

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0134329  
(43) 공개일자 2024년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/68 (2017.01) A61K 31/58 (2021.01)

A61P 37/00 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6845 (2017.08)

A61K 31/58 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7025079

(22) 출원일자(국제) 2023년01월19일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년07월24일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/073057

(87) 국제공개번호 WO 2023/143351

국제공개일자 2023년08월03일

(30) 우선권주장

202210110349.5 2022년01월29일 중국(CN)

(71) 출원인

상하이 쉹디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드

중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 디스트릭트, 장지양 타운, 하이커 로드 넘버 1288

지양수 쉹그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드

상하이 쉹후이 메디슨 컴퍼니 리미티드

중국, 201203 상하이 푸둥 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4

(72) 발명자

런 원밍

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지양 타운 하이커 로드 넘버 1288

주 링지안

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에리어 프리 트레이드 파일럿 존 진커 로드 넘버 3728 빌딩 넘버 14 플로어 4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

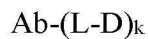
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 글루코코르티코이드의 약물 집합체

## (57) 요약

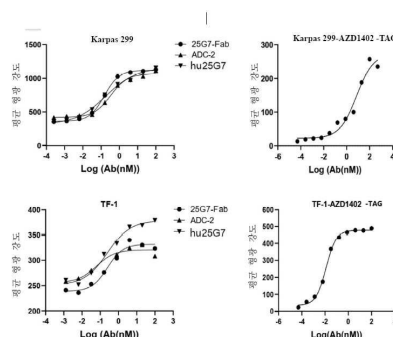
식 (I)로 표시되는 항체-약물 집합체:



(I)

여기서 Ab는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, L은 Ab를 D에 공유결합시키는 링커이며, k는 1 내지 20이고, D는 글루코코르티코이드 또는 이의 잔기이며, 상기 글루코코르티코이드는 부테소니드 또는 시클레소니드로부터 선택된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6803* (2023.08)

*A61K 47/6889* (2017.08)

*A61P 37/00* (2018.01)

*C07K 16/22* (2013.01)

(72) 발명자

**천 하오**

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지앙 타운  
하이커 로드 넘버1288

**탕 만평**

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지앙 타운  
하이커 로드 넘버1288

**린 위엔**

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지앙 타운  
하이커 로드 넘버1288

**저우 차이홍**

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지앙 타운  
하이커 로드 넘버1288

**후양 지안**

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에리어 프리 트레이드  
파일럿 존 진커 로드 넘버3728 빌딩 넘버14 플로어  
4

**리아오 칭**

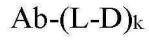
중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에리어 장지앙 타운  
하이커 로드 넘버1288

## 명세서

## 청구범위

## 청구항 1

식 (I)로 표시되는 항체-약물 접합체로서,



(I)

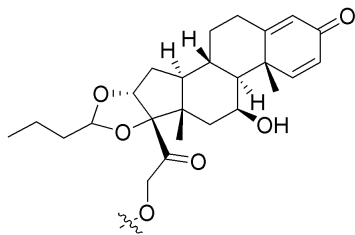
여기서, Ab는 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고,

L은 Ab를 D에 공유결합시키는 링커이며, k는 1 내지 20이고,

D는 글루코코르티코이드 또는 이의 잔기이며, 상기 글루코코르티코이드는 부데소니드 또는 시클레소니드로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

## 청구항 2

제1항에 있어서, D는 다음과 같은, 항체-약물 접합체:



## 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이하 (I) 내지 (IV):

(I) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

각각 SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(II) 각각 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

각각 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 16에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(III) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

각각 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(IV) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

각각 SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 39 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하는, 항체-약물 접합체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체는 마우스 유래 항체, 키메라 항체, 전체 인간 항체 및 인간화 항체 중 임의의 하나로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 경쇄 IGHV3-11\*01로부터 유래된 FR 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 FR을 포함하며; 상기 FR은 바람직하게는 46P, 47W 및 71Y 중 하나 이상으로부터 선택되는 역 돌연변이를 포함하고; 및/또는

인간 생식 계열 중쇄 IGHV3-48\*01로부터 유래된 FR 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 FR을 포함하며; 상기 FR은 바람직하게는 49A, 67S 및 93T 중 하나 이상으로부터 선택되는 역 돌연변이를 포함하고;

또는 바람직하게는, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 경쇄 IGKV2D-29\*01로부터 유래된 FR 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 FR을 포함하고; 상기 FR은 바람직하게는 4L 및/또는 58I로부터 선택되는 역 돌연변이를 포함하고; 및/또는

인간 생식 계열 중쇄 IGHV1-2\*02로부터 유래된 FR 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 FR을 포함하며; 상기 FR은 바람직하게는 69L, 71I, 73K 및 94K 중 하나 이상으로부터 선택되는 역 돌연변이를 포함하는, 항체-약물 접합체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이하 (i) 내지 (vi):

(i) SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 43과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 37과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(ii) SEQ ID NO: 9에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 9와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 10과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(iii) SEQ ID NO: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 1과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 2와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(iv) SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 43과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO: 41에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 41과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(v) SEQ ID NO: 25~27 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 25~27 중 하나와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO: 28~30 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 28~30 중 하나와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(vi) SEQ ID NO: 31~33 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 31~33 중 하나와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

SEQ ID NO 34~36 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO 34~36 중 하나와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하고;

바람직하게는, 상기 항IL-4R 항체 또는 항원 결합 단편은 이하 (vii) 내지 (xii):

(vii) SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역;

(viii) SEQ ID NO: 9에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 10에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역;

(ix) SEQ ID NO: 1에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 2에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역;

(x) SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 41에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역;

(xi) SEQ ID NO: 25~27 중 하나에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 28~30 중 하나에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역;

(xii) SEQ ID NO: 31~33 중 하나에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 34~36 중 하나에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄 가변 영역

중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하는, 항체-약물 접합체.

## 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역은 인간화 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체이고; 및/또는

상기 항원 결합 단편은 Fab, Fv, scFv, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>인, 항체-약물 접합체.

## 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a)~(d):

(a) SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 44와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 45와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(b) SEQ ID NO: 19에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 19와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 20과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(c) SEQ ID NO: 17에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 17과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(d) SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 44와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 46과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하고;

보다 바람직하게는, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (e)~(i):

- (e) SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;
  - (f) SEQ ID NO: 47에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;
  - (g) SEQ ID NO: 17에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;
  - (h) SEQ ID NO: 19에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;
  - (i) SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄
- 중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하는, 항체-약물 접합체.

## 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a)~(f):

(a) SEQ ID NO: 48에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 48과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(b) SEQ ID NO: 49에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 49와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(c) SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 50과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 45와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(d) SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 50과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 46과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(e) SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 51과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 45와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

(f) SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 51과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 46과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

보다 바람직하게는, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (h)~(m):

(h) SEQ ID NO: 48에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;

(i) SEQ ID NO: 49에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;

(j) SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;

(k) SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;

(l) SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄;

(m) SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 서열의 중쇄 및 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 서열의 경쇄

중에서 선택되는 임의의 하나를 포함하는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 9

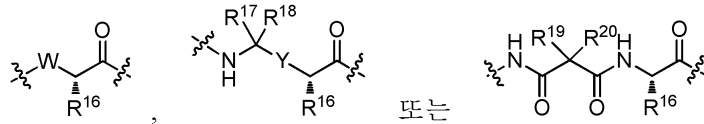
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, L-D는 하기 식으로 표시되는 화학 부분이고:

-Str-Pep-Sp-D,

여기서, Str는 Ab에 공유결합되는 신축 베이스 유닛이고,

Sp는 스페이스 유닛이며,

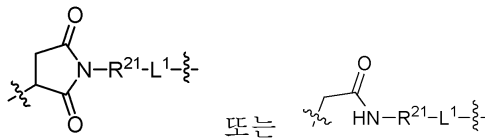
Pep는 아미노산 유닛, 이황화물 부분, 술폰아미드 부분 또는



와 같은 비펩타이드 화학 부분으로부터 선택되고, 여기서 W는 -NH-헤테로시클로알킬렌- 또는 헤테로시클로알킬이고; Y는 헤테로아릴렌, 아릴렌, -C(O)C<sub>1-6</sub>알킬렌, C<sub>2-6</sub>알케닐렌, C<sub>1-6</sub>알킬렌 또는 -C<sub>1-6</sub>알킬렌-NH-이며; 각 R<sup>16</sup>은 독립적으로 C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, -(C<sub>1-6</sub>알킬렌)NHC(NH)NH<sub>2</sub> 또는 -(C<sub>1-6</sub>알킬렌)NHC(O)NH<sub>2</sub>로부터 선택되며; R<sup>17</sup> 및 R<sup>18</sup>은 각각 독립적으로 수소, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, 아릴, 헤테로아릴로부터 선택되며, 또는 R<sup>17</sup>과 R<sup>18</sup>은 함께 C<sub>3-6</sub>시클로알킬을 형성할 수 있고; R<sup>19</sup> 및 R<sup>20</sup>은 각각 독립적으로 C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, 아릴, 헤테로아릴, (C<sub>1-6</sub>알킬)OCH<sub>2</sub>-로부터 선택되고, 또는 R<sup>19</sup>와 R<sup>20</sup>은 함께 C<sub>3-6</sub>시클로알킬 고리를 형성할 수 있는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 10

제9항에 있어서, Str는



으로 표시되는 화학 부분으로부터 선택되고, 여기서 R<sup>21</sup>은 -W<sub>1</sub>-C(O)-, -C(O)-W<sub>1</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-로부터 선택되며, 여기서 W<sub>1</sub>은 C<sub>1-6</sub>알킬렌, C<sub>1-6</sub>알킬렌-시클로알킬 또는 1 내지 8개 원자의 직쇄 헤테로알킬로부터 선택되고, 상기 헤테로알킬은 N, O 또는 S로부터 선택되는 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함하고, 상기 알킬, 시클로알킬 및 직쇄 헤테로알킬은 각각 독립적으로 할로겐, 중수소, 히드록시, 시아노, 아미노, C<sub>1-6</sub>알킬, 할로C<sub>1-6</sub>알킬, 중수소화 C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>1-6</sub>알콕시 및 C<sub>3-6</sub>시클로알킬로부터 선택적으로 선택되는 하나 이상에 의해 치환되며, p<sub>1</sub>은 각각 독립적으로 1 내지 20의 정수이고;

L<sup>1</sup>은 -NR<sup>22</sup>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>22</sup>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>C(O)- 또는 단일 결합으로부터 선택되며, 바람직하게는 단일 결합이고; p<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 1 내지 20의 정수이며, R<sup>22</sup>는 수소 원자, C<sub>1-6</sub>알킬, 할로C<sub>1-6</sub>알킬 또는 중수소화 C<sub>1-6</sub>알킬로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 11

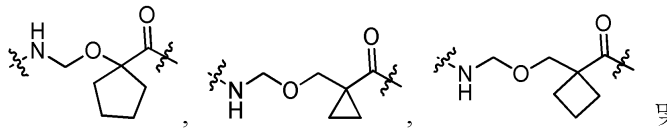
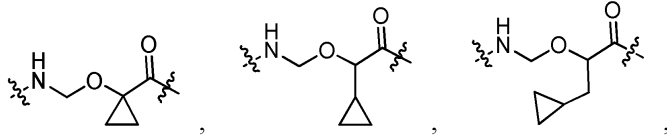
제10항에 있어서, R<sup>21</sup>은 -C<sub>1-6</sub>알킬렌 C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>C(O)- 및 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>C(O)-로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 12

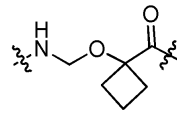
제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 Pep는 발린-시트룰린, 알라닌-알라닌-아스파라긴, 글라이신-글라이신-라이신, 발린-라이신(Val-lys), 발린-알라닌, 발린-페닐알라닌 또는 글라이신-글라이신-페닐알라닌-글라이신으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, Sp는  $-\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ ,



및



로부터 선택되는, 항체-약물

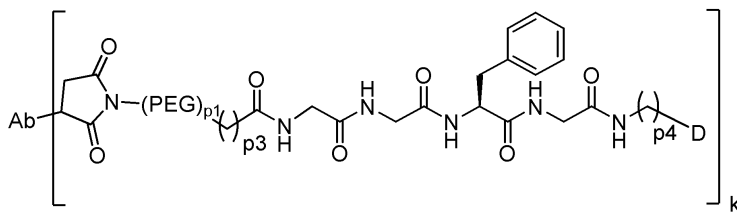
접합체.

### 청구항 14

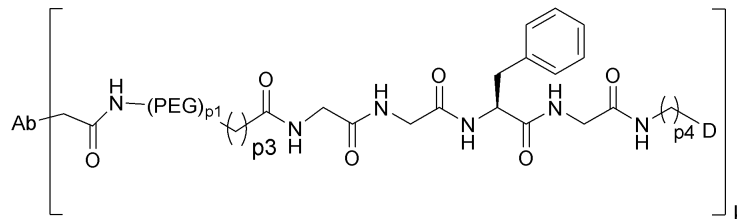
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-약물 접합체에서 링커 L은 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-lys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-lys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-lys, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드 또는 Mal-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-이황화물을 포함하는, 항체-약물 접합체.

### 청구항 15

제1항에 있어서, 이는 하기 식:



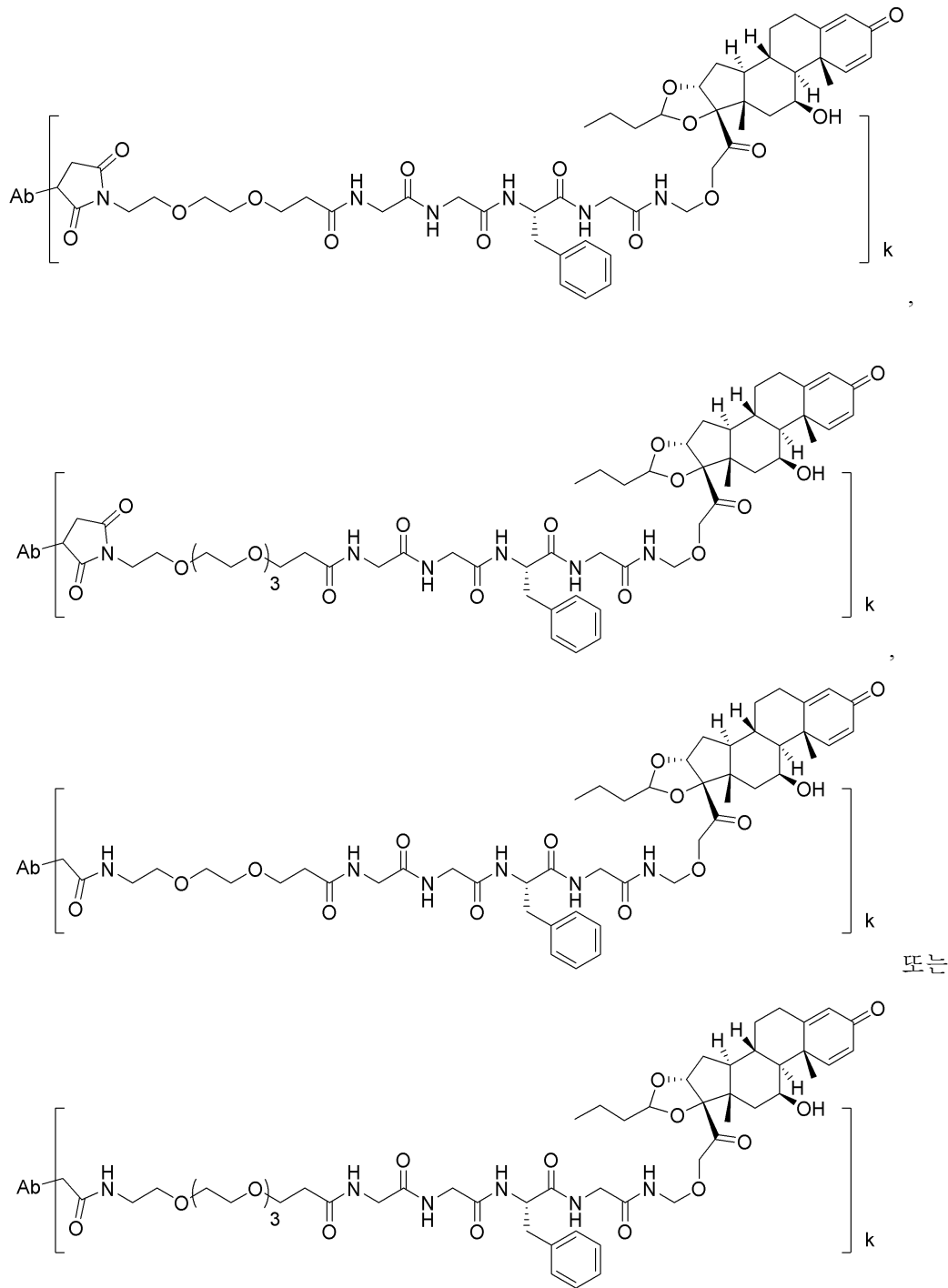
으로 표시되며, 여기서 k는 1 내지 10으로부터 선택되고, p1은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되며, p3 및 p4는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2으로부터 선택되고; 또는



으로 표시되고, 여기서 k는 1 내지 10으로부터 선택되고, p1은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되며, p3 및 p4는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 이는:

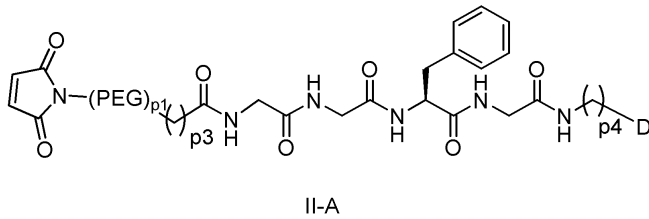


으로부터 선택되며,

여기서 k는 1부터 10으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

**청구항 17**

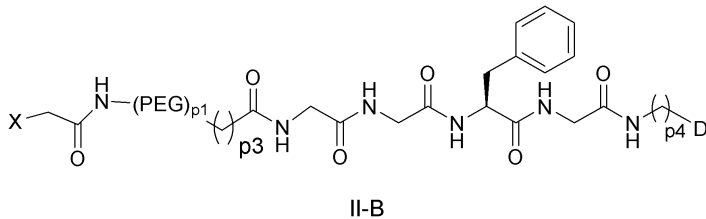
식 II-A로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염으로서,



여기서, p1은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되고, p3 및 p4는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택되며, D는 부테소나이드 또는 시클레소나이드인, 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염.

**청구항 18**

식 II-B로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염으로서,



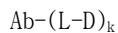
X는 할로젠, 바람직하게는 브롬이고, p1은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되고, p3 및 p4는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택되고, D는 부테소나이드 또는 시클레소나이드인, 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염.

**청구항 19**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 20**

흡입 가능한 약학적 조성물로서, 식 (I)로 표시되는 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고,



(I)

여기서, Ab는 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 항IL-4R의 Fab 단편이고,

L은 Ab를 D에 공유결합시키는 링커이며, k는 1 내지 20이고,

D는 글루코코르티코이드 또는 이의 잔기인, 흡입 가능한 약학적 조성물.

**청구항 21**

면역 질환 또는 병증을 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제조에 있어서, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 또는 제19항 또는 제20항에 따른 약학적 조성물의 용도로서,

상기 질환 또는 병증은 바람직하게는 천식, 비염, 만성 부비동염, 알레르기성 피부 질환, 호산구성 식도염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알레르기성 비염, 관절염, 염증성 질환, 알레르기 반응, 자가면역 림프증식성 증후군, 자가면역 용혈성 빈혈, 바렛 식도, 자가면역 포도막염, 결핵 및 신장병, 보다 바람직하게는 천식 또는 알레르기성 피부 질환인, 용도.

**발명의 설명**

## 기술분야

[0001] 본 개시는 의학 분야에 속하며, 구체적으로 글루코코르티코이드의 약물 접합체에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002] 인터루킨-4(Interleukin-4, IL-4)는 153개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 약 17kDa이다. 초기에 IL-4는 B 세포 증식을 자극할 수 있기 때문에 발견되었으며 B 세포 자극 인자-1(BSF-1)로 명명되었다. IL-13과 마찬가지로 IL-4는 I형 사이토카인 계열에 속하며 4α 나선 소수성 다발 코어로 구성된 4차 구조를 가지고 있다. IL-4는 TH2 세포에서 분비되고 TH2를 매개로 하는 면역 반응에 참여하며 T 세포, 비만 세포, 과립구, 거핵구 및 적혈구의 증식을 자극하는 등 광범위한 생물학적 활성을 갖는다. 또한, IL-4는 B 세포가 주요한 조직의 상용성 복합체 클래스 2 분자를 발현하도록 자극할 수도 있다. IL-13과 IL-4는 약 30%의 아미노산 서열 상동성과 여러 유사한 기능을 갖는다. IL-4와 IL-13은 모두 B 세포의 증식을 촉진할 수 있고, CD40/CD40L과 결합하여 IgM 유형이 IgE로 전환하도록 공동으로 자극하고 유도할 수 있다. IL-4는 비만세포의 응집을 촉진하고, 비만세포의 고친화력 IgE 수용체와 B 세포의 IgE 저친화력 수용체 CD23(FcεRII)의 발현을 상향 조절하고, 혈관 내피 세포의 부착 분자(VCAM-1)의 발현을 상향 조절하고, 호산구, T 림프구, 단핵세포 및 호염기구의 이동을 촉진한다. IL-13과 달리 IL-4는 유치(naive) T 세포가 TH2로 분화되도록 촉진할 수 있다.

[0003] IL-4는 생물학적 기능을 발휘하기 위해 막 수용체에 결합해야 한다. 인간 인터루킨 수용체(IL-4R)는 두 가닥의 폴리펩타이드 사슬로 형성된 이종이량체이며, 여기서 한 가닥의 α 사슬은 IL-4에 대해 친화력이 높으며, IL-4R α 사슬이 IL-4R 복합체에서 IL-4의 결합에 대해 지배적인 역할을 하기 때문에 많은 과학적 연구와 보고서에서 IL-4R을 IL-4R α로 대체하여 자주 사용하고 있다. IL-4R은 인간 B 세포, 비만 세포, 호산구, 호염기구, 대식세포/단핵세포, DC 세포, 섬유세포, 기도 상피 및 평활근 등 다양한 세포에서 모두 발현된다. IL-4R α는 다른 서브유닛과 두 가지 유형의 수용체 복합체를 형성할 수 있으며, 조혈 줄기세포에서는 IL-4R α와 γc로 구성된 I형 수용체가 주로 발현된다. 비조혈 줄기세포에서 IL-4는 주로 IL-4R α와 IL-13R α1로 구성된 II형 수용체를 통해 작용한다. II형 수용체는 IL-4 및 IL-13의 공동 수용체이며, IL-13은 IL-13R α1과 결합하여 기능을 발휘한다. I형 수용체와 II형 수용체는 모두 Jak/STAT 경로를 통해 신호를 전달하고, IL-4R α, γc 및 IL-13R α1은 각각 Jak1, Jak3 및 Tyk2에 결합하여 다운스트림 경로를 활성화하며, IL-4 및 IL-13은 또한 인슐린 수용체 기질군(IRS)을 통해 신호를 전달하여 최종적으로 핵 내의 PI3-K 및 NF-κB를 활성화할 수 있다. IL-4R을 차단하는 것은 IL-4뿐만 아니라 IL-13의 생물학적 기능을 억제할 수 있다.

[0004] 여러 연구에 따르면, IL-4 및 IL-13은 TH2 면역 반응과 관련된 질환과 관련이 있는 것으로 나타났다. 이소성 피부염 또는 유전성 과민 피부염으로도 알려진 아토피성 피부염(AD)은 피부과에서 흔한 질환으로 어린이와 청소년이 많이 걸리며, 일반적으로 알레르기성 비염 및 천식과 같은 특정 유전성 알레르기 질환과 동반되는 경우가 많다. 연구에 따르면 AD 환자의 TH2 인자 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13 수치가 상승하고 IgE 수치도 상승하는 것으로 나타났으며, 또한 TH2 인자가 AD 질환 과정과 관련이 있고, IL-4 및 IL-13과 같은 TH2 인자를 과발현하는 마우스는 피부 보호 결함 및 AD 유사 병증을 나타내는 것으로 밝혀졌다<sup>[14][15]</sup>. AD 환자의 IL-4와 IL-13 수치가 상승하면 표피 분화와 항균 펩타이드의 생산을 방해한다. IL-4 결합 마우스는 알레르기성 피부 염증의 발생을 낮춘다. 이러한 연구에 따르면 IL-4R을 차단하는 것이 AD 치료에 효과적일 수 있는 것으로 나타났다. 해외에서 항IL-4R 단클론 항체가 이미 시판되고 있으며 AD에 대해 양호한 치료 효과를 나타내고 있다.

[0005] IL-13과 IL-4는 천식에 대해서도 중요한 역할을 한다. 천식은 기도 과민반응(AHR)이 높고, 점액이 과다하게 분비되며, 섬유화 및 IgE 수치가 상승하는 것을 특징으로 하는 흔한 폐부 염증성 질환이다. 찬 공기와 같은 비특이적 자극은 종종 기도 과민반응을 증가시키고, AHR 및 점액이 과다하게 분비되어 기도 폐쇄로 이어지며, 이는 천식의 주요 사망 원인이다. TH2 인자는 천식 질환 진행 과정에서 중요한 역할을 하며, 천식 환자의 기관지 및 폐포 세척액에서 IL-4 및 IL-13을 과발현시킨다. IL-13과 IL-4는 일부 기능이 유사하지만, 일부 연구에 따르면 IL-13이 천식의 질환 진행에서 다른 Th2 사이토카인보다 더 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. IL-13은 배상 세포의 분화와 섬유화를 촉진시킬 수 있다. 알레르기 항원에 의해 자극되지 않은 마우스의 기도에 재조합 IL-13을 주입하면 기도 염증, 점액이 과다하게 분비되고 기도의 과민반응을 발생시킬 수 있으며, 가용성 IL13R α2를 주입하면 마우스의 AHR, 점액이 과다하게 분비되고 폐에 염증이 발생하는 것을 예방할 수 있다. 천식 모델에서 IL-4R α 항체를 주입하면 AHR과 폐포 세척액의 호산구를 감소시킬 수 있다. 연구에 따르면 IL-4R α를 차단시키면 천식 치료에 효과적일 수 있는 것으로 나타났다.

