



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0056587
(43) 공개일자 2024년04월30일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07D 307/20 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 47/68031 (2023.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7011779</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년09월16일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년04월09일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/119214</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/041006
국제공개일자 2023년03월23일</p> <p>(30) 우선권주장
202111085308.7 2021년09월16일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
치아타이 티안쑹 파마수티컬 그룹 주식회사
중국 지양수 프로빈스 222062 헨원강 시티 위저우
사우스 로드 넘버 369</p> <p>(72) 발명자
첸, 티안시
중국, 지양수 211100, 난징 장닝 디스트릭트, 장
닝 하이-테크 존, 푸영 로드 넘버 1099
쑤, 통기에
중국, 지양수 211100, 난징 장닝 디스트릭트, 장
닝 하이-테크 존, 푸영 로드 넘버 1099
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 아이피에스</p> |
|--|--|

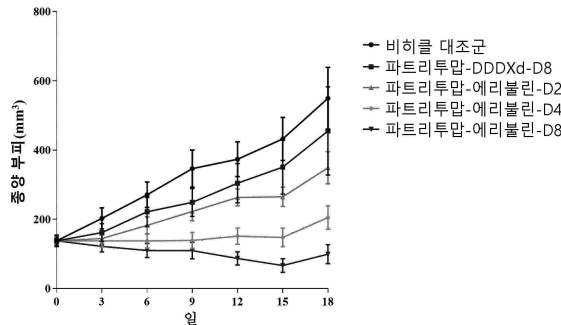
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 항-HER3 항체 약물 접합체, 이의 조성물, 및 이의 용도

(57) 요약

함께 연결된 항체 모이어티, 중간 링커 모이어티 및 세포독성 약물 모이어티를 포함한 항-HER3 항체 약물 접합체를 제공한다. 우수한 항-종양 활성 또는/및 더 우수한 안전성을 나타내는 항체 약물 접합체를 제공한다. 암의 치료에 사용될 수 있는 항체 약물 접합체를 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 47/68033 (2023.08)

A61K 47/68035 (2023.08)

A61K 47/68037 (2023.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07D 307/20 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

(72) 발명자

탕, 시아오키

중국, 지양수 211100, 난징 장닝 디스트릭트, 장닝 하이-테크 존, 푸영 로드 넘버 1099

펑, 웨이웨이

중국, 지양수 211100, 난징 장닝 디스트릭트, 장닝 하이-테크 존, 푸영 로드 넘버 1099

장, 첸펑

중국, 지양수 211100, 난징 장닝 디스트릭트, 장닝 하이-테크 존, 푸영 로드 넘버 1099

명세서

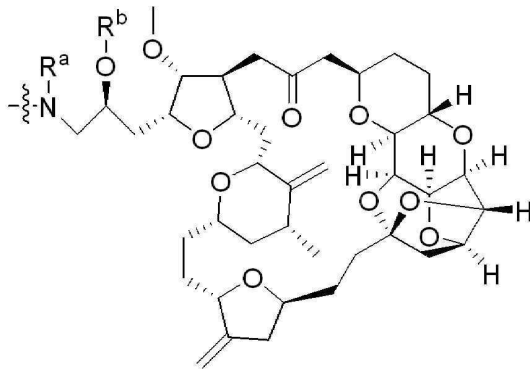
청구범위

청구항 1

일반 화학식 $Ab-(L-U)_n$ 을 갖는 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서,

상기 화학식에서, Ab는 항체 모이어티를 나타내고, L은 링커 모이어티를 나타내고, U는 세포독성 약물 모이어티를 나타내고, 및 n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택되며,

상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IIa의 구조를 포함하고:



IIa,

R^a 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되고;

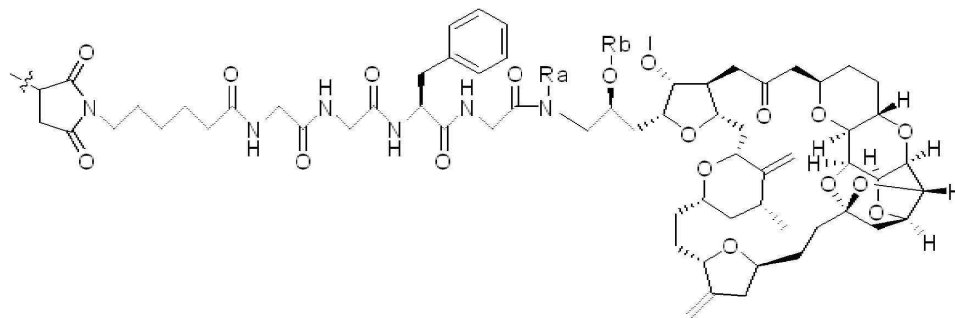
R^b 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되거나; 또는,

R^a 및 R^b 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성하는, 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IIIa의 구조를 포함하는:



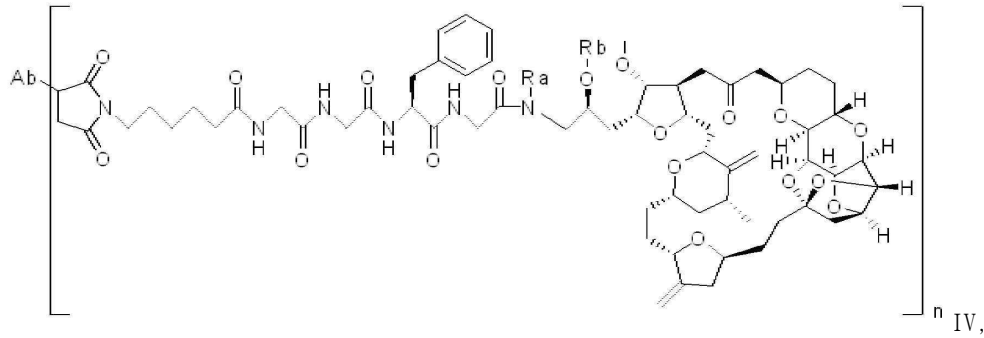
IIIa,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IV의 구조이고:



여기서,

Ab는 항체 모이어티를 나타내고, 및

n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택되는,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

