효능을 나타내지 않았다. 반대로, 낮은 친화도의 RAA2/B09 ADC는 65일까지 완전한 종양 퇴행을 보인 후 3 mg/kg 용량 수준에서 종양 재성장과 2 mg/kg에서 종양 성장 억제를 나타냈다.

[0828] 피하 종양 모델이 생체 내 효능 연구를 위한 믿을 만한 도구가 되었지만, 주요 결점은 종양이 원래 위치에서 자라지 않아서 임의의 약물 반응이 환자의 반응 방식을 실제로 반영하지 못할 수 있다는 점이다. 이러한 문제를 해결하기 위해 루시퍼라제를 안정적으로 발현하도록 유전자 변형된 MEDI-PANC-08 종양을 사용하여 췌장암의 동소 모델이 개발되었다. 췌장에 외과적으로 이식한 후, 종양을 확립하고 이어서 발광 신호를 기준으로 무작위화했다. 그런 다음 마우스를 저친화도의 RAA2/B09 EGFR-cMET ADC, 이소형 대조군 또는 젬시타빈(화학요법 약물)으로 처리하였다. 처리 후, 발광을 매주 측정하였다. **도 11c**에 도시된 바와 같이, 미처리 대조군 및 이소형 대조군의 발광은 시간이 지남에 따라 증가하고, 동물들은 열악한 신체 상태 및 크고 촉진 가능한 복부 종양으로 인해 연구에서 제외되었다. 젬시타빈은 21일쯤에 최저점에 도달한 발광 신호의 최초 감소를 보였으며, 그 후 시간이 지남에 따라 신호가 증가하여, 이 군은 49일에 연구에서 제외되었다. 동소 모델에서 RAA2/B09 ADC의 2 mg/kg 및 3 mg/kg 용량 수준은 모두 60일까지 배경 수준에 가깝게 도달하는 발광 신호의 감소를 유발했다. 피하 연구와 비교하여, 2 mg/kg의 용량 수준은 종양 퇴행을 일으키는 더 나은 활성을 보여주었다. 연구 종료 시 배경에 가까운 발광 신호를 갖는 종양이 더 이상 가시적인 종양을 나타내지 않는 것으로 나타난 동물의 부검은 발광 신호와 종양 부피 사이의 상관관계를 뒷받침한다.

[0829] 결론적으로, 저친화도 EGFR-cMET RAA2/B09 ADC는 피하 PDX 췌장 PDX 모델에서 고친화도 QD6/B09 ADC에 비해 향상된 효능을 입증했으며, 3 mg/kg에서 종양 퇴행이 나타났다. 이 효능은 루시퍼라제를 안정적으로 발현하도록 조작된 동일한 PDX 종양(MEDI-PANC-08)을 사용하는 동소 모델에서도 관찰되었다. RAA2/B09 ADC는 종양 부피 대용으로 발광을 사용하여, 2 및 3 mg/kg 모두에서 종양 퇴행을 생성하는 피하 모델에 비해 향상된 효능을 보여주었다.

[0830] ***실시예 7 - 안전성 및 약동학***

[0831] 마우스 및 시노몰구스 원숭이에서의 최고 및 전체 노출, 제거율 및 반감기를 포함하는 저친화도 및 고친화도 EGFR-cMET ADC의 혈장 PK 매개변수를 비교하기 위해 약동학(PK) 분석을 수행하였다. 주요 목표는 EGFR에 대한 친화도 감소가 EGFR-cMET 이중특이적 ADC의 순환 노출에 영향을 미치는지를 결정하는 것이었다. PK 샘플은 다양한 용량 수준에 걸쳐 QD6/B09-57-AZ1508 및 RAA/B09-57-AZ1508 둘 다에 대해 마우스 및 시노몰구스 원숭이에서 수집되었다. 종 및 용량 수준 전반에 걸친 전체 ADC 농도를 기반으로 QD6/B09-57-AZ1508 및 RAA22/B09-57-AZ1508에 대한 PK 매개변수를 추정하기 위해 비구획 분석을 수행하였다.

[0832] 전반적으로, RAA22/B09-57-AZ1508은 마우스 및 시노몰구스 원숭이 둘 다에서 QD6/B09-57-AZ1508에 비해 더 높은 노출 및 연장된 t½을 나타내며, 이는 더 낮은 친화도의 RAA22/B09-57-AZ1508에서 개선된 PK를 시사한다.

[0833] *7.1 전임상 PK 분석의 생물학적 분석*

[0834] 표적 화합물(QD6/B09-57-AZ1508 및 RAA22/B09-57-AZ1508) 농도 및 전체 항체 농도는 하나의 면역 포획 LC-MS/MS 분석으로 측정되었다. 간략하게는, 다클론성 항인간 항체를 자기 비드에 접합시켰다. 그런 다음 25 µL의 혈장 샘플을 PBS로 희석하고 자기 비드와 함께 인큐베이션하였다. 포획 후, 내부 표준물질의 존재 하에 트립신으로 분해되기 전에 자기 비드를 여러 번 세척했다. 산을 첨가하여 소화를 퀜치시켰다. 그런 다음 액체 내용물을 주입 플레이트로 옮겼다.

[0835] 인간 항체 Fc 영역 및 절단된 탄두의 시그니처 트립신 펩티드를 역상 크로마토그래피(RPLC)를 사용하여 분리한 후 다중 반응 모니터링(MRM)을 사용하여 검출했다. Fc 영역의 시그니처 펩티드를 사용하여 전체 Ab를 계산하고, 소화 방출 탄두를 사용하여 ADC를 계산하였다. 본 실험에 사용된 내부 표준물질은 동위원소 표지된 펩티드나 단백질(SiluMAb, Sigma-Aldrich) 또는 동위원소 표지된 탄두이다. 내부 표준물질에 대한 분석물질의 피크 면적 비

율을 사용하여 표준 곡선에 대해 계산했다.

[0836] 표준 곡선과 QC는 샘플과 동일한 매트릭스에 다양한 수준의 표적 화합물을 스파이크하여 준비한다. 정량화 범위는 100 ng/mL~15,000 ng/mL이며, 희석 QC는 최대 525,000 ng/mL를 아우른다. 표준 곡선은 가능한 가장 간단한 모델로 피팅하였다. 분석의 정확도와 정밀도는 25%인 정량 하한(LLOQ)을 제외하고 모든 수준에서 20% 이내이다.

[0837] *7.2 마우스의 QD6/B09-57-AZ1508 PK*

[0838] NCA 분석에 포함된 마우스 연구는 **표 4**에 요약되어 있다.

표 4

RAA22/B09-57-AZ1508 및 QD6/B09-57-AZ1508의 마우스 연구 목록

[0839]

연구	연구 제목	연구 설계
03-EGFR cMET-ADC-PK -15-003-A	누드 마우스에서의 cMET-EGFR-AZ1508의 약동학 연구 (QD6/B09-57-AZ1508)	1, 3, 5 및 10 mg/kg의 단일 IV 용량; 0.5, 4, 24, 48, 72, 144 및 240시간에 혈장 수집; ADC 및 전체 Ab의 LC-MS/MS 분석
RAA22/B09-AZ1508 마우스 PK 연구 - 2016년 10월	누드 마우스에서의 cMET-EGFR DuetMAb RAA22/B09-AZ1508의 약동학 연구	0.5, 1, 3, 5 및 10 mg/kg의 단일 IV 용량; 0.5시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 6일, 10일 및 14일에 혈장 수집; ADC 및 전체 Ab의 LC-MS/MS 분석

[0840] RAA22/B09-57-AZ1508 및 QD6/B09-57-AZ1508에 대한 마우스에서의 평균 PK 농도-시간 프로파일이 **도 12**에 제시되어 있다.

[0841] RAA22/B09-57-AZ1508 및 QD6/B09-57-AZ1508은 모두 용량 비례 노출(C_{max} 및 AUC)과 함께 테스트된 용량 수준에서 마우스에서 선형 PK를 나타냈으며, 비슷한 CL 및 $t_{1/2}$이 각각 RAA22/B09-57-AZ1508의 경우 0.5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 그리고 QD6/B09-57-AZ1508의 경우 1 mg/kg 내지 10 mg/kg에서 관찰되었다.

[0842] RAA22/B09-57-AZ1508과 QD6/B09-57-AZ1508 사이의 PK 비교는 두 화합물 모두에 대해 테스트된 1, 3, 5, 10 mg/kg 용량 수준에서 평가되며, NCA를 기반으로 한 평균 PK 매개변수는 **표 5**에 요약되어 있다. 결과는 RAA22/B09-57-AZ1508에서 더 느린 CL, 더 높은 노출 및 연장된 $t_{1/2}$를 나타냈으며, RAA22/B09-57-AZ1508의 평균 AUC는 QD6/B09-57-AZ1508에 비해 2~2.91배 증가한 것으로 나타났다. 평균 $t_{1/2}$ 범위는 RAA22/B09-57-AZ1508의 경우 4.24~6.38일, QD6/B09-57-AZ1508의 경우 2.57~3.33일로, RAA22/B09-57-AZ1508의 경우 $t_{1/2}$의 1.27~2.32배 증가를 나타냈다.

표 5

마우스에서 RAA22/B09-57-AZ1508과 QD6/B09-57-AZ1508 사이의 용량 수준에 따른 평균 NCA PK 매개변수

용량 (mg/kg)	1 mg/kg		3 mg/kg		5 mg/kg		10 mg/kg	
분자	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508
C_{max} (mg/mL)	12.8	11.3	51.1	31.0	90.7	44.8	198	134
AUC (mg*일/mL)	41.0	20.5	136	57.5	230	87.9	494	170
t½ (일)	5.97	2.57	4.24	3.33	6.38	3.28	5.31	2.95
CL (mL/kg/일)	20.8	45.7	20.0	46.9	18.5	50.8	17.3	53.8

[0843]

[0844] *7.3 시노몰구스 원숭이의 QD6/B09-57-AZ1508 PK*

[0845] NCA 분석에 포함된 시노몰구스 원숭이 연구는 **표 6**에 요약되어 있다.

표 6

RAA22/B09-57-AZ1508 및 QD6/B09-57-AZ1508의 시노몰구스 원숭이 연구 목록

연구	연구 제목	연구 설계
20102256	RAA22/B09-Maia-AZ1508: 시노몰구스 원숭이에서 안전성과 약동학을 평가하기 위한 정맥 내 반복 용량 독성 연구	IV 볼루스 주사 Q3 Wk x 2
20067678	시노몰구스 원숭이에서 정맥 내 볼루스 주사에 의한 EGFR cMET의 8주 용량 범위 발견 연구	IV 볼루스 주사 Q3 Wk x 3
20067312	시노몰구스 원숭이에서 정맥 내 경로에 의한 8주 단일 상승 용량의 EGFRcMet-ADC(EGFRcMet-1508)	단일 상승 IV 투여

[0846]

[0847] RAA22/B09-57-AZ1508 및 QD6/B09-57-AZ1508에 대한 시노몰구스 원숭이에서의 평균 PK 농도-시간 프로파일이 **도 13**에 제시되어 있다.

[0848] RAA22/B09-57-AZ1508은 2 mg/kg 내지 5 mg/kg에서 시노몰구스 원숭이에서 선형 PK를 나타냈으며, 용량 비례 노출(C_{max} 및 AUC)과 비슷한 CL 및 $t_{1/2}$이 관찰되었다.

[0849] QD6/B09-57-AZ1508은 0.67 mg/kg 내지 3 mg/kg에서 시노몰구스 원숭이에서 비선형 PK를 나타냈으며, 용량 비례 초과의 노출(C_{max} 및 AUC)이 나타났으며, 더 빠른 CL과 더 짧은 $t_{1/2}$이 더 낮은 용량 수준에서 관찰되었다.

[0850] 시노몰구스 원숭이에서 RAA22/B09-57-AZ1508과 QD6/B09-57-AZ1508 사이의 PK 비교는 두 화합물에 대해 테스트된 2 및 3 mg/kg 용량 수준에서 평가되며, NCA를 기반으로 한 평균 PK 매개변수는 **표 7**에 요약되어 있다. 결과는 RAA22/B09-57-AZ1508에서 더 느린 CL, 더 높은 노출 및 연장된 $t_{1/2}$를 나타냈으며, RAA22/B09-57-AZ1508의 평균 AUC는 QD6/B09-57-AZ1508에 비해 1.90~2.43배 증가한 것으로 나타났다. 평균 $t_{1/2}$은 RAA22/B09-57-

AZ1508의 경우 4.30~5.90일, QD6/B09-57-AZ1508의 경우 0.969~1.07일로, RAA22/B09-57-AZ1508의 경우 $t_{1/2}$의 4.44~5.51배 증가를 나타냈다.

표 7

원숭이에서 RAA22/B09-57-AZ1508과 QD6/B09-57-AZ1508 사이의 용량 수준에 따른 평균 NCA PK 매개변수

용량 (mg/kg)	2 mg/kg		3 mg/kg	
분자	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508*	RAA22/B09-57-AZ1508	QD6/B09-57-AZ1508
C_{max} (mg/mL)	59.1	47.5	86.6	73.3
AUC (mg*일/mL)	116	47.6	179	94.4
t½ (일)	5.90	1.07	4.30	0.969
CL (mL/kg/일)	16.7	42.2	16.5	31.6

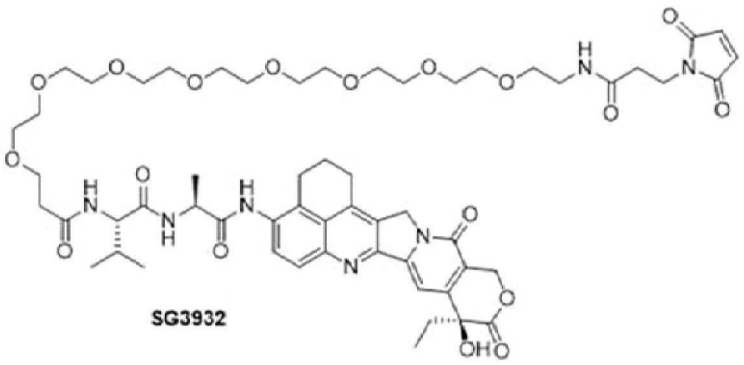
[0851]

[0852] 종합하면, 이러한 데이터는 낮은 친화도의 RAA22/B09-57-AZ1508이 마우스 및 시노몰구스 원숭이 모두에서 높은 친화도의 QD6/B09-57-AZ1508에 비해 더 높은 노출 및 증가된 순환 반감기를 나타냄을 입증한다. 이러한 데이터는 EGFR에 대한 친화도를 감소시키면 정상 조직에 존재하는 EGFR에 대한 결합을 감소시켜 정상 조직 싱크의 영향을 줄이고 혈장 PK 매개변수를 개선한다는 가설과 일치한다.

[0853] *실시예 8 - 토포이소머라제 I 억제제를 페이로드로 포함하는 ADC*

[0854] 이전 실시예에서 사용된 튜불라이신이 아닌 토포이소머라제 I 억제제인 다른 페이로드에 접합된 RAA22/B09-57 이중특이적 분자의 효능과 안전성을 테스트하기 위해 실험을 설계하였다.

[0855] 실시예 1에 따라 생산된 DuetMab RAA22/B09(세린 239 뒤에 "Maia" 시스테인 삽입 포함) 이중특이적 항체를 이중특이적 항체에서 천연 시스테인에 대한 "고전적" 접합을 통해 토포이소머라제 억제제 SG3932에 접합시켰다.



[0856]

[0857] EGFR/cMET 토포이소머라제 I 억제제 ADC의 효능을 PDX 시험을 사용하여 조사하였다. PDX 시험은 췌장암, 결장암, NSCLC 및 편평 두경부 암종(SQHN) 종양으로부터 얻은 다양한 PDX 모델을 사용하여 기본적으로 실시예 5에 대해 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 동물에게 10 mg/kg의 단일 용량의 EGFR-cMET Maia Topo ADC를 주사했다. EGFR-cMET Maia Topo ADC를 사용한 PDX 시험의 결과는 **도 14**에 보고되어 있다.

[0858] **도 14**에 나타낸 바와 같이, EGFR-cMET Maia Topo ADC는 테스트된 다수의 PDX 모델에서 종양 성장 억제 또는 퇴행을 유도했다. 따라서, 이러한 결과는 토포이소머라제 I 억제제를 함유하는 RAA22/B09-57ADC가 다수의 종양 유형을 대표하는 PDX 모델에서 효과적임을 입증한다.

[0859] *실시예 9 - ADC의 PK를 개선하기 위한 돌연변이*

[0860] 실시예 8에서 생산하고 테스트한 토포이소머라제 I 억제제를 포함하는 ADC는 세린 239 뒤에 "Maia" 시스테인 삽입을 포함하는 RAA22/B09 이중특이적 항체를 사용하였다. 그러나 SG3932가 천연 시스테인에 접합되는 것을 감안하면, Maia 시스테인 삽입은 필요하지 않다. 따라서 본 발명자들은 이러한 시스테인 삽입을 제거하기 위해 실시예 8에서 생산된 RAA22/B09 Maia Topo ADC를 변형하고자 했다.

[0861] 또한, Fc 백본의 이펙터 기능이 감소되거나 제거될 경우 면역 독성을 완화하고 약동학을 개선시키는 것이 가능할 수 있음을 인식하였다. 따라서, 이전에 항체 분자에서 Fc 이펙터 기능을 감소시키는 것으로 나타난 L234F/L235E/P331S(EU 넘버링)의 "삼중 돌연변이체(TM)"(Organesyan, 2008; Hay, 2016)를 도입하였다.

[0862] RAA22 및 B09의 가변 영역을 포함하고 239i 돌연변이가 제거되고 TM이 도입된 새로 생성된 "EGFR-cMET TM" 분자는 다음 표에 기재된 아미노산 서열을 갖는다:

[0863]

	EGFR-cMET TM
EGFR 중쇄	59
c-Met 중쇄	60
EGFR 경쇄	61
c-Met 경쇄	62

[0864] SG3932에 대한 접합을 위해, 인산염 완충 식염수 pH 7.4(PBS) 중 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)의 50 mM 용액을 PBS 및 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 함유하는 환원 완충액 중 EGFR-cMET TM 이중특이적 항체의 용액에 약 3 mg/mL의 최종 항체 농도가 되도록 첨가하였다(12.5 몰 당량/항체). 환원 혼합물을 궤도 진탕기에서 부드럽게(60 rpm) 진탕시키면서 2시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 45분 동안 실온까지 냉각시켰다. 이어서 SG3932를 10% (*v/v*) 최종 DMSO 농도를 위해 DMSO 용액(12.5 몰 당량/항체)으로 첨가했다. 용액을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후 N-아세틸 시스테인(5 마이크로몰/SG3932)을 첨가하여 퀜치시키고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 0.2 uM 멸균 필터를 사용하여 여과한 다음 2~8℃에서 밤새 보관하였다. 표면적이 375 cm^2인 MidiKros® 30 kDa 섬유 필터인 mPES를 사용하여 접선 흐름 여과 장치(TFF)를 통해 30 mm 히스티딘, 30 mM 아르기닌, pH 6.8을 함유하는 완충액으로 과량의 유리 약물을 제거하였다. 유리 약물 제거 정도를 순수 접합체를 사용하여 UHPLC-RP로 모니터링하였다. 유리 약물을 완전히 제거한 후 ADC를 완충액 교환하였다. 멸균 분위기 하에서 0.22 μm 필터를 사용하여 ADC를 여과한 후, 폴리소르베이트-80을 최종 농도 0.02% (w/v)가 되도록 첨가했다.