[0006] 현재 각 나라의 많은 제약회사에서 IL-4R의 단클론 항체에 대해 연구 개발하고 있으며, 관련 특허 출원으로는

W02010053751, W02001092340, W02008054606, W02014031610, W02020038454 등이 있다.

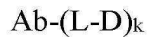
[0007] 글루코코르티코이드도 알레르기 질환, 염증 등을 치료하는 데 효과적인 약물이다. 대표적인 글루코코르티코이드로는 코르티솔, 코르티코스테론 등 생체 내에서 생성되는 글루코코르티코이드와 텍사메타손, 프레드니손, 프레드니솔론, 부테소니드 등의 합성 글루코코르티코이드가 알려져 있다. 이러한 글루코코르티코이드는 스테로이드 구조를 갖고 있어 통칭하여 스테로이드라고 부르며 다양한 질환의 치료에 사용된다. 그러나 이러한 스테로이드는 사용에 따라 스테로이드 소화성 궤양, 스테로이드 자반증, 스테로이드 궤양염, 스테로이드 당뇨병, 스테로이드 백내장, 스테로이드 녹내장 등 부작용이 나타나는 경우도 있다.

[0008] 항체-약물 접합체(antibody drug conjugate, ADC)는 안정적인 화학적 링커 화합물을 통해 생물학적 활성을 갖는 약물에 연결된 단클론 항체 또는 항체 단편을 가리킨다. 전임상 및 임상 개발 중에 있는 대부분의 ADC는 세포 독성 페이로드가 항원 발현 암세포를 표적으로 하는 중양학 적응증에 사용된다. 그러나, ADC를 매개로 생물학적 활성 소분자를 전달함으로써 병원성 세포 활성을 조절하는 것은 비중양학 적응증에도 매력적이기 때문에, 해당 기술을 광범하게 적용할 수 있다.

[0009] 글루코코르티코이드의 일부 약물 접합체는 W02017210471, W02019106609, W02019136487 등과 같은 종래기술에 개시되어 있다.

### 발명의 내용

[0010] 본 개시는 일 측면에서 식 (I)로 표시되는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다.



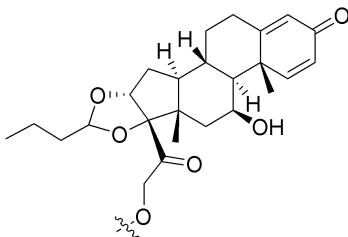
(I)

[0011] 여기서, Ab는 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고,  
[0012]

[0013] L은 Ab를 D에 공유결합시키는 링커이며, k는 1 내지 20(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 임의의 두 수치 사이의 임의의 수치를 포함)이고,

[0014] D는 글루코코르티코이드 또는 이의 잔기이고, 상기 글루코코르티코이드는 텍사메타손, 프레드니손, 프레드니솔론, 부테소니드, 모메타손, 베클로메타손 프로피오네이트, 플루티카손, 트리암시놀론 아세토니드, 및 부테소니드 또는 시클레소니드와 같은 시클레소니드로부터 선택된다.

[0015] 일부 실시양태에서, D는 하기 식으로 표시된 바와 같다:



[0016] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어 W02010053751, W02001092340, W02008054606, W02014031610, W02020038454(각각은 인용을 통해 본원에 포함됨)에 설명된 바와 같이 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 같이 공지된 것일 수 있다.

[0018] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Dupixent, PRS-060, AK-120, 63 IgG1, CBP201, AMG-317 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0019] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항-인간 IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은:

[0021] (I) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3; 또는

- [0022] (II) 각각 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고;
- [0023] 및/또는 항체 경쇄 가변 영역은,
- [0024] (I) 각각 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는
- [0025] (II) 각각 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 16에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는
- [0026] (III) 각각 SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는
- [0027] (IV) 각각 SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 39 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0028] 표 1은 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 CDR 서열을 나타낸다.

표 1. 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 CDR 서열

| 명칭    | 서열                | 번호            |
|-------|-------------------|---------------|
| HCDR1 | GFTFSDYGMH        | SEQ ID NO: 3  |
| HCDR2 | FISSGSSIIYYADIVKG | SEQ ID NO: 4  |
| HCDR3 | GNKRGFFDY         | SEQ ID NO: 5  |
| LCDR1 | NASSSVSYMY        | SEQ ID NO: 6  |
| LCDR2 | LTSNLAS           | SEQ ID NO: 7  |
| LCDR3 | QQWRSNPPMLT       | SEQ ID NO: 8  |
| HCDR1 | GYTFTSYWMH        | SEQ ID NO: 11 |
| HCDR2 | LIHPNSDTTKFSENFKT | SEQ ID NO: 12 |
| HCDR3 | SKIITTIVARHWYFDV  | SEQ ID NO: 13 |
| LCDR1 | KASQSVDYGGDSYMN   | SEQ ID NO: 14 |
| LCDR2 | AASNLES           | SEQ ID NO: 15 |
| LCDR3 | QHSNENPPT         | SEQ ID NO: 16 |
| LCDR1 | RASSVPYMY         | SEQ ID NO: 38 |
| LCDR2 | LASSRPS           | SEQ ID NO: 39 |
| LCDR3 | QQWRAYPPMLT       | SEQ ID NO: 40 |
| LCDR1 | RASPGVPPLA        | SEQ ID NO: 42 |

- [0029] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 (I) 내지 (IV):
- [0030] (I) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0031] 각각 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0032] (II) 각각 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0033] 각각 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 및 SEQ ID NO: 16에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0034] (III) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0035] 각각 SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

- [0037] (IV) 각각 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0038] 각각 SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 39 및 SEQ ID NO: 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 중에서 선택된 어느 하나를 포함한다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 항원 결합 단편은 마우스 유래 항체, 키메라 항체, 전체 인간 항체, 인간화 항체 또는 이의 단편이다. 일부 특정 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 것이다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 경쇄 IGKV3-11\*01(항체 25G7에 사용되는 SEQ ID NO: 22)로부터 유래된 FR 서열 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 역 돌연변이가 있는 서열을 포함한다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 역 돌연변이는 L46P, L47W 및 F71Y 중 하나 이상으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 중쇄 IGHV3-48\*01(항체 25G7에 사용되는 SEQ ID NO: 21)로부터 유래된 FR 영역 서열 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 역 돌연변이가 있는 서열을 포함한다. 일부 특정 실시양태에서, 상기 역 돌연변이는 S94A, F67S 및 A93T 중 하나 이상으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 경쇄 IGKV2D-29\*01(항체 7B10에 사용되는 SEQ ID NO: 24)로부터 유래된 FR 영역 서열 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 역 돌연변이 서열을 포함한다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 역 돌연변이는 M4L 및/또는 V58I로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 생식 계열 중쇄 IGHV1-2\*02(항체 7B10에 사용되는 SEQ ID NO: 23)로부터 유래된 FR 영역 서열 또는 이와 적어도 95%의 동일성을 갖는 역 돌연변이 서열을 포함한다. 일부 구체적인 실시양태에서, 상기 역 돌연변이는 M69L, R71I, T73K 및 R94K 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0041] 인간 생식 계열 중쇄 IGHV3-48\*01:
- [0042] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYSISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
- [0043] SEQ ID NO: 21
- [0044] 인간 생식 계열 경쇄 IGKV3-11\*01:
- [0045] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWP
- [0046] SEQ ID NO: 22
- [0047] 인간 생식 계열 중쇄 IGHV1-2\*02:
- [0048] QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSSGNTYAQKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
- [0049] SEQ ID NO: 23
- [0050] 인간 생식 계열 경쇄 IGKV2D-29\*01:
- [0051] DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPQLLIYEVSNNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP
- [0052] SEQ ID NO: 24
- [0053] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서:
- [0054] 중쇄 가변 영역은
- [0055] (I) SEQ ID NO: 1에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 1과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0056] (II) SEQ ID NO: 9에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 9와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0057] (III) SEQ ID NO: 43에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 43과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 또는
- [0058] 및/또는 경쇄 가변 영역은

- [0059] (I) SEQ ID NO: 2에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 2와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0060] (II) SEQ ID NO: 10에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 10과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0061] (III) SEQ ID NO: 37에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 37과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0062] (IV) SEQ ID NO: 41에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 41과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0063] 25G7 HCVR(25G7 중쇄 가변 영역)
- [0064] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCTRGNKGFFDYWGQGTILTVSS
- [0065] SEQ ID NO: 1
- [0066] 25G7 LCVR(25G7 경쇄 가변 영역)
- [0067] QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCNASSSVSYMYWYQRKPRSSPKPWIIYLTSLNLSGVPVRFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQWRSNPPMLTFGSGTKLEVK
- [0068] SEQ ID NO: 2
- [0069] 7B10 HCVR(7B10 중쇄 가변 영역)
- [0070] QVQLQQPGTELLKPGASVSLCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGLIHPNSDTTKFSENFKTRATLTIDKSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYYCAKSKIITIVARHWYFDVWGTTTVTVSS
- [0071] SEQ ID NO: 9
- [0072] 7B10 LCVR(7B10 경쇄 가변 영역)
- [0073] DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCKASQSDYGGDSYMNWYQQKLGQPPKVLIIAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQHSNENPPTFGGGTKLEIK
- [0074] SEQ ID NO: 10
- [0075] hu25G7-A LCVR(hu25G7-A 경쇄 가변 영역)
- [0076] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVPYMYWYQQKPGQAPRLIIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQWRAYPPMLTFGGGTKVEIK
- [0077] SEQ ID NO: 37
- [0078] hu25G7-B LCVR(hu25G7-B 경쇄 가변 영역)
- [0079] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASPGVPPLAWYQQKPGQAPRLIIYASSRPSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGGTKVEIK
- [0080] SEQ ID NO: 41
- [0081] hu25G7-VH(hu25G7 중쇄 가변 영역)
- [0082] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKLEWVAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKGFFDYWGQGTILTVTVSS
- [0083] SEQ ID NO: 43
- [0084] 적어도 일 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2에 제시된 서열과 같으며; 또는
- [0085] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 9에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 10에 제시된 서열과 같으

며; 또는

- [0086] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 43에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 37에 제시된 서열과 같으며; 또는
- [0087] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 43에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41에 제시된 서열과 같다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서:
- [0089] 중쇄 가변 영역은
- [0090] (I) SEQ ID NO: 25~27 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 25~27 중 하나와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0091] (II) SEQ ID NO: 31~33 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 31~33 중 하나와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고;
- [0092] 및/또는 경쇄 가변 영역은
- [0093] (I) SEQ ID NO: 28~30 중 하나에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 28~30 중 하나와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0094] (II) SEQ ID NO 34~36 중 하나에 표시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO 34~36 중 하나와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0095] hu25G7-VH-a:
- [0096] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSS
- [0097] SEQ ID NO: 25
- [0098] hu25G7-VH-b:
- [0099] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSS
- [0100] SEQ ID NO: 26
- [0101] hu25G7-VH-c:
- [0102] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSS
- [0103] SEQ ID NO: 27
- [0104] hu25G7-VL-a:
- [0105] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGG  
TKVEIK
- [0106] SEQ ID NO: 28
- [0107] hu25G7-VL-b:
- [0108] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGG  
TKVEIK
- [0109] SEQ ID NO: 29
- [0110] hu25G7-VL-c:
- [0111] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQKPGQAPRPWIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGG  
TKVEIK

- [0112] SEQ ID NO: 30
- [0113] hu7B10-VH-a:
- [0114] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIHPNSDITTKFSENFKTRVTMTSDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSKIITIVARHWYFDVWGQGTITVTVSS
- [0115] SEQ ID NO: 31
- [0116] hu7B10-VH-b:
- [0117] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIHPNSDITTKFSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAKSKIITIVARHWYFDVWGQGTITVTVSS
- [0118] SEQ ID NO: 32
- [0119] hu7B10-VH-c:
- [0120] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIHPNSDITTKFSENFKTRVTLTIDKSIISTAYMELSRLSDDTAVYYCAKSKIITIVARHWYFDVWGQGTITVTVSS
- [0121] SEQ ID NO: 33
- [0122] hu7B10-VL-a:
- [0123] DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKASQSVSYGGDSYMNWYLQKPGQPPQLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGGTKVEIK
- [0124] SEQ ID NO: 34
- [0125] hu7B10-VL-b:
- [0126] DIVLTQTPLSLSVTPGPASISCKASQSVSYGGDSYMNWYLQKPGQPPQLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGGTKVEIK
- [0127] SEQ ID NO: 35
- [0128] hu7B10-VL-c:
- [0129] DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKASQSVSYGGDSYMNWYLQKPGQPPQLLIYAASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGGTKVEIK
- [0130] SEQ ID NO: 36
- [0131] 일부 구체적인 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 25~27 중 하나에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 28~30 중 하나에 제시된 서열과 같으며;
- [0132] 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 31~33 중 하나에 제시된 서열과 같고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 34~36 중 하나에 제시된 서열과 같다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터 선택되는 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 구체적인 실시양태에서, 인간화 IgG1의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체가 포함된다. 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화  $\kappa$  사슬 및  $\lambda$  사슬 또는 이의 변이체의 불변 영역을 포함한다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 상기 항체는 인간화 항체이고, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 17에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며; 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0135] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경우, 여기서 상기 항체는 인간화 항체이고, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 19에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며; 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 상기 항체는 인간화 항체이고, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며; 경쇄 서열은 SEQ ID NO:

45에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.

- [0137] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 상기 항체는 인간화 항체이고, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며; 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 인간 IL-4R 또는 이의 에피토프에 결합하기 위해 위에 기재된 바와 같은 임의의 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 것을 특징으로 하는 분리된 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 위에 기재된 바와 같은 임의의 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 이중특이성 항체 또는 다중특이성 항체를 제공한다. 다른 일부 실시양태에서, 위에 기재된 바와 같은 임의의 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단쇄 항체를 제공한다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 인간화 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다. 적어도 일 실시양태에서, 인간화 IgG2 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이 포함된다. IgG2 또는 IgG4는 ADCC 독성이 없기 때문이다. 다른 일 실시양태에서, 아미노산 돌연변이된 후 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 항체 의존성 세포 매개 세포독성) 독성이 없는 IgG1이 사용된다. 적어도 일 실시양태에서, 변이체에는 예를 들어 IgG1의 N297A, L234A, L235A를 포함하나 이에 한정되지 않는 ADCC 이펙터 기능이 감소되거나 결실되는 중쇄 불변 영역 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1은 돌연변이 E239D 및 돌연변이 M241L을 포함한다.
- [0141] 별도로 설명하지 않는 한, 본 개시의 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단백질은 Kabat에 따라 코딩된다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 중쇄는
- [0143] (I) SEQ ID NO: 17에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 17과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0144] (II) SEQ ID NO: 19에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 19와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0145] (III) SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 44와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열;
- [0146] (IV) SEQ ID NO: 47에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 47과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고;
- [0147] 및/또는 경쇄는
- [0148] (I) SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0149] (II) SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 20과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0150] (III) SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 45와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0151] (IV) SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 46과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0152] hu25G7 HC
- [0153] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKLEWVAFISSGSSI IYYADIVKGRSTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTKYTCNVD  
HKPSNTKVKRVEISKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
LHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL  
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK

- [0154] SEQ ID NO: 17
- [0155] hu25G7 LC
- [0156] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC
- [0157] SEQ ID NO: 18
- [0158] hu7B10 HC
- [0159] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIHPNSDITTKFSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAKSKI I  
TTIVARHWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0160] SEQ ID NO: 19
- [0161] hu7B10 LC
- [0162] DIVLTQTPLSLSVTPGPASISCKASQSDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTF  
GGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC
- [0163] SEQ ID NO: 20
- [0164] hu25G7-IgG4 HC
- [0165] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVN  
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYSRL  
TVDKSRWQEGNVFSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
- [0166] SEQ ID NO: 44
- [0167] hu25G7-A LC
- [0168] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVPYMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQWRAYPPMLTFGGG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC
- [0169] SEQ ID NO: 45
- [0170] hu25G7-B LC
- [0171] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASGPVPLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRPSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQWRSNPPMLTFGGG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC
- [0172] SEQ ID NO: 46
- [0173] hu25G7-24-IgG1(E239D, M241L)HC
- [0174] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN  
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0175] SEQ ID NO: 47

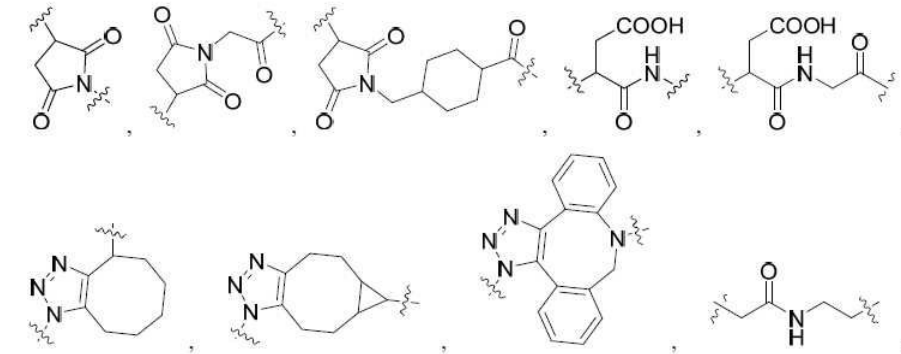
- [0176] 일부 실시양태에서, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 17에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0177] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 19에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 20에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0178] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0179] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0180] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 47에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 중쇄는
- [0182] (I) SEQ ID NO: 48에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 48과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0183] (II) SEQ ID NO: 49에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 49와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0184] (III) SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 50과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열;
- [0185] (IV) SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 51과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고;
- [0186] 및/또는 경쇄는
- [0187] (I) SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0188] (II) SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 45와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열; 또는
- [0189] (III) SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같은 서열 또는 SEQ ID NO: 46과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0190] hu25G7-IgG4 VH-CH1
- [0191] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGTILTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD  
HKPSNTKVDKRV
- [0192] SEQ ID NO: 48
- [0193] hu25G7-IgG1 VH-CH1
- [0194] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGTILTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN  
HKPSNTKVDKKV
- [0195] SEQ ID NO: 49
- [0196] hu25G7-24-IgG4 VH-CH1
- [0197] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGTILTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD  
HKPSNTKVDKRV
- [0198] SEQ ID NO: 50
- [0199] hu25G7-24-IgG1 VH-CH1
- [0200] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIYYADIVKGRSTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR  
GFFDYWGQGTILTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN

HKPSNTKVDKKV

- [0201] SEQ ID NO: 51
- [0202] 일부 실시양태에서, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 48에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0203] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 49에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 18에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0204] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0205] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0206] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같으며; 또는
- [0207] 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 51에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 46에 제시된 바와 같다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 상기 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 변이체일 수 있으며, 상기 변이체는 경쇄에 1 내지 10개(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)의 아미노산 변화가 있고, 및/또는 중쇄에 1 내지 10개(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)의 아미노산 변화가 있다.
- [0209] 일부 실시양태에서, 상술한 변이체는 모체 항IL-4R 항체 또는 이의 단편과 동일하거나 유사한 생물학적 기능 또는 효과를 갖는다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fv, F(ab')<sub>2</sub>, 선형 항체, scFv(단쇄 Fv 항체), 직렬 di-scFv, 직렬 tri-scFv, 이중 사슬 항체(diabody), 삼중 사슬 항체(triabody), 사중 사슬 항체(tetrabody), 단일 도메인 항체 또는 나노 항체(sdAb), sdFv, 펩타이드 항체(peptibody), 도메인 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체, 삼중특이성 항체 또는 사중특이성 항체), 이항화 결합 안정된 Fv(dsFv), 이항화 결합 안정된 단쇄 Fv 항체(ScdsFv)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0211] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매 화합물의 항IL-4R 항체의 항원 결합 단편은 상술한 항IL-4R 항체의 항원 결합 단편과 동일한 IL-4R 또는 이의 에피토프에 결합한다.
- [0212] 일부 실시양태에서, 위에 기재된 바와 같은 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 DNA 또는 RNA와 같은 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 진핵 발현 담체, 원핵 발현 담체 및 바이러스 담체와 같은 상술한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 담체가 제공된다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 진핵 세포 및 원핵 세포와 같은 상술한 발현 담체로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다. 일부 구체적인 실시양태에서, 숙주 세포는 박테리아(예를 들어, 대장균), 효모(예를 들어, 피키아 파스토리스), 포유동물 세포(예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 인간 배아 신장(HEK) 293 세포)이다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 상술한 항-IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법은, 해당 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 위에 기재된 바와 같은 숙주 세포에서 발현시키고, 해당 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 해당 숙주 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [0216] 본 개시의 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 아미노산 세글자 코드 및 한글자 코드는 J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)에 기재된 바와 같다.
- [0217] 특정 실시양태에서, k는 1 내지 10 사이의 임의의 수치, 바람직하게는 2 내지 5 사이의 임의의 수치이다. k는 정수 또는 소수일 수 있다.
- [0218] 특정 실시양태에서, 링커는 ADC가 세포외 환경에 존재할 때 온전하게 유지되도록 세포외 환경에서 안정적이지만, 세포 내에서 내재화 시 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, ADC가 ADC의 항체 부분에 대해 특이성 항원을 발현하는 세포에 진입할 경우, 글루코코르티코이드 약물 부분이 항체 부분으로부터 절단되고, 절단된 부분은 변형되지 않은 형태의 글루코코르티코이드를 방출한다.
- [0219] 특정 실시양태에서, 링커 내의 절단될 수 있는 부분은 절단 가능한 펩타이드 부분이다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 펩타이드 부분을 포함하는 ADC는 다른 절단 가능한 부분을 포함하는 ADC에 비해 응집 수치가 낮고 항체 대 약물 비율이 개선된 것으로 나타났다. 특정 실시양태에서, 절단 불가능한 링커에 비해 절단 가능한 부분

을 첨가함으로써 세포 독성 및/또는 효능을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 펩타이드 부분은 효소에 의해 절단될 수 있고, 링커는 효소에 의해 절단될 수 있는 링커이다. 일부 실시양태에서, 효소는 카텝신이고 링커는 카텝신에 의해 절단될 수 있는 링커이다. 특정 실시양태에서, 효소에 의해 절단될 수 있는 링커(예를 들어, 카텝신에 의해 절단될 수 있는 링커)는 다른 절단 메커니즘에 비해 상술한 개선된 특성 중 하나 이상을 나타낸다.

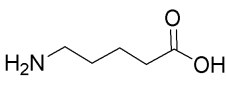
[0220] 일부 실시양태에서, 링커는 일단이 탄소 원자를 통해 항체에 공유 결합되고 다른 일단이 아미노산 유닛, 이황화물 부분, 술폰아미드 부분 또는 비펩타이드 화학 부분에 연결된 화학 구조 단편인 신장 유닛을 포함한다. 예시적인 신장 유닛은



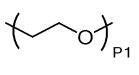
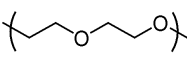
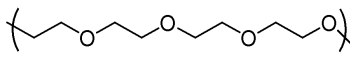
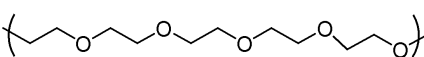
[0221] 을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0222] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 유닛을 포함하며, 상기 아미노산 유닛은 바람직하게는 페닐알라닌, 글라이신, 발린, 라이신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산, 고라이신, n-메틸-발린, (q는

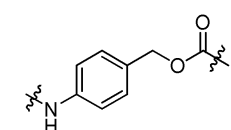
1~6의 정수)인 아미노산으로부터 선택된 2 내지 7개로 구성된 펩타이드 잔기를 포함하고, 예시적인 아미노산 유닛은 발린-시트룰린(Val -Cit), 알라닌-페닐알라닌(Ala-Phe); 페닐알라닌-라이신(Phe -Lys), 페닐알라닌-고라이신(Phe-Homolys), n-메틸-발린-시트룰린(Me-Val-Cit), 알라닌-알라닌(Ala-Ala), 글라이신-글루탐산(Gly-Glu), 글루탐산-알라닌-알라닌(Glu-Ala-Ala) 및 글라이신-라이신(Gly-Lys), 글라이신-발린-시트룰린(Glv-Val-Cit) 및

글라이신-글라이신-글라이신(Gly-Gly-Gly),  을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0223] 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분을 포함할 수 있다. PEG 부분은 예를 들

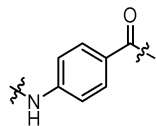
어  $-(\text{PEG})_{p1}-$  및  를 포함할 수 있고, 여기서 p1은 ,  $(\text{PEG})_2$ ; ,  $(\text{PEG})_4$ ; ,  $(\text{PEG})_5$ 와 같은 1 내지 20의 정수이다.

[0224] 일부 실시양태에서, 상기 링커는 D에 연결된 스페이서 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 스페이서 유닛은 p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB),



[0225] 을 포함한다.

[0226] 일부 실시양태에서, 상기 스페이서 유닛은 p-아미노벤조일,



[0227]

을 포함한다.