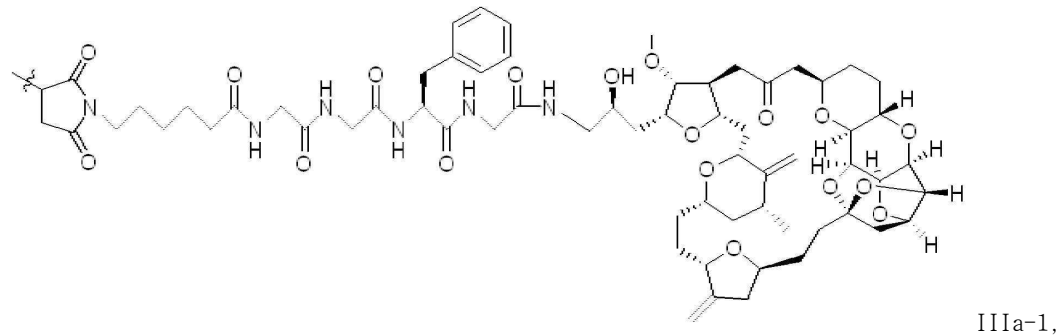
R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택되는,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IIIa-1의 구조를 포함하는:



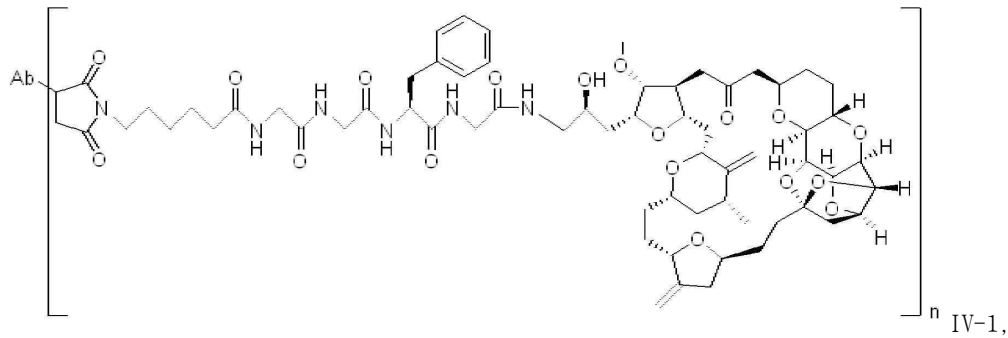
IIIa-1,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 항체-약물 결합체는 하기 화학식 IV-1의 구조인:



항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 n은 2-4.8, 2.6-4.8, 3.5-4.8, 4-4.8, 2-4.5, 2.6-4.5, 3.5-4.5, 4-4.5, 3.5-4.2, 3.5-4, 4-4.2, 7-8, 7-7.9, 7-7.6, 7-7.5, 7.1-8, 7.1-7.9, 7.1-7.6, 7.5-8, 7.6-8, 또는 7.6-7.9인,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 n은 약 2.6, 약 4, 약 4.2, 약 4.8, 약 7, 약 7.1, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.9, 또는 약 8인,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 Ab는 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편인,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함하는: 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고,

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고,

상기 중쇄는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 항-HER3 항체는 파트리투맘(patritumab)인,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 하기 특성 중 하나 또는 여러 가지의 조합을 나타내는:

- (a) HER3에 결합하는 특성;
- (b) 리간드에 대한 HER3의 결합을 차단하는 특성;
- (c) HER3을 발현하는 세포에서 세포내이입을 나타내는 특성;
- (d) HER3을 발현하는 종양 세포에 대한 사멸 활성을 갖는 특성; 및
- (e) 방관자 효과를 갖는 특성,

항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약학적 조성물에 있어서,

선택적으로, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는,

약학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 제15항에 따른 약학적 조성물의 암 치료용 약제의 제조 용도에 있어서,

바람직하게는, 상기 암은 HER3 양성 암이고;

바람직하게는, 상기 암은 담도암, 암육종, 식도암, 식도위 접합암, 유방암, 위암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁암, 흑색종, 인두암, 구강암, 피부암, 폐암, 다형성 교모세포종, 교모세포종, 요로상피암종, 전립선암, 방광암, 위장관 기질 종양, 편평세포암, 복막암, 간암, 타액선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 항문암 또는 음경암인,

암 치료용 약제의 제조 용도.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 제15항에 따른 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 있어서,

바람직하게는, 상기 암은 HER3-양성 암이고;

바람직하게는, 상기 암은 담도암, 암육종, 식도암, 식도위 접합암, 유방암, 위암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁암, 흑색종, 인두암, 구강암, 피부암, 폐암, 다형성 교모세포종, 교모세포종, 요로상피암종, 전립선암, 방광암, 위장관 기질 종양, 편평세포암, 복막암, 간암, 타액선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 항문암 또는 음경암인,

암 치료 방법.

청구항 18

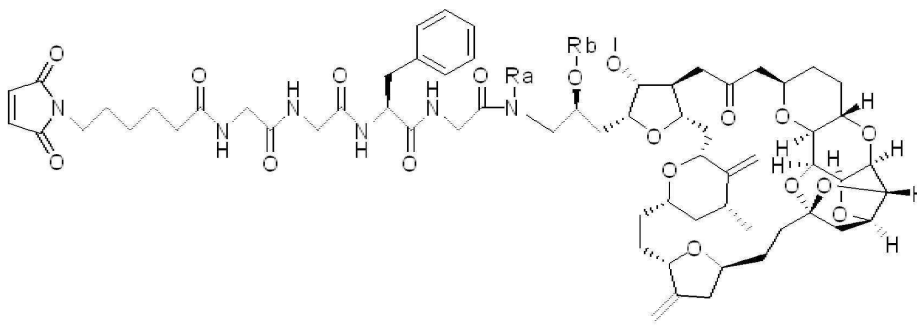
제17항에 있어서,

종양 세포를 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 약학적 조성물과 접촉시켜, 상기 종양 세포를 사멸하거나 상기 종양 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는,

암 치료 방법.

청구항 19

화학식 III의 구조를 가지는 링커-약물 중간체 화합물에 있어서:



III,

R^a는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되고;

R^b는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되거나; 또는,

R^a 및 R^b는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성하는, 링커-약물 중간체 화합물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택되는,

링커-약물 중간체 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연결된 항체 모이어티, 중간 링커 모이어티 및 세포독성 약물 모이어티를 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 항체-약물 접합체의 암 치료용 약제를 제조하기 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

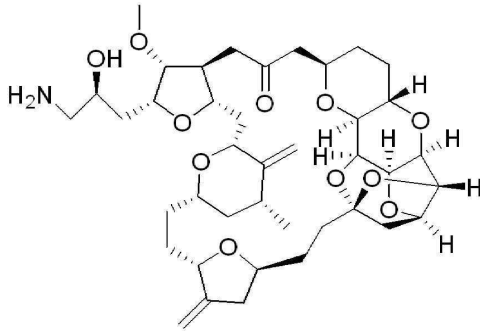
[0002] ErbB-3(수용체 티로신-단백질 키나아제 erbB-3)으로도 알려진 HER3(인간 상피세포 성장인자 수용체 3)은 EGFR(ErbB-1), HER2/c-neu(ErbB-2), HER3(ErbB-3) 및 HER4(ErbB-4)를 포함하는 인간 상피세포 성장인자 수용체(HER/EGFR/ERBB) 패밀리의 구성원이다. HER3은 세포의 리간드 결합 도메인(ECD), ECD 내 이량체화 도메인, 막관통 도메인, 단백질 티로신 키나아제 도메인(TKD), C-말단 인산화 도메인을 가지고 있으나, 세포내 티로신 키나아제 활성이 부족하다.