[0865] 214 nm 및 330 nm(SG3932 특이적)의 환원된 ADC 샘플에서 물과 아세토니트릴의 구배로 용리하는 Thermo Scientific MAbPac 50 mm x 2.1 mm 컬럼을 사용하는 Shimadzu Prominence 시스템에서의 UHPLC 분석을 통해 항체당 SG3932 6.0 분자의 항체당 약물 비율(DAR)이 밝혀졌다.

[0866] EGFR-cMET TM ADC의 효능을 PDX 시험을 사용하여 조사하였다. PDX 시험은 췌장암, 결장암, NSCLC 및 SQHN 종양으로부터 얻은 다양한 PDX 모델을 사용하여 기본적으로 실시예 5에 대해 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 동물에게 5 mg/kg의 단일 용량의 EGFR-cMET TM ADC를 주사했다. EGFR-cMET TM ADC를 사용한 PDX 시험의 결과는 **도 15**에 보고되어 있다. 이 실험의 결과는 EGFR-cMET TM ADC가 테스트된 다수의 PDX 모델에서 종양 성장 억제 또는 퇴행을 유도할 수 있었음을 입증한다.

[0867] EGFR-cMET TM ADC("TM ADC")의 효능을 PDX 모델 SQHN-02 및 PANC-08에서 실시예 8에서 생성된 EGFR-cMET Maia Topo ADC("Maia ADC")와 비교하였다. 동물에게 2.5 mg/kg, 5 mg/kg 또는 10 mg/kg의 각 ADC를 투여하고 종양 성장을 모니터링하였다. 또한 이 실험에는 미처리 대조군("미처리) 및 미접합 EGFR-cMET TM(TM mAb)을 투여한 동물도 포함되었다. 결과는 **도 16**에 제시되어 있다.

[0868] 결과는 EGFR-cMET TM ADC 및 EGFR-cMET Maia Topo ADC 둘 다, 테스트된 용량 범위에서 종양 성장을 감소/종양 퇴행을 유도하는 데 유사하게 효능이 있음("동등한 효능")을 입증한다. 이는 삼중 돌연변이체를 사용한 S239i 돌연변이의 제거 및 Fc 이펙터 기능의 폐지가 이러한 종양 모델에서 효능에 부정적인 영향을 미치지 않음을 시

사한다.

[0869] EGFR-cMET TM ADC는 또한 야생형 또는 돌연변이체 EGFR을 발현하는 NSCLC 종양에서 종양 성장을 감소시키는 데 효과적인 것으로 나타났다. 결과는 EGFR-cMET TM ADC가 야생형 및 돌연변이체 EGFR PDX 모델 둘 다에서 활성임을 입증하며, 이는 **도 17**에 제시되어 있다. 이는 ADC가 다양한 치료적 환경 및 다양한 EGFR 유전자형에 걸쳐 이 점을 제공할 수 있음을 나타내기 때문에 유리하다.

[0870] 추가로, EGFR-cMET TM ADC("TM ADC")와 실시예 8에서 생성된 EGFR-cMET Maia Topo ADC("Maia ADC")를 비교하기 위해 NOD-SCID 마우스에서 약동학(PK) 연구를 수행하였다. 실험은 본질적으로 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0871] 이러한 PK 연구의 대표적인 결과는 **도 18**에 제공되어 있다. 이 도면에 보고된 바와 같이, EGFR-cMET TM ADC는 EGFR-cMET Maia Topo ADC($t_{1/2}$ = 3.0일; CL = 39.7 ml/일/kg)와 비교할 때 더 긴 반감기($t_{1/2}$ = 5.0일)와 감소된 약물 제거율(CL = 14.8 ml/일/kg)을 나타냈다. 따라서, 결과는 여기에 기재된 EGFR-cMET TM ADC가 실시예 7에서 생성된 EGFR-cMET Maia Topo ADC에 비해 개선된 PK를 나타냄을 보여준다. 미접합 EGFR-cMET TM 항체("TM mAb")를 미접합 EGFR-cMET Maia("Maia ADC")와 비교할 경우 유사한 PK 개선이 또한 관찰되었다.

[0872] ***실시예 10 - 오시머티닙과 조합한 ADC 효능***

[0873] 이 실시예는 PDX 시험을 사용하여 다양한 EGFR 돌연변이 종양 모델에서 3세대 티로신 키나제 억제제 TKI 오시머티닙('Osi')과 조합한 ADC 효능을 비교한다.

[0874] *5.1 방법*

[0875] 면역결핍 마우스 또는 환자 유래 이종이식편(PDX)을 보유한 마우스에서의 전임상 효능 연구는 Champions Oncology(무흉선 누드-Foxn1nu 마우스)와 Genendesign(Balb/C 누드 마우스)에서 수행되었다. 모든 연구는 동물 관리 및 복지에 관한 AstraZeneca 글로벌 표준을 준수하였다. 모델은 생존 가능한 인간 종양 조직 또는 체액으로부터 확립되었으며 종양 이질성을 유지하기 위해 제한된 횟수로 동물에서 연속적으로 계대되었다. 마우스의 옆구리에 숙주 동물로부터 수확한 종양 단편을 한 쪽으로 이식했으며, 각각은 특정 계대 로트에서 이식하였다. 연구 전 종양 부피는 예상 시작일로부터 대략 1주일 전부터 기록되었다. 종양이 적절한 종양 개시 부피(TVI) 범위(150 내지 300 mm^3)에 도달하면 동물을 치료군과 대조군으로 무작위화하였다.

[0876] 치료 - 실시예 9에 기재된 EGFR-cMET Top1i 항체 약물 접합체(ADC) 또는 대조군 EGFR-cMET mAb를 투여받은 동물에게 0일에 지정된 용량 수준에서 단일 정맥 내(IV) 용량을 투여하였다. 동물에게 체중에 따라 IV 투여하였다(5 ml/kg의 용량 부피). 0일부터 시작하여, 오시머티닙 치료군의 동물은 비히클(탈이온수 중 0.5% w/v HPMC(하이드록실 프로필 메틸 셀룰로스))에서 2.5 mg/ml의 경구 투여 용액으로 제형화된 약물을 투여받았다. 동물에게 최종 용량 수준이 25 mg/kg이 되도록 10 mL/kg의 투여 부피로 체중에 따라 경구 투여하였다. 오시머티닙 치료 동물은 연구의 처음 21일 동안 매일 투여받았다. 조합 치료군의 동물은 EGFR-cMET ADC와 오시머티닙을 모두 투여받았으며, 각 치료는 위에 기재된 단독요법 투여 일정에 따라 투여되었다. 모든 동물은 연구 내내 개별적으로 추적되었다.

[0877] 종양 성장 억제 - 0일부터 시작하여, 종양 크기를 디지털 캘리퍼로 주 2회 측정하였고 개별 및 평균 추정 종양 부피(평균 TV ± SEM)를 포함한 데이터를 각 군에 대해 기록하였다. 종양 부피는 식 (1): TV = *폭*2 x *길이* x 0.52를 사용하여 계산하였다. 연구 종료 시, 종양 성장 억제 백분율(%TGI) 값을 식 (2)에 의해 초기(i) 및 최종(f) 종양 측정을 사용하여 각 치료군(T) 대 대조군(C)에 대해 계산하여 보고하였다: %TGI = 1 - (Tf-Ti) / (Cf-Ci). 2회 연속 측정에서 0일 측정치의 30% 이하의 종양 부피를 보고한 개별 마우스는 부분 반응자(PR)로 간주하였다. 촉진 가능한 종양이 없는(2회 연속 측정에서 0.00 mm^3) 개별 마우스는 완전 반응자(CR)로 분류하였다. 연구 종료 시까지 CR이 지속된 경우 무종양 생존자(TFS)로 간주하였다. 종양 배가 시간(DT)은 다음 식을 사용하여 비히클 처리군에 대해 결정하였다: DT = (Df - Di) * log2 / (logTVf - logTVi), 여기서 D = 일(day), TV = 종양 부피. 미처리 대조군에서 종양 성장 관찰은 군의 평균 종양 부피(중도절단되지 않음)가 인도적 종점인 1500 mm^3 에 도달하거나 60일에 이를 때까지 중 먼저 도달한 경우에 수행되었다. 치료군에서 종양 성장 관찰은 60일까지 수행되었다. 치료군의 개별 마우스에서 종양이 1500 mm^3 의 인도적 종점에 도달한 경우 동물을 안락사시키고 다른 치료 동물에서 관찰을 계속하였다. 지속적인 반응을 보이는 일부 동물은 60일을 넘어서 관찰하였다.

[0878] **결과**

[0879] 결과는 **도 19 내지 도 21**에 제공된다.

[0880] **도 19a 및 도 19c**는 1차 라인 EGFRm 비소세포폐암(NSCLC)을 나타내는 EGFR L858R 돌연변이를 함유하는 EGFR 돌연변이 모델 'LUN487' 및 'LUN439'에 대한 결과를 보여준다. EGFR-cMET TM ADC는 2, 4 및 8 MPK(mg/kg)로 투여되었다. 또한 한 군에는 mAb 단독 대조군(EGFR-cMET mAb)을 8 mPK로 투여하거나 오시머티닙만을 25 MPK로 투여하였다. 결과는 EGFR-cMET TM ADC 단독요법이 용량 의존적 반응을 보임을 나타낸다. PDX 모델은 오시머티닙에 반응하였다. mAb 단독 대조군에서는 치료 반응이 관찰되지 않았다.

[0881] **도 19b 및 도 19d**는 EGFR 돌연변이 모델 'LUN487' 및 'LUN439'에 대한 결과를 보여주는데, 여기서 EGFR-cMET TM ADC는 2 또는 4 MPK 단독 또는 오시머티닙(25 MPK)과 조합하여 투여되었다. EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙의 조합은 개별적으로 투여된 두 가지 작용제(EGFR-cMET TM ADC 또는 오시머티닙)에 비해 개선된 종양 성장 억제를 입증하였다.

[0882] **도 20a**는 오시머티닙에 대한 1차 내성을 나타내는 엑손20 삽입을 포함하는 EGFR 돌연변이 모델 'CTG-2992'에 대한 결과를 보여준다. EGFR-cMET TM ADC는 2, 4 및 8 MPK(mg/kg)로 투여되었다. 또한 한 군에는 mAb 단독 대조군(EGFR-cMET mAb)을 8 mPK로 투여하거나 오시머티닙만을 25 MPK로 투여하였다. 결과는 EGFR-cMET TM ADC 단독요법이 용량 의존적 반응을 보임을 나타낸다. PDX 모델은 오시머티닙에 반응하였다.

[0883] **도 20b**는 EGFR 돌연변이 모델 'CTG-2992'에 대한 결과를 보여주는데, EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙이 조합하여 투여되었다. EGFR-cMET TM ADC는 2 또는 4 MPK로 투여되었다. EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙의 조합은 개별적으로 투여된 두 가지 작용제(EGFR-cMET TM ADC 또는 오시머티닙)에 비해 개선된 종양 성장 억제를 입증하였다.

[0884] **도 21a**는 오시머티닙에 대한 획득 내성을 나타내는 EGFR 돌연변이 모델 'CTG-2803'에 대한 결과를 보여준다. EGFR-cMET TM ADC는 2, 4 및 8 MPK(mg/kg)로 투여되었다. 또한 한 군에는 mAb 단독 대조군(EGFR-cMET mAb)을 8 mPK로 투여하거나 오시머티닙만을 25 MPK로 투여하였다. 결과는 EGFR-cMET TM ADC 단독요법이 용량 의존적 반응을 보임을 나타낸다. PDX 모델은 오시머티닙 또는 mAb만의 단독요법에 반응하지 않았다.

[0885] **도 21b**는 EGFR 돌연변이 모델 'CTG-2803'에 대한 결과를 보여주는데, EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙이 조합하여 투여되었다. EGFR-cMET TM ADC는 2 또는 4 MPK로 투여되었다. EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙의 조합은 개별적으로 투여된 두 가지 작용제(EGFR-cMET TM ADC 또는 오시머티닙)에 비해 개선된 종양 성장 억제를 입증하였다.

[0886] 종합하면, 이러한 결과는 EGFR-cMET TM ADC와 오시머티닙의 조합은 오시머티닙 내성으로 분류되는 것을 포함하여 다양한 EGFR 돌연변이 암에서 효능을 보였다는 점을 입증한다.

[0887] ***실시예 11 - 오시머티닙과 조합한 ADC에 대한 EGFRmut NSCLC PDX의 반응***

[0888] 이 실시예는 돌연변이 EGFR이 있는 NSCLC PDX 모델에서 오시머티닙과 EGFR-cMET TM ADC의 조합 효능을 추가로 평가하는 것이다. 다양한 EGFR 돌연변이를 포함하는 추가 23종의 NSCLC PDX 모델이 등록되었다. 연구는 대체로 실시예 10의 섹션 5.1에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0889] 각 PDX에 대한 마우스는 일반적으로 세 개의 군으로 나뉘어, 21일 동안 오시머티닙 25 mg/kg 매일, EGFR-cMET TM ADC 2 mg/kg 또는 오시머티닙 25 mg/kg 매일 및 EGFR-cMET TM ADC 2 mg/kg을 투여받았다. 실험은 8 mg/kg으로 투여된 이소형 ADC R347 대조군 및/또는 8 mg/kg으로 투여된 네이키드 EGFR-cMET TM mAb 대조군을 사용하여 수행되었다.

[0890] 세 개의 치료군 각각에 대한 각 모델의 반응은 도 22a, 도 22b 및 도 22c에 나와 있다.

[0891] 결과에 따르면 조합군에서 14/23(61%) 모델에서 반응이 관찰된 반면, 오시머티닙 및 EGFR-cMET TM ADC 단독요법군은 각각 8/23(34.8%) 및 7/23(30.4%) 모델에서 반응률을 나타냈다. 반응은 기준선으로부터 종양 부피의 30%의 퇴행으로 정의된다. 퇴행은 투여 후 1주일부터 분석되었다. 보고된 값은 연구 기간 동안 관찰된 최선의 반응이다.

[0892] 더 자세한 반응 데이터와 EGFR 돌연변이 상태에 대한 정보는 아래 표에 나와 있다.

[0893] 표 9는 각 모델에 대한 각 연구군의 최선의 전반적인 반응을 보여주며, R은 반응을 의미하고 NR은 반응 없음을 의미한다. % 변화는 기준선과 비교한 종양 부피의 변화를 나타낸다.

[0894]

모델	오시머티닙	반응	ADC	반응	조합	반응	EGFRmut
CTG-0743	52%	NR	140%	NR	-1%	NR	A1158V
CTG-1212	18%	NR	57%	NR	14%	NR	Ex19del, T790M
CTG-1342	92%	NR	68%	NR	23%	NR	R521K
CTG-1612	3%	NR	-3%	NR	2%	NR	R521K
CTG-2405	-31%	R	-16%	NR	-38%	R	L858R, A289V
CTG-2531	-77%	R	35%	NR	-80%	R	Ex19del
CTG-2534	-45%	R	7%	NR	-58%	R	G719C, S768I
CTG-2535	-15%	NR	34%	NR	-56%	R	Ex19del
CTG-2537	-95%	R	-35%	R	-85%	R	L858R, T790M
CTG-2548	-93%	R	-62%	R	-86%	R	L858R, 여러 가지 드문 돌연변이
CTG-2790	-93%	R	-79%	R	-91%	R	Ex19del
CTG-2839	-20%	NR	-13%	NR	-48%	R	Ex19del
CTG-3160	-74%	R	3%	NR	-73%	R	Ex19del
CTG-3192	9%	NR	-100%	R	19%	NR	Ex19del
CTG-3196	-24%	NR	43%	NR	-10%	NR	L858R
CTG-3213	118%	NR	140%	NR	12%	NR	R1068L
CTG-3271	-72%	R	-65%	R	-60%	R	Ex19del, T790M

[0895]

CTG-3320	102%	NR	-66%	R	-74%	R	Ex19del
CTG-3414	186%	NR	-22%	NR	-65%	R	Ex19del, T790M
CTG-3470	-16%	NR	37%	NR	-7%	NR	Ex19del
CTG-3475	72%	NR	-33%	R	-32%	R	L858R
CTG-3477	64%	NR	184%	NR	15%	NR	Ex19del, T790M
CTG-3543	56%	NR	51%	NR	-81%	R	Ex19del

[0896] **참고문헌**

[0897] 본 개시내용 및 본 개시내용과 관련된 분야의 기술 수준을 더욱 충분히 설명하고 개시하기 위하여 다수의 간행물을 위에 인용하였다. 이러한 참고문헌에 대한 전체 인용은 아래에 제공된다. 이러한 참고문헌 각각의 전체가 본원에 포함된다.