[0228]

일부 실시양태에서, 상기 스페이서 유닛은  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 를 포함하며, 여기서  $n1$ 은 0~6 사이의 정수로부터 선택되고;  $\text{L}^a$ 는  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{NR}^7-(\text{CH}_2)_{n2}-$ ,  $-\text{O}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{R}^7$ 은 수소,  $\text{C}_{1-6}$ 알킬,  $-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n4}-\text{OH}$ 로부터 선택되며,  $n3$ 은 1~4 사이의 정수로부터 선택되고,  $n4$ 은 1~6 사이의 정수로부터 선택되며;  $\text{L}^b$ 는  $-\text{CR}^8(\text{R}^9)-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^{10}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 독립적으로 수소,  $\text{C}_{1-6}$ 알킬,  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬,  $-(\text{CH}_2)_{n5}-\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n6}-\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n7}-\text{OH}$ 로부터 선택되며,  $\text{R}^{10}$ 은 수소 또는  $\text{C}_{1-6}$ 알킬로부터 선택되고,  $n5$ 은 0~6 사이의 정수로부터 선택되며,  $n6$ 은 1~4 사이의 정수로부터 선택되고,  $n7$ 은 1~4 사이의 정수로부터 선택되며,  $n5$ 가 0인 경우,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 상이하거나,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 이에 연결된 탄소 원자와 함께  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬을 형성하고;  $\text{L}^c$ 는  $-\text{CH}_2-$  또는  $-\text{C}(=\text{O})-$ 를 나타낸다.

[0229]

일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{L}^c$ 는  $-\text{NHCH}_2-$ 를 나타낸다.

[0230]

일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 독립적으로 수소,  $\text{C}_{1-6}$ 알킬, 및 수소, 메틸, 에틸 또는 시클로프로필과 같은  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬로부터 선택된다.

[0231]

일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{L}^a$ 는  $-\text{O}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{L}^b$ 는  $-\text{CR}^8(\text{R}^9)-$  또는 단일 결합을 나타내며,  $\text{L}^c$ 는  $-\text{C}(=\text{O})-$ 를 나타내고,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 이에 연결된 탄소 원자와 함께  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬을 형성한다.

[0232]

일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{L}^a$ 는  $-\text{O}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{L}^b$ 는  $-\text{CR}^8(\text{R}^9)-$  또는 단일 결합을 나타내며,  $\text{L}^c$ 는  $-\text{C}(=\text{O})-$ 를 나타내고,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 독립적으로 수소,  $\text{C}_{1-6}$ 알킬,  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬,  $-(\text{CH}_2)_{n5}-\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n6}-\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n7}-\text{OH}$ 로부터 선택되고,  $\text{R}^{10}$ 은 수소 또는  $\text{C}_{1-6}$ 알킬로부터 선택되며,  $n5$ 은 0~6 사이의 정수로부터 선택되고,  $n6$ 은 1~4 사이의 정수로부터 선택되며,  $n7$ 은 1~4 사이의 정수로부터 선택되고,  $n5$ 가 0인 경우,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 상이하다.

[0233]

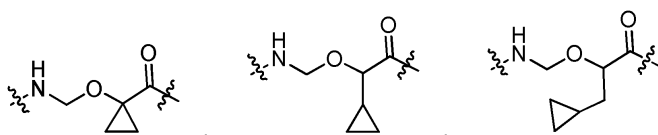
일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{L}^a$ 는  $-\text{O}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{L}^b$ 는  $-\text{CR}^8(\text{R}^9)-$  또는 단일 결합을 나타내며,  $\text{L}^c$ 는  $-\text{CH}_2-$ 를 나타낸다.

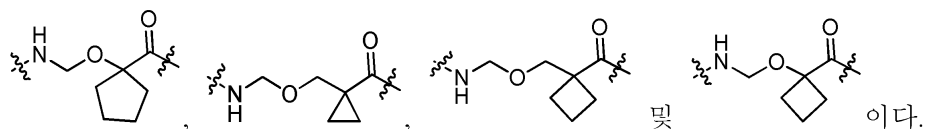
[0234]

일부 실시양태에서,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 에서  $\text{L}^a$ 는  $-\text{O}-$  또는 단일 결합을 나타내고,  $\text{L}^b$ 는  $-\text{CR}^8(\text{R}^9)-$  또는 단일 결합을 나타내며,  $\text{L}^c$ 는  $-\text{CH}_2-$ 를 나타내고,  $\text{R}^8$  및  $\text{R}^9$ 는 독립적으로 수소,  $\text{C}_{1-6}$ 알킬,  $\text{C}_{3-6}$ 시클로알킬, 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸 또는 시클로프로필 중에서 선택된다.

[0235]

일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체에서  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 는  $-\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{NHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,





[0236] 일부 실시양태에서,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ 는  $-\text{NHCH}_2-$  또는  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 이다.

[0237] 일부 실시양태에서, 링커 내의 스페이서 유닛은 (PEG)<sub>2</sub>를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 길이는 짧지만, 긴 스페이서 서브 유닛(예를 들어, (PEG)<sub>8</sub>)을 포함하는 ADC, 짧은 스페이서 서브 유닛(예를 들어, (PEG)<sub>2</sub>)을 포함하는 ADC에 비해 낮은 응집 수준 및/또는 높은 약물 로딩을 나타낸다.

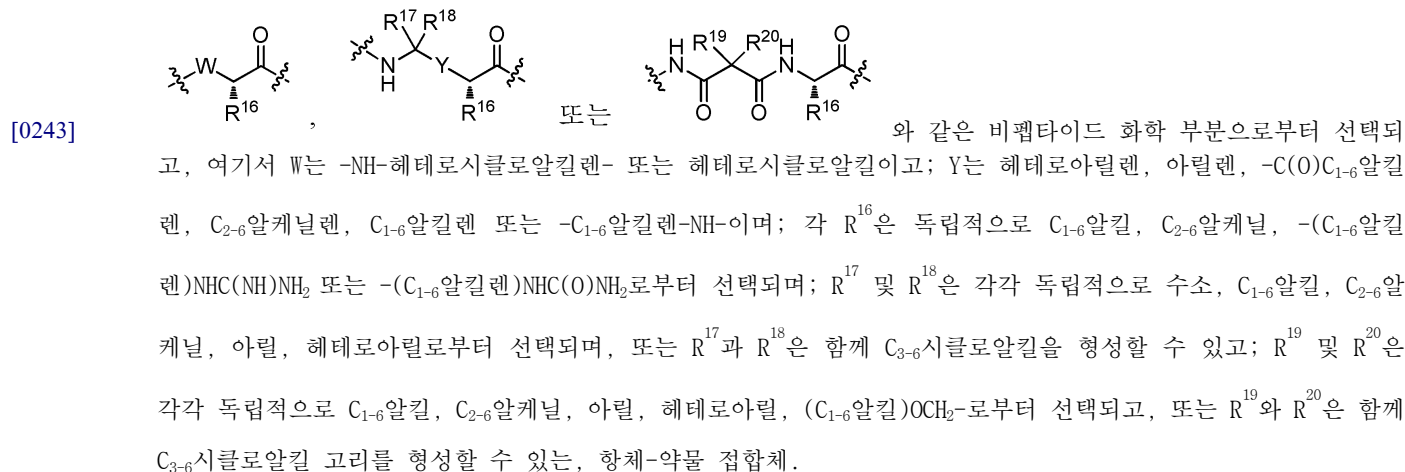
[0238] 다른 일 측면에서, 본 개시의 항체 접합체(ADC)에서 L-D는 하기 식으로 표시되는 화학 부분이다.

[0239] -Str-Pep-Sp-D

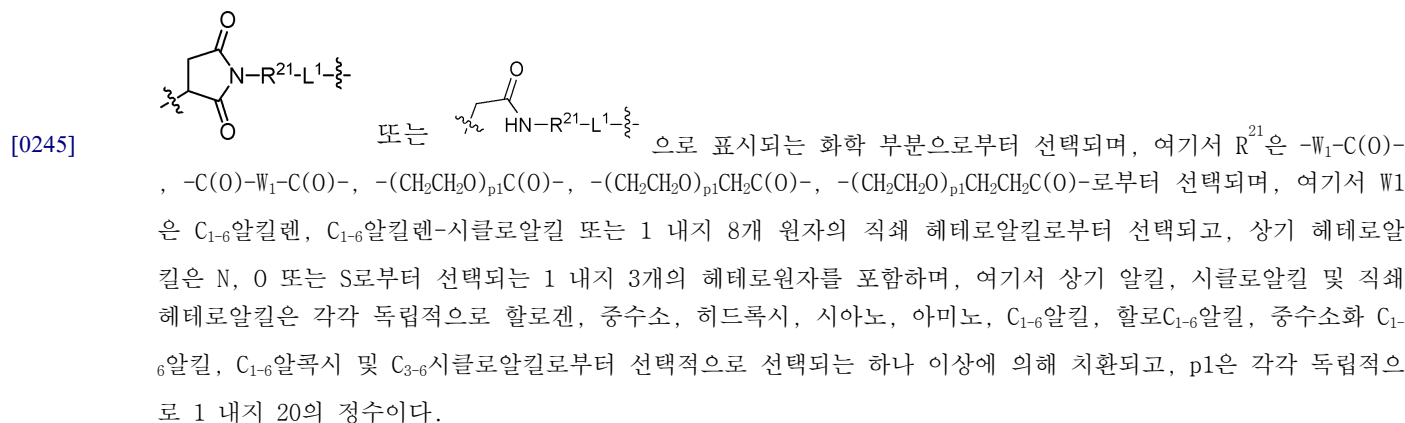
[0240] Str은 Ab에 공유결합된 신축 베이스 유닛이고,

[0241] Sp는 스페이스 유닛이며,

[0242] Pep는 아미노산 유닛, 이황화물 부분, 술폰아미드 부분 또는



[0244] 일부 실시양태에서, 상기 항체-약물 접합체(ADC)의 Str은 다음의 식

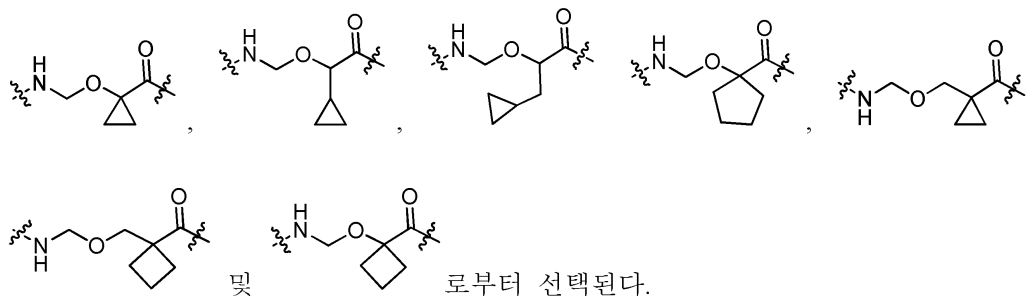


[0246]  $L^1$ 은  $-NR^{22}-(CH_2CH_2O)_{p2}CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-NR^{22}-(CH_2CH_2O)_{p2}CH_2C(O)-$ ,  $-S(CH_2)_{p2}C(O)-$ ,  $-(CH_2)_{p2}C(O)-$  또는 단일 결합으로부터 선택되고, 바람직하게는 단일 결합이며;  $p2$ 는 1 내지 20의 정수이고,  $R^{22}$ 는 수소 원자,  $C_{1-6}$ 알킬, 할로 $C_{1-6}$ 알킬 또는 중수소화  $C_{1-6}$ 알킬로부터 선택된다.

[0247] 일부 실시양태에서, 상기 항체-약물 접합체 Str의 R<sup>21</sup>은 C<sub>1-6</sub>알킬렌 C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)- 및 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(O)-로부터 선택된다.

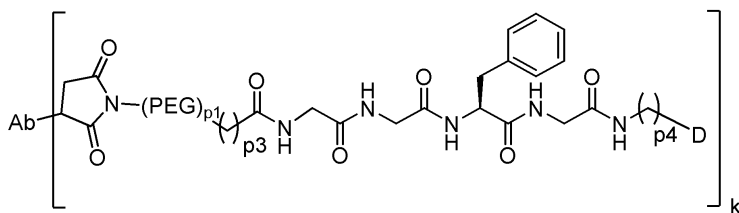
[0248] 일부 실시양태에서, 상기 Pep는 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn), 글라이신-글라이신-라이신(Gly-Gly-lys), 발린-라이신(Val-lys), 발린-알라닌(Val- Ala), 발린-페닐알라닌(Val-Phe) 또는 글라이신-글라이신-페닐알라닌-글라이신(Gly-Gly-Phe-Gly)으로부터 선택된다.

[0249] 일부 실시양태에서, 상기 Sp는  $\text{-NHCH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NHCH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH(CH}_2\text{)}_3\text{-C(O)-}$ ,  $\text{-NHCH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(O)-}$ ,  $\text{-NH(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(O)-}$ ,

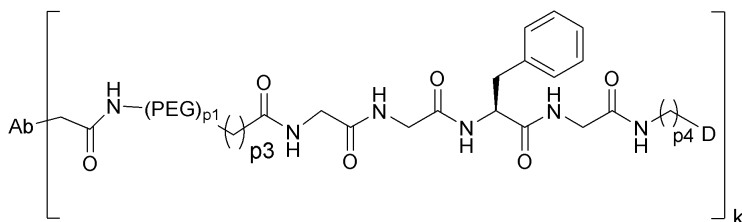


[0250] 일부 실시양태에서, 상기 항체-약물 접합체의 링커 L에는, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-Iys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Iys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-Iys, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드 또는 Mal-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-이황화물이 포함된다.

[0251] 다른 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체-약물 접합체(ADC)는 하기 식:

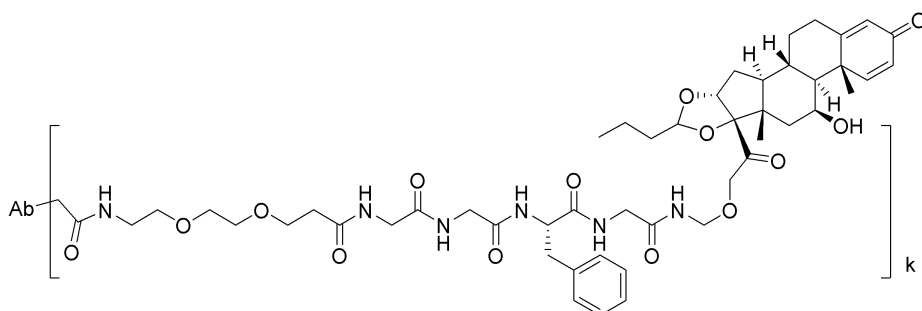
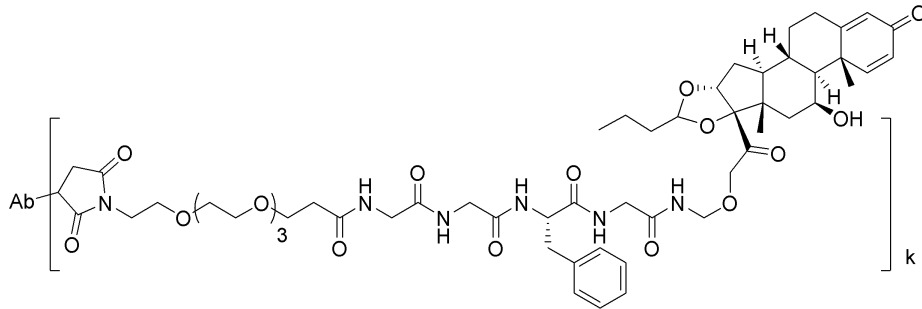
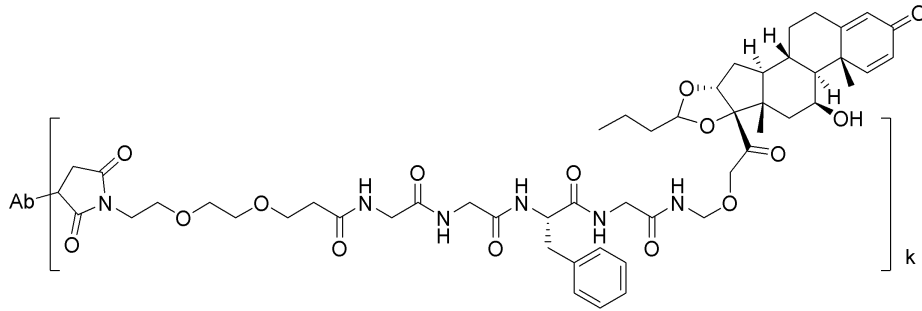


[0252] 로 표시되며, 여기서  $k$ 는 1 내지 10으로부터 선택되며 정수 또는 소수일 수 있고,  $p_1$ 은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되며,  $p_3$  및  $p_4$ 는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택되고;

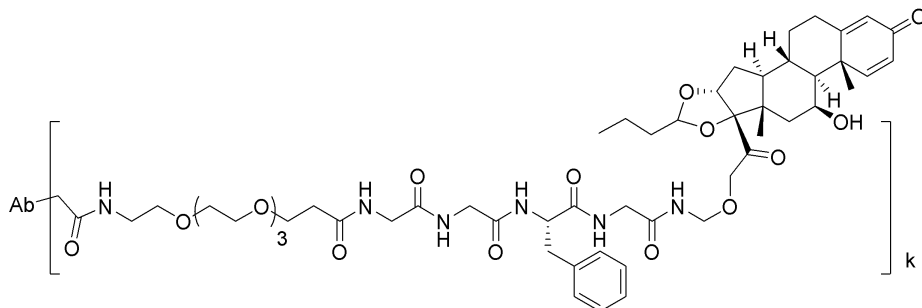


[0253] 로 표시되며, 여기서  $k$ 는 1 내지 10으로부터 선택되며 정수 또는 소수일 수 있고,  $p_1$ 은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되며,  $p_3$  및  $p_4$ 는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택되고;

[0254] 다른 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체-약물 접합체(ADC)는



또는



[0255]

선택되며,

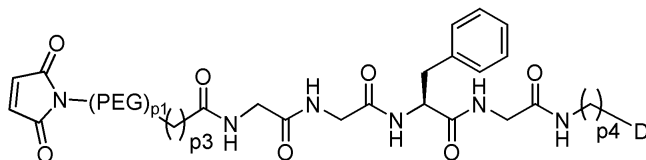
으로부터

[0256]

여기서 k는 1 내지 10로부터 선택되며 정수 또는 소수일 수 있다.

[0257]

본 개시는 또한 식 II-A로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염,



II-A

[0258]

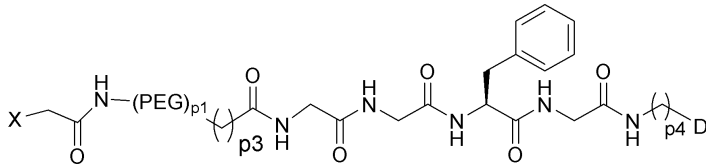
을 제공하며,

[0259]

여기서 p1은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되고, p3 및 p4는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택된다.

[0260]

본 개시는 또한 식 II-B로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염,



II-B

을 제공하며,

여기서  $X$ 는 할로겐이고,  $p_1$ 은 2, 4, 6 또는 8로부터 선택되며,  $p_3$  및  $p_4$ 는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택된다.

본 개시에 기재된 구조에서, 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타낸다.

본 개시는 또한 적어도 하나의 전술한 항체-약물 접합체, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

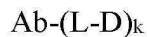
일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물의 단위 용량은 0.001mg~1000mg이다.

일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01%~99.99%의 전술한 화합물을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 0.1%~99.9%의 전술한 화합물을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 0.5%~99.5%의 전술한 화합물을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 1%~99%의 전술한 화합물을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 2%~98%의 전술한 화합물을 함유한다.

일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01%~99.99%의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 0.1%~99.9%의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 0.5%~99.5%의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 1%~99%의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 2%~98%의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다.

본 개시의 항체-약물 접합체는 비경구, 국소 또는 흡입과 같이 적응증에 적합한 방식으로 환자에게 투여될 수 있다. 길항제는 주사되는 경우, 예를 들어 관절 내, 정맥 내, 근육 내, 부상 내, 복강 내 또는 피하 경로를 통해 급속 농축 주입 또는 연속 주입으로 투여될 수 있다. 질환 또는 부상 부위에서의 국소 투약은 경피 전달 및 임플란트로부터의 지속 방출로 간주된다. 흡입에 의한 전달에는 비강 또는 경구 흡입, 스프레이 사용, 에어로졸 형태와 같은 길항제 흡입 등이 포함된다. 다른 옵션으로는으로는 안약, 알약, 시럽, 로젠지 또는 츄잉껌을 포함한 경구용 제제와 로션, 젤, 스프레이 및 연고와 같은 국소 제제가 있다.

본 개시는 또한 식 (I)로 표시되는 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 흡입 가능한 약학적 조성물을 제공한다.



(I)

여기서, Ab는 항IL-4R 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고,

L은 Ab를 D에 공유결합시키는 링커이며, k는 1 내지 20(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 임의의 두 수치 사이의 임의의 수치를 포함)이고,

D는 글루코코르티코이드 또는 이의 잔기이다.

선택적으로  $Ab$ ,  $L$ ,  $D$ 는 앞서 기재된 바와 같다.

일부 실시양태에서, Ab는 항IL-4R의 Fab 단편이다.

본 개시는 또한 IL-4R를 매개로 하는 질환 또는 병증을 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제조에 있어서, 상기 항체-약물 접합체 및/또는 항체-약물 접합체를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

본 개시는 또한 면역 질환 또는 병증을 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제조에 있어서, 상기 항체-약물 접합체

및/또는 항체-약물 접합체를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 상기 질환 또는 병증은 천식, 비염, 만성 부비동염, 알레르기성 피부 질환, 호산구성 식도염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알레르기성 비염, 관절염, 염증성 질환, 알레르기 반응, 자가면역 림프증식성 증후군, 자가면역 용혈성 빈혈, 바렛 식도, 자가면역 포도막염, 결핵 및 신장병으로부터 선택된다. 바람직하게는 천식이나 알레르기성 피부 질환이다.

[0278] 본 개시는 또한 IL-4R을 발현하는 세포를 본 개시에 기재된 항체-약물 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, IL-4R을 발현하는 세포에 글루코코르티코이드를 전달하는 방법을 제공한다.

[0279] 본 개시는 추가로 본 개시에 기재된 항체-약물 접합체 또는 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0280] 발명의 상세한 설명

[0281] 별도로 한정하지 않는 한, 본 개시에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시에 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 일치하다. 본 개시에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료를 채택하여 본 개시를 실시 또는 테스트할 수 있으나, 본 개시에서는 바람직한 방법 및 재료에 대해 설명한다. 본 개시에 대해 설명하고 보호를 청구하는 경우, 이하 정의에 따라 다음에 나열된 용어를 사용한다.

[0282] 본 개시에서 상품명을 사용하는 경우, 출원인은 해당 상품명 제품의 제제, 해당 상품명 제품의 비특허 약 및 활성 성분 약물 부분을 포함하는 것을 의도로 한다.

[0283] 달리 설명하지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서 사용되는 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다.

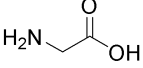
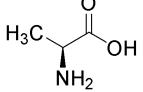
[0284] 용어 "링커", "연결 유닛", "링커 유닛", "링커" 또는 "연결 단편"은 일단이 리간드에 연결되고 다른 일단이 약물에 연결된 화학 구조 단편 또는 결합을 가리키며, 다른 링커에 연결된 다음 약물에 연결될 수도 있다.

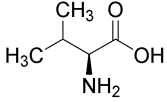
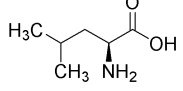
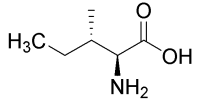
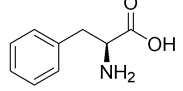
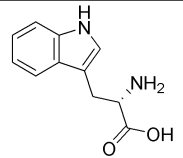
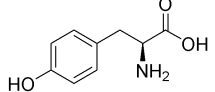
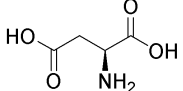
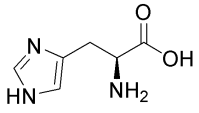
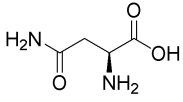
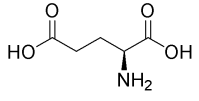
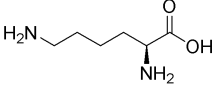
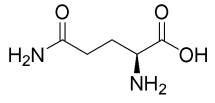
[0285] 링커는 하나 이상의 링커 부재를 포함할 수 있다. 예시적인 링커 부재는 6-말레이미도헥사노일(MC), 말레이미도프로피오닐(MP), 발린-시트룰린(Val-Cit 또는 vc), 알라닌-페닐알라닌(ala-phe), p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), 및 링커 시제와의 결합으로부터 유래되는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)발레레이트(SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트(SMCC, 본원에서는 MCC라고도 함) 및 N-숙신이미딜(4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트(SIAB)를 포함한다. 링커는 신장 유닛, 스페이서 유닛, 아미노산 유닛 및 연장 유닛을 포함할 수 있다. US2005-0238649A1에 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법을 통해 합성될 수 있다. 링커는 세포에서 약물 방출을 용이하게 하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커(예를 들어, 히드라존), 프로테아제에 민감한(예를 들어, 펩티다제에 민감한) 링커, 광에 불안정한 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커(Chari 등, *Cancer Research* 52: 127-131(1992); 미국 특허 No.5,208,020)가 사용될 수 있다.

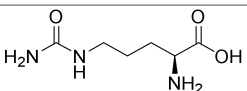
[0286] 용어 "신장 유닛"은 일단이 탄소 원자를 통해 항체에 공유결합되고 다른 일단이 아미노산 유닛, 이황화물 부분, 술폰아미드 부분 또는 비펩타이드 화학 부분에 연결된 화학 구조 단편을 가리킨다.

[0287] 용어 "스페이서 유닛"은 아미노산 유닛과 글루코코르티코이드를 결합하여 궁극적으로 항체-약물 접합체를 형성하는 데 사용할 수 있는 이중 기능 화합물 구조 단편이고, 이러한 결합 방식으로 글루코코르티코이드를 아미노산 유닛에 선택적으로 연결할 수 있다.