[0003] HER3의 리간드인 뉴레글린(NRG, 헤레글린(HRG)이라고도 함)은 HER3의 세포의 도메인에 결합하여 다른 HER 패밀리의 구성원과 이량체화 및 세포내 도메인의 트랜스인산화를 촉진함으로써 수용체-매개 신호전달 경로를 활성화시킨다. HER3과 HER 패밀리의 다른 구성원에 의해 형성된 이량체는 HER3의 신호전달 전위를 확장시켜 신호 다양화 수단뿐만 아니라 신호 증폭 수단으로도 작용한다. 예를 들어, HER2/HER3 헤테로이량체는 HER 패밀리의 구성원에서 가장 중요한 유사분열 신호를 유도한다. HER3은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 폐암, 피부암, 췌장암 등 다양한 암에서 편재적으로 발현된다.

[0004] 항체-약물 접합체(ADC)는 치료용 항체의 높은 특이성과 세포독성 약물의 높은 사멸 활성을 조합한 약물의 일종으로, 치료용 항체 모이어티는 중간 링커 모이어티를 통해 세포독성 약물 모이어티와 연결된다. 현재, 전 세계적으로 최소 10개의 ADC 약물이 시판되고 있다. 이들 약물 중 브렌투시맙 베도틴(brentuximab vedotin), 폴라투주맙 베도틴(polatuzumab vedotin), 엔포르투맙 베도틴(enfortumab vedotin)의 항체 모이어티는 각각 CD30, CD79b, Nectin-4를 표적으로 하고, 트라스투주맙 엠탄신(trastuzumab emtansine)과 트라스투주맙 데루크테칸(trastuzumab deruxtecan)의 항체 모이어티는 HER2를 표적으로 하고, 겐투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin)과 이노투주맙 오조가미신(inotuzumab ozogamicin)의 항체 모이어티는 각각 CD33, CD22를 표적으로 하고, 사시투주맙 글로비테칸(sacituzumab govitecan)의 항체 모이어티는 TROP2를 표적으로 하고, 새로 승인된 베란타맙 마포도틴(belantamab mafodotin)과 론카투시맙 테시린(loncastuximab tesirine)은 각각 BCMA, CD19를 표적으로 한다. 세포독성 약물 모이어티의 경우, 미세소관에 작용하는 아우리스타틴(auristatins)이 브렌투시맙 베도틴, 폴라투주맙 베도틴, 엔포르투맙 베도틴, 베란타맙 마포도틴에 채택되고, 미세소관에 작용하는 메이탄시노이드(maytansinoid) 독소 분자는 트라스투주맙 엠탄신에 채택되고, DNA에 작용하는 칼리케아미신

(calicheamicin) 독소 분자는 겐투주맵 오조가미신과 이노투주맵 오조가미신에 채택되고, 캄프토테신 (camptothecin) 독소 분자는 트라스투주맵 데루크테칸과 사시투주맵 글로비테칸에 채택되고, DNA에 작용하는 PBD 이량체는 론카톡시맵 테시린에 채택된다. 중간 링커 모이어티의 경우, 비-절단성 링커가 트라스투주맵 엠탄신과 베란타맵 마포도틴에 채택되고, 절단성 링커는 나머지 8개의 분자에 채택된다.

[0005] 에리블린(eribulin) (하기 화학식 I)은 천연 해양 제품인 할리콘드린 B(halichondrin B)의 합성 유사체이다. 미세소관 성장 단계를 억제하고 튜불린-기반 항유사분열 매커니즘을 통해 작용할 수 있어, G2/M 세포 주기의 정지, 유사분열 방추의 붕괴, 최종적으로 장기 유사분열 정지 후 세포사멸(apoptosis)을 초래한다. 에리블린은 현재 전이성 유방암과 연조직 육종의 치료에 승인되었다.



I

[0006] ADC 약물은 세포독성 저분자의 높은 효능과 특정 종양 세포에 대한 항체의 높은 선택성의 두 가지 장점을 결합하고 있지만, 더 많은 적응증을 표적으로 할 수 있는 고효능 저-독성 ADC 약물 개발의 필요성은 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 항체-약물 접합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)

[0010] 본 발명은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 세포독성 약물 에리블린 (eribulin) 또는 이의 유도체에 접합된, 바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 HER3에 특이적으로 결합하는 항체-약물 접합체를 제공한다.

[0011] 일 측면에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 화학식에서, Ab는 항체 모이어티를 나타내고, L은 링커 모이어티를 나타내며, U는 세포독성 약물 모이어티를 나타내며, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택된다. 특정 실시예에서, 항체 모이어티 Ab는 특정 작용기를 통해 링커 모이어티에 연결되고, 항체 모이어티는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0012] 일 측면에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 세포독성 약물 모이어티 U가 링커 모이어티 L을 통해 항체 모이어티 Ab에 접합된다. 일부 구체적인 실시예에서, 본원에 제공된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물에서, 각각의 세포독성 약물 모이어티 U는 하나의 링커 모이어티 L을 통해 항체 모이어티 Ab에 접합된다. 본원에 개시된 링커 모이어티 L은 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해 항체 모이어티에 연결될 수 있으며; 바람직하게는, 링커 모이어티는 설피드릴(sulfydryl) 및/또는 아미노(amino)를 통해 항체 모이어티에 연결된다. 일부 보다 바람직한 실시예에서, 본원에 개시된 링커 모이어티는 설피드릴을 통해 항체 모이어티에 연결된다.

[0013] 일 측면에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 세포독성 약물 모이어티 U는 링커 모이어티 L을 통해 항체 모이어티 Ab에 접합되며, 상기 링커 모이어티는 절단성 링커 또는 비-절단성 링커일 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 링커 모이어티는 절단성 링커로서, 예를 들어, 낮은 pH-의존성 분해 유형(하이드라존 결합, 탄산염 결합 등 포함), 단백질 분해 유형(펩타이드계 결합 포함), 높은 글루타티온 농도-의존성 분해 유형(이황화 결합 포함) 등일 수 있다. 절단성 링커는 표적 세포 내에서 절단되어 세포독성 약물을 방출할 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 링커 모이어티는 비-절단성 링커이고, 예를 들어 말레이미도카프로일(maleimidocaproyl) 등일 수 있다.