Angevin, 2017	Angevin, E., et al., *Phase I study of ABBV-399, a c-Met antibody-drug conjugate (ADC), as monotherapy and in combination with erlotinib in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC).* Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15_suppl): p. 2509-2509.
Bagshawe, 1991	Bagshawe et al. *Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites.* Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 1991, 4: 915-922
Bardia, 2017	Bardia et al. *Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer.* J Clin Oncol. 2017, 35(19):2141-2148
Beck, 2017	Beck, A., et al. *Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates.*, Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16, pp. 315-337
Birchmeier, 2003	Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**: p. 915-925.
Brinkmann, 2017	Brinkmann, U. and R.E. Kontermann, *The making of bispecific antibodies.* MAbs, 2017. **9**(2): p. 182-212.
Calvo, 2017	Calvo, E., et al., *Preliminary results from a phase 1 study of the antibody-drug conjugate ABBV-221 in patients with solid tumors likely to express EGFR.* Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15_suppl): p. 2510-2510.
Cardillo, 2015	Cardillo et al. *Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers.* Bioconjug Chem., 2015, 26(5):919-31
Chalouni, 2018	Chalouni and Doll 2018 J Exp Clin Cancer Res. 37(1):20.
Chang 2020	Chang et al. *The Clinical Significance of RAS, PIK3CA, and PTEN Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer Using Cell-Free DNA* J Clin Med 2020 9(8):2642

[0898]

Comer, 2018	Comer, F., C. Gao, and S. Coats, *Bispecific and Biparatopic Antibody Drug Conjugates*, in *Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates*, M. Damelin, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 267-280.
Dimasi, 2017	Dimasi et al. *Efficient Preparation of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Cysteine Insertion.* Mol Pharmaceuticals, 2017, 14(5) 1501-1516
Domling, 2005	Domling et al. *Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents.* Mol. Diversity, 2005 9:141-147
Dornan, 2009	Dornan et al., *Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2009, 114(13):2721-2729
Dubowchik, 2002	Dubowchik et al., *Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity,* Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869
Engelman, 2007	Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.* Science, 2007. **316**: p. 1039-1043.
Ferguson, 2008	Ferguson, Annu Rev Biophys. (2008) 37: 353-373.
Foot 1992	Foot and Winter *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops* J Mol Biol. 1992 224(2):487-99
Gébleux, 2016	Gébleux and Casi, Pharmacol Ther (2016) 167: 48-59
Graziano, 2004	Graziano and Guptill, Methods Mol Biol. 2004; 283:71-85.
Hamblett, 2004	Hamblett et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clin. Cancer Res., 2004, 10:7063-7070
Hay, 2016	Hay et al., *Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447.* Oncoimmunology, 2016 5(8):e1208875.
Holliger, 2005	Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005).
Junutula, 2008	Junutula, et al., *Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index.* Nature Biotech., 2008, 26(8):925-932
Kabat, 1991	Kabat, E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991

[0899]

Klein, 2012	Klein et al. *Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies.* MAbs, 2012, 4:653-63
Kontermann, 2012	Kontermann, MAbs 2012, 4(2):182-197
Kontermann, 2015	Kontermann and Brinkmann 2015, 20(7): 838-847
Kunkel 1985	Kunkel. *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection* Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 82(2):488-92.
Ledermann, 1991	Ledermann et al. *A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response.* Int. J. Cancer, 1991, 47: 659-664
Mazor, 2015	Mazor, Y., et al., *Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity.* MAbs, 2015. **7**(3): p. 461-9.
Mazor, 2017	Mazor, Y., et al., *Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 40098.
McDermott, 2010	McDermott, U., et al., *Acquired Resistance of Non–Small Cell Lung Cancer Cells to MET Kinase Inhibition Is Mediated by a Switch to Epidermal Growth Factor Receptor Dependency.* Cancer research, 2010. **70**(4): p. 1625-1634.
Mo, 2017	Mo, H.N. and P. Liu, *Targeting MET in cancer therapy.* Chronic Dis Transl Med, 2017. **3**(3): p. 148-153.
Moores, 2016	Moores, S.L., et al., *A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet that is Effective Against EGFR Inhibitor- Resistant Lung Tumors.* Cancer research, 2016.
Ogitani, 2016a	Ogitani et al. *Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology.* Bioorg Med Chem Lett. 2016, 26(20):5069-5072
Ogitani, 2016b	Ogitani et al. *DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1.* Clin Cancer Res. 2016, 22(20):5097-5108
Organ, 2011	Organ, S.L. and M.S. Tsao, *An overview of the c-MET signaling pathway.* Therapeutic advances in medical oncology, 2011. **3**(1 Suppl): p. S7-S19.

[0900]

Organesyan, 2008	Organesyan et al. *Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 ;64(Pt 6):700-4.
Philips, 2018	Phillips, A.C., et al., *Characterization of ABBV-221, a Tumor-Selective EGFR Targeting Antibody Drug Conjugate*. Mol Cancer Ther, 2018.
Persic, 1997	Persic et al. *An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries*. Gene, 1997, 187: 9-18.
Ridgway, 1996	Ridgway et al., *'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization*. Protein Eng., 1996, 9:617-621
Sanderson, 2005	Sanderson et al., *In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate*. Clin. Cancer Res. 2005, 11:843-852
Sierra, 2011	Sierra, J.R. and M.-S. Tsao, *c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer*. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011. **3**(1 suppl): p. S21-S35.
Suda 2009:	Suda, K. et al. *EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival?* J Thorac Oncol. 2009;4(1):1-4.
Suda, 2010	Suda, K., et al., *Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. **16**(22): p. 5489-5498.
Tolcher, 2014	Tolcher, A., et al., *342 A phase 1/2 study evaluating the safety, pharmacokinetics and efficacy of ABT-414 in subjects with advanced solid tumors likely to over-express the epidermal growth factor receptor (EGFR)*. European Journal of Cancer, 2014. **50**: p. 111.
Vaughan, 1996	Vaughan, et al., *Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library*, Nat Biotechnol,. 1996. 14: p. 309
Vyse and Huang, 2019	Vyse, S and Huang, P. *Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer*. Signal Transduction and Targeted Therapy 2019 **4**(5)
Wang, 2017	Wang, J., et al., *ABBV-399, a c-Met Antibody-Drug Conjugate that Targets Both MET-Amplified and c-Met-Overexpressing Tumors, Irrespective of MET Pathway Dependence*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2017. **23**(4): p. 992-1000.
Wang, 2018	Wang, X. et al., IgG *Fc engineering to modulate antibody effector functions* Protein Cell . 2018;9(1):63-73

[0901]

[0902]

[0903] **서열**

[0904] ***저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)에 대한 CDR 서열***

[0905] HCDR1 - DNDFS (서열번호 1)

[0906] HCDR2 - AIVAVFRTETYAQKFQD (서열번호 2)

[0907] HCDR3 - RLMSAISGPGAPLLM (서열번호 3)

[0908] LCDR1 - TGTSSDVGGYNYVS (서열번호 4)

[0909] LCDR2 - DVSKRPS (서열번호 5)

[0910] LCDR3 - SSYTSSDTLEI (서열번호 6)

[0911] ***고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)에 대한 CDR 서열***

[0912] HCDR1 - DNDFS (서열번호 1)

[0913] HCDR2 - AIVAVVRTETYAQKFQD (서열번호 7)

[0914] HCDR3 - RLMSAISGPGAPLLM (서열번호 3)

[0915] LCDR1 - TGTSSDVGGYNYVS (서열번호 4)

[0916] LCDR2 - DVSERPS (서열번호 66)

[0917] LCDR3 - FSYTSSDTLEI (서열번호 67)

[0918] *항-EGFR 결합 아암 RAA22 및 QD6에 대한 FR 서열*

[0919] HFR1 - QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS (서열번호 8)

[0920] HFR2 - WVRQAPGQGLEWMG (서열번호 9)

[0921] HFR3 - RVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열번호 10)

[0922] HFR4 - WGQGTLVTVSS (서열번호 11)

[0923] LFR1 - QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (서열번호 12)

[0924] LFR2 - WYQQHPGKAPKLMIY (서열번호 13)

[0925] LFR3 - GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (서열번호 14)

[0926] LFR4 - FGGGTKLTVL (서열번호 15)

[0927] *저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 가변 중쇄(VH) 영역의 아미노산 서열(서열번호 16)*

[0928] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSS

[0929] *저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 VH 영역의 핵산 서열(서열번호 17):*

[0930] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTT
AGCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGTTCCGGACAGAGACATACGCCCAGAAATTCCAGGACAGAGTG
AAAATCACCGCCGACATCAGCACCAGAACCACCTACATGGAACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACGGCTGATGTCT
GCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCATGTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

[0931] *항-EGFR 항체 클론 QD6의 VH 영역의 아미노산 서열(서열번호 18):*

[0932] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSS

[0933] *항-EGFR 항체 클론 QD6의 VH 영역의 핵산 서열(서열번호 19):*

[0934] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTT
AGCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGGTCCGGACAGAGACATACGCCCAGAAATTCCAGGACAGAGTG
AAAATCACCGCCGACATCAGCACCAGAACCACCTACATGGAACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACGGCTGATGTCT
GCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCATGTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

[0935] *항-EGFR 항체 클론 RAA22의 가변 경쇄(VL) 영역의 아미노산 서열(서열번호 20):*

[0936] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIF
GGGTKLTVL

[0937] *항-EGFR 항체 클론 RAA22의 VL 영역의 핵산 서열(서열번호 21):*

[0938] CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTAT
GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAG
TCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTCATATACAAGCAGCGACACTCTCGAAATATTC
GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0939] *고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)의 VL 영역의 아미노산 서열(서열번호 22):*

[0940] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSERPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIF

GGGTKLTVL

[0941] *고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)의 VL 영역의 핵산 서열(서열번호 23):*

[0942] CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTAT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAGTGAACGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTTCTCATATACAAGCAGCGACACTCTCGAAATATTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0943] *항-cMet 결합 아암 B09-GL에 대한 CDR 서열*

[0944] HCDR1 - DYYIH (서열번호 24)

[0945] HCDR2 - WMNPNSGNTGYAQKFQG (서열번호 25)

[0946] HCDR3 - GQGYTHS (서열번호 26)

[0947] LCDR1 - RASEGIYHWLA (서열번호 27)

[0948] LCDR2 - KASSLAS (서열번호 28)

[0949] LCDR3 - QQYSNYPPT (서열번호 29)

[0950] *항-cMet 결합 아암 B09-GL에 대한 FR 서열*

[0951] HFR1 - QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (서열번호 30)

[0952] HFR2 - WVRQATGQGLEWMG (서열번호 31)

[0953] HFR3 - RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열번호 32)

[0954] HFR4 - WGQGTMVTVSS (서열번호 33)

[0955] LFR1 - DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC (서열번호 34)

[0956] LFR2 - WYQQKPGKAPKLLIY (서열번호 35)

[0957] LFR3 - GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (서열번호 36)

[0958] LFR4 - FGGGTKLEIK (서열번호 37)

[0959] *항-cMet 결합 아암 B09-GL의 가변 중쇄(VH) 영역의 아미노산 서열(서열번호 38):*

[0960] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGY THSWGQGTMVTVSS

[0961] *항-cMet 결합 아암 B09-GL의 VH 영역의 핵산 서열(서열번호 39):*

[0962] CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATC CACTGGGTCCGCCAGGCCACAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATGAACCCCAACAGCGGCAACACCGGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTG ACCATGACCCGGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCCAGGGCTAC ACCCACAGCTGGGGCCAGGGCACCATGGTCACAGTGTCCAGC

[0963] *항-cMet 결합 아암 B09-GL의 가변 경쇄(VL) 영역의 아미노산 서열(서열번호 40):*

[0964] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGT KLEIK

[0965] *항-cMet 결합 아암 B09-GL의 VL 영역의 핵산 서열(서열번호 41):*

[0966] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCACCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCGAGGGCATCTACCACTGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAGCCTGGCCAGCGGAGTCCCTAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGC ACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAACTACCCCCCCACCTTCGGCGGAGGCACC AAGCTGGAAATCAAG

[0967] *인간 면역글로불린 G1 중쇄 불변(CH) 영역의 아미노산 서열(서열번호 42):*

[0968] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0969] ***"노브" 돌연변이, 쇄간 시스테인 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 43):***

[0970] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0971] "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C); 및 시스테인 삽입(C239i), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0972] ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
VDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0973] ***"노브" 돌연변이, 쇄간 시스테인 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 없는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 44):***

[0974] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0975] "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(S354C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0976] ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
VDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0977] ***"홀" 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 45):***

[0978] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0979] "홀" 돌연변이(T366S, L368A, 및 Y407V); 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C); 및 시스테인 삽입(C239i), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0980] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0981] ***"홀" 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 없는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 46):***

[0982] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0983] "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0984] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0985] ***야생형 인간 면역글로불린 카파 불변 영역의 아미노산 서열(서열번호 47):***

[0986] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

[0987] *S121C 및 C214V 치환을 포함하도록 변형된 인간 면역글로불린 카파 불변 영역의 아미노산 서열(서열번호 48):*

[0988] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0989] S121C 및 C214V, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0990] RTVAAPSVFIFPP**C**DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**V**

[0991] *인간 면역글로불린 람다 불변 영역의 아미노산 서열(서열번호 49):*

[0992] GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0993] *시스테인 삽입이 있는 항-cMet 결합 아암 B09-GL의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 50):*

[0994] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0995] "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C); 및 시스테인 삽입(C239i), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[0996] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS**V**DKTHTCPPCPAPELLGGPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**REEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0997] *시스테인 삽입이 없는 항-cMet 결합 아암 B09-GL의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 51):*

[0998] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[0999] "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(S354C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1000] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS**V**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**REEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1001] *항-cMet 결합 아암 B09-GL의 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 52):*

[1002] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1003] S121C 및 C214V, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1004] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP**C**DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**V**

[1005] *시스테인 삽입이 있는 고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 53):*

[1006] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1007] "홀" 돌연변이(T366S, L368A, 및 Y407V); 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C); 및 시스테인 삽입(C239i), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1008] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1009] *시스테인 삽입이 없는 고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 54):*

[1010] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1011] "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1012] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1013] *고친화도 항-EGFR 결합 아암(QD6)의 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 55):*

[1014] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSERPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG
STVEKTVAPTECS

[1015] *시스테인 삽입이 있는 저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 56):*

[1016] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1017] "홀" 돌연변이(T366S, L368A, 및 Y407V); 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C); 및 시스테인 삽입(C239i), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1018] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1019] *시스테인 삽입이 없는 저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 57):*

[1020] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1021] "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1022] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1023] *저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 58):*

[1024] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG
STVEKTVAPTECS

[1025] *삼중 돌연변이(TM)가 있는 저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 59):*

[1026] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1027] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1028] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVFRTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMS
AISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS**V**DKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**REEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1029] ***삼중 돌연변이(TM)가 있는 항-cMet 결합 아암의 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 60):***

[1030] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1031] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1032] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGY
THSWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1033] ***"EGFR-cMET TM" 항체의 저친화도 항-EGFR 결합 아암(RAA22)의 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 61):***

[1034] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1035] S121C 및 C214V, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1036] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP**C**SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG
STVEKTVAPTE**V**S

[1037] ***"EGFR-cMET TM" 항체의 항-cMet 결합 아암의 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 62):***

[1038] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[1039] ***"노브" 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 없고 TM은 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 63):***

[1040] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1041] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1042] ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
VDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**REEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1043] ***"홀" 돌연변이, 안정화 이황화 브릿지를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 없고 TM은 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열번호 64):***

[1044] 다음의 치환에는 밑줄이 그어져 있다:

[1045] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C), 여기서 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름.

[1046] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1047] ***S121C 및 C214V 치환을 포함하도록 변형된 인간 면역글로불린 람다 불변 영역의 아미노산 서열(서열번호 65):***

[1048] GQPKAAPSVTLFPP**C**SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TE**V**S

[1049] ***인간 EGFR 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열번호 68):***

[1050] LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYD
ANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSP
SDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCE
GPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQ
HGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRE
CVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGC
PTNGPKIPS

[1051] *시노몰구스 원숭이 EGFR 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열번호 69):*

[1052] LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYD
ANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSP
SDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCE
GPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQ
HGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRE
CVDKCNILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGC
ARNGPKIPS

[1053] *인간 cMET 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열번호 70):*

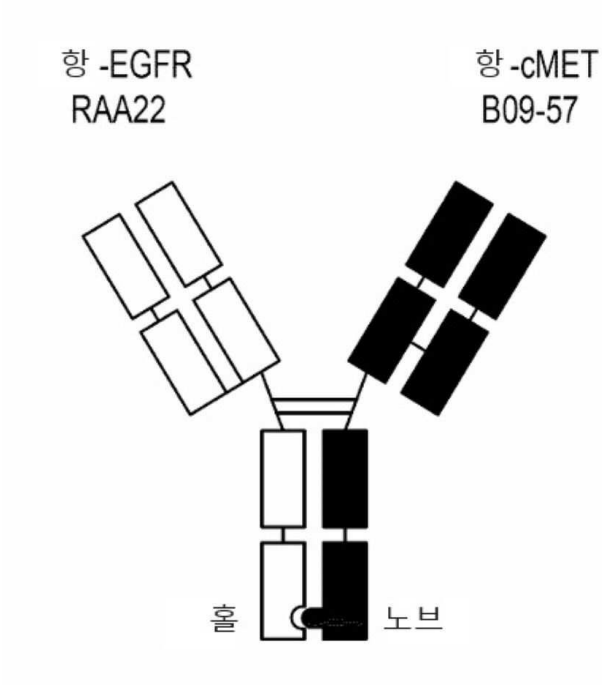
[1054] ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYY
DDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETKDGFMF
LTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLA
RQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMG
QFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPP
FVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNM
SIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSY
REDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPV
FKPFEKPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFT

[1055] *시노몰구스 원숭이 cMET 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열번호 71):*

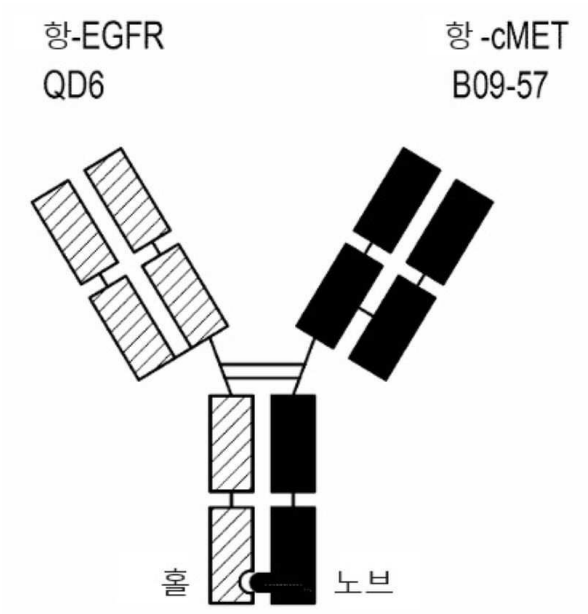
[1056] ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYY
DDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPNQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPHHPLHSISVRRLKETKDGFMF
LTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNNFIYFLTVQRETLNAQTFHTRIIRFCSLNSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLA
RQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRVDLFMG
QFSEVLLTSISTFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHPLNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPP
FVQCGWCHDKCVRSEECPSGTWTQQICLPAIYKVFPTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNM
SIIISNGHGTTQYSTFSYVDPIITSISPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSY
REDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLHSVSVPRMVINVHEAGRNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPV
FKPFEKPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFT

도면

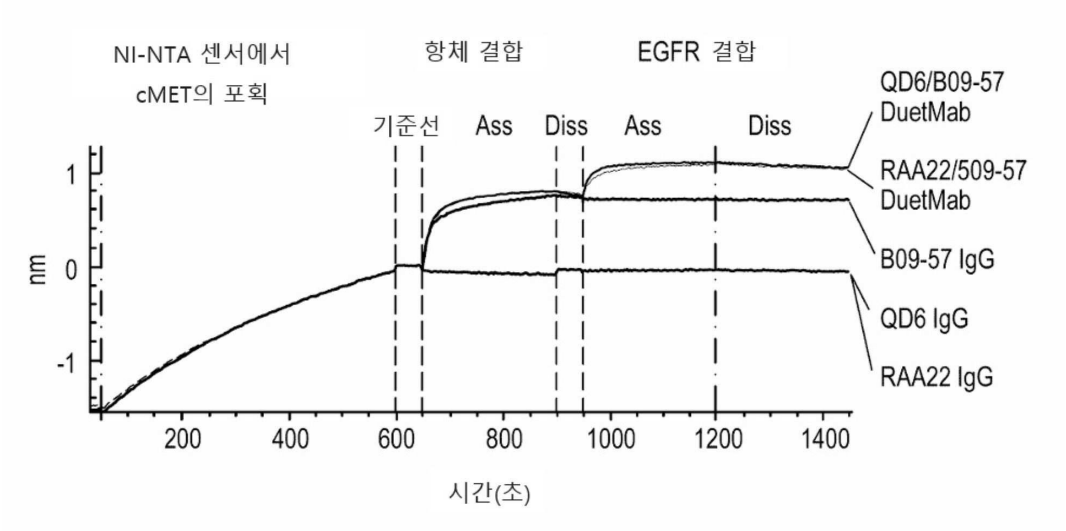
도면1a



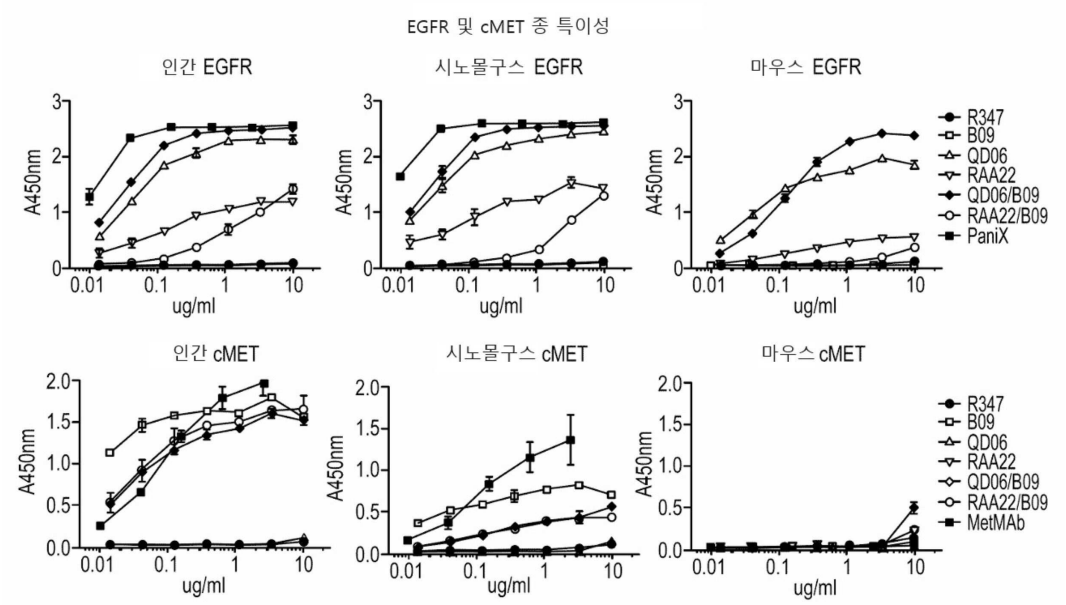
도면1b



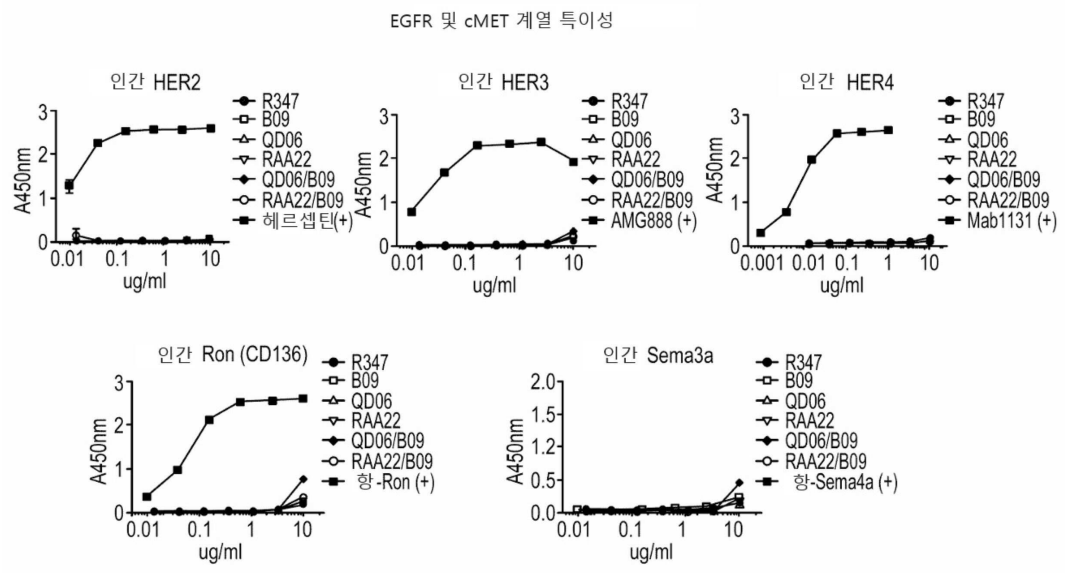
도면2


NI-NTA 센서에서
cMET의 포획
항체 결합
EGFR 결합
기준선
Ass
Diss
Ass
Diss
QD6/B09-57
DuetMab
RAA22/509-57
DuetMab
B09-57 IgG
QD6 IgG
RAA22 IgG
nm
1
0
-1
200
400
600
800
1000
1200
1400
시간(초)

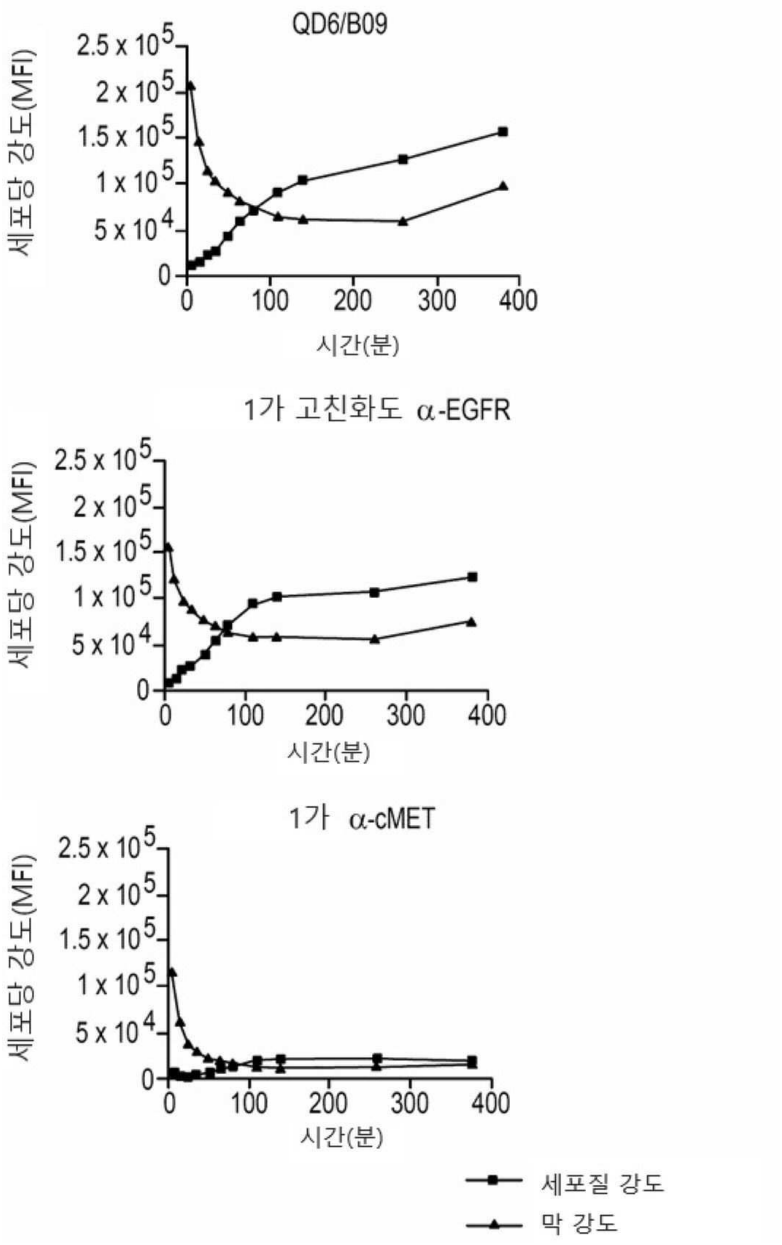
도면3a


EGFR 및 cMET 종 특이성
인간 EGFR
시노몰구스 EGFR
마우스 EGFR
A450nm
ug/ml
R347
B09
QD06
RAA22
QD06/B09
RAA22/B09
PaniX
인간 cMET
시노몰구스 cMET
마우스 cMET
MetMAb

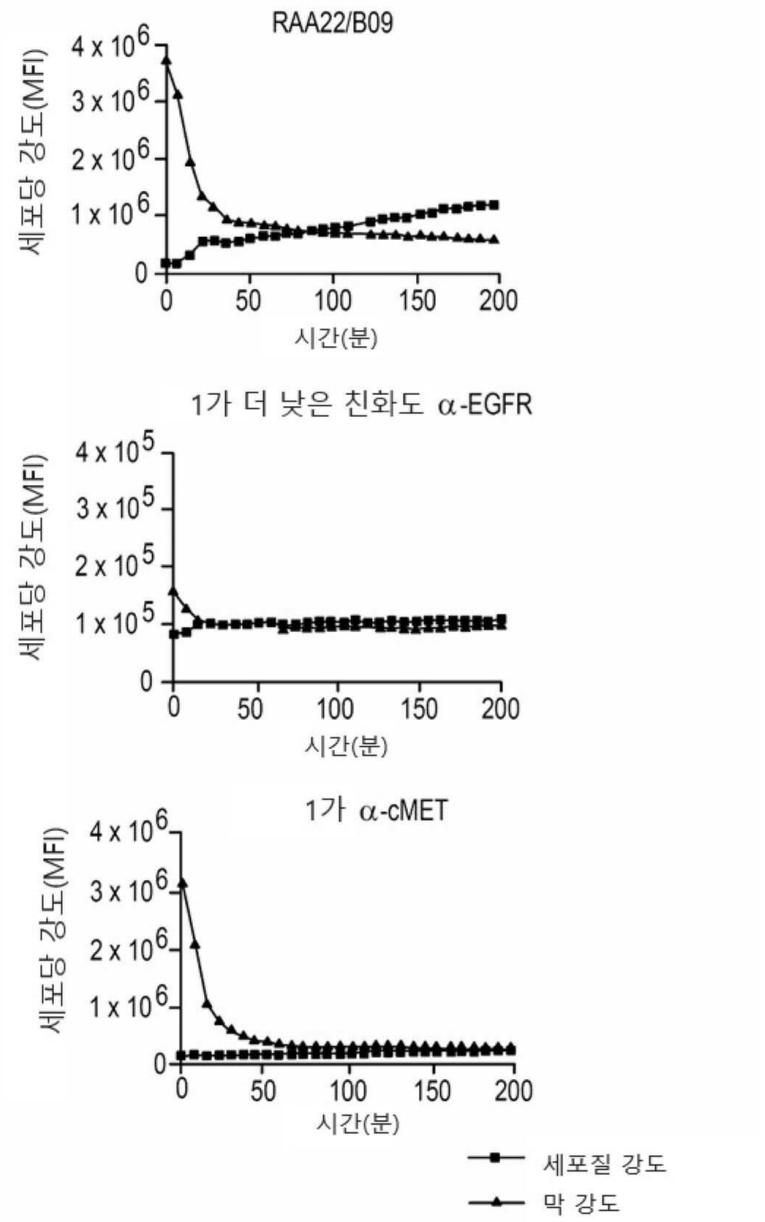
도면3b


EGFR 및 cMET 계열 특이성
인간 HER2
A450nm
ug/ml
R347
B09
QD06
RAA22
QD06/B09
RAA22/B09
헤르셉틴(+)
인간 HER3
AMG888 (+)
인간 HER4
Mab1131 (+)
인간 Ron (CD136)
항-Ron (+)
인간 Sema3a
항-Sema4a (+)

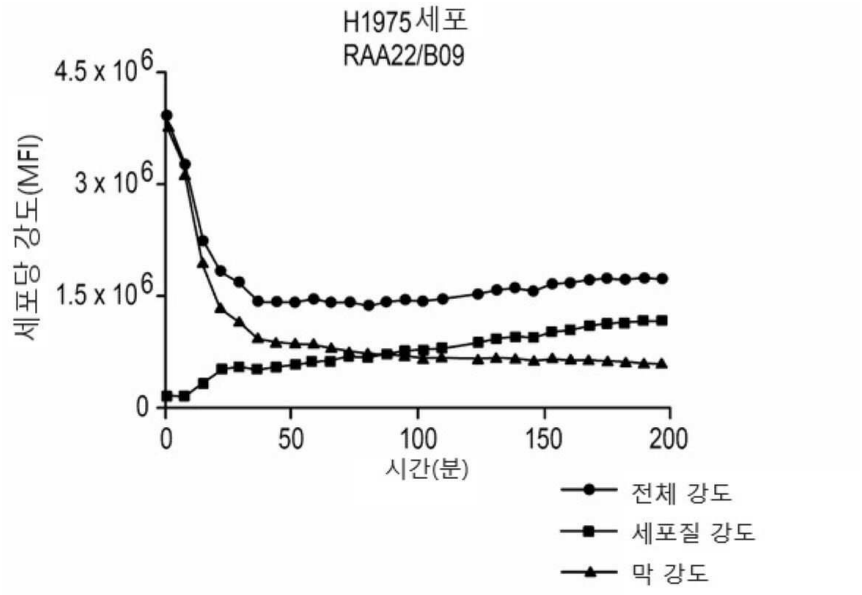
도면4a


QD6/B09
세포당 강도(MFI)
2.5 x 10^5
2 x 10^5
1.5 x 10^5
1 x 10^5
5 x 10^4
0
0
100
200
300
400
시간(분)
1가 고친화도 α-EGFR
세포당 강도(MFI)
시간(분)
1가 α-cMET
세포당 강도(MFI)
시간(분)
세포질 강도
막 강도

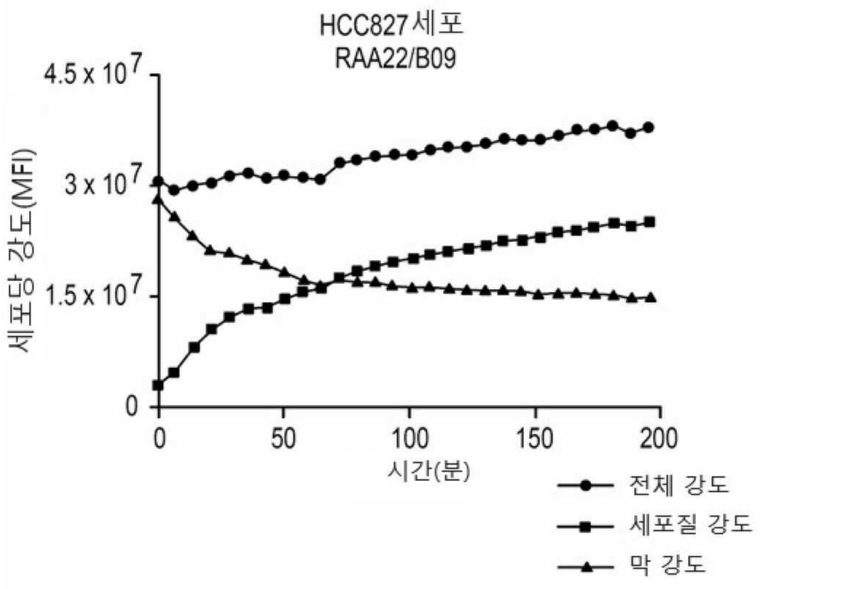
도면4b


RAA22/B09
세포당 강도(MFI)
4 x 10^6
3 x 10^6
2 x 10^6
1 x 10^6
0
0
50
100
150
200
시간(분)
1가 더 낮은 친화도 α-EGFR
세포당 강도(MFI)
4 x 10^5
3 x 10^5
2 x 10^5
1 x 10^5
0
0
50
100
150
200
시간(분)
1가 α-cMET
세포당 강도(MFI)
4 x 10^6
3 x 10^6
2 x 10^6
1 x 10^6
0
0
50
100
150
200
시간(분)
세포질 강도
막 강도

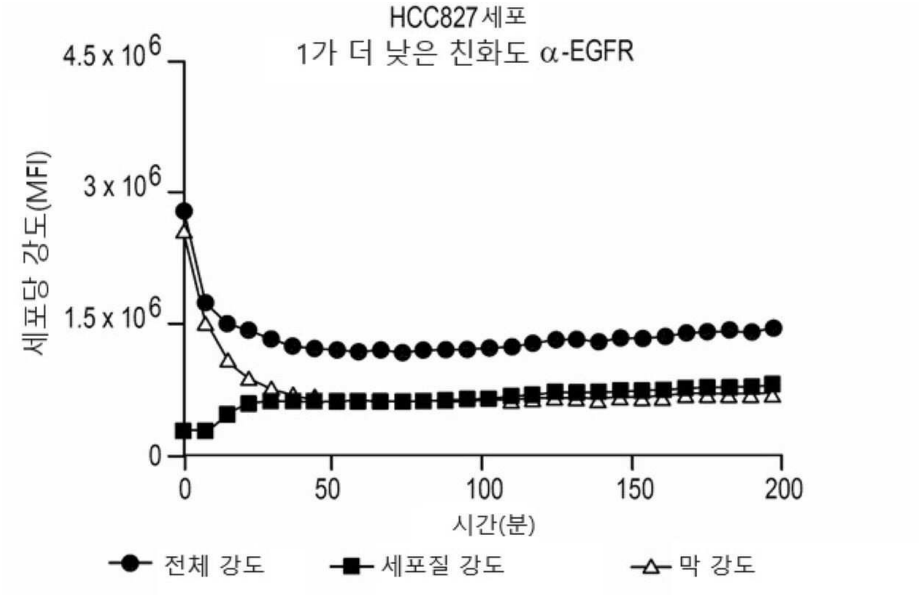
도면5a


H1975세포
RAA22/B09
4.5 x 10^6
3 x 10^6
1.5 x 10^6
0
세포당 강도(MFI)
0
50
100
150
200
시간(분)
전체 강도
세포질 강도
막 강도