[0288] 용어 "아미노산"은 분자구조 내에 "아미노산"은 분자구조 내에 아미노 및 카르복실을 포함하고, 아미노와 카르복실이 모두 -CH- 구조에 직접 연결되어 있는 유기 화합물을 가리킨다. 일반식은 H<sub>2</sub>NCHRCOOH이고, R은 H, 치환 또는 치환되지 않은 알킬 등이다. 카르복실산의 탄소 원자에 연결된 아미노기의 위치에 따라 α, β, γ, δ, ε .....-아미노산으로 분류할 수 있다. 생물계에서 천연 단백질을 구성하는 아미노산은 특정된 구조적 특성, 즉 그 아미노기가 α-탄소 원자, 즉 글라이신(Glycine), 알라닌(Alanine), 발린(Valine), 루신(Leucine), 아이소루신(Isoleucine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 트립토판(Tryptophan), 티로신(Tyrosine), 아스파르트산(Aspartic acid), 히스티딘(Histidine), 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamic acid), 라이신(Lysine), 글루타민(Glutamine), 메티오닌(Methionine), 아르기닌(Arginine), 세린(Serine), 트레오닌(Threonine), 시스테인(Cysteine), 프롤린(Proline) 등을 포함한 α-아미노산에 직접 연결된다. 시트룰린과 같은 비천연 아미노산이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 비천연 아미노산은 천연 단백질을 구성하지 않으므로 본 개시의 항체 합성에 참여하지 않는다. 본 개시에서 사용되는 아미노산 세글자 코드와 한 글자 코드는 J.biol.chem, 243, p3558(1968)에 기재된 바와 같다.

| 약칭 | 약어  | 명칭              | 구조                                                                                |
|----|-----|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| G  | Gly | 글라이신<br>Glycine |  |
| A  | Ala | 알라닌<br>Alanine  |  |

|   |     |                         |                                                                                     |
|---|-----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| V | Val | 발린<br>Valine            |    |
| L | Leu | 루신<br>Leucine           |    |
| I | Ile | 아이소루신<br>Isoleucine     |    |
| F | Phe | 페닐알라닌<br>Phenylalanine  |    |
| W | Trp | 트립토판<br>Tryptophan      |   |
| Y | Tyr | 티로신<br>Tyrosine         |  |
| D | Asp | 아스파르트산<br>Aspartic acid |  |
| H | His | 히스티딘<br>Histidine       |  |
| N | Asn | 아스파라긴<br>Asparagine     |  |
| E | Glu | 글루탐산<br>Glutamic acid   |  |
| K | Lys | 라이신<br>Lysine           |  |
| Q | Gln | 글루타민<br>Glutamine       |  |

|   |     |                    |                                                                                     |
|---|-----|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| C | Cit | 시트룰린<br>Citrulline |  |
|---|-----|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|

- [0292] 용어 "항체-약물 접합체"는 안정적인 연결 유닛을 통해 생물학적 활성을 갖는 약물에 연결된 리간드를 가리킨다. 본 개시에서, "항체-약물 접합체"(antibody drug conjugate, ADC)는 안정적인 연결 유닛을 통해 생물학적 활성을 갖는 글루코코르티코이드에 연결되는 단클론 항체 또는 항체 단편을 가리킨다. 여기서, 항체 또는 항체 단편은 내부 특정 그룹(예를 들어, 사슬간 이황화 결합)을 통해 링커를 포함하는 글루코코르티코이드 분자에 결합할 수 있다.
- [0293] 용어 "약물 로딩량"은 항체-약물 접합체 집단에서 각 항체-약물 접합체 분자에 로딩되는 약물의 평균 수량을 가리키며, 약물 양 대 항체 양의 비율로 표시될 수도 있다. 약물 로딩량은 각 항체(Ab)에 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 10개의 글루코코르티코이드(D)를 연결하는 범위일 수 있다. 본 개시의 실시양태에서, 약물 로딩량을 k로 표시되며, 예시적으로는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 임의의 두 수치 사이의 수치의 평균 값일 수 있다. 바람직하게는 1~10, 보다 바람직하게는 1~8, 또는 2~8, 또는 2~7, 또는 3~8, 또는 3~7, 또는 3~6, 또는 4~7, 또는 4~6, 또는 4~5의 평균 값이다. 커플링 반응이 일어난 후 ADC 분자당 평균 약물 수량은 UV/가시광 분광법, 질량 분석법, ELISA 시험, 단클론 항체 크기 변형 결정(CE-SDS) 및 HPLC 특징과 같은 일반적인 방법을 사용하여 분석할 수 있다.
- [0294] 본 개시의 단클론 항체 분자 크기 변이체 측정 방법(CE-SDS)은 모세관 전기영동법 (2015년판 "중국 약전" 0542)에 따라 분자량 크기를 기준으로 환원 및 비환원 조건에서 도데실 황산 나트륨 모세관 전기영동(CE-SDS) 자외선 검출법을 채택하여, 제조한 단클론 항체 제품의 순도를 정량적으로 측정한다.
- [0295] 본 개시의 일 실시양태에서, 글루코코르티코이드는 링커 유닛을 통해 리간드의 N-말단 아미노 및/또는 라이신 잔기의  $\epsilon$ -아미노에 결합되며, 일반적으로 결합 반응에서 항체에 결합될 수 있는 약물 분자의 수는 이론적인 최대치보다 작다.
- [0296] 항체-약물 접합체의 로딩량을 제어하기 위해,
- [0297] (1) 연결 시제와 단클론 항체의 물비를 제어하는 단계,
- [0298] (2) 반응 시간 및 온도를 제어하는 단계,
- [0299] (3) 상이한 반응 시제를 선택하는 단계를 포함하는 비제한적인 방법을 사용할 수 있다.
- [0300] 용어 "항체"는 사슬간 이황화 링커에 의해 연결된 두 가닥의 동일한 중쇄와 두 가닥의 동일한 경쇄로 구성된 테트라펩타이드 사슬 구조인 면역글로불린을 가리킨다. 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 아미노산 조성 및 서열 순서가 다르기 때문에 이의 항원성도 다르다. 따라서, 면역글로불린은 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE의 5가지 종류 또는 면역글로불린의 아이소타입으로 분류할 수 있으며, 이에 상응하는 중쇄는 각각  $\mu$  사슬,  $\delta$  사슬,  $\gamma$  사슬,  $\alpha$  사슬 및  $\epsilon$  사슬이다. 동일한 종류의 Ig는 이의 힌지 영역의 아미노산 조성 및 중쇄 이황화 결합의 수 및 위치의 상이함에 따라, IgG를 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4와 같은 서로 다른 서브클래스 분류할 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 상이함에 따라  $\kappa$  사슬 또는  $\lambda$  사슬로 나눌 수 있다. 5가지 종류의 Ig에서 각 종류의 Ig에는 모두  $\kappa$  사슬 또는  $\lambda$  사슬이 있을 수 있다.
- [0301] 항체 중쇄와 경쇄의 N-말단에 근접하는 약 110개의 아미노산의 서열은 변화가 매우 커서 가변 영역(Fv 영역)이고; C-말단에 근접하는 나머지 아미노산 서열은 상대적으로 안정적이어서 불변 영역이다. 가변 영역은 3개의 초가변영역(HVR) 및 상대적으로 보존된 서열을 가진 4개의 백본 영역(FR)을 포함한다. 3개의 초가변영역이 항체의 특이성을 결정하며, 상보성 결정영역(CDR)이라고도 칭한다. 각 가닥의 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 중쇄 가변 영역(HCVR)은 3개의 CDR 영역과 4개의 FR영역으로 구성되어, 아미노기단으로부터 카르복실기단까지 순차적으로 배열되는 순서는 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4이다. 경쇄의 3개의 CDR영역은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3임을 가리키고; 중쇄의 3개의 CDR영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3임을 가리킨다.
- [0302] 본 개시의 항체는 마우스 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 전체 인간 항체를 포함하며, 바람직하게는 인간화 항체 및 전체 인간화 항체이다.
- [0303] 용어 "마우스 유래 항체"는 본 개시에서 당업계 지식 및 기술에 따라 마우스로 제조된 항체이다. 시험 대상에 특정 항원을 주입한 후 원하는 서열이나 기능적 특성을 갖는 항체를 발현하는 하이브리도마를 분리하여 제조된다.
- [0304] 용어 "키메라 항체(chimeric antibody)"는 마우스 유래 항체의 가변 영역과 인간 항체의 불변 영역을 융합하여 형성된 항체를 가리키며, 이는 마우스 유래 항체에 의해 유도되는 면역 응답 반응을 감소시킬 수 있다. 키메라 항체를 구축하려면, 먼저 마우스 유래 특이성 단클론 항체를 분리하는 하이브리도마를 구축한 다음, 마우스 하

이브리도마 세포에서 가변 영역 유전자를 클로닝하고, 필요에 따라 인간 항체의 불변 영역 유전자를 클로닝하여, 마우스 가변 영역 유전자를 인간 불변 영역 유전자에 연결하여 키메라 유전자를 형성한 후 발현 담체에 삽입하여 최종적으로 키메라 항체 분자를 진핵계 또는 원핵계에서 발현시킨다.

[0305] CDR 이식 항체(CDR-grafted antibody)라고도 알려진 용어 "인간화 항체(humanized antibody)"는 마우스 CDR 서열을 인간 항체 가변 영역 프레임워크, 즉 다양한 유형의 인간 생식 계열 항체 프레임워크 서열 내에서 생성된 항체로 이식하는 것을 가리킨다. 키메라 항체는 다량의 마우스 단백질 성분을 가지고 있기 때문에 키메라 항체에 의해 유발되는 이중 반응을 극복할 수 있다. 이와 같은 프레임워크 서열은 생식 계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스 또는 개시된 참고 문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식 계열 서열 데이터베이스(인터넷 [www.mrccepe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccepe.com.ac.uk/vbase)에서 얻을 수 있음) 및 Kabat, E.A. 등, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판에서 찾을 수 있다. 면역원성 감소로 인한 활성 감소를 피하기 위해, 상술한 인간 항체 가변 영역 프레임워크 서열에 최소한의 역 돌연변이를 수행하여 활성을 유지할 수 있다. 본 개시의 인간화 항체는 또한 추가적으로 파지 디스플레이에 의해 CDR의 친화력이 성숙된 이후의 인간화 항체를 포함한다. 마우스 항체로 인간화하는 방법을 추가적으로 설명하는 문헌은 예를 들어, Queen 등, Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869, 1991 및 Winter 및 그의 동료들의 방법 [Jones 등, Nature, 321, 522(1986), Riechmann, 등, Nature, 332, 323-327(1988), Verhoeyen, 등, Science, 239, 1534(1988)]이 포함된다.

[0306] 용어 "전체 인간화 항체", "전체 인간 항체" 또는 "전체 인간화 항체"는 "전체 인간화 단클론 항체"라고도 칭하며, 이의 항체 가변 영역과 불변 영역은 모두 인간으로부터 유래된 것으로, 면역원성과 독성 부작용을 제거한다. 단클론 항체의 발전은 마우스 유래 단클론 항체, 키메라 단클론 항체, 인간화 단클론 항체 및 전체 인간화 단클론 항체의 4단계를 거친다. 본 개시는 전체 인간화 단클론 항체이다. 전체 인간 항체의 제조와 관련되는 기술은 주로 인간 하이브리도마 기술, EBV 형질전환 B 림프구 기술, 파지 디스플레이 기술(phage display), 형질전환 마우스(transgenic mouse) 항체 제조 기술 및 단일 B세포 항체 제조 기술 등이 있다.

[0307] 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 하나 이상의 항체 단편을 가리킨다. 전장 항체의 단편을 이용하여 항체의 항원 결합 기능을 진행할 수 있다는 것으로 이미 나타났다. "항원 결합 단편"에 포함된 결합 단편의 예시로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지를 통해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 싱글암의 VH 및 VL 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된 단일 도메인 또는 dAb 단편(Ward 등, (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (vii) 임의로 합성된 링커에 의해 연결된 2개 이상의 분리된 CDR의 조합을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두 개의 도메인 VL 및 VH가 분리된 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 방법을 사용하여 합성된 링커를 통해 연결할 수 있으므로, VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬(단쇄 Fv(scFv)로 칭함)을 생산할 수 있고; 예를 들어, 문헌 Bird 등(1988) Science242: 423-426; 및 Huston 등 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85: 5879-5883을 참조한다. 이와 같은 단쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원 결합 단편"에 포함되도록 의도된다. 이와 같은 항체 단편은 당업자에게 알려진 일반적인 기술을 사용하여 얻고, 또한 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 기능성에 대해 스크리닝한다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 면역글로불린의 효소 또는 화학 단절에 의해 생성될 수 있다. 항체는 IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위 유형 포함), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체와 같은 다른 아이소타입의 항체일 수 있다.

[0308] Fab는 IgG 항체 분자를 프로테아제인 파파인(H쇄의 224번째 위치의 아미노산 잔기를 절단함)으로 처리하여 얻은 단편 중 항원에 대한 결합 활성을 가지며 분자량이 약 50,000인 항체 단편으로, 여기서 H쇄 N-말단 측의 약 절반과 L쇄 전체가 이황화 결합을 통해 결합되어 있다.

[0309] F(ab')<sub>2</sub>는 효소 펩신으로 IgG 힌지 영역 중 2개의 이황화 결합의 아래 부분을 분해하여 얻어진 것으로서, 그 분자량이 약 100,000이며, 항원 결합 활성이 있고, 힌지 위치에 연결된 두 개의 Fab 영역을 포함하는 항원 단편 항원 단편이다.

[0310] Fab'는 상술한 F(ab')<sub>2</sub>의 힌지 영역에 있는 이황화 결합을 절단하여 얻어진 분자량이 약 50,000이고 항원 결합 활성이 있는 항체 단편이다.

[0311] 또한, 항체의 Fab' 단편을 코딩하는 DNA를 원핵생물 발현 담체 또는 진핵생물 발현 담체에 삽입하고, 담체를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab'를 발현함으로써 Fab'를 생산할 수 있다.

- [0312] 용어 "단쇄 항체", "단쇄 Fv" 또는 "scFv"는 링커에 의해 연결된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 영역; VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(또는 영역; VL)을 포함하는 분자를 가리킨다. 이와 같은 scFv 분자는 NH<sub>2</sub>-VL-링커-VH-COOH 또는 NH<sub>2</sub>-VH-링커-VL-COOH인 일반적 구조를 가질 수 있다. 적합한 종래기술에 있어서 링커는 중복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성되고, 예를 들어, 1~4개의 중복된 변이체를 사용한다(Holliger 등(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448). 본 개시에 사용될 수 있는 기타 링커는 문헌 Alfthan 등(1995), Protein Eng.8: 725-731, 문헌 Choi 등(2001), Eur.J.Immunol. 31: 94-106, 문헌 Hu 등(1996), Cancer Res.56: 3055-3061, 문헌 Kipriyanov 등(1999), J.Mol.Biol.293: 41-56 및 문헌 Roovers 등(2001), Cancer Immunol.에 설명되어 있다.
- [0313] 용어 "CDR"은 항체의 가변 도메인 내에서 주로 항원 결합을 촉진하는 6개의 초가변영역 중 하나임을 가리킨다. 상기 6개의 CDR에 대한 가장 자주 사용되는 정의 중 하나는 문헌 Kabat E.A. 등, (1991)Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242에서 제공한다. 본원에 사용되는 CDR의 Kabat 정의는 경쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3(CDR L1, CDR L2, CDR L3 또는 L1, L2, L3) 및 중쇄 가변 도메인의 CDR2 및 CDR3(CDR H2, CDR H3 또는 H2, H3)에만 적용된다. 통상적으로, 각 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3)이 존재하고, 각 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3)이 존재한다. CDR의 아미노산 서열 경계는 "Kabat" 넘버링 규칙(Kabat 등 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 참조), "Chothia" 넘버링 규칙(Al-Lazikani 등, (1997) JMB 273:927-948 참조) 및 ImMunoGenTics(IMGt) 넘버링 규칙(Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P. 등, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003) 참조) 등 알려진 다양한 방안 중 하나를 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 고전적인 형식의 경우, Kabat의 규칙에 따라 상기 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)로 넘버링된다. 경쇄 가변 도메인(VL)의 CDR 아미노산 잔기는 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)로 넘버링된다. Chothia 규칙에 따라 VH의 CDR 아미노산 잔기 번호는 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)이고, VL의 아미노산 잔기 번호는 26-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 91-96(LCDR3)이다. Kabat 및 Chothia 양자의 CDR 정의를 결합하면, CDR은 인간 VH의 아미노산 잔기 26-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3) 및 인간 VL의 아미노산 잔기 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)로 구성된다. IMGt 규칙에 따라 VH의 CDR 아미노산 잔기 번호는 대략 26-35(CDR1), 51-57(CDR2) 및 93-102(CDR3)이고, VL의 CDR 아미노산 잔기 번호는 대략 27-32(CDR1), 50-52(CDR2) 및 89-97(CDR3)이다. IMGt 규칙에 따라 항체의 CDR 영역은 IMGt/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0314] 용어 "항체 프레임워크"는 가변 도메인 VL 또는 VH의 일부분임을 가리키고, 이는 해당 가변 도메인의 항원 결합 고리(CDR)의 스텐트로 사용된다. 본질적으로는, 이는 CDR을 갖지 않는 가변 도메인이다.
- [0315] "IL-4R에 결합"은 인간 IL-4R(또는 이의 에피토프 또는 단편)과 상호작용할 수 있는 것을 가리킨다. 본원에서 용어 "항원 결합 부위"는 본원에서 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 식별되는 3차원 부위를 가리킨다.
- [0316] 용어 "에피토프" 또는 "항원결정기"는 면역글로불린 또는 항체가 항원에 특이적으로 결합되는 부위를 가리킨다. 에피토프는 통상적으로 독특한 공간 형태로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 연속 또는 비연속적인 아미노산을 포함한다(예를 들어 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 제66권, G.E.Morris, Ed.(1996) 참조).
- [0317] 용어 "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적으로 결합" 및 "특이적으로 결합"은 항체의 미리 결정된 항원 상의 에피토프와의 결합을 가리킨다. 통상적으로, 항체는 약  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M 또는  $10^{-10}$  M 이하 또는 보다 더 작은 것과 같은 약  $10^{-7}$  M 이하의 친화력(KD)으로 결합된다.
- [0318] 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 가리킨다. 핵산분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산과 다른 핵산 서열과 함께 기능 관계에 놓은 경우, 핵산은 "유효 연결되는 것"이다. 예를 들어, 만약 촉진자 또는 증폭자가 코딩 서열의 전사에 영향을 끼친다면, 촉진자 또는 증폭자는 상기 코딩 서열에 유효적으로 연결된다.
- [0319] 용어 "담체"는 이에 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산분자를 가리킨다. 일 실시양태에서, 담체는 "플라스미드"이며, 이는 다른 DNA 세그먼트를 그 안에서 연결시킬 수 있는 고리형 이중 가닥 DNA 고리를 가리킨다. 다른 일 실시양태에서, 담체는 바이러스 담체이고, 여기서 다른 DNA 세그먼트를 바이러스 계통에 연결시킬 수

있다. 본원에서 개시하는 담체는 이미 이들을 인입한 숙주 세포에서 자가 복제(예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 담체와 부가형 포유동물 담체)를 할 수 있고 또는 숙주 세포 인입 후 숙주 세포의 유전자 그룹에 통합될 수 있어, 숙주 유전자 그룹의 복제에 따라 함께 복제(예를 들어, 비부가형 포유동물 담체)된다.

[0320] 항체 및 항원 결합 단편을 생산하고 정제하는 방법으로, 콜드 스프링 하버(Cold Spring Harbor)의 항체 실험 기술 지침의 제5장 내지 제8장 및 제15장 등 종래기술에 잘 알려져 있다. 항원 결합 단편도 일반적인 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 유전자 공학 방법을 통해 비인간화 CDR 영역에 하나 이상의 인간화 FR 영역을 추가한다. 인간 FR 생식 계열 서열은 IMGT 인간 항체 가변 영역 생식 계열 유전자 데이터베이스를 MOE 소프트웨어와 비교함으로써, ImMunoGeneTics(IMG)의 웹사이트 <http://imgt.cines.fr>로부터 얻을 수 있거나, 번역글로볼린 잡지, 2001ISBN012441351로부터 얻을 수 있다.

[0321] 용어 "숙주 세포"는 그 안에서 발현 담체를 도입한 세포를 가리킨다. 숙주 세포는 박테리아, 미생물, 식물 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 형질전환이 용이한 박테리아는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라균(*Salmonella*)의 균주와 같은 장내세균과(*enterobacteriaceae*)의 구성원; 고초균(*Bacillus subtilis*)과 같은 바실러스과(*Bacillaceae*); 폐렴구균(*Pneumococcus*); 연쇄상 구균(*Streptococcus*) 및 헤모필루스 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*)을 포함한다. 적당한 미생물로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스 효모(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 적당한 동물 숙주 세포주는 CHO(중국 햄스터 난소 세포주) 및 NSO 세포를 포함한다.

[0322] 본 개시의 공정화된 항체 또는 항원 결합 단편은 일반적인 방법으로 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA 서열은 GS 발현 담체에 복제하여 재조합할 수 있다. 재조합된 번역글로볼린 발현 담체는 안정적으로 CHO 세포를 형질감염할 수 있다. 보다 권장되는 종래기술로서, 포유동물 발현 시스템은 특히 Fc 영역의 고도로 보존된 N-말단 부위에서 항체의 글리코실화를 초래한다. 양성 클론을 생물 반응기의 무혈청 배지에서 확장 배양하여 항체를 생성하였다. 항체를 분비한 배양액은 일반적인 기술로 정제할 수 있다. 예를 들어, 조절된 완충액이 포함된 A 또는 G Sepharose FF 컬럼으로 정제한다. 비특이적으로 결합된 성분을 세척한다. 다시 PH 경사법으로 결합된 항체를 세척하고, SDS-PAGE로 항체 단편을 검출하고 수집한다. 항체는 일반적인 방법으로 여과하여 농축할 수 있다. 용해 가능한 혼합체 및 폴리머는 분자체 및 이자교환과 같은 통상적인 방법으로 제거할 수 있다. 얻어진 생성물은 -70°C와 같은 온도에서 즉시 냉동시키거나 동결 건조해야 한다.

[0323] 아미노산 서열의 "동일성"은 아미노산 서열을 비교하고 서열 동일성의 최대 백분율을 달성하기 위해 필요한 경우 갭을 도입하며, 서열 동일성의 일부로서 보존적 치환을 고려하지 않고 제2 서열의 아미노산 잔기와 동일한 제1 서열의 아미노산 잔기의 백분율을 가리킨다. 아미노산 서열 동일성의 백분율을 측정하기 위해, 정렬은 당업계 범위 내의 다양한 방식, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR)소프트웨어와 같은 공개적으로 획득 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 구현할 수 있다. 당업자는 정렬되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 모든 알고리즘을 포함하여 정렬 측정에 적합한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0324] 용어 "항IL-4R 항체" 또는 "IL-4R에 결합하는 항체"는 예를 들어 충분한 친화력으로 IL-4R에 결합하여 IL-4R을 표적으로 하는 치료제로서 사용될 수 있는 항체를 가리킨다. 항IL-4R 항체가 관련이 없는 비IL-4R 단백질에 결합하는 정도는 예를 들어 방사면역측정법(RIA)으로 측정하는 항체가 IL-4R과의 결합의 약 10% 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-4R에 결합하는 항체는  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100\text{nM}$ ,  $\leq 10\text{nM}$ ,  $\leq 1\text{nM}$  또는  $\leq 0.1\text{nM}$ 의 해리 상수(Kd)를 갖는다.

[0325] 용어 "펩타이드"는 2개 이상의 아미노산 분자가 펩타이드 결합을 통해 서로 연결된 아미노산과 단백질 사이의 화합물 단편을 가리키며, 호르몬, 효소 등과 같은 본질적으로 모두 펩타이드인 단백질의 구조적 및 기능적 단편이다.

[0326] 용어 "당"은 단당류, 이당류 및 다당류 등으로 나눌 수 있는 C, H, O 세 가지 원소로 구성된 생물학적 거대분자를 가리킨다.

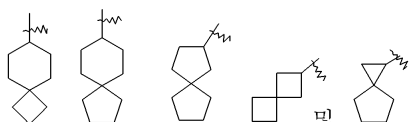
[0327] 용어 "형광 프로브"는 자외선-가시-근적외선 영역에서 특징적인 형광을 가지며, 이의 형광특성(여기 및 방출 파장, 강도, 수명 및 양극화 등)이 극성, 굴절률, 점도 등과 같은 환경 성질의 변화에 따라 민감하게 변화할 수 있으며, 핵산(DNA 또는 RNA), 단백질 또는 기타 거대분자와의 구조적 비공유 상호작용으로 인해 하나 이상의 형광 특성에 변화가 발생하여 거대분자 물질의 특성과 거동을 연구하는 데 사용할 수 있는 형광 분자의 일종을 가리킨다.