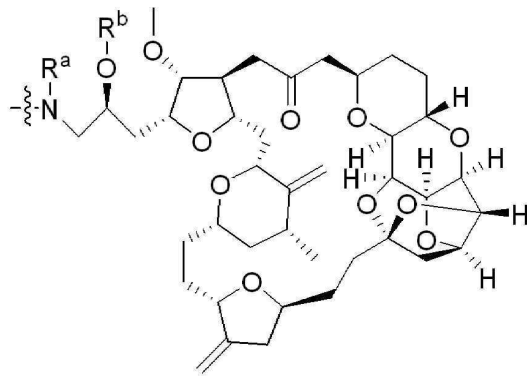
[0014] 일 측면에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 항체 모이어티 Ab는 하나 이상의 세포독성 약물 모이어티 U에 접합되며, 상기 세포독성 약물은 예를 들어, 알칼로이드, 항대사물, 항종양 항생제, 알킬화제, 백금계 약물 등에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는, 미세소관 억제제 세포독성 약물(메이탄시노이드(maytansinoid), 아우리스타틴(auristatin), 에리블린(eribulin) 등 포함) 또는 DNA에 작용하는 세포독성 약물(칼리키아마이신(calicheamicin), 듀오카마이신(duocarmycin), PBD(피롤로벤조디아제핀, pyrrolobenzodiazepine), 토포이소머라제 I 억제제(topoisomerase I inhibitor) 등 포함이다.

[0015] 일부 구체적인 실시예에서, 본원에 제공된 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체의 세포독성 약물 모이어티 U 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 미세소관 억제제이다.

[0016] 일부 구체적인 실시예에서, 본원에 제공된 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체의 세포독성 약물 모이어티 U 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 에리블린 또는 이의 유도체이다.

[0017] 특정 실시예에서, 세포독성 약물 모이어티는 작용기를 통해 링커 모이어티에 연결되어, 세포독성 약물 분자가 종양 세포에서 유리되어 항-종양 효과를 발휘할 수 있다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 식에서, Ab는 항체 모이어티를 나타내고, L은 링커 모이어티를 나타내며, U는 세포독성 약물 모이어티를 나타내고, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택되며, 상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IIa의 구조를 포함하고:



IIa,

[0019]

여기서,

[0020]

[0021] R^a는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되고;

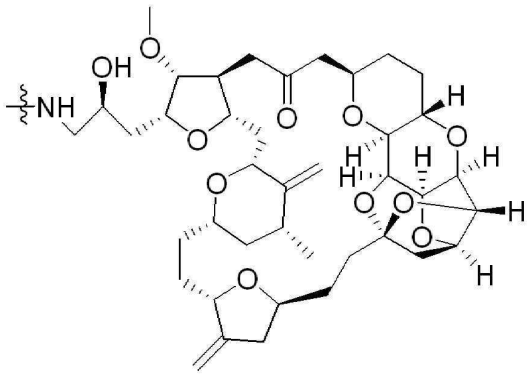
[0022] R^b는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되거나;

[0023]

또는,

[0024] R^a 및 R^b는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b는 수소 원자이다.

[0025] 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체는 하기 기재된 화학식 IIa-1의 구조를 포함한다:



IIa-1.

[0026]

[0027]

일부 실시예에서, 본 발명은 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 화학식에서, Ab는 항체 모이어티를 나타내고, L은 링커 모이어티를 나타내고, U는 세포독성 약물 모이어티를 나타내고, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택되며, 상기 -U는 화학식 IIa의 구조이고:

[0028]

여기서,

[0029]

R^a는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되고;

[0030]

R^b는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되거나;

[0031]

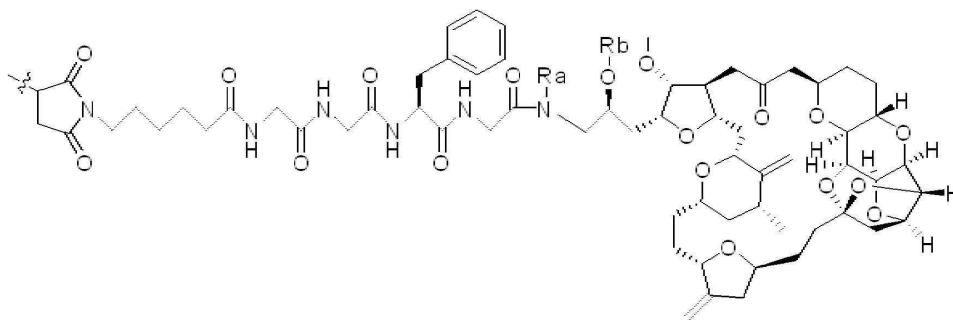
또는,

[0032]

R^a 및 R^b는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b는 수소 원자이다. 일부 실시예에서, -U는 화학식 IIa-1의 구조이다.

[0033]

일부 실시예에서, 본 개시에서 제공된 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 하기 화학식 IIIa의 구조를 포함하고:



IIIa,

[0034]

[0035]

여기서,

[0036]

R^a는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되고;

[0037]

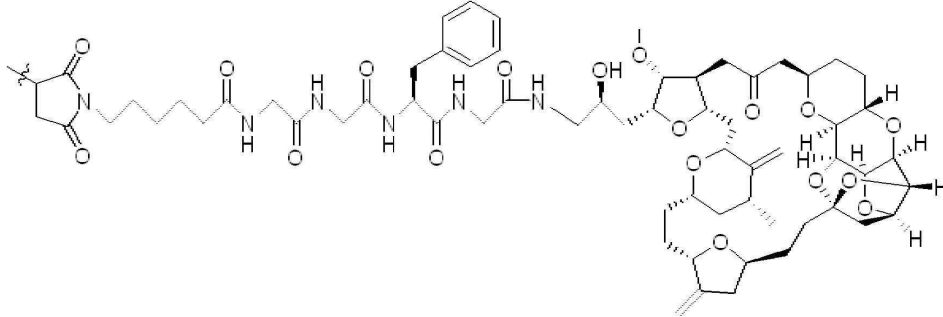
R^b는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되거나;

[0038]

또는,

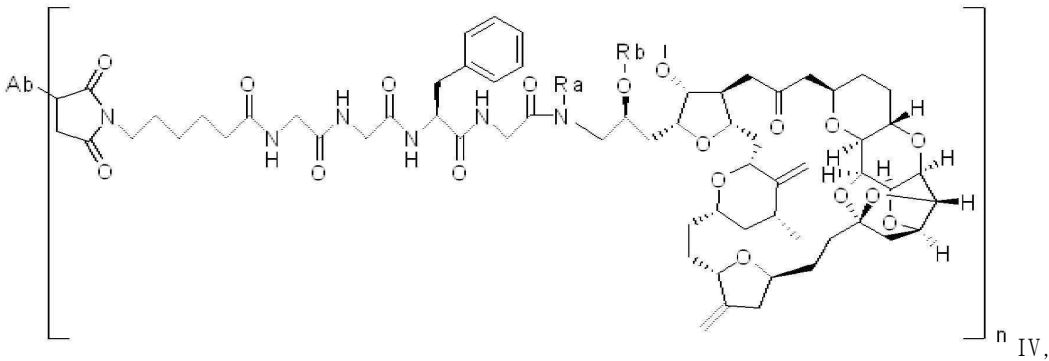
[0039] R^a 및 R^b 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b 는 수소 원자이다.