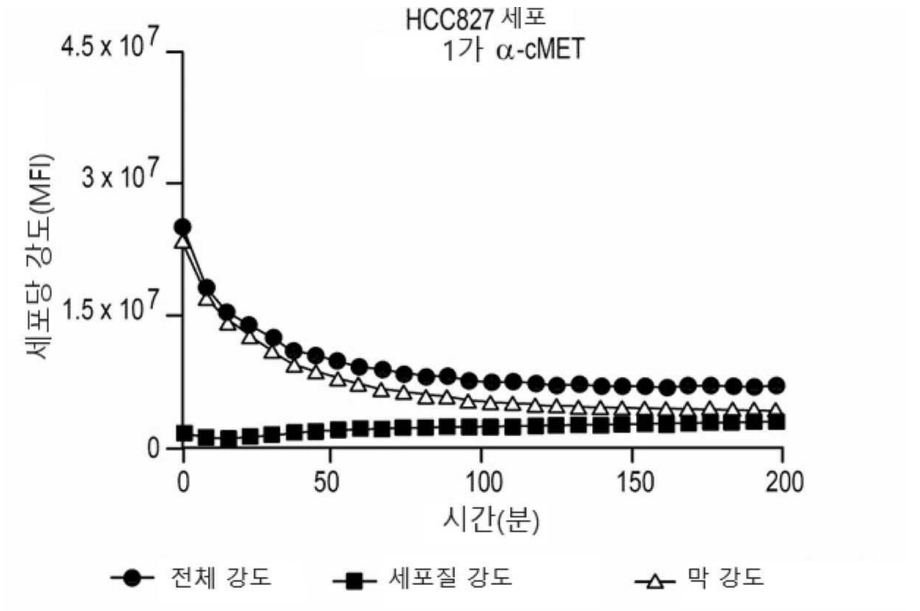
도면5b


HCC827세포
RAA22/B09
4.5 x 10^7
3 x 10^7
1.5 x 10^7
0
세포당 강도(MFI)
0
50
100
150
200
시간(분)
전체 강도
세포질 강도
막 강도

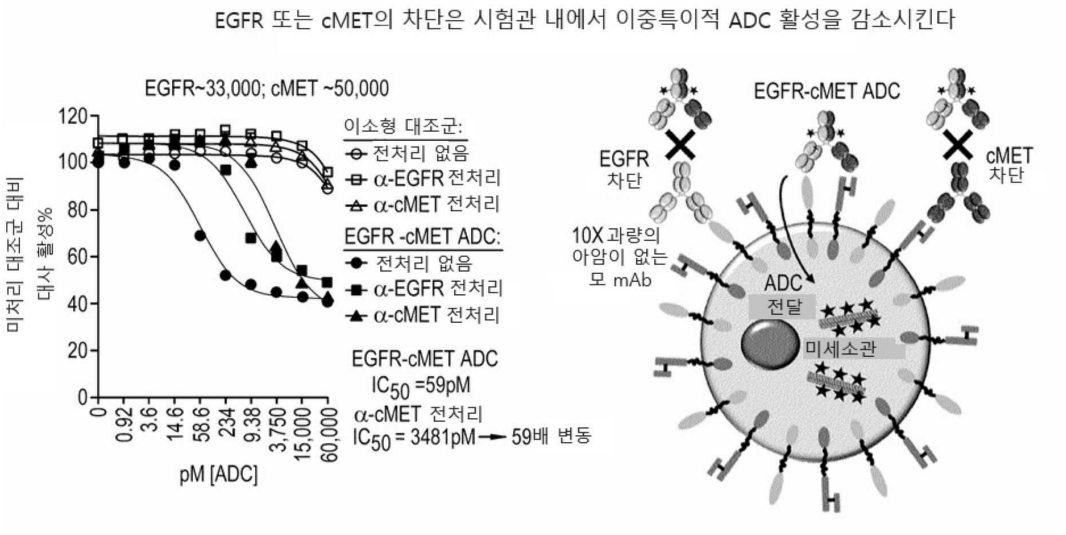
도면6a


HCC827 세포
1가 더 낮은 친화도 α-EGFR
세포당 강도(MFI)
4.5 x 10^6
3 x 10^6
1.5 x 10^6
0
0
50
100
150
200
시간(분)
전체 강도
세포질 강도
막 강도

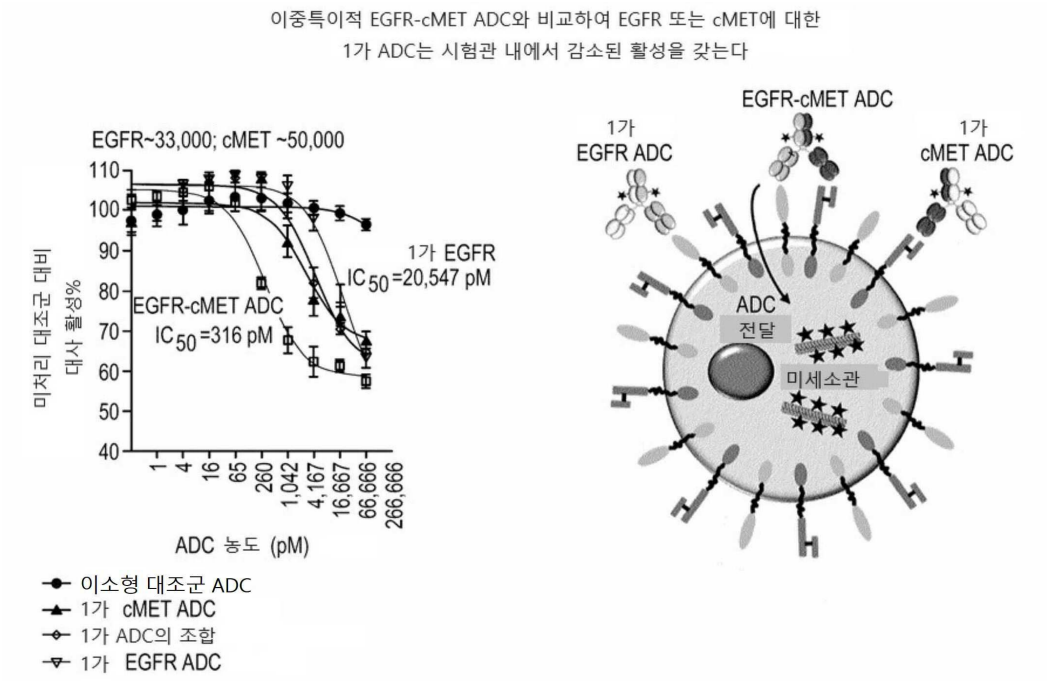
도면6b


HCC827 세포
1가 α-cMET
세포당 강도(MFI)
4.5 x 10^7
3 x 10^7
1.5 x 10^7
0
0
50
100
150
200
시간(분)
전체 강도
세포질 강도
막 강도

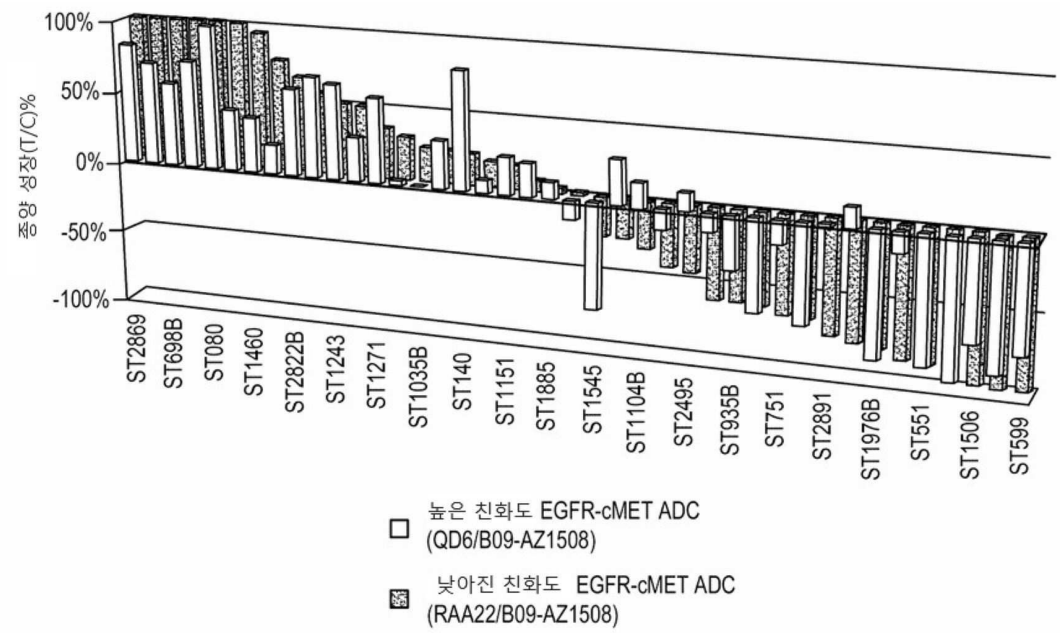
도면7


EGFR 또는 cMET의 차단은 시험관 내에서 이중특이적 ADC 활성을 감소시킨다
EGFR~33,000; cMET ~50,000
미처리 대조군 대비 대사 활성%
이소형 대조군:
전처리 없음
α-EGFR 전처리
α-cMET 전처리
EGFR -cMET ADC:
전처리 없음
α-EGFR 전처리
α-cMET 전처리
EGFR-cMET ADC
IC50 =59pM
α-cMET 전처리
IC50 = 3481pM → 59배 변동
pM [ADC]
EGFR-cMET ADC
EGFR 차단
cMET 차단
10X 과량의 아암이 없는 모 mAb
ADC 전달
미세소관

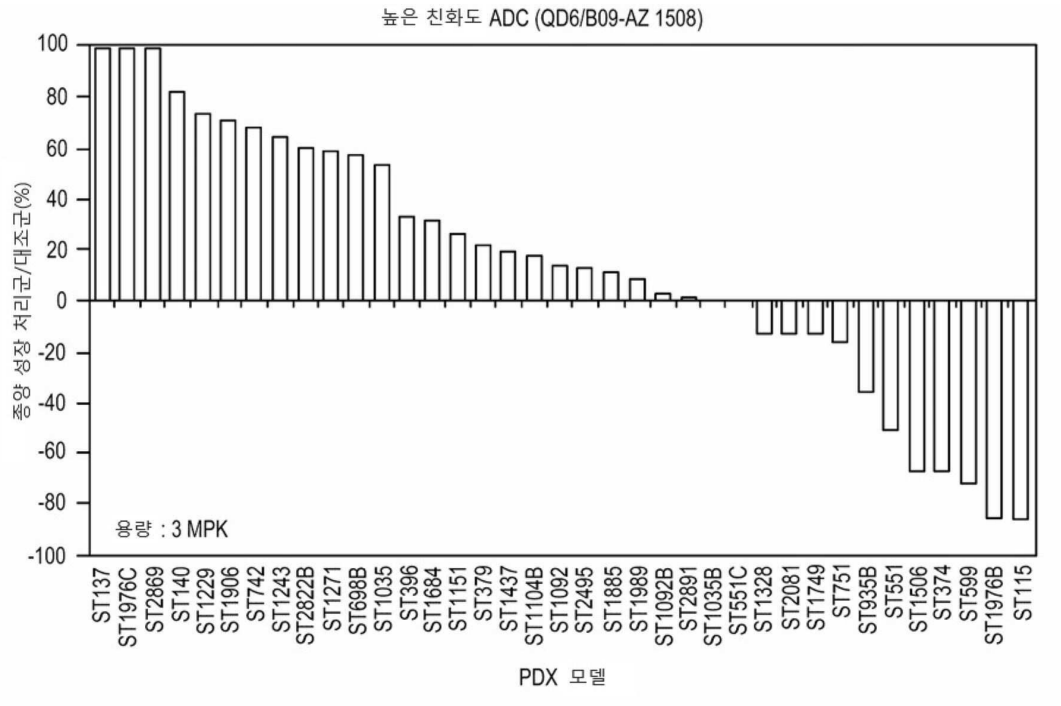
도면8


이중특이적 EGFR-cMET ADC와 비교하여 EGFR 또는 cMET에 대한
1가 ADC는 시험관 내에서 감소된 활성을 갖는다
EGFR~33,000; cMET ~50,000
미처리 대조군 대비 대사 활성%
1가 EGFR IC50 =20,547 pM
EGFR-cMET ADC IC50 =316 pM
ADC 농도 (pM)
이소형 대조군 ADC
1가 cMET ADC
1가 ADC의 조합
1가 EGFR ADC
EGFR-cMET ADC
1가 EGFR ADC
1가 cMET ADC
ADC 전달
미세소관

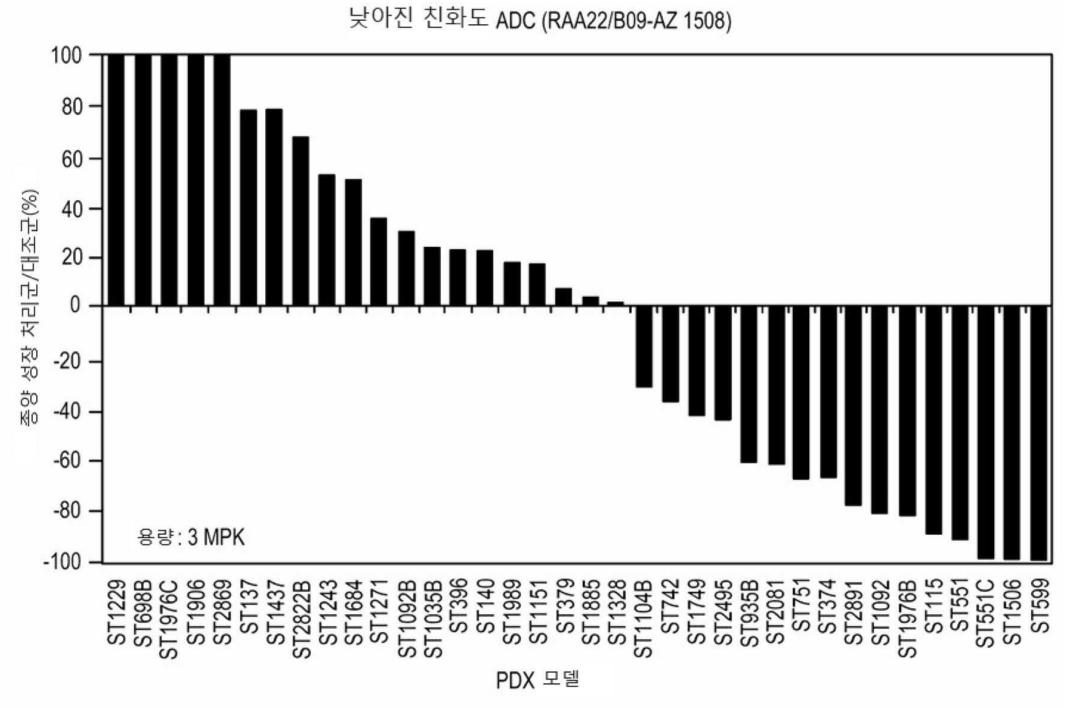
도면9a


100%
50%
0%
-50%
-100%
종양 성장(T/C)%
ST2869
ST698B
ST080
ST1460
ST2822B
ST1243
ST1271
ST1035B
ST140
ST1151
ST1885
ST1545
ST1104B
ST2495
ST935B
ST751
ST2891
ST1976B
ST551
ST1506
ST599
높은 친화도 EGFR-cMET ADC
(QD6/B09-AZ1508)
낮아진 친화도 EGFR-cMET ADC
(RAA22/B09-AZ1508)

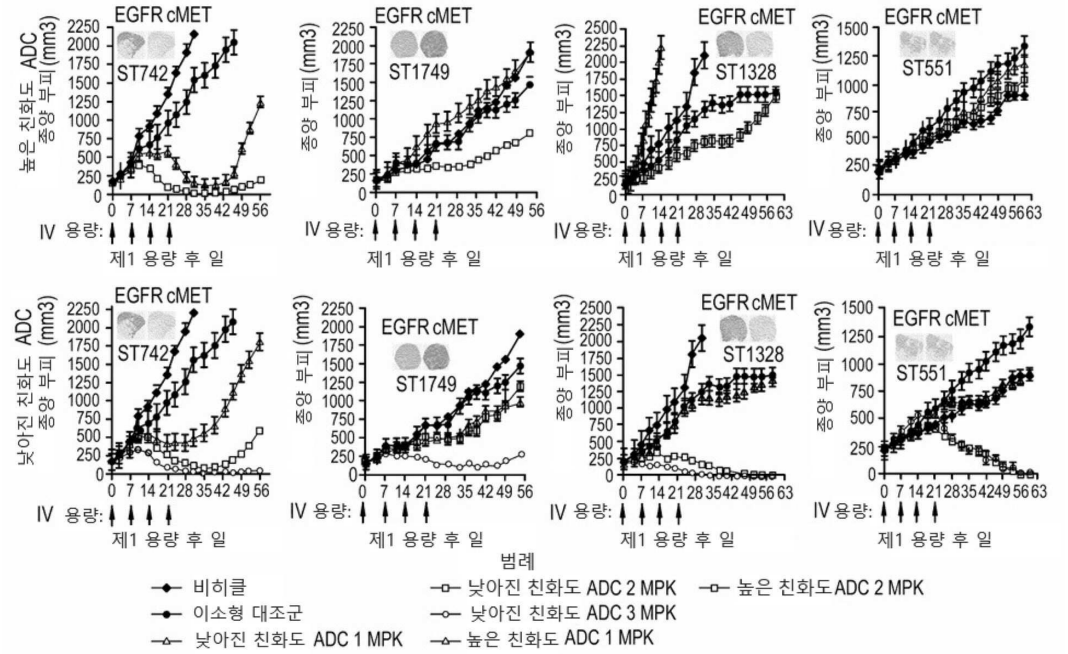
도면9b


높은 친화도 ADC (QD6/B09-AZ 1508)
종양 성장 처리군/대조군(%)
용량 : 3 MPK
PDX 모델
ST137
ST1976C
ST2869
ST140
ST1229
ST1906
ST742
ST1243
ST2822B
ST1271
ST698B
ST1035
ST396
ST1684
ST1151
ST379
ST1437
ST1104B
ST1092
ST2495
ST1885
ST1989
ST1092B
ST2891
ST1035B
ST551C
ST1328
ST2081
ST1749
ST751
ST935B
ST551
ST1506
ST374
ST599
ST1976B
ST115