[0328] 용어 "알킬"은 포화 지방족 탄화수소 그룹을 가리키며, 이는 1 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 직쇄 또는 분지쇄 그룹, 바람직하게는 1 내지 12개의 탄소 원자를 포함하는 알킬이다. 비제한적인 예시로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, sec-부틸, n-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, n-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-디메틸부틸, n-헵틸, 2-메틸헥실, 3-메틸헥실, 4-메틸헥실, 5-메틸헥실, 2,3-디메틸펜틸, 2,4-디메틸펜틸, 2,2-디메틸펜틸, 3,3-디메틸펜틸, 2-에틸펜틸, 3-에틸펜틸, n-옥틸, 2,3-디메틸헥실, 2,4-디메틸헥실, 2,5-디메틸헥실, 2,2-디메틸헥실, 3,3-디메틸헥실, 4,4-디메틸헥실, 2-에틸헥실, 3-에틸헥실, 4-에틸헥실, 2-메틸-2-에틸펜틸, 2-메틸-3-에틸펜틸, n-노닐, 2-메틸-2-에틸헥실, 2-메틸-3-에틸헥실, 2,2-디에틸펜틸, n-데실, 3,3-디에틸헥실, 2,2-디에틸헥실 및 이의 다양한 분지쇄 이성질체 등이 포함된다. 보다 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬이고, 비제한적인 실시예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, sec-부틸, n-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸 프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, n-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-디메틸부틸 등이 포함된다. 알킬은 치환되거나 또는 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 임의의 사용 가능한 연결점에서 치환될 수 있고, 상기 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로알콕시, 헤테로시클로알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 옥소, 카르복실 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

[0329] 용어 "헤테로알킬"은 N, O 또는 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 함유하는 알킬을 가리키며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

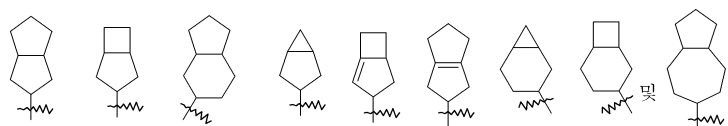
[0330] 용어 "시클로알킬"은 포화 또는 부분적으로 불포화 및 모노시클릭 또는 폴리시클릭 고리탄화수소 치환기를 가리키며, 시클로알킬 고리는 3 내지 20개의 탄소 원자, 바람직하게는 3 내지 12개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 3 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다. 모노시클릭 시클로알킬의 비제한적인 예시로는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥세닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헥사디에닐, 시클로헵틸, 시클로헵타트리에닐 및 시클로옥틸 등을 포함하고; 폴리시클릭 시클로알킬은 스피로 고리, 축합 고리 및 브릿지된 고리의 시클로알킬을 포함한다. "탄소 고리"은 시클로알킬의 고리 시스템을 가리킨다.

[0331] 용어 "스피로 시클로알킬"은 모노시클릭 사이에 하나의 탄소 원자(스피로 원자라고 칭함)를 공유하는 5 내지 20 원의 폴리시클릭 그룹을 가리키며, 이는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있지만 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않는다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 스피로 시클로알킬은 고리 사이에 공유되는 스피로 원자의 수에 따라 모노스피로 시클로알킬, 비스스피로 시클로알킬 또는 폴리스피로 시클로알킬로 분류되며, 바람직하게는 모노스피로 시클로알킬 및 비스스피로 시클로알킬이다. 보다 바람직하게는 4원/4원, 4원/5원, 4원/6원, 5원/5원 또는 5원/6원 모노스피로 시클로알킬이다. "스피로 탄소 고리"는 스피로 시클로알킬의 고리 시스템을 가리킨다. 스피로 시클로알킬의 비제한적인 예시로는



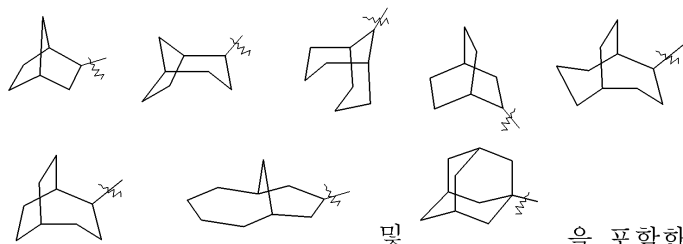
[0332] 을 포함한다.

[0333] 용어 "축합 시클로알킬"은 시스템의 각 고리가 시스템의 다른 고리와 인접한 한 쌍의 탄소 원자를 공유하는 5 내지 20원의 전체 탄소 폴리시클릭 그룹을 가리키며, 여기서 하나 이상의 고리에는 하나 이상의 이중 결합이 함유될 수 있지만 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않는다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 고리를 구성하는 수에 따라 이환, 삼환, 사환 또는 폴리시클릭 축합 시클로알킬로 분류할 수 있으며, 바람직하게는 이환 또는 삼환, 보다 바람직하게는 5원/5원 또는 5원/6원 이환 알킬이다. "축합 탄소 고리"는 축합 시클로알킬의 고리 시스템을 가리킨다. 축합 시클로알킬의 비제한적인 예시



를 포함한다.

용어 "브릿지된 시클로알킬"은 임의의 두 개의 고리가 직접 연결되지 않은 두 개의 탄소 원자를 공유하는 5 내지 20원의 전체 탄소 폴리시클릭 그룹을 가리키며, 이는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있지만 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않는다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 고리를 구성하는 수에 따라 이환, 삼환, 사환 또는 폴리시클릭 브릿지된 시클로알킬로 분류할 수 있으며, 바람직하게는 이환, 삼환 또는 사환, 보다 바람직하게는 이환 또는 삼환 브릿지된 시클로알킬이다. 브릿지된 시클로알킬의 비제한적인 예시로는

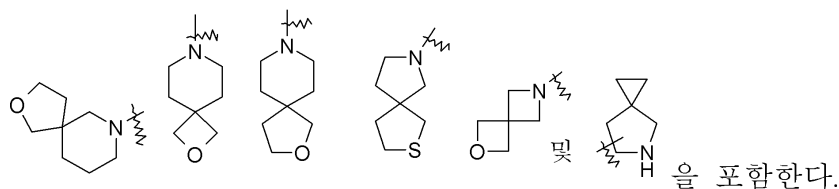


를 포함한다.

상기 시클로알킬 고리는 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로시클로알킬 고리에 축합될 수 있으며, 여기서 모체 구조와 함께 연결된 고리는 시클로알킬이고, 비제한적인 예시로는 인다닐, 테트라히드로나프틸, 벤조시클로헥틸 등을 포함한다. 시클로알킬은 선택적으로 치환 또는 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 옥소, 카르복실 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

용어 "헤테로시클릭"은 포화 또는 부분적으로 불포화의 모노시클릭 또는 폴리시클릭 고리탄화수소 치환기를 가리킨다. 이는 3 내지 20개의 고리 원자를 포함하며, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 질소, 산소 또는 S(O)<sub>m</sub>(여기서 m은 0 내지 2의 정수)로부터 선택되는 헤테로원자이나, -O-O-, -O-S- 또는 -S-S-의 고리 부분을 포함하지 않고, 나머지 고리 원자는 탄소이다. 바람직하게는 3 내지 12개의 고리 원자를 포함하고, 여기서 1~4개는 헤테로원자이고; 보다 바람직하게는 3 내지 6개의 고리 원자를 포함한다. 모노시클릭 헤테로시클릭의 비제한적인 예시로는 피롤리딘, 이미다졸리딘, 테트라히드로푸릴, 테트라히드로티에닐, 디히드로이미다졸릴, 디히드로푸릴, 디히드로피롤릴, 디히드로피롤릴, 피페리딘, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 호모피페라지닐 등을 포함하며, 바람직하게는 피페리딘, 피롤리딘이다. 폴리시클릭 헤테로시클릭은 스피로 고리, 축합 고리 및 브릿지 고리의 헤테로시클릭을 포함한다. "헤테로시클"은 헤테로시클릭의 고리 시스템을 가리킨다.

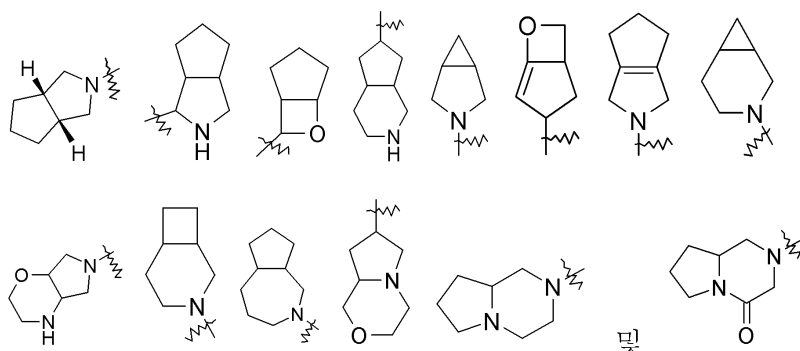
용어 "스피로 헤테로시클릭"은, 모노시클릭 사이에 하나의 원자(스피로 원자라 칭함)를 공유하는 5원 내지 20원의 폴리시클릭 헤테로시클릭 그룹을 가리키며, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 질소, 산소 또는 S(O)<sub>m</sub>(여기서 m은 0 내지 2의 정수)로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소이다. 이는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있으나, 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않는다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 스피로 헤테로시클릭은 고리 사이에 공유되는 스피로 원자의 수에 따라 모노스피로 헤테로시클릭, 비스피로 헤테로시클릭 또는 폴리스피로 헤테로시클릭으로 분류되며, 바람직하게는 모노스피로 헤테로시클릭 및 비스피로 헤테로시클릭이다. 보다 바람직하게는 4원/4원, 4원/5원, 4원/6원, 5원/5원 또는 5원/6원 모노스피로 헤테로시클릭이다. "스피로 헤테로시클"은 스피로 헤테로시클릭의 고리 시스템을 가리킨다. 스피로 헤테로시클릭의 비제한적인 예시로는



[0339]

[0340]

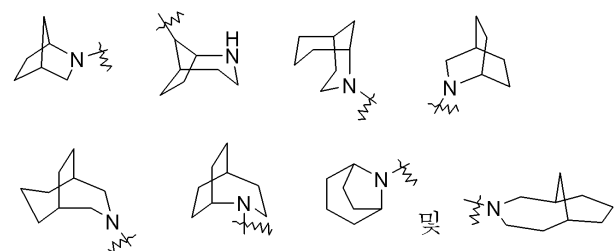
용어 "축합 헤테로시클릴"은 시스템의 각 고리가 시스템의 다른 고리와 인접한 한 쌍의 원자를 공유하는 5 내지 20원의 폴리시클릭 헤테로시클릴 그룹을 가리키며, 하나 이상의 고리에는 하나 이상의 이중 결합이 함유될 수 있으나, 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않고, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 질소, 산소 또는  $S(O)_m$ (여기서  $m$ 은 0 내지 2의 정수)로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소이다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 고리를 구성하는 수에 따라 이환, 삼환, 사환 또는 폴리시클릭 축합 헤테로시클릴로 분류할 수 있으며, 바람직하게는 이환 또는 삼환, 보다 바람직하게는 5원/5원 또는 5원/6원 비시클릭 축합 헤테로시클릴이다. "축합 헤테로시클"은 축합 헤테로시클릴의 고리 시스템을 가리킨다. 축합 헤테로시클릴의 비제한적인 예시로는



[0341]

[0342]

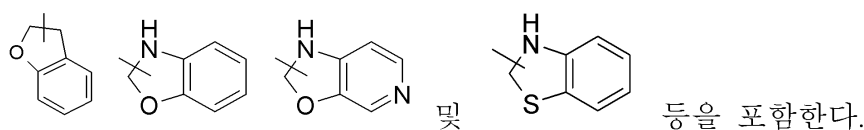
용어 "브릿지된 헤테로시클릴"은 임의의 두 개의 고리가 두 개의 직접 연결되지 않는 원자를 공유하는 5 내지 14원의 폴리시클릭 헤테로시클릴 그룹을 가리키며, 이는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있으나, 어느 한 고리에도 완전히 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖지 않고, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 질소, 산소 또는  $S(O)_m$ (여기서  $m$ 은 0 내지 2의 정수)로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소이다. 바람직하게는 6원 내지 14원이고, 보다 바람직하게는 7원 내지 10원이다. 고리를 구성하는 수에 따라 이환, 삼환, 사환 또는 폴리시클릭 브릿지된 헤테로시클릴로 분류할 수 있으며, 바람직하게는 이환, 삼환 또는 사환, 보다 바람직하게는 이환 또는 삼환 브릿지된 헤테로시클릴이다. 브릿지된 헤테로시클릴의 비제한적인 예시로는



[0343]

[0344]

상기 헤테로시클릴 고리는 아릴, 헤테로아릴 또는 시클로알킬 고리에 축합될 수 있으며, 여기서 모체 구조와 함께 연결된 고리는 헤테로시클릴이며, 이의 비제한적인 예시로는



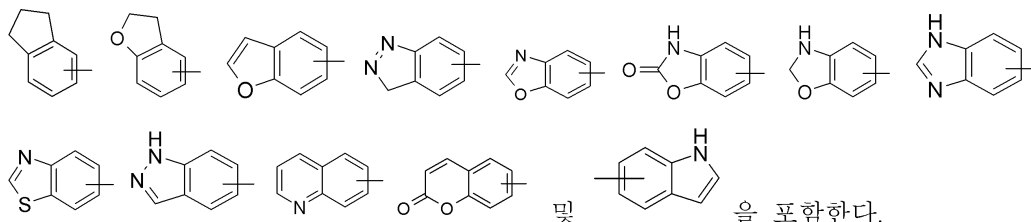
[0345]

[0346]

헤테로시클릴은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로

테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 옥소, 카르복시 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

- [0347] 용어 "아릴"은 공액된  $\pi$  전자 시스템을 갖는 6원 내지 14원의 탄소로만 이루어진 모노시클릭 고리 또는 축합 폴리시클릭(즉, 인접한 탄소 원자의 쌍을 공유하는 고리) 그룹을 가리키며, 바람직하게는 6원 내지 10원이며, 예를 들어 페닐 및 나프틸이다. 상기 아릴 고리는 헤테로아릴, 헤테로시클릭 또는 시클로알킬 고리에 축합될 수 있으며, 여기서 모체 구조와 함께 연결된 고리는 아릴 고리이다. "방향족 고리"는 아릴의 고리 시스템을 가리킨다. 아릴의 비제한적인 예시로는

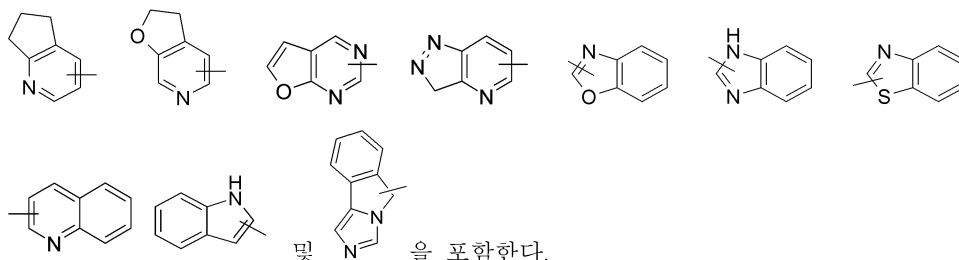


- [0348] 을 포함한다.

- [0349] 아릴은 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 카르복실기 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이며, 바람직하게는 페닐이다.

- [0350] 용어 "축합 시클로아릴"은 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 고리 구조를 연결하여 형성된 8 내지 14개의 고리 원자를 함유하는 불포화 방향족 축합 고리 구조일 수 있으며, 고리 원자는 바람직하게는 8 내지 12개이다. 예를 들어, 나프탈렌, 페난트렌 등과 같은 모든 불포화 축합 시클로아릴을 포함하며, 또한 벤조 3 내지 8원 포화 모노시클릭 시클로알킬, 벤조 3 내지 8원 부분 포화 모노시클릭 시클로알킬과 같은 부분 포화 축합 시클로아릴을 포함한다. "축합 방향족 고리"는 축합 시클로아릴의 고리 시스템을 가리킨다. 축합 시클로아릴의 구체적인 예시로는 2,3-디히드로-1H-인데닐, 1H-인데닐, 1,2,3,4-테트라히드로나프틸, 1,4-디히드로나프틸 등을 포함한다.

- [0351] 용어 "헤테로아릴"은 1 내지 4개의 헤테로원자, 5 내지 14개의 고리 원자를 포함하는 헤테로방향족 시스템을 가리키며, 여기서 헤테로원자는 산소, 황 및 질소로부터 선택된다. 헤테로아릴은 바람직하게는 이미다졸릴, 푸릴, 티에닐, 티아졸릴, 피라졸릴, 옥사졸릴, 피롤릴, 테트라졸릴, 피리딜, 피리미디닐, 티아디아졸, 피라지닐 등과 같은 5 내지 12원이고, 바람직하게는 이미다졸릴, 피라졸릴, 피리미디닐 또는 티아졸릴; 보다 바람직하게는 피라졸릴 또는 티아졸릴이다. 상기 헤테로아릴 고리는 아릴, 헤테로시클릭 또는 시클로알킬 고리에 축합될 수 있으며, 여기서 모체 구조와 함께 연결된 고리는 헤테로아릴 고리이다. "헤테로방향족 고리"는 헤테로아릴의 고리 시스템을 가리킨다. 헤테로아릴의 비제한적인 예시로는



- [0352] 을 포함한다.

- [0353] 헤테로아릴은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 카르복실기 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

- [0354] 용어 "축합 헤테로아릴"은 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 고리 구조를 연결하여 형성되는 동시에 산화될 수 있는 탄소, 질소 및 황 원자를 포함하는 5 내지 14개의 고리 원자(적어도 하나의 헤테로원자가 함유됨)를 포함하는 불포화 방향족 축합 고리 구조일 수 있고, 바람직하게는 "5 내지 12원 축합 헤테로아릴", "7 내지 12원 축합 헤테로아릴", "9 내지 12원 축합 헤테로아릴" 등이고, 예를 들어 벤조푸릴, 벤즈이소푸릴, 벤조티

에닐, 인돌릴, 이소인돌, 벤즈옥사졸릴, 벤즈이미다졸릴, 인다졸릴, 벤조트리아졸릴, 퀴놀릴, 2-퀴놀리논, 4-퀴놀리논, 1-이소퀴놀리논, 이소퀴놀리닐, 아크리디닐, 페난트리디닐, 벤조피리다지닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 페놀라지닐, 프테리디닐, 퓨리닐, 나프티리디닐, 펜 아진, 페노티아진 등이다. "축합 헤테로방향족 고리"는 축합 헤테로아릴의 고리 시스템을 가리킨다.

[0355] 헤테로아릴은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 카르복실 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

[0356] 용어 "알킬렌(-CH<sub>2</sub>-)"은 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄 및 분지쇄 하위 그룹을 포함하는, 2개의 수소 원자를 제거한 후 남은 알케인 분자 부분을 나타낸다. 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬렌의 비제한적인 예시로는 메틸렌(-CH<sub>2</sub>-), 에틸렌(예컨대, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- 또는 -CH(CH<sub>3</sub>)-), 프로필렌(예컨대, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- 또는 -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-), 부틸렌(예컨대, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)을 포함한다. 알킬렌은 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우, 치환기는 임의의 사용 가능한 연결점에서 치환될 수 있고, 바람직하게는 할로젠, 중수소, 히드록시, 니트로, 시아노 또는 아미노로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다. 마찬가지로, "알케닐렌", "헤테로아릴렌", "아릴렌", "헤테로시클로알킬렌" 등은 앞에 정의된 바와 같다.

[0357] 용어 "알케닐렌"은 2 내지 8개의 탄소 원자, 바람직하게는 2 내지 6개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖고 임의의 위치에 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 선형 알켄을 포함하는 것을 가리키며, 예를 들어, 비닐렌, 알릴렌(allylene), 프로페닐렌, 부테닐렌, 프레닐렌(prenylene), 부타디에닐렌(butadienylen), 펜테닐렌, 헥세닐, 헥사디에닐 등이 포함된다.

[0358] 용어 "알키닐렌"은 2 내지 8개의 탄소 원자, 바람직하게는 2 내지 6개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖고 임의의 위치에 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 선형 알키닐렌을 포함하는 것을 가리키며, 예를 들어 에티닐렌, 프로피닐렌, 부티닐렌, 페니닐렌, 헥시닐렌 등이 포함된다.

[0359] 용어 "알콕시"는 -O-(알킬) 및 -O-(치환되지 않은 시클로알킬)를 가리키며, 여기서, 알킬에 대한 정의는 위에 기재된 바와 같다. 알콕시의 비제한적인 예시로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 시클로프로폭시, 시클로부톡시, 시클로펜톡시, 시클로헥실폭시를 포함한다. 알콕시는 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환되는 경우 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오, 카르복실 또는 카르복실레이트로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

[0360] 용어 "알킬티오"는 -O-(알킬) 및 -O-(치환되지 않은 시클로알킬)를 가리키며, 여기서, 알킬에 대한 정의는 위에 기재된 바와 같다. 알킬티오의 비제한적인 예시로는 메틸티오, 에틸티오, 프로필티오, 부틸티오, 시클로프로필티오, 시클로부틸티오, 시클로펜틸티오, 시클로헥실티오를 포함한다. 알킬티오는 선택적으로 치환된 것이거나 또는 비치환된 것일 수 있는 것으로, 치환된 경우 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 히드록시, 니트로, 시아노, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 시클로 알콕시, 헤테로시클로 알콕시, 시클로알킬티오, 헤테로시클로알킬티오로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 그룹이다.

[0361] 용어 "히드록시알킬"은 히드록시에 의해 치환된 알킬을 가리키며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0362] 용어 "할로알킬"은 할로젠에 의해 치환된 알킬을 가리키며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0363] 용어 "중수소알킬"은 중수소 원자에 의해 치환된 알킬을 가리키며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0364] 용어 "히드록시"는 -OH 그룹을 가리킨다.

[0365] 용어 "옥소"는 =O 그룹을 가리킨다. 예를 들어, 탄소 원자는 이중 결합을 통해 산소 원자에 연결되어 케톤 또는 알데히드를 형성한다.

[0366] 용어 "티오"는 =S 그룹을 가리킨다. 예를 들어, 탄소 원자는 이중 결합을 통해 황 원자에 연결되어 티오키르보닐 -C(S)-를 형성한다.

- [0367] 용어 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 가리킨다.
- [0368] 용어 "아미노"는  $-NH_2$ 를 가리킨다.
- [0369] 용어 "시아노"는  $-CN$ 을 가리킨다.
- [0370] 용어 "니트로"는  $-NO_2$ 를 가리킨다.
- [0371] 용어 "카르복실"은  $-C(O)OH$ 를 가리킨다.
- [0372] 용어 "알데히드"는  $-CHO$ 를 가리킨다.
- [0373] 용어 "카르복실레이트"는  $-C(O)O(알킬)$  또는  $-C(O)O(시클로알킬)$ 을 가리키며, 여기서, 알킬 및 시클로알킬은 위에 정의된 바와 같다.
- [0374] 용어 "아실 할라이드"는  $-C(O)-$ 할로젠을 함유하는 그룹 화합물을 가리킨다.
- [0375] 용어 "설폰닐"은  $-S(O)(O)-$ 를 가리킨다.
- [0376] 용어 "설피닐"은  $-S(O)-$ 를 가리킨다.
- [0377] "아미노 보호기"는 당업계에 알려진 아미노 보호에 적합한 그룹으로, 문헌("Protective Groups in Organic Synthesis", 5<sup>th</sup>. Ed. T. W. Greene & P.G.M. Wuts)에서의 아미노 보호기를 참조하고, 바람직하게는, 상기 아미노 보호기는 포르밀, 아세틸, 벤조일 등과 같은 ( $C_{1-10}$ 알킬 또는 아릴)아실일 수 있으며; ( $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{6-10}$ 아릴)설폰닐일 수 있고; 또한 Boc 또는 Cbz와 같은 ( $C_{1-6}$ 알콕시 또는  $C_{6-10}$ 아릴옥시)카르보닐일 수 있으며; 또한 트리틸(Tr), 2,4-디메톡시벤질(DMB), p-메톡시벤질(PMB) 또는 벤질(Bn)과 같은 치환되거나 치환되지 않은 알킬일 수 있다.
- [0378] "선택적" 또는 "선택적으로"는 이어서 설명되는 사건 또는 환경이 발생할 수 있으나 반드시 발생하는 것은 아님을 의미하는 것으로서, 해당 설명은 해당 사건 또는 환경이 발생하거나 발생하지 않는 상황을 포함한다. 예를 들어, "선택적으로 알킬에 의해 치환되는 헤테로시클로알킬 그룹"은 알킬이 존재할 수 있으나 반드시 존재하는 것은 아님을 의미하며, 해당 설명은 헤테로시클로알킬 그룹이 알킬에 의해 치환된 상황과 헤테로시클로알킬 그룹이 알킬에 의해 치환되지 않는 상황을 포함한다.
- [0379] 용어 "약학적 조성물"은 본원에 기재된 하나 이상의 화합물 또는 이의 생리학적/약학적으로 사용 가능한 염 또는 전구약물과 기타 화학적 성분의 혼합물 및 생리학적/약학적으로 사용 가능한 담체 및 부형제와 같은 기타 성분을 함유하는 것을 나타낸다. 약학적 조성물은 생물에 대한 투약을 촉진하고, 활성 성분의 흡수를 촉진하여 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 것을 목적으로 한다.
- [0380] 본 개시의 약물에 사용되는 용어 "약물 담체"는 약물이 인체에 유입되는 방식과 체내에서의 분포를 변화시키고 약물의 방출 속도를 제어하고 약물을 표적 기관에 전달할 수 있는 시스템을 가리킨다. 약물 담체 방출 및 표적 시스템은 약물의 분해 및 손실을 감소시키고, 부작용을 낮추고, 생체 이용률을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 담체로서 사용될 수 있는 고분자 계면활성제는 이의 독특한 양친성 구조로 인해, 자기 조립되어 다양한 형태의 응집체를 형성할 수 있으며, 미셀, 마이크로에멀션, 젤, 액정, 소포 등과 같은 바람직한 예시가 있다. 이러한 응집체는 약물분자를 감싸 운송할 수 있는 능력을 갖는 동시에, 또한 막에 대한 양호한 삼투성을 가지는 것으로, 우수한 약물 담체로 사용될 수 있다.
- [0381] 용어 "부형제"는 약학적 제제에서 주요한 약물을 제외한 부가물을 가리키는 것으로서, 보조제라고도 할 수 있다. 예를 들어, 정제의 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제; 반고체 제제의 연고제, 크림제의 기질 부분; 액체 제제의 방부제, 향산화제, 방취제, 방향제, 용융제, 유화제, 가용화제, 삼투압 조절제, 착색제 등을 모두 부형제라고 칭할 수 있다.
- [0382] 용어 "희석제"는 또한 충전제라고도 칭하고, 이의 주요 용도는 정제의 중량과 부피를 증가시키는 것이다. 희석제의 추가는 일정의 정해진 부피 크기를 보장할 뿐만 아니라, 주요 성분의 용량 차이를 줄이고, 약물의 압축 성형성 등을 개선한다. 정제의 약물에 유성 성분이 함유될 경우, 유성 물질을 흡수하도록 흡수제를 추가하여, "긴조" 상태를 유지함으로써 정제의 제조를 용이하게 해야 한다.
- [0383] 본 개시의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있고, 따라서 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체를

생성할 수 있으며, 절대 입체 화학에 따라 (R)- 또는 (S)- 또는 아미노산에 대해 (D)- 또는 (L)-의 다른 입체 이성질체 형태로 정의될 수 있다. 본 개시는 모든 가능한 이성질체뿐만 아니라 이의 라세미 및 광학적 순수한 형태를 포함한다. 광학 활성(+) 및 (-), (R)- 및 (S)- 또는 (D)- 및 (L)- 이성질체는 키랄 신포논 또는 키랄 시약으로 제조할 수 있고, 또는 크로마토그래피 및 분별 결정화와 같은 일반적인 방법으로 제조할 수 있다. 각 거울상 이성질체를 제조/분리하는 데 사용되는 일반적인 방법은 적합한 광학적 순수한 전구체로부터의 키랄 합성 또는 키랄 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하는 라세미체(또는 염 또는 유도체의 라세미체) 분리를 포함한다. 본원에 설명된 화합물이 올레핀 이중 결합 또는 기타 기하학적 비대칭 중심을 함유하며, 별도로 설명하지 않는 한, 상기 화합물은 E 및 Z 기하 이성질체를 포함함을 의미한다. 또한, 모든 호변 이성질체 형태도 안에서 포함됨을 의미한다.