[0040] 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체는 하기 기재된 화학식 IIIa-1의 구조를 포함한다:



[0041] IIIa-1.

[0042] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 하기 화학식 IV의 구조이고:



[0043] IV,

[0044] 상기 화학식에서, Ab는 항체 모이어티를 나타내고;

[0045] n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택되며;

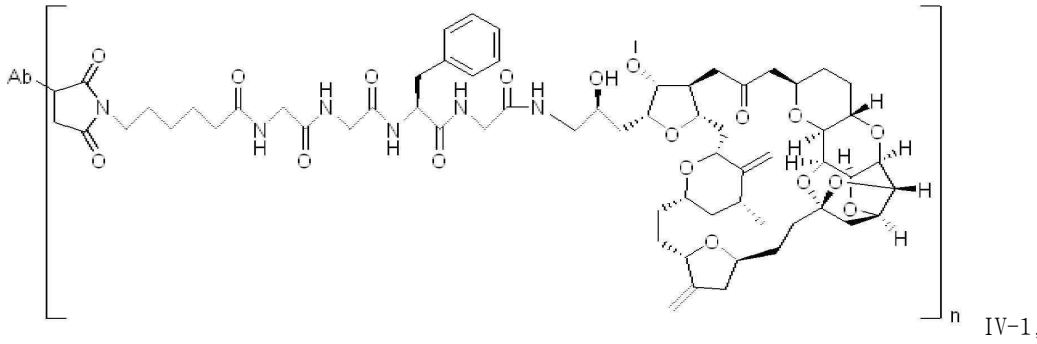
[0046] R^a 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되고;

[0047] R^b 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C₁₋₆ 알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 임의로 치환된 C₃₋₇ 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C₆₋₁₀ 아릴, 및 임의로 치환된 C₅₋₁₂ 헤테로아릴 중에서 선택되거나;

[0048] 또는,

[0049] R^a 및 R^b 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 수소 원자 및 C₁₋₅ 알킬 (바람직하게는 C₁₋₄ 알킬, 예를 들어, C₁₋₃ 알킬) 중에서 선택된다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다. 일부 실시예에서, R^a 및 R^b 는 수소 원자이다.

[0050] 일 구체적인 실시예에서, 본 개시내용은 하기 화학식 IV-1의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 제공하고:



- [0051]
- [0052] 여기서,
- [0053] Ab는 항체 모이어티이고, 및
- [0054] n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택된다.
- [0055] 일부 실시예에서, 상기에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에서, n은 2-4.8, 2.6-4.8, 3.5-4.8, 4-4.8, 2-4.5, 2.6-4.5, 3.5-4.5, 4-4.5, 3.5-4.2, 3.5-4, 4-4.2, 7-8, 7-7.9, 7-7.6, 7-7.5, 7.1-8, 7.1-7.9, 7.1-7.6, 7.5-8, 7.6-8, 또는 7.6-7.9이다. 일부 실시예에서, n은 약 2.6, 약 4, 약 4.2, 약 4.8, 약 7, 약 7.1, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.9, 또는 약 8이다.
- [0056] 본원에 개시된 항체-약물 접합체(ADC)에서 항체 모이어티에 접합된 세포독성 약물의 수는 본원에 제공된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물이 이중일 수 있도록 다양할 수 있는데, 즉, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 다양한 수의 세포독성 약물이 접합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하며; 예를 들어, 0 (즉, 세포독성 약물 없음), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 세포독성 약물 분자가 1개의 항체 또는 항원-결합 단편 분자에 접합된다.
- [0057] 상술한 서로 다른 수의 세포독성 약물이 접합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 비율을 조절함으로써, 서로 다른 약물 항체 비율(DAR)을 갖는 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제조할 수 있다. "DAR"과 "n"은 본원에서 호환적으로 사용된다. DAR 또는 n은 ADC에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대한 세포독성 약물의 평균 몰비, 즉, 항체 또는 항원-결합 단편 분자 당 접합된 세포독성 약물의 평균 수인 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, "약 4의 DAR" 또는 "약 4의 n"은 다음과 같은 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 의미한다: 다양한 양의 세포독성 약물이 접합되었지만(예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 세포독성 약물이 각 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합된), 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대한 세포독성 약물의 평균 몰비가 약 4인 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 각 분자를 포함하는 이중 혼합물. 유사하게, "약 8의 DAR" 또는 "약 8의 n"은 ADC에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대한 세포독성 약물의 평균 몰비가 약 8임을 의미한다.
- [0058] 일 측면에서, 본 개시는 일반 화학식 Ab-(L-U)_n을 갖는 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 Ab(항체 모이어티)는 당업계에서 알려진 임의의 종양 치료 표적으로부터 선택될 수 있는 종양 항원에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 표적의 비제한적인 예는 HER2, HER3, EGFR, CD20, CD30, CD33, CD47, CD79b, VEGF, VEGFR, MET, RET, PD-1 또는 PD-L1을 포함한다. 일부 실시예에서, 본 개시는 화학식 IV-1의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하며, 상기 Ab(항체 모이어티)는 당업계에서 알려진 임의의 종양 치료 표적으로부터 선택될 수 있는 종양 항원에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 표적의 비제한적인 예는 HER2, HER3, EGFR, CD20, CD30, CD33, CD47, CD79b, VEGF, VEGFR, MET, RET, PD-1 또는 PD-L1을 포함한다.
- [0059] 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물에서, Ab는 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0060] 일부 실시예에서, Ab는 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR(HCDR) 1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR(LCDR) 1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0061] 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 CDR의 아미노산 서열은 하기 표 S1에 제공되어 있다.

[0062] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 일반 화학식 Ab-(L-U)_n의 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 항체 모이어티는 하기 표 S1에 나타난 서열을 갖는 파트리투맘(patritumab)이다.