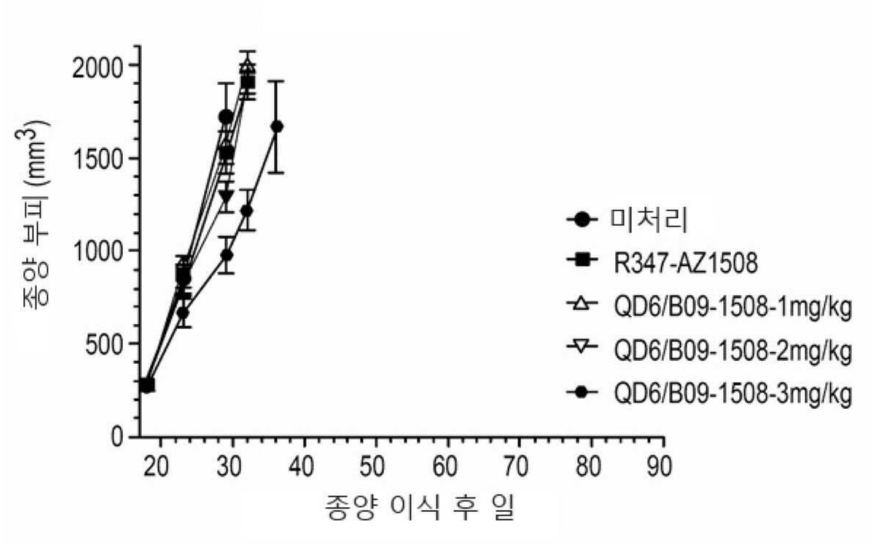
도면9c


낮아진 친화도 ADC (RAA22/B09-AZ 1508)
종양 성장 처리군/대조군(%)
용량 : 3 MPK
ST1229 ST698B ST1976C ST1906 ST2869 ST137 ST1437 ST2822B ST1243 ST1684 ST1271 ST1092B ST1035B ST396 ST140 ST1989 ST1151 ST379 ST1885 ST1328 ST1104B ST742 ST1749 ST2495 ST935B ST2081 ST751 ST374 ST2891 ST1092 ST1976B ST115 ST551 ST551C ST1506 ST599
PDX 모델

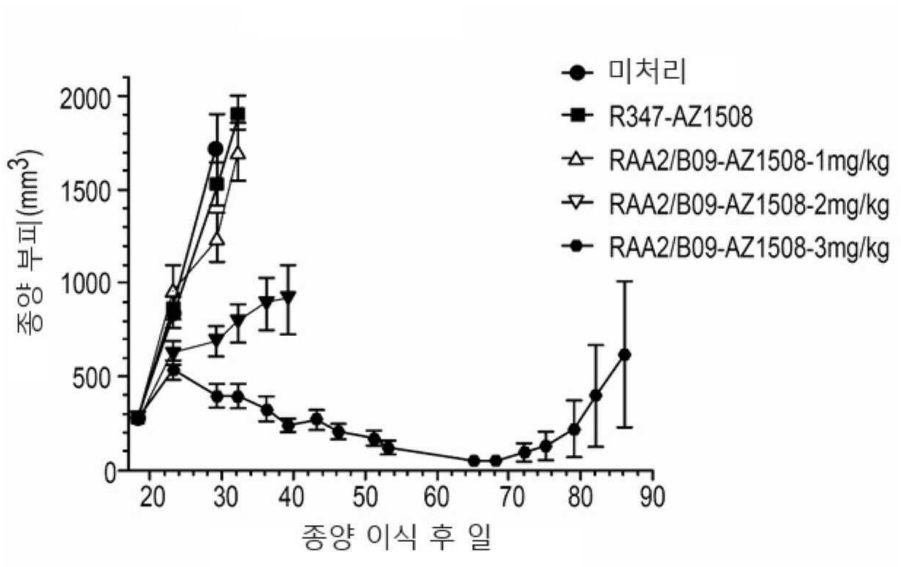
도면10


높은 친화도 ADC
낮아진 친화도 ADC
종양 부피 (mm3)
EGFR cMET
ST742
ST1749
ST1328
ST551
IV 용량:
제1 용량 후 일
범례
비히클
이소형 대조군
낮아진 친화도 ADC 1 MPK
낮아진 친화도 ADC 2 MPK
낮아진 친화도 ADC 3 MPK
높은 친화도 ADC 1 MPK
높은 친화도ADC 2 MPK

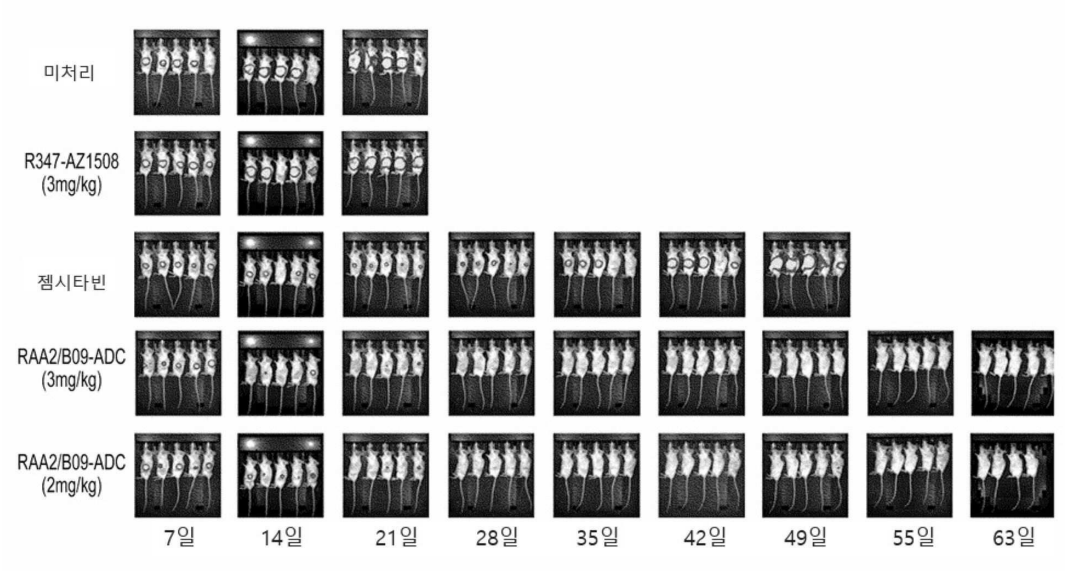
도면11a


종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
20
30
40
50
60
70
80
90
종양 이식 후 일
미처리
R347-AZ1508
QD6/B09-1508-1mg/kg
QD6/B09-1508-2mg/kg
QD6/B09-1508-3mg/kg

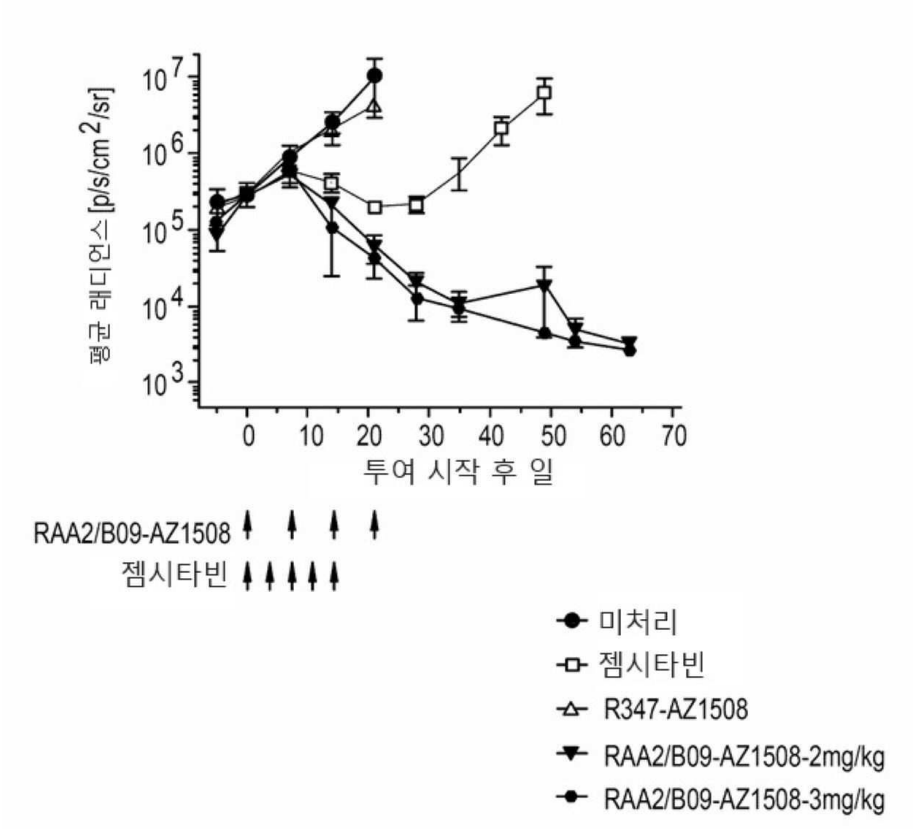
도면11b


종양 부피(mm3)
2000
1500
1000
500
0
20
30
40
50
60
70
80
90
종양 이식 후 일
미처리
R347-AZ1508
RAA2/B09-AZ1508-1mg/kg
RAA2/B09-AZ1508-2mg/kg
RAA2/B09-AZ1508-3mg/kg

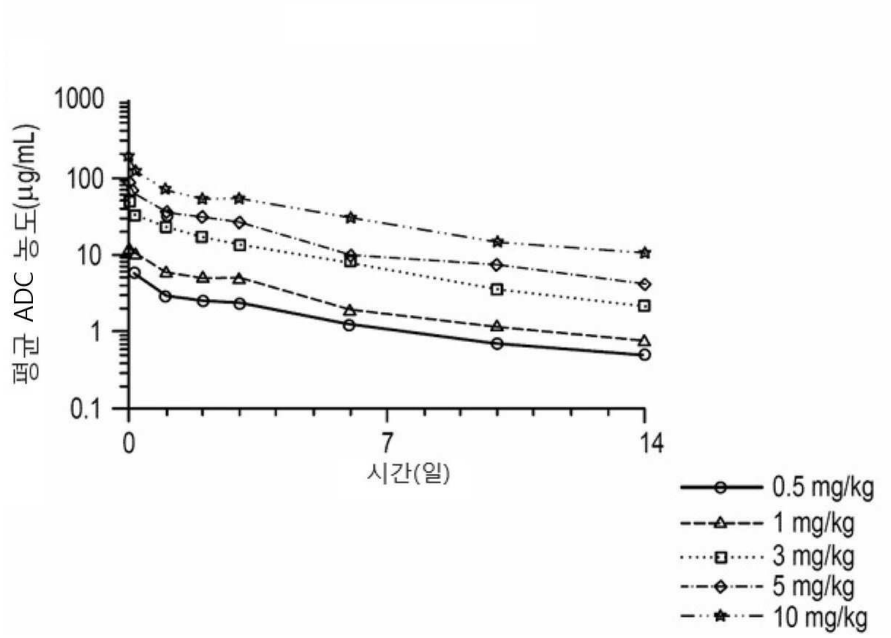
도면11c


미처리
R347-AZ1508
(3mg/kg)
젬시타빈
RAA2/B09-ADC
(3mg/kg)
RAA2/B09-ADC
(2mg/kg)
7일
14일
21일
28일
35일
42일
49일
55일
63일

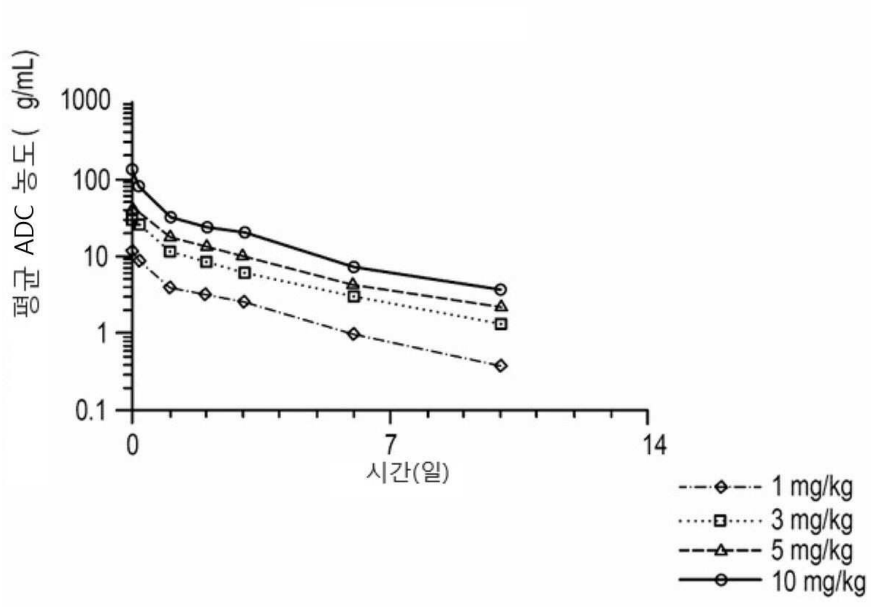
도면11d


평균 래디언스 [p/s/cm 2/sr]
10 7
10 6
10 5
10 4
10 3
0
10
20
30
40
50
60
70
투여 시작 후 일
RAA2/B09-AZ1508
젬시타빈
미처리
젬시타빈
R347-AZ1508
RAA2/B09-AZ1508-2mg/kg
RAA2/B09-AZ1508-3mg/kg

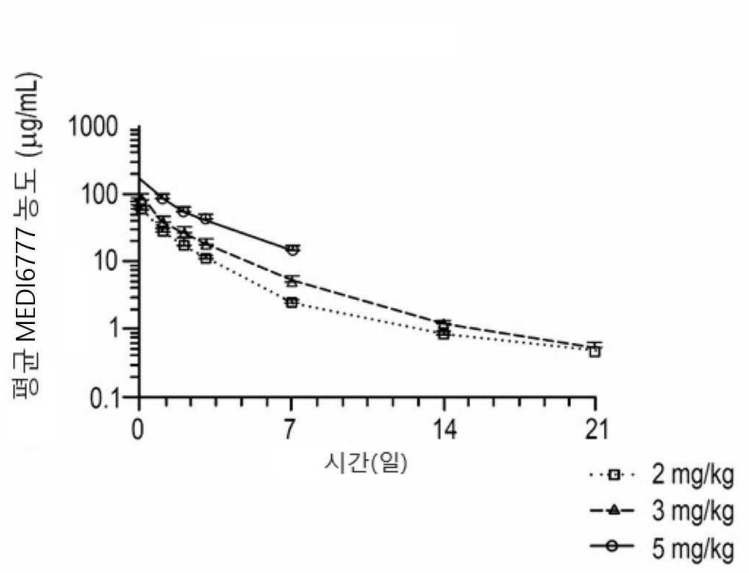
도면12a


1000
100
10
1
0.1
평균 ADC 농도(μg/mL)
0
7
14
시간(일)
0.5 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
5 mg/kg
10 mg/kg

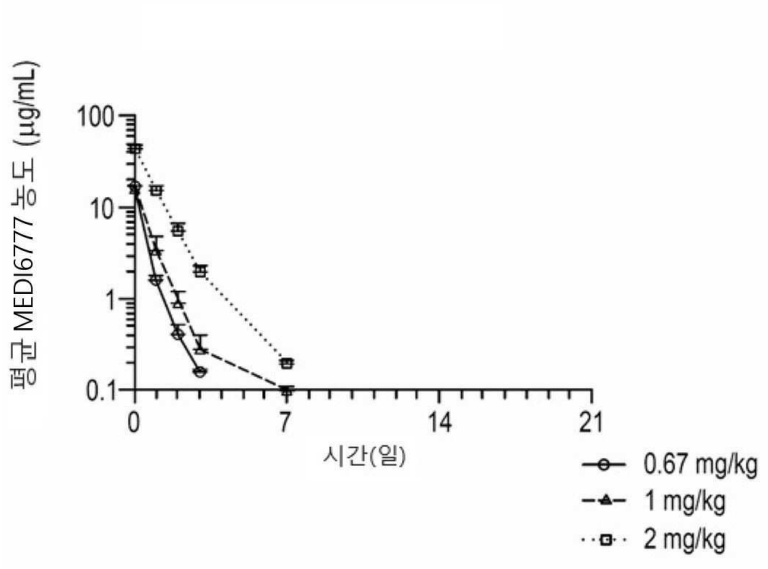
도면12b


1000
100
10
1
0.1
평균 ADC 농도(g/mL)
0
7
14
시간(일)
1 mg/kg
3 mg/kg
5 mg/kg
10 mg/kg

도면13a



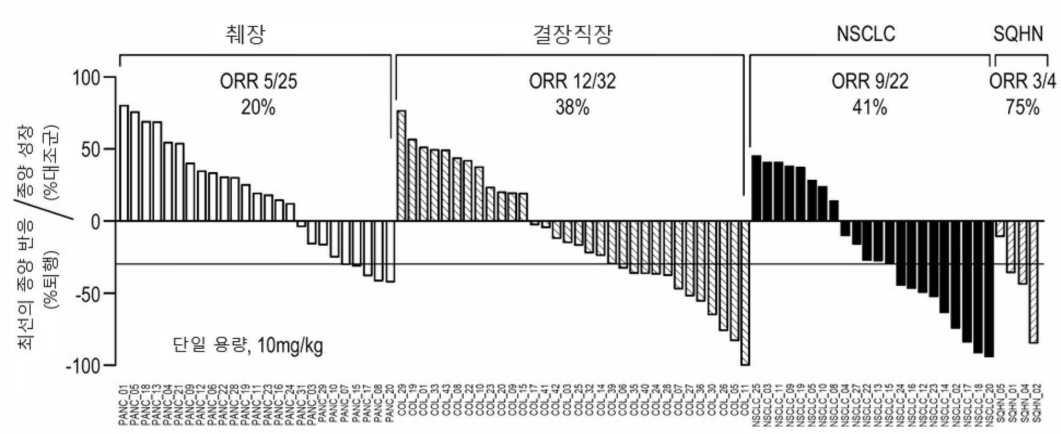
도면13b



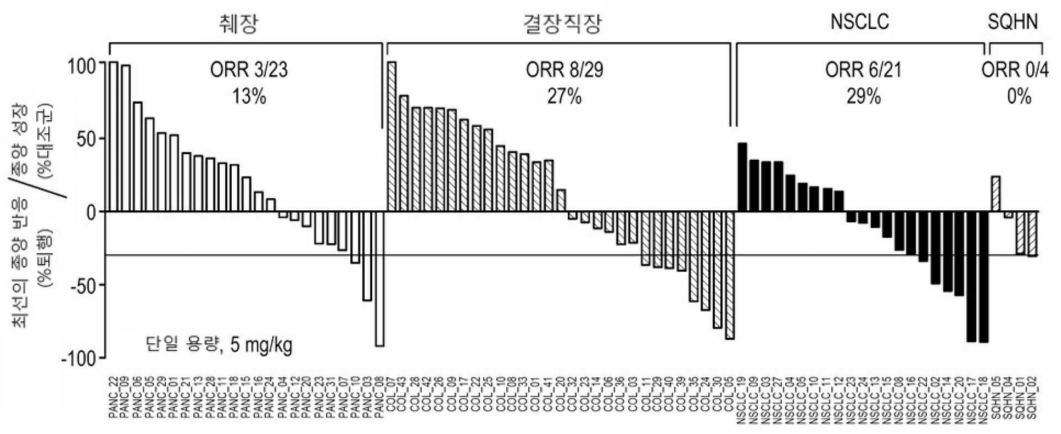
도면13c

QD6/B09-57-AZ1508 PK 매개변수			
용량 (mg/kg)	1	2	3
C_{max} (μg/mL)	20.4	51.4	73.3
AUC (μg* 일 /mL)	14.5	52.2	94.4
t1/2(일)	0.491	1.11	0.969
CL (mL/kg/ 일)	67.8	38.1	31.6