[0384] 본 개시에 기재된 화합물의 화학 구조에서, 결합 ""는 지정되지 않은 배열을 나타내며, 즉, 화학 구조에 키랄 이성질체가 존재하는 경우, 결합 "" 또는 ""일 수 있고, 또는 "" 및 ""의 두 가지 배열을 동시에 포함할 수 있다. 본 개시에 기재된 화합물의 화학 구조에서, 결합 ""은 배열이 지정되지 않고, 즉, Z 배열 또는 E 배열일 수 있고, 또는 두 가지 배열을 동시에 포함할 수 있다.

[0385] "입체 이성질체"는 동일한 결합으로 결합되지만 서로 다른 3차원 구조를 갖는 동일한 원자로 구성되는 화합물을 가리키며, 이는 상호교환이 불가능하다. 본 개시에서 다양한 입체 이성질체 및 이들의 혼합물이 고려되며, 분자가 서로 겹쳐질 수 없는 거울상인 2개의 입체 이성질체를 지칭하는 "거울상 이성질체"를 포함한다.

[0386] "호변 이성질체"는 양성자가 분자의 한 원자에서 동일한 분자의 다른 원자로 전달되는 것을 가리킨다. 본 개시에는 상기 화합물의 임의의 호변 이성질체가 포함된다.

[0387] 본 개시의 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 사용 가능한 염 또는 이의 이성질체의 임의의 동위원소 표지된 유도체가 모두 본 개시에 포함된다. 동위원소로 표시할 수 있는 원자는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소, 요오드 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이들은 각각 동위원소  $^2\text{H(D)}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  및  $^{125}\text{I}$  등으로 대체될 수 있다. 별도로 설명하지 않는 한, 한 위치가 중수소(D)로 특별히 지정된 경우, 해당 위치에서는 천연적인 중수소 풍부도(0.015%)보다 적어도 3000배 더 높은 중수소(즉, 적어도 45%의 중수소 혼입) 풍부도를 갖는 것으로 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0388] 도 1: 시험 단백질과 인간화 IL-4R $\alpha$  발현 세포의 전체 세포 결합 활성 용량-반응 곡선  
 도 2: IL-4/IL-13 신호 전달 경로에 대한 시험 단백질의 차단 효과의 용량-반응 곡선  
 도 3: TF-1 세포에서 시험 단백질의 세포내이입율-시간 곡선  
 도 4: 기관 내에 투약한 후, 각 조직에서 ADC-2 및 유리 Budesonide의 시간-농도 곡선  
 도 5: 시험예 6의 폐포 세척액 내 백혈구 계수와 분화된 세포 계수  
 도 6: 시험예 7의 폐포 세척액 내 백혈구 계수와 분화된 세포 계수

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0389] 이하 실시예를 결합하여 본 개시에 기재된 화합물 및 약학적으로 사용 가능한 염의 제조를 추가적으로 설명할 것이나, 이러한 실시예는 본 개시의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0390] 본 개시의 실시예에서 구체적인 조건이 명시되지 않은 실험 방법은, 통상적으로 일반적인 조건에 따르거나, 원료 또는 제품의 제조업체가 권장하는 조건에 따른다. 구체적인 출처가 명시되지 않은 시약은 시판되는 일반적인 시약이다.

[0391] NMR 이동( $\delta$ )은  $10^{-6}$ (ppm) 단위로 주어진다. NMR 측정은 Bruker AVANCE-400 핵자기공명 장비를 사용하였고, 측정 용매는 중수소화 디메틸설폭시드(DMSO- $d_6$ ), 중수소화 클로로포름( $\text{CDCl}_3$ ), 중수소화 메탄올( $\text{CD}_3\text{OD}$ )이며, 내부

표준은 테트라메틸실란(TMS)이다.

- [0392] MS 측정은 Shimadzu 2010 질량분석기(Mass Spectrometer) 또는 Agilent 6110A MSD 질량분석기를 사용하였다.
- [0393] HPLC 측정은 Shimadzu LC-20A 시스템, Shimadzu LC-2010HT 시리즈 또는 Agilent 1200 LC 고압 액체 크로마토그래피(Ultimate XB-C18 3.0\*150mm 크로마토그래피 컬럼 또는 Xtimate C18 2.1\*30mm 크로마토그래피 컬럼)를 사용하였다.
- [0394] 키랄 HPLC 분석 측정은 Chiralpak IC-3 100×4.6mm I.D., 3μm, Chiralpak AD-3 150×4.6mm I.D., 3μm, Chiralpak AD-3 50×4.6mm I.D., 3μm, Chiralpak AS-3 150×4.6mm I.D., 3μm, Chiralpak AS-3 100×4.6mm I.D., 3μm, ChiralCel OD-3 150×4.6mm I.D., 3μm, Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D., 3μm, ChiralCel OJ-H 150×4.6mm I.D., 5μm, Chiralcel OJ-3 150×4.6mm I.D., 3μm 크로마토그래피 컬럼을 사용하고; 박층 크로마토그래피 실리카겔 플레이트는 Yantai Huanghai HSGF254 또는 Qingdao GF254 실리카겔 플레이트를 사용하고, 박층 크로마토그래피(TLC)는 0.15mm~0.2mm 사양의 실리카겔 플레이트를 사용하며, 박층 크로마토그래피 분리 및 정제 제품은 0.4mm~0.5mm 사양을 사용하였다.
- [0395] 컬럼 크로마토그래피는 일반적으로 Yantai Huanghai 실리카겔 100~200 메쉬, 200~300 메쉬 또는 300~400 메쉬 실리카겔을 담체로 사용하였다.
- [0396] 키랄 제조 컬럼은 DAICEL CHIRALPAK IC(250mm\*30mm, 10 μm) 또는 Phenomenex-Amylose-1(250mm\*30mm, 5 μm)을 사용하였다.
- [0397] CombiFlash 신속 제조 장치는 Combiflash Rf150(TELEDYNE ISCO)을 사용하였다.
- [0398] 키나제의 평균 억제율과 IC<sub>50</sub> 값의 측정은 NovoStar 마이크로플레이트 리더(독일 BMG 회사)를 사용하였다.
- [0399] 본 개시의 알려진 출발 물질은 당업계에 이미 알려진 방법에 따라 합성되거나, ABCR GmbH & Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Shaoyuan Chemical Technology(Accela ChemBio Inc), Darui Chemicals 등 회사로부터 구입할 수 있다.
- [0400] 실시예에서 별도로 설명하지 않는 한, 반응은 모두 아르곤 분위기 또는 질소 분위기 하에서 수행될 수 있다.
- [0401] 아르곤 분위기 또는 질소 분위기는 반응 플라스크에 약 1L 용적의 아르곤 풍선 또는 질소 풍선을 연결하는 것을 가리킨다.
- [0402] 수소 분위기는 반응 플라스크에 약 1L 용적의 수소 풍선을 연결하는 것을 가리킨다.
- [0403] 가압 수소화 반응은 Parr 3916EKX형 수소화 기기 및 Qinglan QL-500형 수소 발생기 또는 HC2-SS형 수소화 기기를 사용하였다.
- [0404] 수소화 반응은 통상적으로 진공으로 만들어 수소를 채우는 조작을 3번 반복하는 것이다.
- [0405] 마이크로파 반응은 CEM Discover-S 908860형 마이크로파 반응기를 사용하였다.
- [0406] 실시예에서 별도로 설명하지 않는 한, 용액은 수용액을 가리킨다.
- [0407] 실시예에서 별도로 설명하지 않는 한, 반응 온도는 실온인 20℃~30℃이다.
- [0408] 실시예에서의 반응 과정은 박층 크로마토그래피(TLC)로 모니터링하며, 반응에 사용되는 현상제, 화합물 정제에 채택한 컬럼 크로마토그래피 용리제 시스템 및 박층 크로마토그래피 현상제 시스템에는 A: 디클로로메탄/메탄올 시스템, B: n-헥산/에틸 아세테이트 시스템, C: 석유 에테르/에틸 아세테이트 시스템, D: 석유 에테르/에틸 아세테이트/메탄올이 포함되며, 용매의 부피 비율은 화합물의 극성에 따라 조절되며, 트리에틸아민 및 아세트산과 같은 소량의 염기성 또는 산성 시제를 첨가하여 조절할 수도 있다.
- [0409] 1.0M 트리스 완충액(Tris buffer) pH=8.30±0.1의 배합:
- [0410] 50mL의 메스플라스크에 tris 6.0g을 칭량하여 넣고, 정제수 40mL를 첨가하고 흔들어 용해시킨 다음, 농염산 1.2mL를 드롭방식으로 첨가하여, pH를 8.30으로 조정한 후 정제수로 부피를 고정하였다.
- [0411] 완충액 A의 배합:
- [0412] 2.0L의 용기에 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(8.50g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(8.56g), NaCl(5.86g) 및 EDTA(1.50g)를 첨가하고, 1.6L의 주사용수를 첨

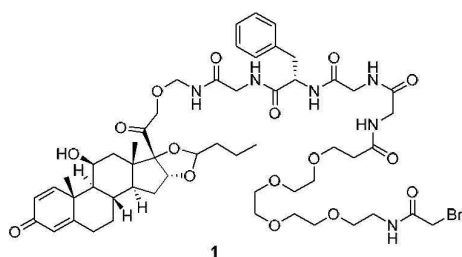
가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨 후 주사용수로 부피를 2.0L로 고정하고, 측정된 pH는  $6.30 \pm 0.1$ 이다.

[0413] 다음 실험에서 사용되는 약어는 다음과 같은 의미를 갖는다:

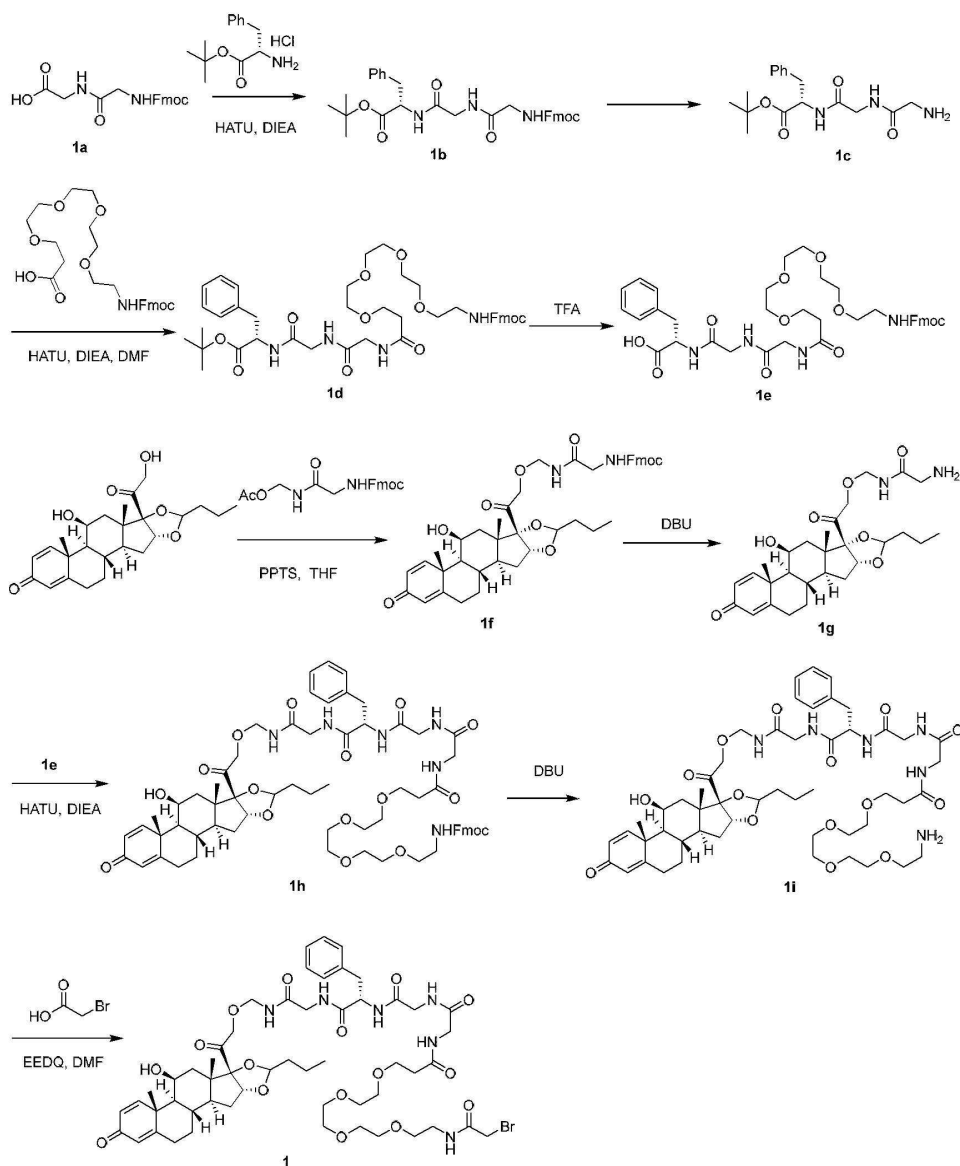
[0414] DAST: 디에틸아민 황 삼불화물; THF: 테트라히드로푸란; NMP: *N*-메틸피롤리돈; DCM: 디클로로메탄; *m*-CPBA: 메타-클로로퍼옥시벤조산; DIEA: *N,N*-디이소프로필에틸아민; TEA: 트리에틸아민; Boc: *tert*-부톡시카르보닐, MeOH: 메탄올; Et<sub>2</sub>O: 디에틸 에터.

[0415] 본 출원에서 25G7 및 7B10 항체의 제조 및 정제 방법은 출원 번호가 W02020038454A1인 특허 문서에 기재되어 있으며, 전술한 출원 문서의 전체 내용은 본 개시에 인용방식으로 포함된다.

[0416] 실시예 1: N-((10*S*)-10-벤질-1-((6*aR*,6*bS*,7*S*,8*aS*,8*bS*,11*aR*,12*aS*,12*bS*)-7-히드록시-6*a*,8*a*-디메틸-4-옥소-10-프로펠-1,2,4,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,11*a*,12,12*a*,12*b*-도데카히드로-8*bH*-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-*d*][1,3]디옥솔-8*b*-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-테트라폴리에틸렌 글리콜-16-일)-1-(2-브로모아세트아미노)-3,6,9,12-테트라옥소펜타데칸-15-아미드(화합물 1)의 제조



[0417]



[0418]

[0419] 단계 1) (((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닌 tert-부틸 에스테르(화합물 1b)의 제조

[0420] 화합물 1a(5.14g, 20.0mmol, 1.0eq)와 L-페닐알라닌 tert-부틸 에스테르 염산염(7.08g, 20.0mmol, 1.0eq)을 250mL의 삼구 플라스크에 넣고 무수 DMF(60mL)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시킨 후, HATU(9.12g, 24.0mmol, 1.2eq)와 DIEA(7.74g, 60.0mmol, 3.0eq)를 첨가하고, 빙수욕에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액에 물을 첨가하고 에틸 아세테이트로 추출한 후, 유기상을 포화 식염수로 세척하고 건조시킨 후, 감압 농축하여 화합물 1b(11.5g, 수율: 100%)을 얻었고, 조생성물은 다음 단계에 직접 투입될 수 있다.

[0421] MS (ESI): m/z 580.3 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0422] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.21-8.16(m, 1H), 8.12-8.05 (m, 1H), 7.91-7.87 (m, 2H), 7.72-7.68 (m, 2H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.44-7.38 (m, 2H), 7.36-7.25 (m, 4H), 7.23-7.18 (m, 3H), 4.41-4.18 (m, 4H), 3.76-3.72 (m, 2H), 3.68-3.61 (m, 2H), 2.98-2.89 (m, 2H), 2.69 (s, 2H), 1.30 (s, 9H).

[0423] 단계 2) 글리실글리실-L-페닐알라닌 tert-부틸 에스테르(화합물 1c)의 제조

[0424] 화합물 1b(5.57g, 10.0mmol, 1.0eq)을 250mL의 삼구 플라스크에 넣고, 무수 DCM(60mL)을 첨가하여 완전히 용해시킨 후 빙수욕에서 냉각시켰다. 피페리딘(8.5g, 100.0mmol, 10.0eq)을 천천히 첨가하고, 첨가 완료 후 실온에서 약 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응액을 직접 농축하여 건조시키고, 조생성물을 컬럼 크로마토그래

피로 정제하여 화합물 **1c**(2.70g, 수율: 81%)를 얻었다.

[0425] MS (ESI):  $m/z$  358.3  $[M+H]^+$ .

[0426] 단계 3) (1-(9H-플루오렌-9-일)-3-옥소-2,7,10,13,16-펜타옥시-4-테트라폴리에틸렌 글리콜-19-옥시)글리실글리실-L-페닐알라닌 tert-부틸 에스테르(화합물 **1d**)의 제조

[0427] 100mL의 삼구 플라스크에 원료 1-(9H-플루오렌-9-일)-3-옥소-2,7,10,13,16-펜타옥소-4-테트라폴리에틸렌 글리콜-19-올레인산(1.0g, 2.05mmol, 1.0eq; Tonglai Biochemical로부터 유래됨) 및 **1c**(0.69g, 2.05mmol, 1.0eq)를 첨가하고, 무수 DMF(25mL)를 첨가하여 완전히 용해시킨 후, 빙수욕에서 냉각시켰다. HATU(1.01g, 2.67mmol, 1.3eq) 및 DIEA(529mg, 4.10mmol, 2.0eq)를 첨가하고, 빙수욕에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 물을 첨가하고 에틸 아세테이트로 추출한 후, 포화 식염수로 세척하고, 건조시킨 후 감압 농축하여 화합물 **1d**(1.60g, 수율: 97%)를 얻었다.

[0428] MS (ESI):  $m/z$  805.3  $[M+H]^+$ .

[0429] 단계 4) (1-(9H-플루오렌-9-일)-3-옥소-2,7,10,13,16-펜타옥시-4-테트라폴리에틸렌 글리콜-19-옥시)글리실글리실-L-페닐알라닌(화합물 **1e**)의 제조

[0430] 100mL의 일구 플라스크에 화합물 **1d**(1.60g, 1.99mmol, 1.0eq)를 첨가하고, 무수 디클로로메탄(16mL)을 첨가하여 용해시켰다. 실온에서 트리플루오로아세트산(8mL)을 첨가하고, 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응액을 직접 농축하여 건조시키고, 에틸 아세테이트를 첨가하여 용해시키고 포화 식염수로 세척하고 건조시킨 후 감압 농축하여 화합물 **1e**(1.23g, 수율: 83%)을 얻었다.

[0431] MS (ESI):  $m/z$  749.3  $[M+H]^+$ .

[0432] 단계 5) (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-(((2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에톡시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)카르바메이트(화합물 **1f**)의 제조

[0433] 100mL의 삼구 플라스크에 원료 부테소니드(1.29g, 3.0mmol, 1.0eq) 및 (2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미노)아세테이트 메틸 에스테르(1.16g, 3.15mmol, 1.0eq; 문헌 "Tetrahedron, 2018, 74(15), 1951-1956"의 제조 방법을 참조) 및 피리디늄 p-톨루엔설포산염(75mg, 0.30mmol, 0.1eq)를 첨가하였다. 실온에서 무수 테트라히드로푸란(20mL)을 첨가하고, 4시간 동안 환류 가열하면서 반응시켰다. 반응액을 직접 농축하여 건조시키고, 조생성물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 **1f**(0.54g, 수율: 24%)를 얻었다.

[0434] MS (ESI):  $m/z$  739.4  $[M+H]^+$ .

[0435]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.76-8.69 (m, 1H), 7.91-7.84 (m, 2H), 7.73-7.67 (m, 2H), 7.63-7.57 (m, 1H), 7.43-7.58 (m, 2H), 7.35-7.23 (m, 3H), 6.13 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 5.15-4.97 (m, 1H), 4.73-4.45 (m, 5H), 4.30-4.09 (m, 5H), 3.65-3.59 (m, 2H), 2.29-2.21 (m, 1H), 2.11-1.87 (m, 2H), 1.74-1.21 (m, 11H), 1.09-0.77 (m, 8H).

[0436] 단계 6) 2-아미노-N-((2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에톡시)메틸)아세트아미드(화합물 **1g**)의 제조

[0437] 25mL의 일구 플라스크에 화합물 **1f**(540mg, 0.73mmol, 1.0eq)를 넣고, 무수 디클로로메탄(10mL)을 첨가하여 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시키고, DBU(167mg, 1.10mmol, 1.5eq)를 첨가하고 30분 동안 교반하면서 반응시켰다. 물을 첨가하여 분액한 후, 수상을 디클로로메탄으로 2회 추출하고, 포화 식염수로 세척한 다음, 감압 농축하여 화합물 **1g**(450mg, 수율: 100%)를 얻었고, 조생성물은 다음 단계 반응에 직접 사용될 수 있다.

[0438] MS (ESI):  $m/z$  517.4  $[M+H]^+$ .

[0439] 단계 7) (9H-플루오렌-9-일)메틸((10S)-10-벤질-1-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-

d][1,3]디옥솔-8b-일)-1,6,9,12,15,18-헥사옥소-3,21,24,27,30-펜타옥소-5,8,11,14,17-펜타아미노트리아콘탄-32-일)카르바메이트(화합물 1h)의 제조

[0440] 100mL의 삼구 플라스크에 화합물 1g(0.45g의 조생성물, 0.73mmol로 환산, 1.0eq) 및 1e(0.55g, 0.73mmol, 1.0eq)를 넣고, 무수 DMF(9mL)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시키고, HATU(361mg, 0.95mmol, 1.3eq) 및 DIEA(189mg, 1.46mmol, 2.0eq)를 순차적으로 첨가하고 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응액에 물을 첨가하고, 디클로로메탄으로 2회 추출하고, 유기상을 합하여 포화 식염수로 1회 세척하고, 건조시키고 감압 농축하여 조생성물을 얻었다. 조생성물을 석유 에테르와 에틸 아세테이트의 혼합 용매에서 슬러리화하고 정제하여 화합물 1h(710mg, 수율: 78%)를 얻었다.

[0441] MS (ESI): m/z 1269.7 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0442] 단계 8) 1-아미노-N-((10S)-10-벤질-1-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3] 디옥솔-8b-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-폴리테트라에틸렌 글리콜-16-일-3,6,9,12-테트라옥소펜타데칸-15-아미드(화합물 1i)의 제조

[0443] 25mL의 일구 플라스크에 화합물 1h(350mg, 0.28mmol, 1.0eq)를 넣고, 무수 디클로로메탄(10mL)을 첨가하여 완전히 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시키고, DBU(64mg, 0.42mmol, 1.5eq)를 첨가하고 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응액을 직접 농축하여 건조시키고, 조생성물을 얻었고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 1i(289mg, 수율: 89%)를 얻었다.

[0444] MS (ESI): m/z 1025.6 [M+H]<sup>+</sup>.