[0063] 표 S1. 파트리투맘의 CDR 및 가변 영역의 아미노산 서열

이름	아미노산 서열	서열 번호
HCDR1	GGSFSGY	1
HCDR2	NHSGS	2
HCDR3	DKWTWYFDL	3
LCDR1	QSVLYSSSNRNYLA	4
LCDR2	WASTRES	5
LCDR3	QQYYSTPRT	6
중쇄 가변 영역	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI NHSGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWY FDLWGRGTLVTVSS	7
경쇄 가변 영역	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIK	8

[0064]

[0065] 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시되고, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 8로 표시된다.

[0066] 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린의 불변 영역, 또는 불변 영역의 단편, 유사체, 변이체, 또는 유도체를 더 포함할 수 있다.

[0067] 일부 실시예에서, 불변 영역은 인간 면역글로불린 중쇄, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄, 또는 다른 유형의 면역글로불린, 바람직하게는 IgG1의 중쇄로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 불변 영역은 문맥에서 기술된 변형, 예를 들어 아미노산의 삽입, 결실, 치환 또는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 불변 영역은 이펙터 기능을 변경하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 불변 영역의 임의의 아미노산 잔기는 임의의 동종이형(allotype)의 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

[0068] 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 9로 표시되고, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시된다.

[0069] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTW

YFDLWGRGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 9);

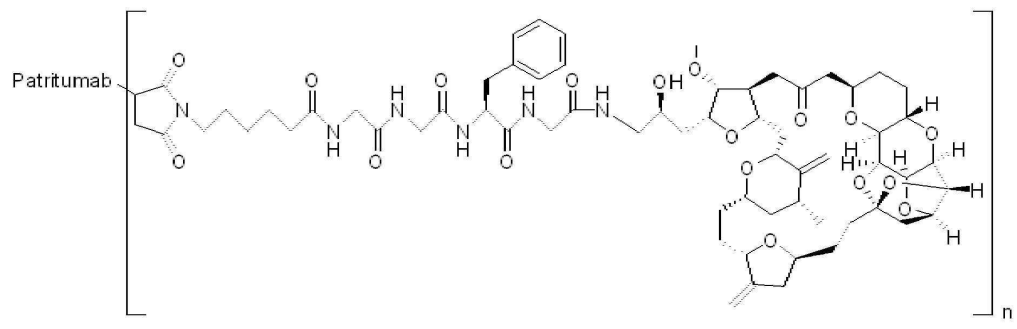
[0070] DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRYLAWYQQNPGQPPLL IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPR
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 10).

[0071] 일부 실시예에서, 항-HER3 항체는 파트리투맵(patritumab), 세리반투맵(seribantumab), 엘젠티투맵(elgentumab),
둘리고투맵(duligotuzumab), CDX-3379, 루메투맵(lumretuzumab) 및 GSK2849330으로 이루어진 군으로부터 선택
된다. 일부 특정 실시예에서, 항-HER3 항체는 파트리투맵이다.

[0072] 일부 실시예에서, 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일클론 항체, 다중특이적 항체, Fab 단편, Fab'
단편, F(ab)'2 단편, Fd 단편, Fv 단편, dAb 단편, 분리된 CDR 영역, scFv, 나노바디, 및 융합 단백질로부터
선택된다.

[0073] 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 일반
화학식은 $Ab-(L-U)_n$ 이며, 상기 화학식에서 Ab는 예를 들어 아미노산 서열의 하나 이상의 변화, 부가 또는 결실
을 포함하는 변형가능하다. 여기서, 변형된 Ab는 여전히 이의 상응하는 항원에 특이적으로 결합하는 활성을 보
유한다.

[0074] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 하기
나타낸 구조이다:



[0075] 이러한 일부 실시예에서, n은 2-4.8, 2.6-4.8, 3.5-4.8, 4-4.8, 2-4.5, 2.6-4.5, 3.5-4.5, 4-4.5, 3.5-4.2,
3.5-4, 4-4.2, 7-8, 7-7.9, 7-7.6, 7-7.5, 7.1-8, 7.1-7.9, 7.1-7.6, 7.5-8, 7.6-8, 또는 7.6-7.9이다. 일부
구체적인 실시예에서, n은 약 2.6, 약 4, 약 4.2, 약 4.8, 약 7, 약 7.1, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.9, 또는 약 8
이다.

[0077] 일 측면에서, 본원에 제공된 일반 화학식 $Ab-(L-U)_n$ 을 갖는 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한
염 또는 용매화물은 하기 특성 중 하나 또는 여러 가지의 조합을 나타낸다:

- [0078] (a) HER3에 결합하는 특성;
- [0079] (b) 리간드에 대한 HER3의 결합을 차단하는 특성;
- [0080] (c) HER3을 발현하는 세포에서 세포내이입을 나타내는 특성;
- [0081] (d) HER3을 발현하는 종양 세포에 대한 사멸 활성을 갖는 특성;
- [0082] (e) 방관자 효과를 갖는 특성.

[0083] 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 인간 HER3에 결합한다.

[0084] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 HER3
발현량이 상이한 세포에서 강한 세포내이입을 나타내며, 세포내이입 시간이 증가함에 따라 세포내이입된 ADC의
양을 지속적으로 추적할 수 있다.

[0085] 약학적 조성물

[0086] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 실시예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 부형제, 희석제, 캡슐화 물질, 충전제, 완충제 또는 기타 제제를 포함한다.

[0087] 용도

[0088] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 암 치료용 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물의 암 치료용 약제의 제조 용도를 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 암 본원에 개시된 약학적 조성물의 암 치료용 약제의 제조 용도를 제공한다.

[0089] 일 측면에서, 본 발명은 암 치료에 사용하기 위한 상기 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 또는 약학적 조성물을 제공한다.

[0090] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 또는 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 종양 세포를 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 약학적 조성물과 접촉시켜, 상기 종양 세포를 사멸하거나 상기 종양 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다.

[0091] 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 본원에 개시된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것은 종양 세포를 사멸시키거나 종양 세포의 성장을 억제할 수 있다.

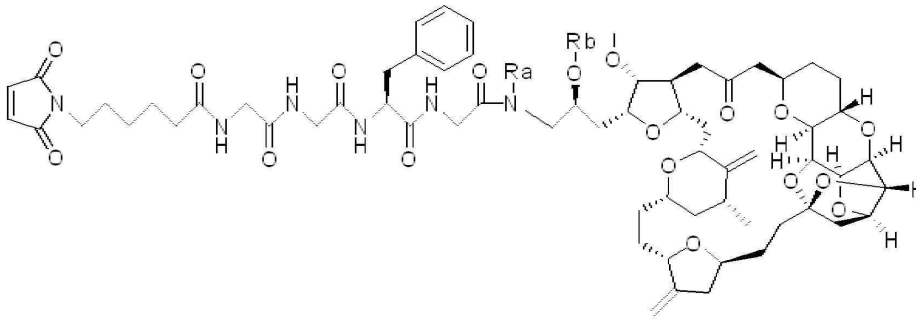
[0092] 일 측면에서, 본 발명은 암 치료에 있어서, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 용도를 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물의 암 치료 용도를 제공한다. 일 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 약학적 조성물의 암 치료 용도를 제공한다.