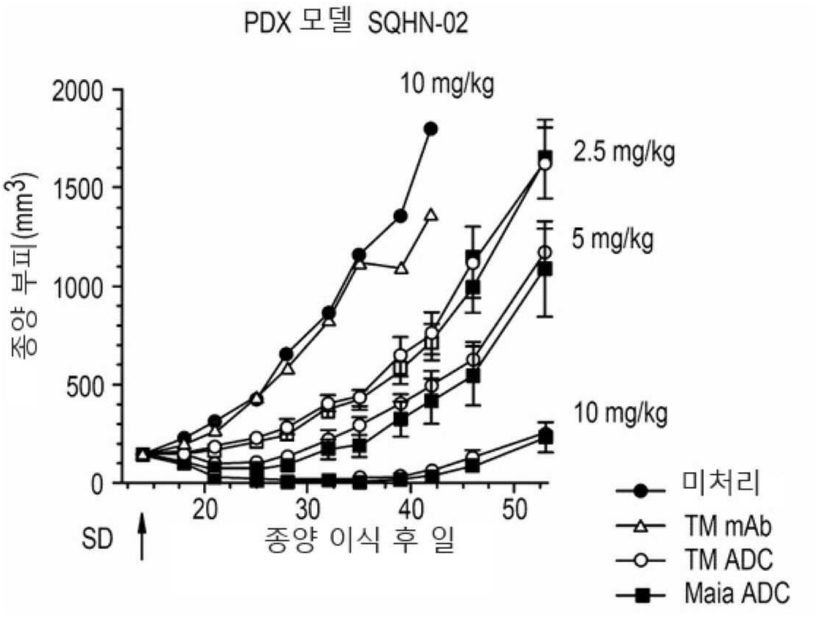
도면14



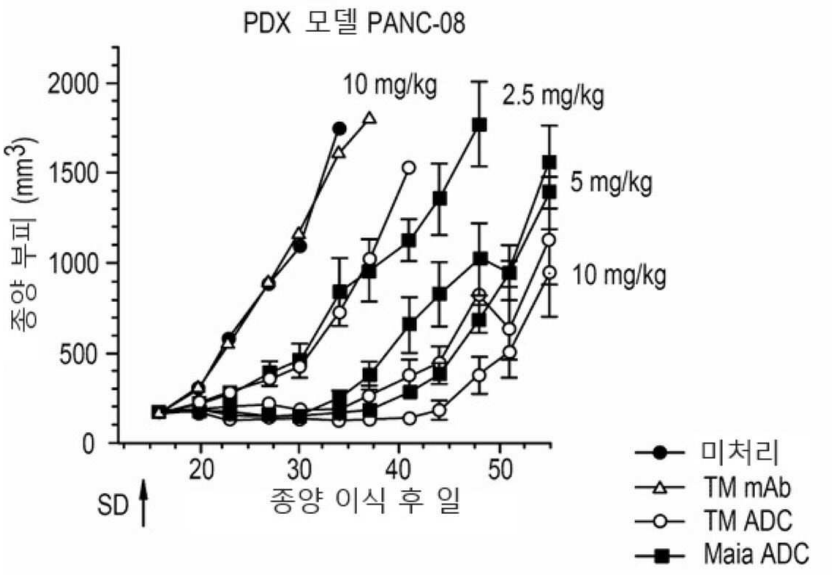
도면15



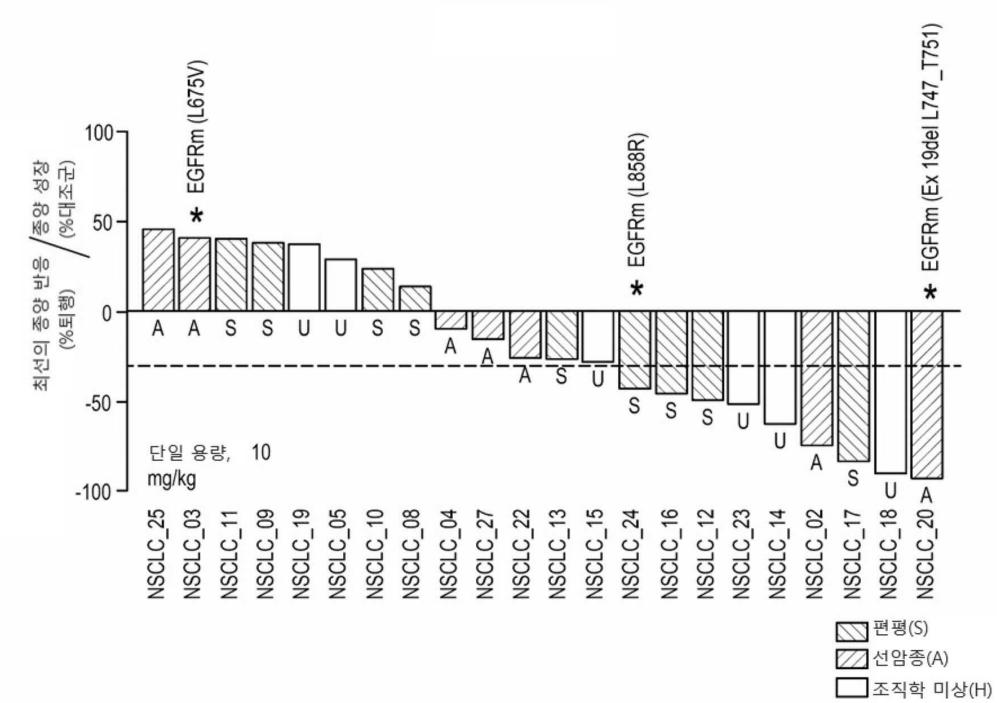
도면16a



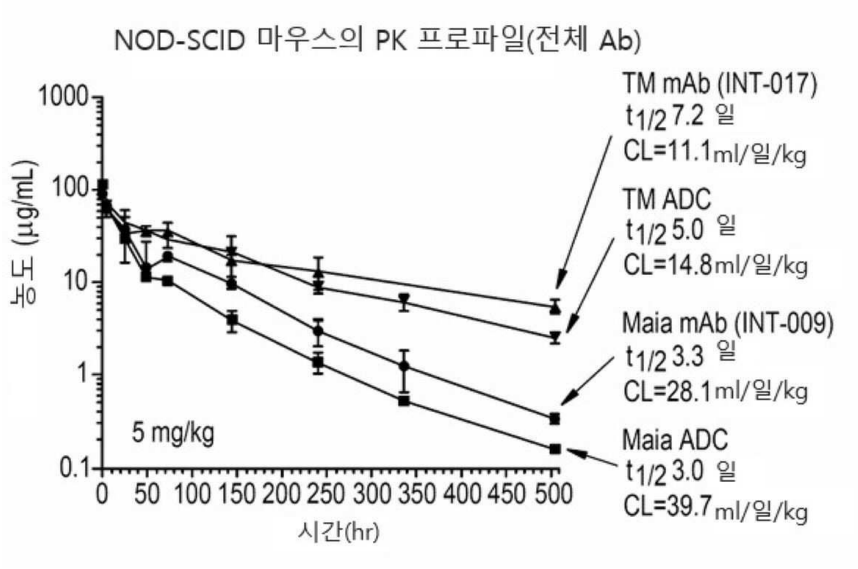
도면16b


PDX 모델 PANC-08
종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
10 mg/kg
2.5 mg/kg
5 mg/kg
10 mg/kg
20
30
40
50
SD
종양 이식 후 일
미처리
TM mAb
TM ADC
Maia ADC

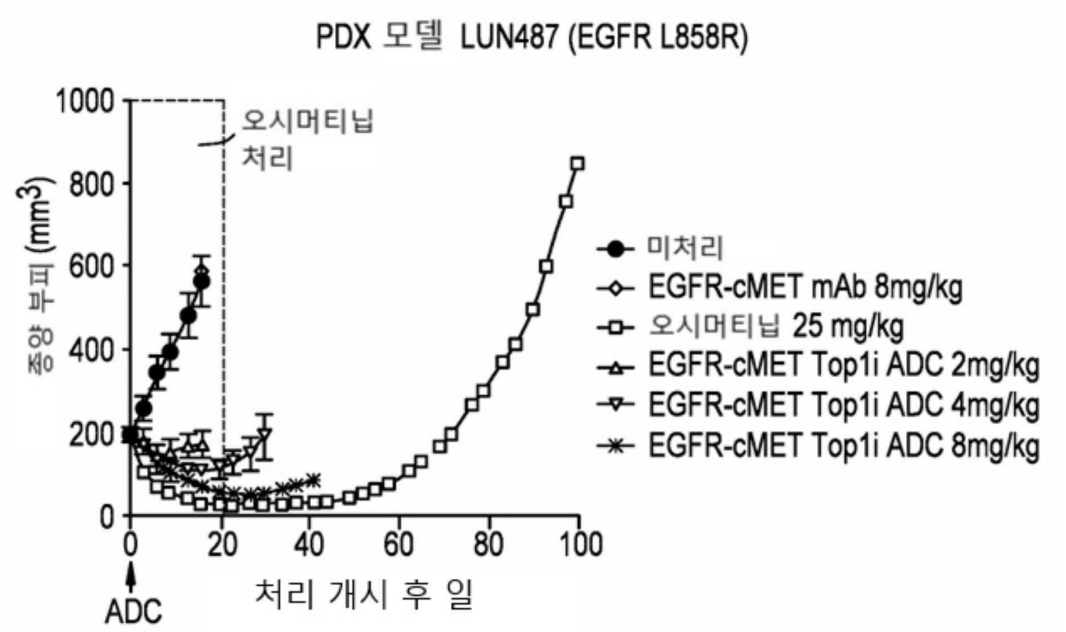
도면17


최선의 종양 반응 / 종양 성장 (%대조군) (%퇴행)
100
50
0
-50
-100
EGFRm (L675V)
EGFRm (L858R)
EGFRm (Ex 19del L747_T751)
A A S S U U S S A A A S U S S S U U A S A
단일 용량, 10 mg/kg
NSCLC_25
NSCLC_03
NSCLC_11
NSCLC_09
NSCLC_19
NSCLC_05
NSCLC_10
NSCLC_08
NSCLC_04
NSCLC_27
NSCLC_22
NSCLC_13
NSCLC_15
NSCLC_24
NSCLC_16
NSCLC_12
NSCLC_23
NSCLC_14
NSCLC_02
NSCLC_17
NSCLC_18
NSCLC_20
편평(S)
선암종(A)
조직학 미상(H)

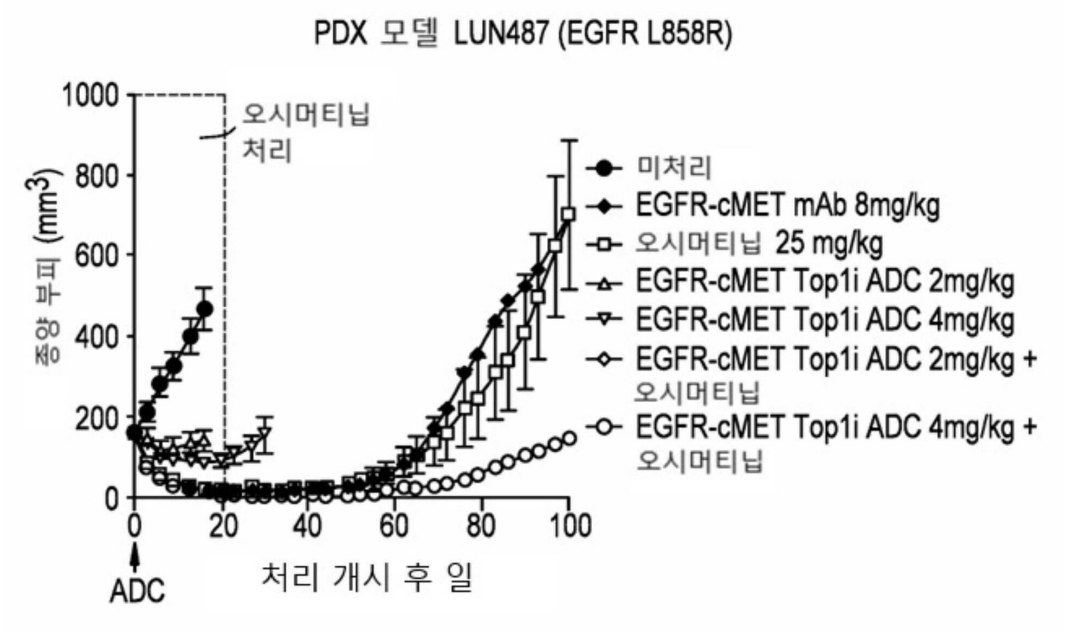
도면18


NOD-SCID 마우스의 PK 프로파일(전체 Ab)
TM mAb (INT-017)
t1/2 7.2 일
CL=11.1ml/일/kg
TM ADC
t1/2 5.0 일
CL=14.8ml/일/kg
Maia mAb (INT-009)
t1/2 3.3 일
CL=28.1ml/일/kg
Maia ADC
t1/2 3.0 일
CL=39.7ml/일/kg
농도 (μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
5 mg/kg
0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500
시간(hr)

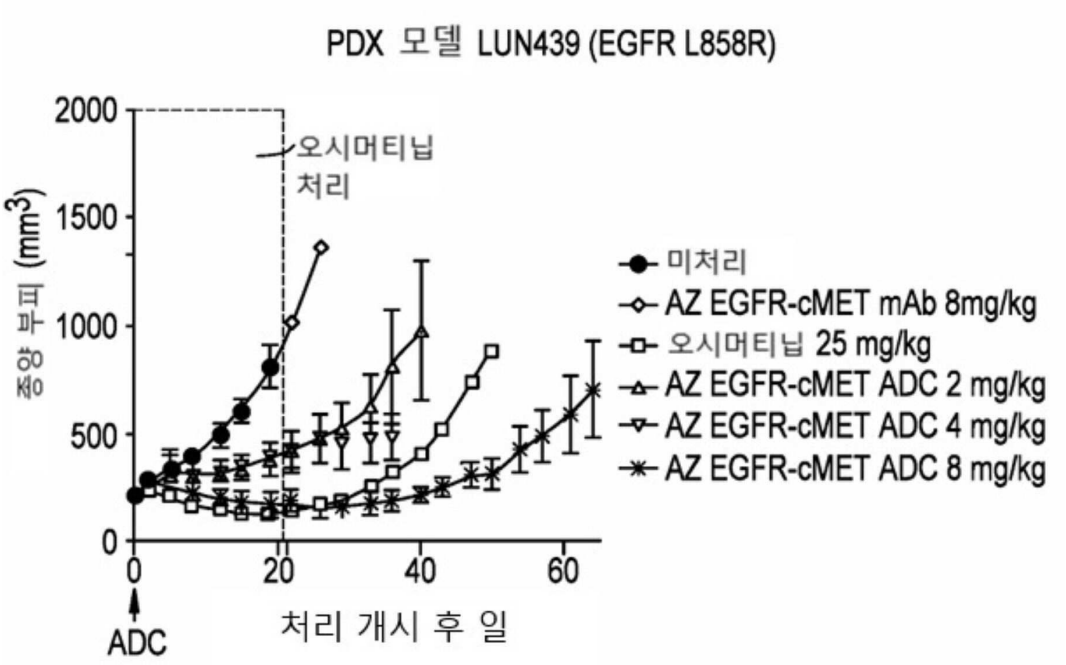
도면19a


PDX 모델 LUN487 (EGFR L858R)
오시머티닙
처리
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0 20 40 60 80 100
ADC
처리 개시 후 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 8mg/kg

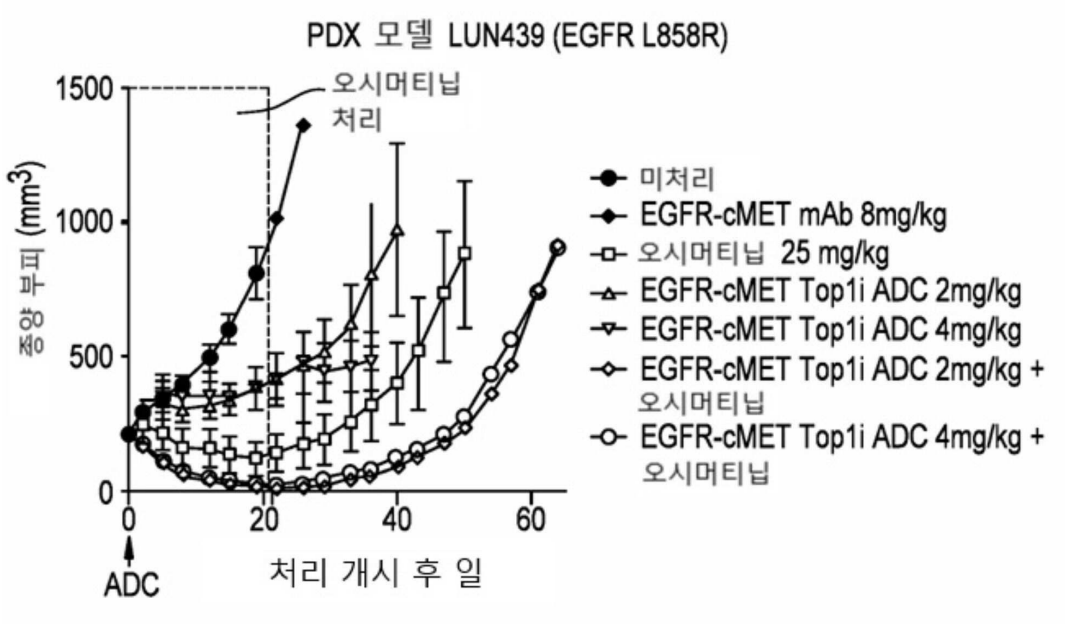
도면19b


PDX 모델 LUN487 (EGFR L858R)
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
80
100
ADC
처리 개시 후 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg +
오시머티닙
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg +
오시머티닙