[0445] 단계 9) N-((10S)-10-벤질-1-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-테트라폴리에틸렌 글리콜-16-일)-1-(2-브로모아세트아미노)-3,6,9,12-테트라옥소펜타데칸-15-아미드(화합물 1)의 제조

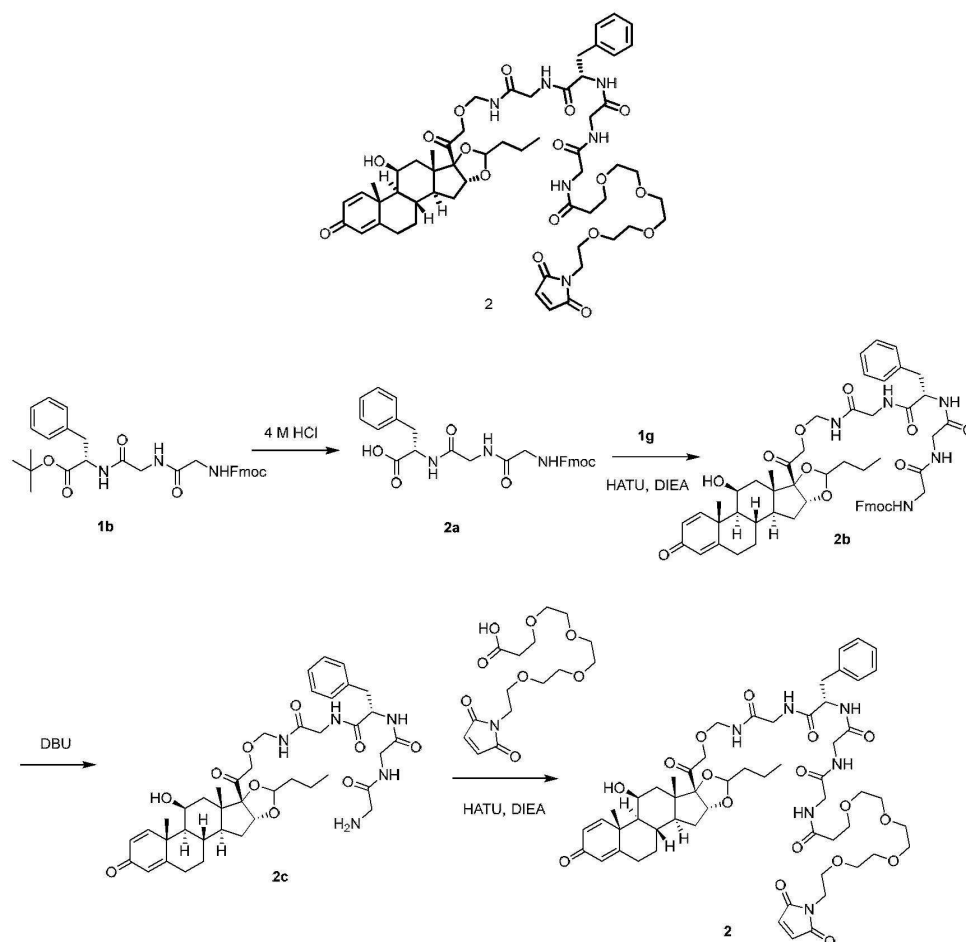
[0446] 25mL의 Schlenk-Tube에 브로모아세트산 고체(35.2mg, 0.127mmol, 1.0eq) 및 EEDQ(63mg, 0.25mmol, 2.0eq)를 넣고 무수 DMF(5mL)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 화합물 1i(130mg, 0.127mmol, 1.0eq)를 DMF(2mL)에 용해시키고, 이 용액을 상술한 제조된 활성 에스테르 용액에 드롭 방식으로 첨가하고, 첨가 완료 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 시스템에 물을 첨가하고 에틸 아세테이트로 2회 추출한 후, 유기상을 합하고 포화 식염수로 세척하여, 건조시키고 감압 농축하여 조생성물을 얻었고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 1(39mg, 수율: 27%)을 얻었다.

[0447] MS (ESI): m/z 1145.5/1147.6 [M+1]<sup>+</sup>.

[0448] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.62-8.57 (m, 1H), 8.34-8.28 (m, 2H), 8.19-8.11(m, 2H), 8.03-7.99(m, 1H), 7.30-7.17(m, 6H), 6.15 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.18-5.03 (m, 1H), 4.72-4.47 (m, 5H), 4.29-4.15 (m, 2H), 3.78-3.42 (m, 27H), 3.27-3.21 (m, 2H), 3.06-2.84 (m, 2H), 2.41-2.28 (m, 3H), 2.06-1.73 (m, 2H), 1.60-1.24 (m, 10H), 1.01-0.82 (m, 8H).

[0449] 실시예2:

[0450] N-((10S)-10-벤질-1-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-테트라폴리에틸렌 글리콜-16-일)-1-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-3,6,9,12-테트라옥소펜타데칸-15-아미드



**단계 1) (((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닌(화합물 2a)의 제조**

100mL의 일구 플라스크에 화합물 **1b**(1.50g, 2.69mmol, 1.0eq)를 넣고, 4M HCl의 1,4-디옥산 용액(20mL)을 첨가하여 용해시켰다. 실온에서 원료 **1b**의 반응이 완료될 때까지 4시간 동안 교반하였다. 반응액을 직접 농축하여 건조시키고, 화합물 **1a**(1.34g, 수율: 100%)를 얻었다.

MS (ESI):  $m/z$  502.3  $[M+1]^+$

**단계 2) (9H-플루오렌-9-일)메틸-((10S)-10-벤질-1-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-테트라플리에틸렌 글리콜-16-일)카르바메이트(화합물 2b)의 제조**

화합물 **2a**(0.97g, 1.63mmol, 1.0eq) 및 **1g**(1.0g, 1.95mmol, 1.2eq)를 100mL의 삼구 플라스크에 넣었다. DMF(20mL)를 첨가하고 빙수욕에서 냉각시켰다. HATU(927mg, 2.44mmol, 1.5eq) 및 DIEA(420mg, 3.26mmol, 2.0eq)를 순차적으로 첨가한 후 빙수욕에서 1~2시간 동안 반응시켰다. 반응액을 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 **2b**(860mg, 수율: 53%)를 얻었다.

MS (ESI):  $m/z$  1000.5  $[M+1]^+$

**단계 3) (2S)-2-(2-(2-아미노아세트아미노)아세트아미노-N-(2-(((2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,**

**11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,**

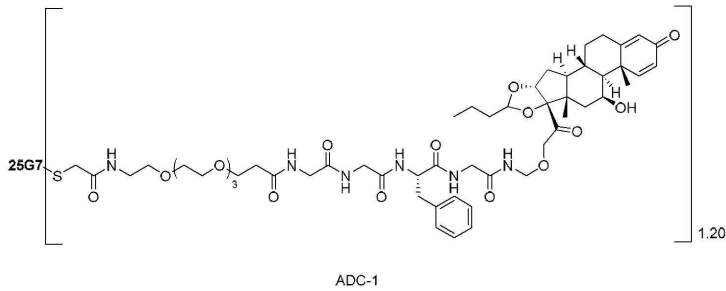
**12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에톡시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)-3-페닐프로판아미드(화합물 2c)의 제조**

25mL의 일구 플라스크에 화합물 **2b**(860mg, 0.86mmol, 1.0eq)를 넣고, 무수 DMF(10mL)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시키고, DBU(196mg, 1.29mmol, 1.5eq)를 첨가하고 30분 동안 교반하면서 반응시켰다.

반응액을 직접 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 **2c**(485mg, 수율: 72%)를 얻었다.

- [0462] MS (ESI):  $m/z$  778.4  $[M+1]^+$
- [0463] 단계 4) *N*-((10*S*)-10-벤질-1-((6*aR*,6*bS*,7*S*,8*aS*,8*bS*,11*aR*,12*aS*,12*bS*)-7-히드록시-6*a*,8*a*-디메틸-4-옥소-10-프로필-1,2,4,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,11*a*,12,12*a*,12*b*-도데카히드로-8*bH*-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-*d*][1,3]디옥솔-8*b*-일)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥소-5,8,11,14-테트라폴리에틸렌 글리콜-16-일)-1-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)-3,6,9,12-테트라옥소펜타데칸-15-아미드(화합물 **2d**)의 제조
- [0464] 100mL의 삼구 플라스크에 화합물 **2c**(480mg, 0.62mmol, 1.0eq) 및 1-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)-3,6,9,12-테트라옥시글루타르산-15-올레인산(213mg, 0.62mmol, 1.0eq; Tonlai Biochemical으로부터 유래됨)을 넣고, 무수 DMF(10mL)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 빙수욕에서 냉각시키고, HATU(352mg, 0.93mmol, 1.5eq) 및 DIEA(159mg, 1.23mmol, 2.0eq)를 순차적으로 첨가하고 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응액을 직접 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 **2d**(360mg, 수율: 53%)를 얻었다.
- [0465] MS (ESI):  $m/z$  1105.6  $[M+1]^+$
- [0466]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.61-8.56 (m, 1H), 8.32-8.26 (m, 1H), 8.22-8.13 (m, 2H), 8.03-7.96(m, 1H), 7.39-7.20(m, 6H), 7.02 (s, 2H), 6.17-6.13 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.16-4.99 (m, 1H), 4.76-4.40 (m, 6H), 4.29-4.16 (m, 2H), 3.64-3.19 (m, 26H), 3.09-3.02 (m, 1H), 2.86-2.79 (m, 1H), 2.41-2.26 (m, 3H), 2.12-1.90 (m, 2H), 1.78-1.25 (m, 10H), 1.03-0.83 (m, 8H).
- [0467] 실시예 3: 25G7-Fab 단백질의 제조 공정
- [0468] 합성된 항체의 유전자 서열을 pcDNA3.4 담체에 서브 클로닝하였다. 연결 생성물을 Top10 컴피턴트 세포로 형질 전환시키고, 양성 클론을 선별하여 확대 배양하였다. 클론을 배지에 접종하여 확대 배양하고, 25G7-Fab 항체의 DNA 서열을 포함하는 플라스미드를 대량으로 추출하였다. 리소솜 형질감염을 사용하여, 발현 플라스미드를 형질 감염 시체에 혼합한 후 Expi 293 세포에 첨가하고, 항온 인큐베이터에서 5일 동안 배양한 후 세포 배양물을 얻었다. 세포 배양물을 원심분리한 후 상청액을 취하고, 여과하여 세포 잔해를 제거하고, 투명한 용액을 수집하였다. 카파 선택(kappa select) 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 표적 단백질을 포획하였다. 표적 단백질을 여과하고, Nanodrop으로 A280 흡광도 값을 측정하여 흡광계수로 나누어 단백질 농도를 얻었고, 부피를 곱하여 최종 수율을 결정하고, 겔전기영동 및 부피 배제 크로마토그래피를 통해 단백질에 대한 SDS-PAGE, SEC-HPLC 및 내독소 검출을 수행하여 최종 생성물 25G7-Fab를 얻었다.
- [0469] 실시예 4: AZD1402-TAG 단백질의 제조 공정
- [0470] AZD1402-TAG(단백질 서열은 특허 WO2020200960A1의 SEQ ID NO: 1로부터 유래하고, 단백질 제조와 정제를 용이하게 하기 위해 해당 서열의 C 단에 His tag를 융합시켜 최종적으로 AZD1402-TAG로 명명하였다.)
- [0471] AZD1402-TAG
- [0472] ASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRVYNSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQRKGRWQKYKLVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFHSEGLCPGQPVPGVWLVRDPKNNLEALEDFEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPGSDHHHHHH
- [0473] SEQ ID NO: 52
- [0474] 상술한 단백질의 코딩 유전자 서열을 합성하고 pcDNA3.4에 서브 클로닝하였다. 발현 플라스미드를 형질감염 시체에 혼합한 후, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하고, 혼합 용액을 HEK293 세포액에 드롭방식으로 첨가하고 37°C에서 1주일 동안 세포액을 진탕 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하여 상청액을 취하였다. 이미다졸이 없는 완충액을 사용하여 니켈 친화력 크로마토그래피 컬럼을 평형화한 후, 단백질 샘플을 니켈 친화력 크로마토그래피 컬럼을 통과시켜 로딩하고, 이미다졸이 없는 완충액을 사용하여 다시 평형화한 후 고농도의 이미다졸이 포함된 완충액으로 컬럼에 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질을 투석백에 옮겨 1×PBS로 투석하여 PBS 저장 완충액으로 치환하였다. 검출을 통해 표적 단백질을 얻었다.

[0475] 실시예 5: 항체-약물 접합체 ADC-1의 제조



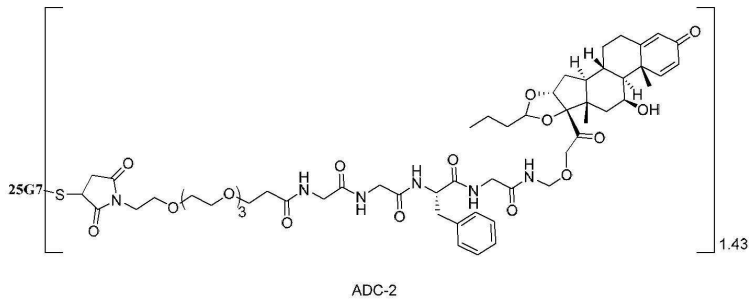
[0476]

[0477] Buffer A의 배합: 2.0L의 용기에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (8.50g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (8.56g),  $\text{NaCl}$ (5.86g) 및  $\text{EDTA}$ (1.50g)를 첨가하고, 1.6L의 주사용수를 첨가하고 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨 후, 주사용수로부피를 2.0L로 정하고, 측정된 pH는  $6.30 \pm 0.1$ 이다.

[0478]  $37^\circ\text{C}$ 에서, 항체 25G7-Fab(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 50에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같음)의 buffer A 완충 수용액(pH=6.3인 0.05M의 완충 수용액; 10.0mg/mL, 0.5mL, 0.125mmol)에 배합된 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)의 수용액(2.5mM, 100.0uL, 0.250mmol)을 첨가하고 수욕 진탕기에 놓고  $37^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 흔들면서 반응시키고, 반응을 종료시켰다. 수욕을 통해 반응액의 온도를  $25^\circ\text{C}$ 로 낮추었다.

[0479] 상술한 반응액에 1.0M의 Tris buffer(50uL)를 첨가하여, 화합물 1(1.43mg, 1.250mmol)을 25uL의 DMSO에 용해시키고, 상술한 반응액에 첨가하고, 수욕 진탕기에 놓고  $25^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 흔들면서 반응시키고, 반응을 종료시켰다. 반응액을 Sephadex G25 겔 컬럼으로 탈염 정제하고(용출상: buffer A), 한외여과관으로 농축하여 표제 생성물 ADC-1의 buffer A 완충액(6.06mg/mL, 0.60mL)을 얻었고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

[0480] 실시예 6: 항체-약물 접합체 ADC-2의 제조



[0481]

[0482]  $37^\circ\text{C}$ 에서 항체 25G7-Fab의 buffer A 완충 수용액(pH=6.3인 0.05M의 완충 수용액; 10.0mg/mL, 6.0mL, 1.50mmol)에 배합된 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)의 수용액(10.0mM, 1.50mL, 15.0mmol)을 첨가하고, 수욕 진탕기에 놓고  $37^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 흔들면서 반응시키고, 반응을 종료시켰다. 수욕을 통해 반응액의 온도를  $25^\circ\text{C}$ 로 낮추었다.

[0483] 화합물 2(12.2mg, 12.0nmol)를 300  $\mu\text{L}$ 의 DMSO에 용해시키고, 상술한 반응액에 첨가하여 수욕 진탕기에 놓고  $25^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 흔들면서 반응시키고, 반응을 종료시켰다. 반응액을 Sephadex G25 겔 컬럼으로 탈염 정제하고(용출상: buffer A), 한외여과관으로 농축하여 표제 생성물 ADC-2의 buffer A 완충액(3.65mg/mL, 12.8mL)을 얻었고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

[0484] 생물학적 평가

[0485] 본 개시는 시험예를 결부하여 아래에 추가로 설명될 것이나, 이러한 실시예는 본 개시의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0486] 시험예 1: 항체-약물 접합체 ADC-2와 인간화 IL-4R $\alpha$  단백질의 친화력 검출

[0487] 1. 시험 단백질

[0488] 항체-약물 접합체 ADC-2, 25G7-Fab, AZD1402-TAG

[0489] 2. 실험 방법

[0490] 표면 플라즈몬 공명 기술(surface plasmon resonance, SPR)을 사용하여 항체-약물 접합체 ADC-2, 25G7-Fab 및 AZD1402-TAG와 인간화 IL-4R $\alpha$  항원 단백질의 친화력을 검출하였다. SA 센서 칩(Cytiva)을 Biacore 8K(Cytiva)에 넣고, Biotin 표지된 인간화 IL-4R $\alpha$  단백질(SinoBiological, CAT# 10402-H08H-B)이 SA 센서 칩에 포획되고, 이동상은 HBS-EP+ 완충액(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20)을 사용하였다. 각 시험 단백질은 HBS-EP+ 완충액으로 2배 구배 희석하여 분석물질로 주입하였으며, 유속을 30  $\mu$ L/min으로, ADC-2, 25G7-Fab 및 AZD1402-TAG의 검출 시간을 결합은 100초, 해리는 600초로 설정하였다. Biacore 8K 평가 소프트웨어(Cytiva)를 사용하여 분석하고 각 시험 단백질의 친화력 데이터를 얻었다.

[0491] 3. 실험 결과

표 1. 인간화 IL-4R $\alpha$  단백질에 결합하는 시험 단백질의 친화력 KD 값

| 단백질<br>포획       | 시험 단백질      | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (pM) |
|-----------------|-------------|------------|------------|---------|
| hIL-4R $\alpha$ | ADC-2       | 8.78E+06   | 9.62E-05   | 11.0    |
|                 | 25G7-Fab    | 4.69E+06   | 2.06E-04   | 43.9    |
|                 | AZD1402-TAG | 4.77E+06   | 1.02E-04   | 21.3    |

[0492]

[0493] 결과는 표 1에 나타난 바와 같이, 인간화 IL-4R $\alpha$  항원 단백질에 결합하는 ADC-2의 KD 값은 11.0pM으로 AZD1402-TAG 및 25G7-Fab에 비해 약간 우수한 것으로 나타났다.

[0494] **시험예 2: 인간화 IL-4R $\alpha$  발현 세포에 대한 항체-약물 접합체 ADC-2의 전체 세포 결합 활성**

[0495] 1. 시험 단백질

[0496] 항체-약물 접합체는 ADC-2, 25G7-Fab, hu25G7(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 44에 제시된 바와 같고, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 45에 제시된 바와 같음), AZD1402-TAG이다.

[0497] 2. 실험 방법

[0498] TF-1 및 Karpas 299 세포주는 IL-4R $\alpha$ 를 발현하는 것으로 확인되었다. 대수 생장기에 있는 TF-1 및 Karpas299 세포를 수집한 후, 세포 밀도를 계수하고 조절하여 둥근 바닥 96웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  세포/웰로 플레이팅하였다. 세포를 다양한 농도의 항IL-4R 항체(25G7, 네이키드 항체 25G7-Fab), 항체-약물 접합체 ADC-2 및 AZD1402-TAG와 함께 4° C에서 45분 동안 인큐베이션하고, FACS Buffer(2%의 FBS를 함유한 PBS)로 세척하여 항체를 제거한 후, 염색을 위해 형광 표지된 2차 항체를 첨가하고, 25G7-Fab, hu25G7 및 ADC-2는 FITC에 결합된 항인간 IgG(Fab 특이성) 2차 항체(Sigma, CAT#F5512-1ML)를 사용하였고, AZD1402-TAG는 FITC에 결합된 항-His 항체(GenScript, CAT#A01620)를 사용하였다. 세포를 4° C 조건에서 2차 항체와 함께 30분 동안 인큐베이션한 후, FACS Buffer로 2회 세척하고, 유세포 분석기(BD, FACS Celesta)로 검출하였으며, 검출 결과는 FlowJo(FlowJo, LLC) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0499] 3. 실험 결과

표 2. 인간화 IL-4R $\alpha$  발현 세포에 대한 시험 단백질의 전체 세포 결합 활성 EC<sub>50</sub> 값

| 시험 단백질                      | ADC-2          | 25G7-Fab | hu25G7 | AZD1402-TAG   |
|-----------------------------|----------------|----------|--------|---------------|
| 2차 항체 검출                    | Anti-hFab-FITC |          |        | Anti-His-FITC |
| EC <sub>50</sub> (nM, TF-1) | 0.107          | 0.243    | 0.247  | 0.0124        |

[0500]

[0501] 결과는 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, TF-1 세포에 결합된 ADC-2의 EC<sub>50</sub> 값은 0.107nM으로, 네이키드 항체 25G7-Fab과 hu25G7와 상당한 것으로 나타났다. AZD1402-TAG는 TF-1 세포에 강력한 결합 효과가 있지만, 검출 항

체가 다르기 때문에 테이터를 ADC-2, 25G7-Fab 등과 비교할 수 없었다.

### [0502] 시험예 3: IL-4/IL-13 신호 전달 경로에 대한 항체-약물 접합체 ADC-2의 차단 효과

#### [0503] 1. 시험 단백질

[0504] 항체-약물 접합체는 ADC-2 및 25G7-Fab이다.

#### [0505] 2. 실험 방법

[0506] STAT6의 활성화는 IL-4/IL-13 신호 전달 경로를 활성화하는 중요한 단계이다. 본 실시예에서, HEK-Blue™ IL-4/IL-13 리포터 유전자 세포주를 사용하여 IL-4/IL-13 신호 전달 경로에 대한 ADC-2의 차단 효과를 평가하였다. Invivogen(Cat#hkb-il413)에서 구입한 해당 세포는 인간화 STAT6 유전자와 인산화된 STAT6에 의해 유도된 분비형 알칼리성 포스파타제 리포터 유전자(SEAP)를 과발현하였으며, SEAP 기질 QUANTI-Blue를 사용하여 세포 배양 상청액에서 분비된 SEAP의 함량을 검출하여 IL-4/IL-13 신호 전달 경로의 활성화 수준을 평가할 수 있다.

[0507] 대수 성장기에 있는 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 세포를 수집한 후, 밀도를  $5 \times 10^5$  세포/mL로 조절하고, 96웰 평면 바닥 배양 플레이트에 웰당 100  $\mu$ L를 첨가하고, 37° C에서 5%의 CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 20  $\mu$ L의 구배 희석된 시험 단백질과 20  $\mu$ L의 재조합 인간 IL-4 또는 IL-13을 각 웰에 첨가하고, 세포 배양 플레이트를 37° C에서, 5%의 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 놓고 20-24시간 동안 계속 인큐베이션하였다. 배양이 완료된 후, 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 각 웰에서 세포 배양 상청액 20  $\mu$ L를 흡출하여 다른 96웰 플레이트로 옮기고, 37° C로 예열된 QUANTI-Blue 발색 용액을 180  $\mu$ L/웰로 첨가하고, 37° C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 620nm 파장에서 광흡수 값을 검출하였다.

#### [0508] 3. 실험 결과

표 3. 시험 단백질이 IL-4/IL-13 신호 전달 경로를 차단하는 IC<sub>50</sub> 값

| 시험 단백질                                         | ADC-2 | 25G7-Fab |
|------------------------------------------------|-------|----------|
| IL-4 신호 전달 경로를 차단하는<br>IC <sub>50</sub> 값(nM)  | 0.68  | 0.61     |
| IL-13 신호 전달 경로를 차단하는<br>IC <sub>50</sub> 값(nM) | 10.60 | 14.59    |

[0509] 결과는 도 2 및 표 3에 나타난 바와 같이, 각 시험 단백질은 모두 재조합 인간 IL-4 및 IL-13에 의해 유도된 STAT6의 활성화를 차단하는 효과가 있고, IL-4 신호 전달 경로를 차단하는 ADC-2의 IC<sub>50</sub> 값은 0.68nM로, 25G7-Fab의 IC<sub>50</sub> 값 0.61nM에 근접하였으며; IL-13 신호 전달 경로를 차단하는 ADC-2의 IC<sub>50</sub> 값은 10.60nM로, 25G7-Fab의 IC<sub>50</sub> 값 14.59nM과 상당하였다.

### [0511] 시험예 4: TF-1 세포에서 항체-약물 접합체 ADC-2의 세포내이입 활성

#### [0512] 1. 시험 단백질

[0513] 항체-약물 접합체는 ADC-2, 25G7-Fab, hu25G7, AZD1402-TAG이다.

#### [0514] 2. 실험 방법

[0515] 성장 상태가 양호한 TF-1 세포를 수집한 후, 밀도를  $1 \times 10^6$  세포/mL로 조절하여, 96웰 세포 배양 플레이트에 100  $\mu$ L/웰로 첨가하고, 4° C에 놓고 최종 농도가 2nM인 각 시험 단백질을 첨가하고, 4° C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세포 인큐베이터에 놓고, 4° C에서 5%의 CO<sub>2</sub> 조건에서 계속 배양하고, 각 시점마다 한 지점에 배양 플레이트를 설치하고, 인큐베이션 시간에 따라 배양 플레이트를 꺼내 FACS buffer로 세척하고 원심분리한 후 형광표지된 2차 항체를 첨가하여 인큐베이션하였다. 25G7-Fab, hu25G7 및 ADC-2는 FITC에 결합된 항인간 IgG(Fab-특이성) 2차 항체를 사용하여 표지하였고, AZD1402-TAG는 FITC에 결합된 항-His 항체를 사용하여 표지하였다.

세포를 4℃ 조건에서 2차 항체와 함께 30분 동안 인큐베이션한 후, FACS Buffer로 2회 세척하고, 유세포 분석기 (BD, FACS Celesta)로 검출하였으며, 검출 결과는 FlowJo(FlowJo, LLC) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 특정 시점에서 세포내이입을 계산 공식은 다음과 같다:

$$(\text{gMFI}_{\text{X시점에서의 시험 Ab}} - \text{gMFI}_{\text{X시점에서의 ISO Ab}}) / (\text{gMFI}_{\text{영점에서의 시험 Ab}} - \text{gMFI}_{\text{영점에서의 ISO Ab}}) * 100\%$$

### 3. 실험 결과

실험 결과는 도 3에 나타난 바와 같이, TF-1 세포에서 각 시험 단백질은 세포내이입 신호를 모두 검출할 수 있는 것으로 나타났다. ADC-2와 hu25G7의 세포내이입 활성은 상당하며, 3시간 내 세포내이입율은 약 70%이며; 25G7-Fab의 세포내이입 작용이 더 빠르고, 세포내이입율도 더 높았다. AZD1402-TAG에 비해 ADC-2, 25G7-Fab 및 hu25G7의 세포내이입 속도 및 세포내이입율은 모두 AZD1402-TAG보다 현저히 우수하였으며, 약 2시간에 플랫폼에 도달하였고, ADC-2의 세포내이입 활성은 25G7-Fab보다 좀 약하였다.