[0093] 일부 실시예에서, 상기 기재된 방법 또는 용도에서, 환자는 HER2를 표적화하는 약물로의 치료에 적합하지 않다. 일부 실시예에서, 상기 기재된 방법 또는 용도에서, 환자는 HER2를 표적화하는 약물에 내성이 있다.

[0094] 일부 실시예에서, 상기 방법 또는 용도에서, 암은 HER3-양성 암이다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 HER3 단백질을 발현하는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 본원에 개시된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것은 HER3-발현 종양 세포를 사멸하거나 HER3-발현 종양 세포의 성장을 억제할 수 있다. 암의 예로는 담도암, 암육종, 식도암, 식도위 접합암, 유방암, 위암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁암, 흑색종, 인두암, 구강암, 피부암, 폐암, 다형성 교모세포종, 교모세포종, 요로상피암, 전립선암, 방광암, 위장관 기질 종양, 편평세포암, 복막암, 간암, 타액선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 항문암 또는 음경암 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0095] 링커-약물 중간 화합물

[0096] 일부 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 III의 구조를 갖는 링커-약물 중간체 화합물을 제공한다:



III,

[0097]

여기서,

[0098]

[0099] R^a 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되고;

[0100]

R^b 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되거나; 또는,

[0101]

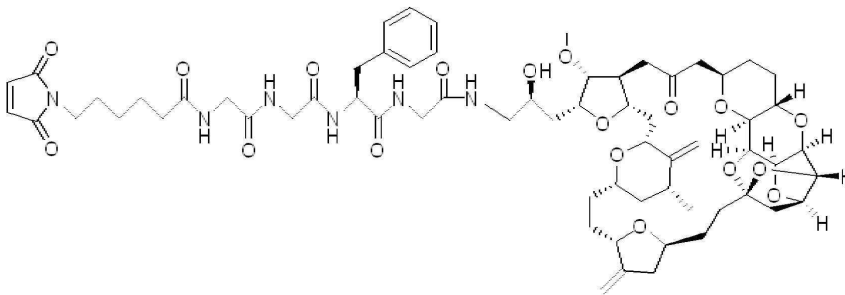
R^a 및 R^b 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다.

[0102]

일부 실시예에서, 화학식 III의 구조를 갖는 링커-약물 중간체 화합물에서, R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다.

[0103]

일 구체적인 실시예에서, 본 발명은 하기 화학식 III-1의 구조를 갖는 링커-약물 중간체 화합물을 제공한다,



III-1.

[0104]

[0105] 본 발명에서 사용되는 링커 구조는 항-종양 화합물 에리블린 또는 이의 유도체를 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결시키고, 제공된 항체-약물 접합체는 우수한 항-종양 효과 및/또는 안전성을 실현한다. 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체의 항-종양 효과 및/또는 안전성은 에리블린보다 우수하다. 일부 실시예에서, 항체-약물 접합체의 항-종양 효과 및/또는 안전성은 Daiichi Sankyo Co., Ltd의 항-HER3 항체-약물 접합체 U3-1402(파트리투맙 데루크테칸, patritumab deruxtecان)보다 우수하다. 일부 실시예에서, 제공된 항-HER3 항체-약물 접합체는 종양 세포, 다양한 종양 세포, 및/또는 상이한 (높은 및/또는 중간인 및/또는 낮은) HER3 발현 수준을 갖는 세포에 대해 우수한 사멸 활성을 나타낸다. 일부 실시예에서, 제공된 항-HER3 항체-약물 접합체는 트라스투주맙-내성 종양 세포에 대해 우수한 사멸 활성을 나타낸다. 일부 실시예에서, 제공된 항-HER3 항체-약물 접합체는 우수한 안전성을 갖는다. 일부 실시예에서, 제공된 항체-약물 접합체, 예컨대 항-HER3 항체-약물 접합체는 응집되기 어렵다. 일부 실험에서, 항체-약물 접합체의 항-응집 특성은 본원에 개시된 링커 구조를 사용하여 항-종양 화합물 에리블린 또는 이의 유도체를 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결함으로써 개선될 수 있다.

[0106]

설명 및 정의

[0107]

달리 언급되지 않는 한, 본 출원에서 사용되는 다음 용어는 다음과 같은 의미를 가진다. 어떤 용어는 특별히 다르게 정의되지 않는 한 불확실하거나 불명확한 것으로 간주되어서는 안 되며, 해당 분야에서 통상의 의미에 따라 해석되어야 한다. 상품명을 참고할 때에는 그에 상응하는 상업적 제품 또는 이의 활성 성분을 참고하고자 한다.

[0108]

용어 "치환된"은 특정 원자의 원자가가 정상이고 생성된 화합물이 안정한 한 특정 원자의 임의의 하나 이상의

수소 원자가 치환기로 치환된다는 것을 의미한다. 치환기가 옥소 (즉, =O)인 경우, 이는 두 개의 수소 원자가 치환되고 옥소가 방향족기 상에서 가능하지 않음을 의미한다.