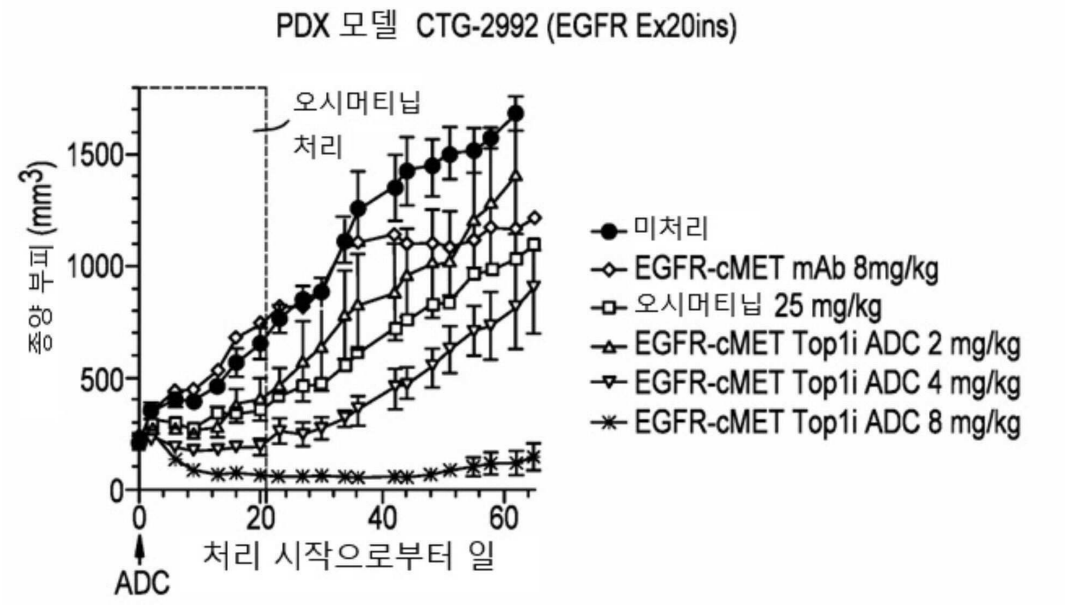
도면19c


PDX 모델 LUN439 (EGFR L858R)
종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
ADC
처리 개시 후 일
미처리
AZ EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
AZ EGFR-cMET ADC 2 mg/kg
AZ EGFR-cMET ADC 4 mg/kg
AZ EGFR-cMET ADC 8 mg/kg

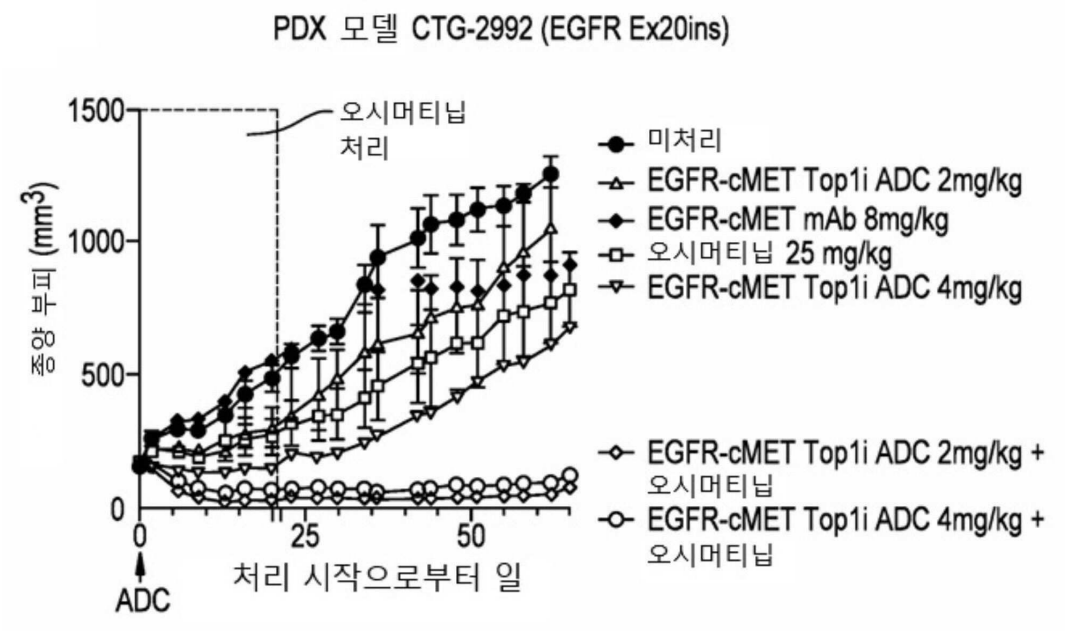
도면19d


PDX 모델 LUN439 (EGFR L858R)
종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
ADC
처리 개시 후 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg + 오시머티닙
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg + 오시머티닙

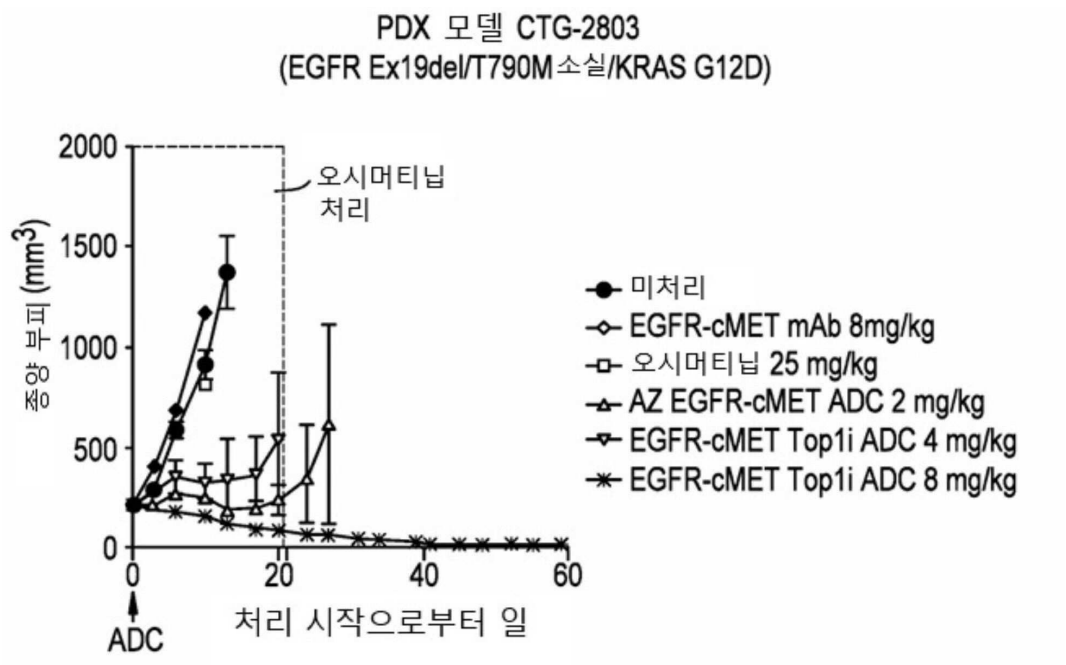
도면20a


PDX 모델 CTG-2992 (EGFR Ex20ins)
종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
ADC
처리 시작으로부터 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 8 mg/kg

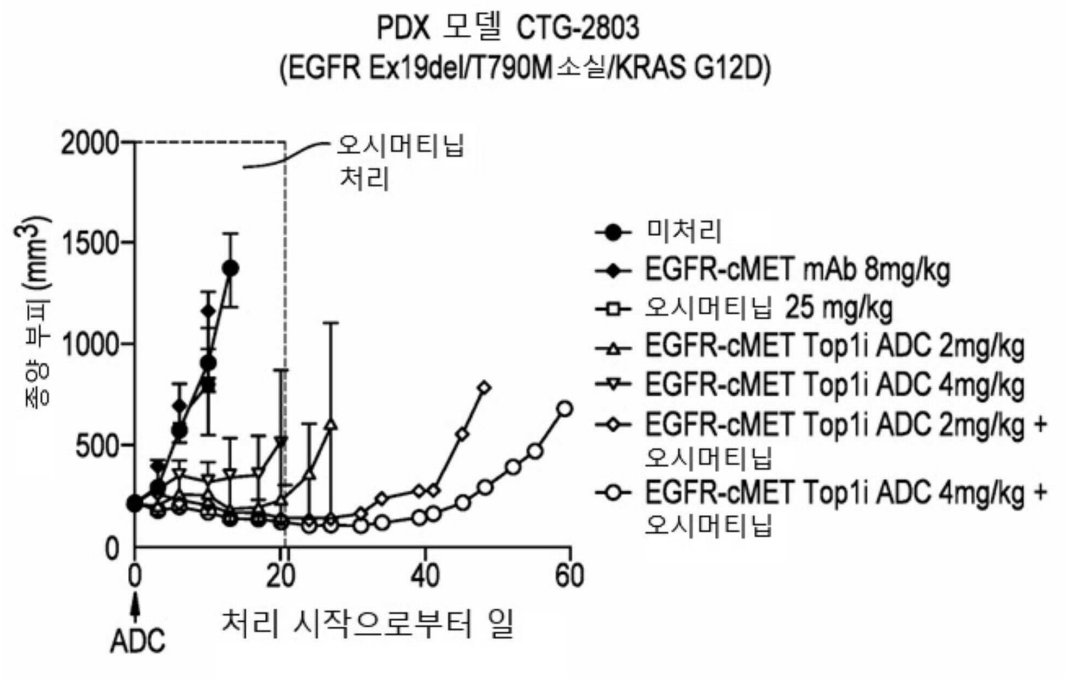
도면20b


PDX 모델 CTG-2992 (EGFR Ex20ins)
종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
25
50
ADC
처리 시작으로부터 일
미처리
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg +
오시머티닙
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg +
오시머티닙

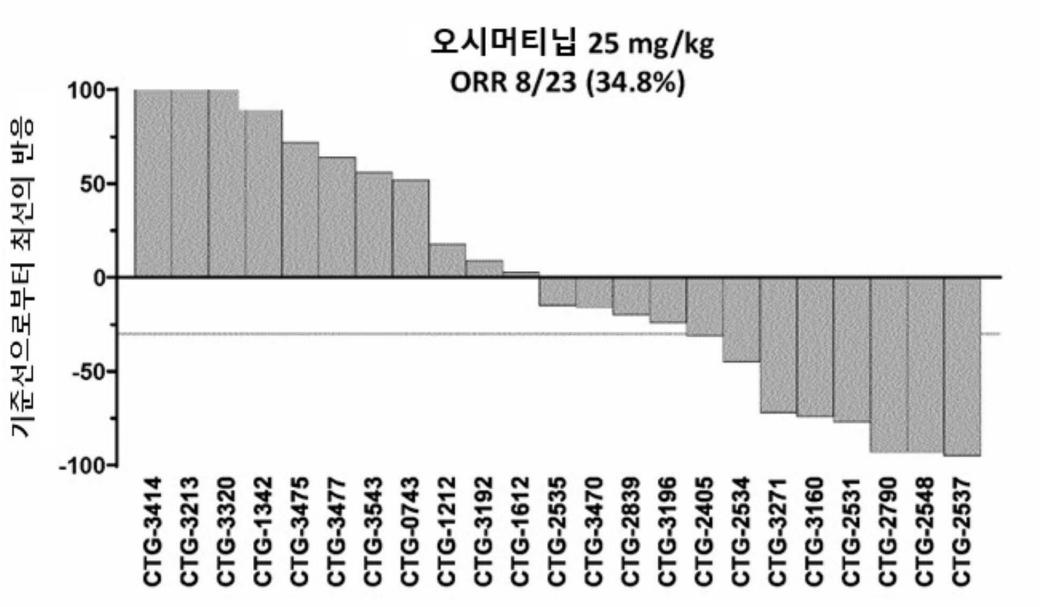
도면21a


PDX 모델 CTG-2803
(EGFR Ex19del/T790M소실/KRAS G12D)
종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
ADC
처리 시작으로부터 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
AZ EGFR-cMET ADC 2 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 8 mg/kg

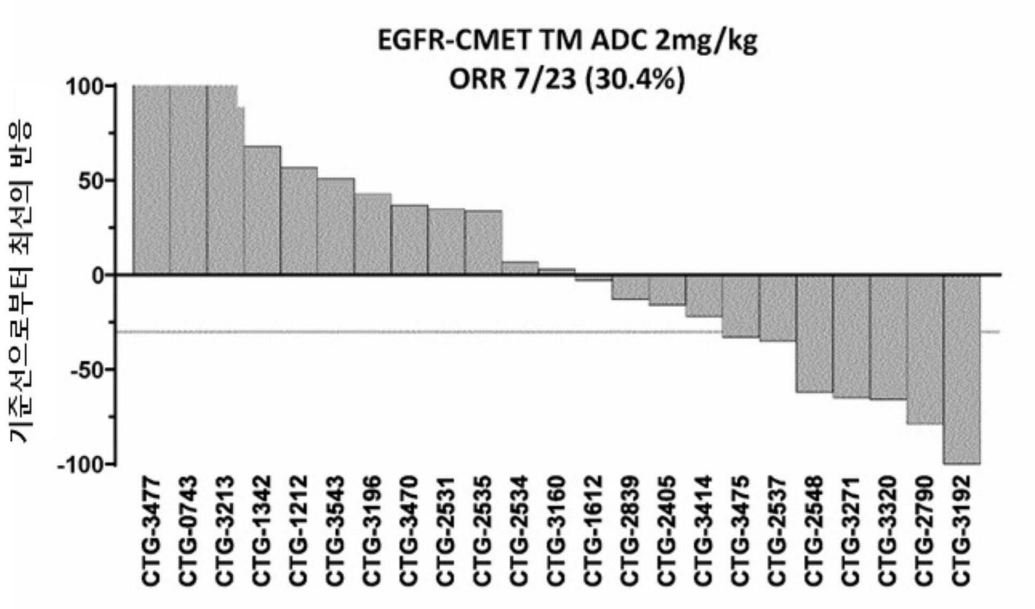
도면21b


PDX 모델 CTG-2803
(EGFR Ex19del/T790M 소실/KRAS G12D)
종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
오시머티닙
처리
0
20
40
60
ADC
처리 시작으로부터 일
미처리
EGFR-cMET mAb 8mg/kg
오시머티닙 25 mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg
EGFR-cMET Top1i ADC 2mg/kg +
오시머티닙
EGFR-cMET Top1i ADC 4mg/kg +
오시머티닙

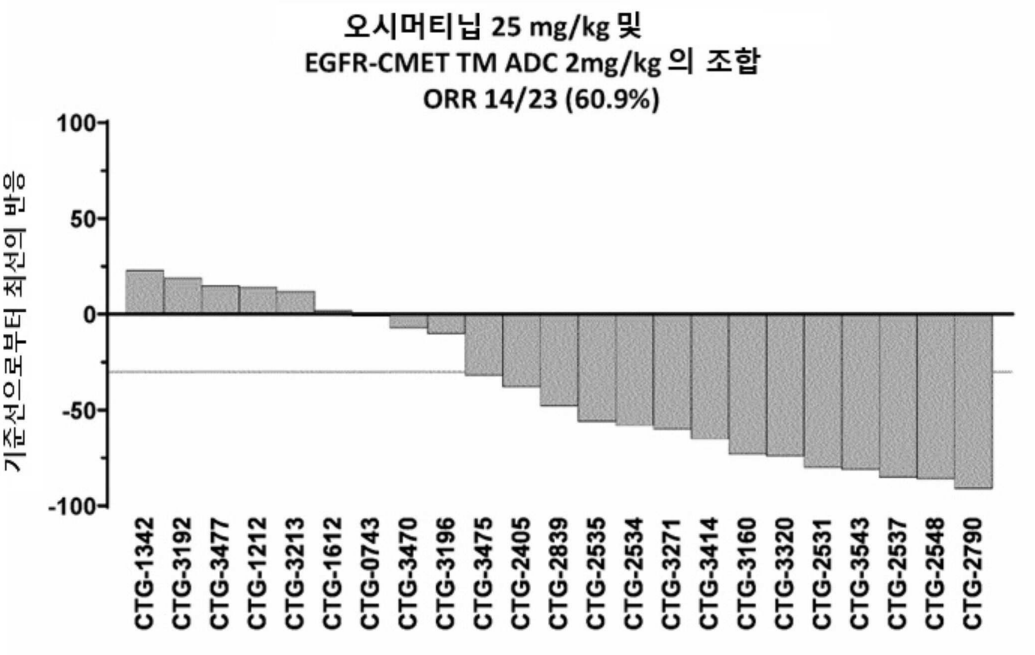
도면22a


오시머티닙 25 mg/kg
ORR 8/23 (34.8%)
기준선으로부터 최선의 반응
100
50
0
-50
-100
CTG-3414
CTG-3213
CTG-3320
CTG-1342
CTG-3475
CTG-3477
CTG-3543
CTG-0743
CTG-1212
CTG-3192
CTG-1612
CTG-2535
CTG-3470
CTG-2839
CTG-3196
CTG-2405
CTG-2534
CTG-3271
CTG-3160
CTG-2531
CTG-2790
CTG-2548
CTG-2537

도면22b


EGFR-CMET TM ADC 2mg/kg
ORR 7/23 (30.4%)
기준선으로부터 최선의 반응
100
50
0
-50
-100
CTG-3477
CTG-0743
CTG-3213
CTG-1342
CTG-1212
CTG-3543
CTG-3196
CTG-3470
CTG-2531
CTG-2535
CTG-2534
CTG-3160
CTG-1612
CTG-2839
CTG-2405
CTG-3414
CTG-3475
CTG-2537
CTG-2548
CTG-3271
CTG-3320
CTG-2790
CTG-3192

도면22c


오시머티닙 25 mg/kg 및
EGFR-CMET TM ADC 2mg/kg 의 조합
ORR 14/23 (60.9%)
기준선으로부터 최선의 반응
100
50
0
-50
-100
CTG-1342
CTG-3192
CTG-3477
CTG-1212
CTG-3213
CTG-1612
CTG-0743
CTG-3470
CTG-3196
CTG-3475
CTG-2405
CTG-2839
CTG-2535
CTG-2534
CTG-3271
CTG-3414
CTG-3160
CTG-3320
CTG-2531
CTG-3543
CTG-2537
CTG-2548
CTG-2790

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.