### 시험예 5: 마우스 모델을 이용한 항체-약물 접합체 ADC-2의 약동학적 시험

#### 1. 시험 단백질

항체-약물 접합체 ADC-2

#### 2. 실험 방법

##### 2.1 실험 동물

C57BL6/J 마우스, 8 주령, 수컷, Saiye(Suzhou) Biotechnology Co., Ltd.

##### 2.2 마우스 투약 작업

마우스에게 기관내 에어로졸 투약(intratracheal, i.t.)을 실시하고, 투약한 후 다른 시점에서 300~400 μL의 하악 혈액을 채취하고, 2시간 동안 방치한 후, 4℃에서 7500rpm으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 채혈한 후 마우스를 마취시켜 고정시킨 후, 마우스의 목 근육을 둔성 분리하여 기관을 노출시킨 후, 기관을 측면으로 개방하고 세척 침을 천천히 삽입하여 미리 추출하여 포장된 4℃의 미리 냉각된 생리 식염수를 폐 조직에 천천히 주입하여 세척하고 폐포 세척액(BALF)을 수집하였다. 총 3회 세척하며, 처음 두 번은 각각 300 μL의 생리 식염수, 세 번째는 400 μL의 생리 식염수를 사용하여 세척하였다. 수집된 폐포 세척액을 1000rpm으로, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 마우스를 안락사시킨 후 마우스 가슴을 절개하여 온전한 마우스 폐 조직을 분리하여 수집하고, PBS로 폐 조직 표면의 핏자국을 씻어내고 종이 타월로 PBS에 담근 표면을 건조시킨 후, 폐 조직의 무게를 측정하였다. 폐 조직을 2mL의 원심분리 튜브에 넣고 1mL의 세포 용해액(CST, #9803)을 첨가하고, 균질화기(Shanghai Jing Xin, TissueLyser-48)로 60Hz에서 2분 동안 연마한 후 10,000×g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하며, 상청액이 바로 폐 조직의 균질액이며, 균질액의 단백질 농도를 검출하였다(Pierce, 23227). 혈청, BALF 및 폐 조직 균질액을 -80℃에서 보관하였다. 투약 방안은 표 4를 참조하고, 샘플링 방안은 표 5를 참조한다.

표 4. 투약 방안

| 군별     | 동물 수(마리) | 시험 단백질 | 용량( $\mu\text{g}$ ) | 투약 경로 | 투약 빈도 |
|--------|----------|--------|---------------------|-------|-------|
| ADC-2군 | 15       | ADC-2  | 100                 | i.t.  | 1회    |

표 5. 샘플링 방안

| 투약 후 시간                                           |         |         |            |            |                     |            |
|---------------------------------------------------|---------|---------|------------|------------|---------------------|------------|
| 5 min                                             | 1 h     | 6 h     | 24 h       | 48 h       | Pre-dose            | 30 min     |
| 동물 번호                                             |         |         |            |            |                     |            |
| 1, 2, 3                                           | 4, 5, 6 | 7, 8, 9 | 10, 11, 12 | 13, 14, 15 | 10, 11, 12          | 13, 14, 15 |
| 해당 시점에서 먼저 혈청을 수집하고, 동물을 죽인 후 BALF 및 폐 조직을 수집하였다. |         |         |            |            | 해당 시점에서는 혈청만 수집하였다. |            |

[0527]

[0528]

### 2.3 ADC-2의 함량 검출

[0529]

(1) 코팅: 항원 hIL-4R $\alpha$ 를 탄산염 완충액으로 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Acro, ILR-H5221)로 희석하고 ELISA 플레이트의 각 웰에 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고, 4° C에서 밤새 동안(16~18시간) 인큐베이션하였다.

[0530]

(2) 플레이트 세척: ELISA 플레이트를 실온으로 회복시키고 각 웰에 300  $\mu\text{L}$ 의 0.05%의 PBST(PBS+0.05% Tween20) 완충액을 첨가하여, 플레이트를 총 3회 세척하였다.

[0531]

(3) 블로킹: 각 웰에 300  $\mu\text{L}$ 의 3%의 BSA가 포함된 PBS를 첨가하고 실온에서 플레이트를 400rpm으로 흔들면서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0532]

(4) 플레이트 세척: 각 웰에 300  $\mu\text{L}$ 의 0.05%의 PBST를 첨가하고 플레이트를 3회 세척하였다.

[0533]

(5) 샘플 인큐베이션: 100  $\mu\text{L}$ 의 희석된 혈청, BALF 또는 폐 조직 균질액을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 실온에서 400rpm으로 플레이트를 흔들면서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다.

[0534]

(6) 플레이트 세척: 각 웰에 300  $\mu\text{L}$ 의 0.05%의 PBST를 첨가하고 플레이트를 3회 세척하였다.

[0535]

(7) 검출: 검출할 항체(Invitrogen, A18811)를 Assay buffer(0.5%의 BSA를 포함한 0.05%의 PBST)로 10000배로 희석한 후, ELISA 플레이트에 각 웰에 100  $\mu\text{L}$  첨가하고, 실온에서 플레이트를 400rpm으로 흔들면서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0536]

(8) 플레이트 세척: 각 웰에 300  $\mu\text{L}$ 의 0.05%의 PBST를 첨가하고 플레이트를 3회 세척하였다.

[0537]

(9) 발색: 각 웰에 100  $\mu\text{L}$ 의 TMB 기질(Sera care, 5120-0080)을 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다.

[0538]

(10) 종결: 각 웰에 100  $\mu\text{L}$ 의 기질 반응 정지 용액(Solarbio, C1058)을 첨가하고, 620nm 파장에서 광흡수 값을 검출하였다.

[0539]

### 2.4 유리 Budesonide의 함량 검출

[0540]

30  $\mu\text{L}$ 의 혈청, BALF 또는 폐 조직 균질액을 취하여 30.0  $\mu\text{L}$ 의 내부 표준 작업 용액(5.00ng/mL 부테소니드-D8) 및 120  $\mu\text{L}$ 의 아세토니트릴을 첨가하고, 1분 동안 와류하고, 13,000rpm, 4° C에서 5분 동안 원심분리하여 상청액 100  $\mu\text{L}$ 를 취하여 96웰 플레이트에 넣고, 100  $\mu\text{L}$ 의 0.3%의 FA 희석액을 첨가하고, 실온에서 플레이트를 1,000rpm으로 흔들면서 15분 동안 인큐베이션한 후, 20  $\mu\text{L}$ 를 취하여 LC-MS/MS 분석을 수행하였다(Shimadzu 액체 크로마토그래피 시스템; AB Sciex, Triple Quad 6500<sup>+</sup> 형 삼중 사중극자 탠덤 질량 분석기, 일본 Shimadzu).

[0541]

### 3. 실험 결과

[0542] 항체-약물 접합체 ADC-2 및 유리 Budesonide의 약동학적 파라미터는 표 6에 나타난 바와 같고, 약물 시간 곡선은 도 4에 도시된 바와 같다.

표 6. ADC-2 및 유리 Budesonide의 PK 파라미터

| 약동학적 파라미터                                     | ADC-2 |        |        | 유리 Budesonide |       |       |
|-----------------------------------------------|-------|--------|--------|---------------|-------|-------|
|                                               | 혈청    | BALF   | 폐 조직   | 혈청            | BALF  | 폐 조직  |
| 약물 피크 농도<br>(C <sub>최대</sub> , ng/mL)         | 2427  | 31377  | 7293   | 0.7           | 1.1   | 1.88  |
| 약물 피크 시간<br>(T <sub>최대</sub> , h)             | 1.0   | 1.0    | 1.0    | 1.0           | 0.083 | 6.0   |
| 약물 시간 곡선 면적<br>(AUC <sub>마지막</sub> , ng/mL·h) | 28526 | 451418 | 133942 | 3.43          | 0.046 | 53.72 |
| 반감기(T <sub>1/2</sub> , h)                     | 9.4   | 13.8   | 10.7   | /             | /     | /     |
| 제거율(CL, g/h)                                  | 3.41  | 0.20   | 0.72   | /             | /     | /     |
| 겉보기 분포 용적(V <sub>z</sub> , g)                 | 46.46 | 4.06   | 11.17  | /             | /     | /     |

[0543]

[0544] 실험 결과, 항체-약물 접합체 ADC-2를 기관 내에 투약한 후, 약물은 주로 혈청과 BALF에 분포되고 혈청 노출량이 낮은 것으로 나타났다. 각 조직에서 Budesonide의 노출량은 모두 낮았다.

[0545] **시험예 6:** OVA에 의해 유발된 마우스 천식 모델에서 ADC-2의 생체 내 약효

[0546] 1. 시험 물질

[0547] 항체-약물 접합체는 ADC-2, 25G7-Fab, AZD1402-TAG, Budesonide이다.

[0548] 2. 실험 방법

[0549] 2.1 실험 동물

[0550] IL-4 hu/hu-IL-4R $\alpha$  hu/hu 이중 형질전환 C57BL6/J 마우스, 8 주령, 암컷, Saiye(Suzhou) Biotechnology Co., Ltd.

[0551] 2.2 마우스 투약 작업

[0552] 동물을 정상 대조 동물과 모델 동물로 무작위로 분류하였다. 각각 0일, 7일, 14일째에 200  $\mu$ g의 OVA(Sigma, A5503)를 함유한 100  $\mu$ L의 PBS 용액을 복강내 주사하고, 동일한 부피의 수산화알루미늄을 보조제로 사용하여 마우스를 감작시켰다. 21~27일에는 마우스에게 하루에 한 번씩 3%의 OVA 에어로졸 용액을 35분 동안 흡입시켰다. 21일째부터 OVA 에어로졸 용액을 흡입하기 30분 전에 마우스에게 기관 내 에어로졸 투약을 실시하였다. 구체적인 투약 방안은 표 7을 참조한다.

[0553] 28일째에 마우스를 안락사시킨 후, 마우스의 목 근육을 둔성 분리하여 기관을 노출시키고, 기관을 측면으로 개방한 후, 세척 침을 천천히 삽입하여, 미리 추출하여 포장한 4°C의 미리 냉각된 생리 식염수를 폐 조직에 천천히 주입하여 세척하고 폐포 세척액을 수집하였다. 총 3회 세척하며, 처음 두 번은 각각 300  $\mu$ L의 생리 식염수, 세 번째는 400  $\mu$ L의 생리 식염수를 사용하여 세척하였다. 4°C에서 1,000rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 세포 펠렛을 350  $\mu$ L의 미리 냉각된 생리 식염수로 재현탁한 후, 완전 자동 혈액 분석기를 사용하여 백혈구와 분화된 세포를 계산하였다.

표 7. 투약 방안

| 군별           | 동물 수(마리) | 시험 단백질      | 투약 용량( $\mu$ g) | 투약 경로 | 투약 빈도 |
|--------------|----------|-------------|-----------------|-------|-------|
| 정상 대조군       | 6        | PBS         | /               | i.t.  | QD    |
| 모델링군         | 6        | PBS         | /               | i.t.  | QD    |
| ADC-2군       | 8        | ADC-2       | 100             | i.t.  | QD    |
| AZD1402-TAG군 | 8        | AZD1402-TAG | 30              | i.t.  | QD    |
| 25G7-Fab군    | 8        | 25G7-Fab    | 100             | i.t.  | QD    |
| Budesonide군  | 6        | Budesonide  | 1               | i.t.  | QD    |

### 2.3 실험 지표

BALF 내 백혈구 및 분화된 세포 수.

### 2.4 통계학적 분석

특별히 설명하지 않는 한, 두 군별의 세포 계수 간의 비교는 one-way ANOVA를 채택하여 검사하였고,  $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 정의하였다.

### 3. 실험 결과

실험 결과는 도 5에 도시된 바와 같다. 모델군에 비해 등물 용량에서 항체-약물 접합체 ADC-2는 BALF 내 백혈구, 호산구 및 호중구 수를 현저히 감소시키고 단핵세포 수에 대해서도 일정한 억제 효과를 나타내어 약효가 AZD1402-TAG보다 우수한 것으로 나타났으며, 25G7-Fab 및 Budesonide보다도 유의하게 우수하였다. ADC-2는 약효적으로 25G7-Fab과 Budesonide의 시너지 효과를 나타냈다.

### 시험예 7: OVA에 의해 유발된 마우스 천식 모델에서 ADC-2의 생체 내 약효 용량 탐색

#### 1. 시험 물질

항체-약물 접합체는 ADC-2, AZD1402-TAG, Budesonide이다.

#### 2. 실험 방법

##### 2.1 실험 동물

IL-4 hu/hu-IL-4R $\alpha$  hu/hu 이중 형질전환 C57BL6/J 마우스, 8 주령, 암컷, Saiye(Suzhou) Biotechnology Co., Ltd.

##### 2.2 마우스 투약 작업

[0568] 투약 및 BALF 샘플링 작업은 시험예 6과 동일하다. 구체적인 투약 방안은 표 8을 참조한다.

| 군별           | 동물 수(마리) | 시험 단백질      | 투약 용량( $\mu$ g) | 투약 경로 | 투약 빈도 |
|--------------|----------|-------------|-----------------|-------|-------|
| 정상 대조군       | 8        | PBS         | /               | i.t.  | QD    |
| 모델링군         | 8        | PBS         | /               | i.t.  | QD    |
| ADC-2 저용량군   | 8        | ADC-2       | 10              | i.t.  | QD    |
| ADC-2 중용량군   | 8        | ADC-2       | 30              | i.t.  | QD    |
| ADC-2 고용량군   | 8        | ADC-2       | 100             | i.t.  | QD    |
| AZD1402-TAG군 | 8        | AZD1402-TAG | 30              | i.t.  | QD    |
| Budesonide군  | 6        | Budesonide  | 1 mpk           | i.t.  | QD    |

[0569]

[0570] 2.3 실험 지표

[0571] BALF 내 백혈구 및 분화된 세포 수.

[0572] 2.4 통계학적 분석

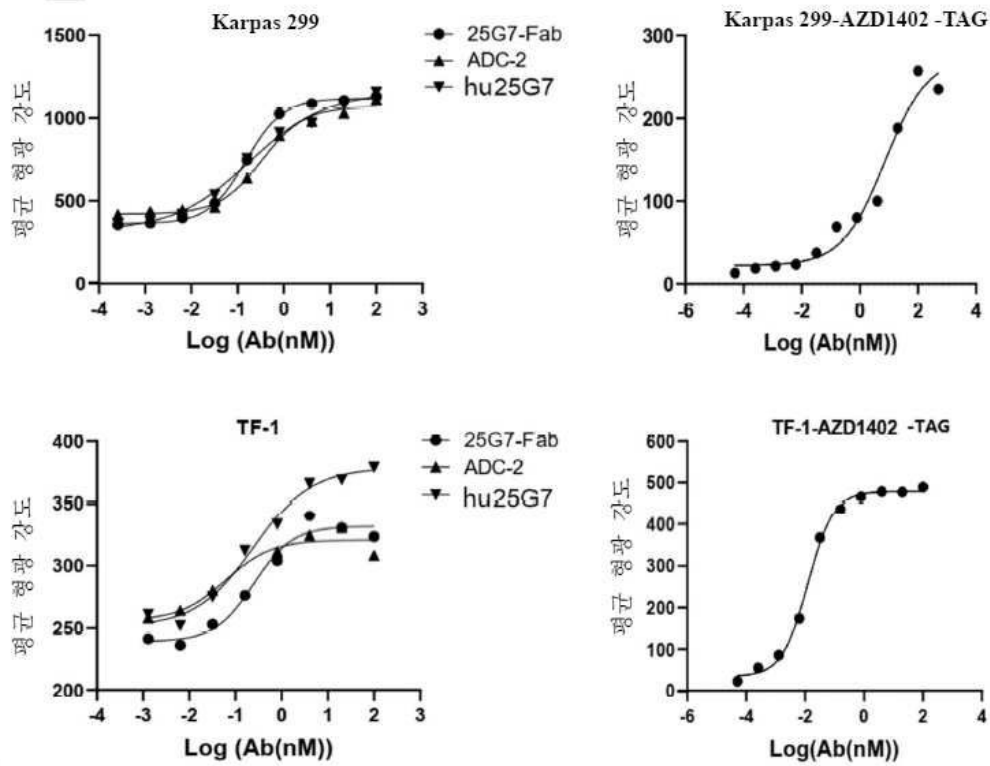
[0573] 특별히 설명하지 않는 한, 두 군별의 세포 계수 간의 비교는 one-way ANOVA를 채택하여 검사하였고,  $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 정의하였다.

[0574] 3. 실험 결과

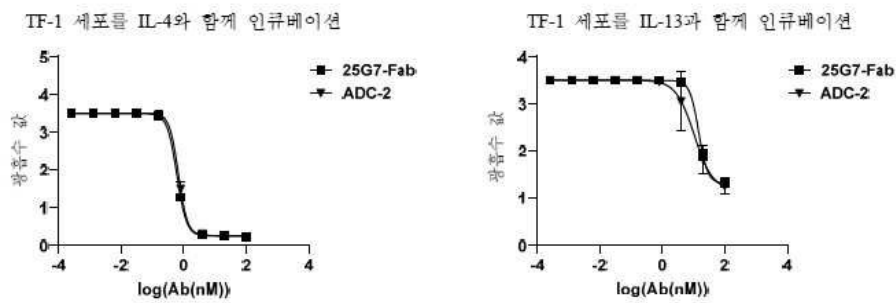
[0575] 실험 결과는 도 6에 도시된 바와 같다. 모델링군에 비해, 10  $\mu$ g의 ADC-2는 폐포 세척액 내 호산구 수량을 현저히 감소시킬 수 있으며, 이는 AZD1402-TAG와 상당하며, 임상적으로 동등한 효과에 사용되는 용량의 부테소니드보다 약간 우수하였다. 또한, 10  $\mu$ g의 ADC-2는 백혈구 수에 대한 억제 기능이 매우 유의하였으며, 단핵세포와 호중구 수에 대해서도 일정한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 1/10 몰 용량의 ADC-2로 AZD1402-TAG와 동등한 약효를 달성할 수 있는 것으로 나타났다.

## 도면

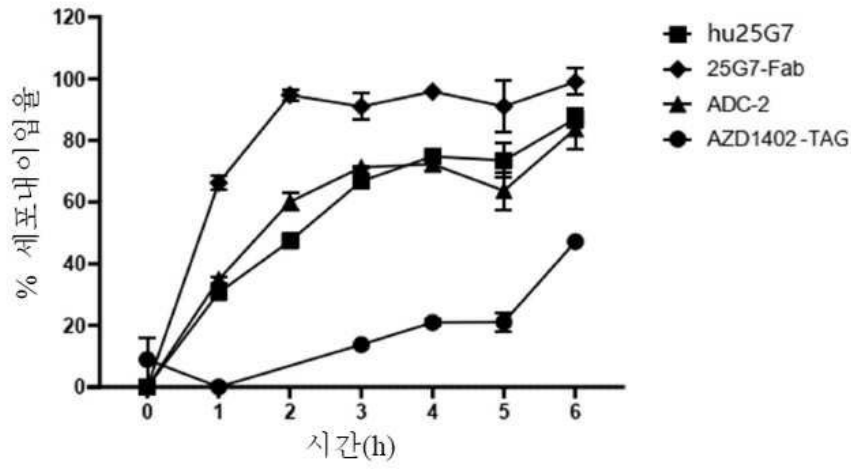
### 도면1



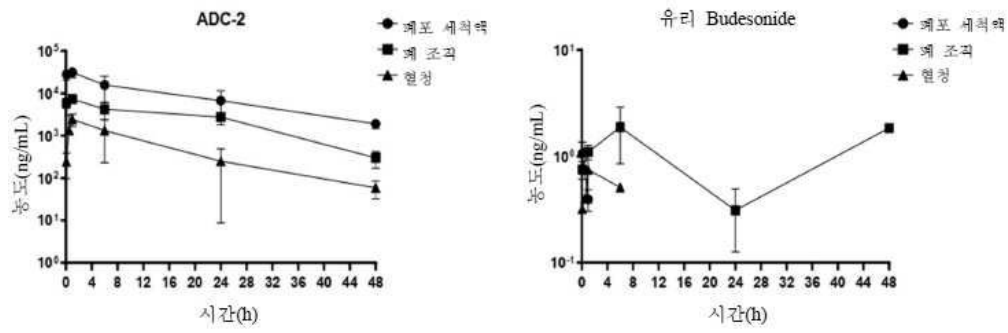
### 도면2



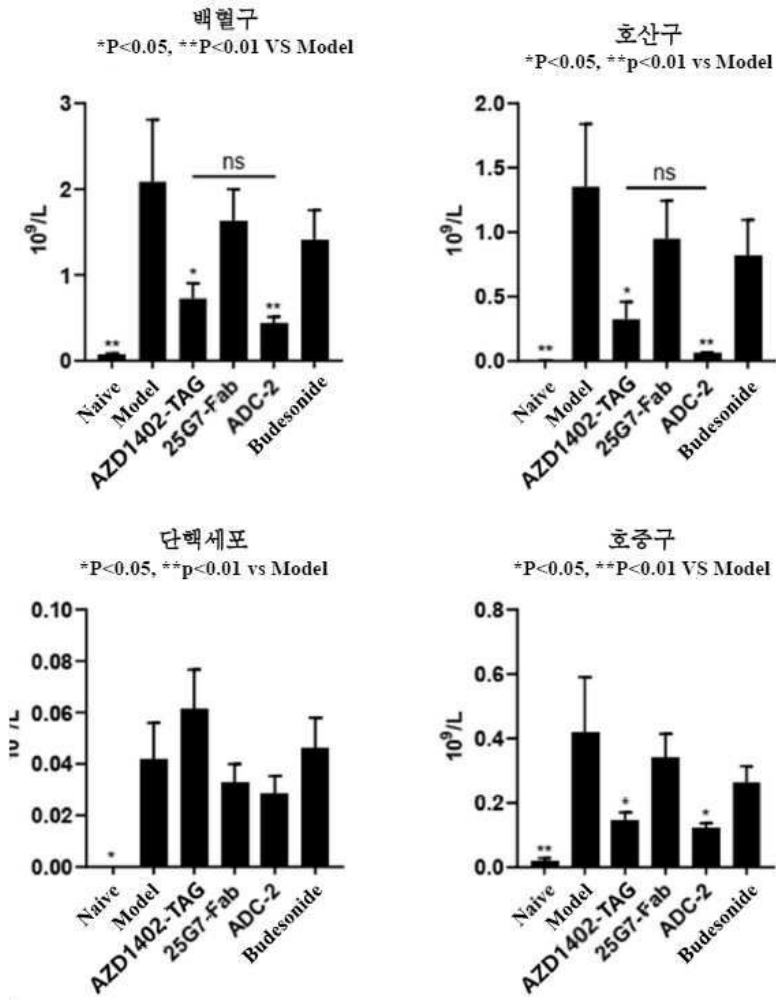
도면3



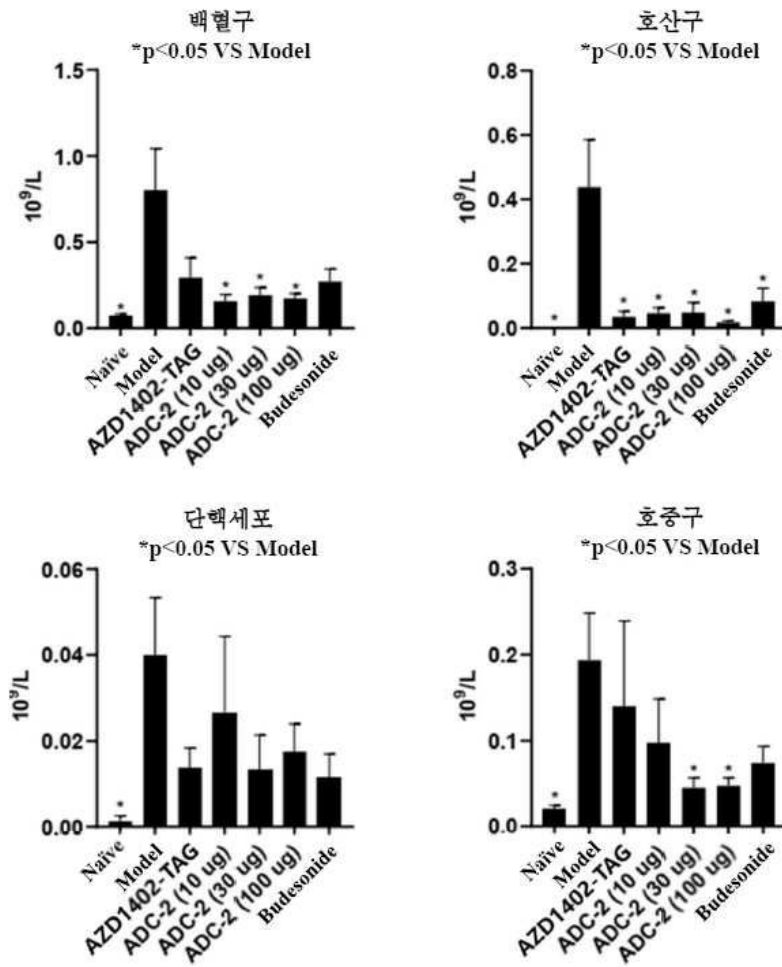
도면4



도면5



도면6



## 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.