- [0109] 용어 "임의적" 또는 "임의적으로"은 후술하는 사건 또는 상황이 발생할 수 있지만, 반드시 발생하지는 않음을 의미한다. 상기 설명은 사건이나 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함한다. 용어 "임의로 치환된"은 용어는 치환 또는 비치환된 것을 의미한다. 예를 들어, 에틸이 할로젠으로 "임의로" 치환된다는 것은 에틸이 비치환된 (CH_2CH_3), 일치환된 (예를 들어, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), 다치환된 (예를 들어, CHFCH_2F 및 CH_2CHF_2), 또는 완전히 치환된 (CF_2CF_3) 것일 수 있음을 의미한다. 당업자라면 하나 이상의 치환기를 포함하는 임의의 그룹에 대해, 공간적으로 존재하지 않거나 합성될 수 없는 임의의 치환 또는 치환 패턴은 도입되지 않는다는 것을 이해할 것이다.
- [0110] 본원에 사용된 C_{n-n} 은 모이어티가 주어진 범위에서의 정수 또는 소수의 탄소 원자를 가짐을 의미한다. 예를 들어, " C_{1-6} "은 그룹이 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자, 4개의 탄소 원자, 5개의 탄소 원자 또는 6개의 탄소 원자를 가질 수 있음을 의미한다.
- [0111] 임의의 변수(예를 들어, R)가 화합물의 구성이나 구조에서 한 번 또는 그 이상 발생하는 경우, 각 경우의 변수의 정의는 독립적이다. 따라서, 예를 들어, 그룹이 2개의 R로 치환되는 경우, 각각의 R의 정의는 독립적이다.
- [0112] 연결 기의 수가 0, 예를 들어 $-(\text{CH}_2)_0-$ 인 경우, 이는 연결 기가 공유 결합임을 의미한다.
- [0113] 공유 결합에서 변수를 선택할 때는, 연결하는 두 기가 직접 연결되어 있음을 의미한다. 예를 들어, A-L-Z에서, L이 공유결합을 나타내는 경우, 그 구조는 실제로 A-Z임을 의미한다.
- [0114] 용어 "할로-" 또는 "할로젠"은 플루오린, 클로린, 브로민 및 아이오딘을 지칭한다.
- [0115] 용어 "하이드록시"는 $-\text{OH}$ 기를 지칭한다.
- [0116] 용어 "시아노"는 $-\text{CN}$ 기를 지칭한다.
- [0117] 용어 "설피드릴"은 $-\text{SH}$ 기를 지칭한다.
- [0118] 용어 "아미노"는 $-\text{NH}_2$ 기를 지칭한다.
- [0119] 용어 "니트로"는 $-\text{NO}_2$ 기를 지칭한다.
- [0120] 용어 "알킬"은 일반 화학식 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 을 갖는 하이드로카빌을 지칭한다. 알킬은 선형 또는 분지형일 수 있다. 예를 들어, 용어 " C_{1-6} 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬을 지칭한다(예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소프로필, n-부틸, 아이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 1-메틸부틸, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, 네오펜틸, 헥실, 2-메틸펜틸 등). 알콕시, 알킬아미노, 디알킬아미노, 알킬설포닐 및 알킬티오의 알킬 모이어티 (즉, 알킬)는 상기와 유사하게 정의된다.
- [0121] 용어 "알콕실"은 $-\text{O}$ -알킬을 지칭한다.
- [0122] 용어 "알킬아미노"는 $-\text{NH}$ -알킬을 지칭한다.
- [0123] 용어 "디알킬아미노"는 $-\text{N}(\text{알킬})_2$ 를 지칭한다.
- [0124] 용어 "알킬설포닐"은 $-\text{SO}_2$ -알킬을 지칭한다.
- [0125] 용어 "알킬티오"는 $-\text{S}$ -알킬을 지칭한다.
- [0126] 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 탄소 원자 및 수소 원자로 이루어진 선형 또는 분지형 불포화 된 지방족 하이드로카빌을 지칭한다. 알케닐의 비제한적인 예로는 에테닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 1-부테닐, 아이소부테닐, 1,3-부타디에닐 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0127] 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 탄소 원자 및 수소 원자로 이루어진 선형 또는 분지형 불포화 된 지방족 하이드로카빌을 지칭한다. 알키닐의 비제한적인 예로는 에티닐 ($-\text{C}\equiv\text{1-프로피닐}$ ($-\text{C}\equiv_3$), 2-프로피닐 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{1,3-부타디닐}$ ($-\text{C}\equiv_3$ 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0128] 용어 "사이클로알킬"은 완전히 포화된 탄소 고리를 지칭하며, 모노사이클릭, 다리 걸친(bridged) 사이클릭 또는 스피로(spiro) 사이클릭 구조의 형태로 존재할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 탄소 고리는 보통 3 내지 10원 고리이다. 사이클로알킬의 비제한적인 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 노르보르닐(바이사이클로[2.2.1]헵틸), 바이사이클로[2.2.2]옥틸, 아다만틸 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0129] 용어 "사이클로알케닐"은 완전히 포화되지 않은 비방향족 탄소고리를 지칭하며, 모노사이클릭, 다리 걸친(bridged) 사이클릭 또는 스피로(spiro) 사이클릭 구조의 형태로 존재할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 탄소 고리는 보통 5 내지 8원 고리이다. 사이클로알케닐의 비제한적인 예로는 사이클로펜테닐, 사이클로헥타디에닐, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵테닐, 사이클로헵타디에닐 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0130] 용어 "헤테로사이클릴"은 모노사이클릭, 다리 걸친(bridged) 사이클릭 또는 스피로(spiro) 사이클릭 구조의 형태로 존재할 수 있는 완전히 포화된 또는 부분 불포화된(그러나 완전 불포화된 헤테로방향족 기는 아님) 비방향족 고리를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로사이클릴은 보통 황, 산소 및/또는 질소로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 헤테로원자(바람직하게는 1 또는 2개의 헤테로원자)를 함유하는 3 내지 7원 고리이다. 헤테로사이클릴의 비제한적인 예로는 옥시라닐, 테트라하이드로푸라닐, 디하이드로푸라닐, 피롤리디닐, N-메틸 피롤리디닐, 디하이드로피롤릴, 피페리디닐, 피페라지닐, 피라졸리디닐, 4H-피라닐, 모르폴리닐, 설포모르폴리닐, 테트라하이드로티에닐 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0131] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 모노사이클릭, 다리 걸친(bridged) 사이클릭 또는 스피로(spiro) 사이클릭 구조의 형태로 존재할 수 있는 완전히 포화된 사이클릭 기를 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로사이클릴은 보통 황, 산소 및/또는 질소로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 헤테로원자(바람직하게는 1 또는 2개의 헤테로원자)를 함유하는 3 내지 7원 고리이다. 3원 헤테로사이클로알킬의 예로는 옥시라닐, 티라닐 및 아지라닐이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고; 4원 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예로는 아제티디닐, 옥세타닐 및 티에타닐이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고; 5원 헤테로사이클로알킬의 예로는 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로티에닐, 피롤리디닐, 이속사졸리디닐, 옥사졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 티아졸리디닐, 이미다졸리디닐 및 테트라하이드로피라졸릴이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고; 6원 헤테로사이클로알킬의 예로는 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 모르폴리닐, 피페라지닐, 1,4-옥사티아닐, 1,4-디옥사닐, 티오모르폴리닐, 1,3-디티아닐 및 1,4-디티아닐이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고; 7원 헤테로사이클로알킬의 예로는 아자사이클로헵타닐, 옥사사이클로헵타닐 및 티오사이클로헵타닐이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬이 바람직하다.
- [0132] 용어 "아릴"은 공액 π 전자 시스템을 갖는 모든-탄소 방향족 모노사이클릭 또는 융합된 폴리사이클릭 기를 지칭한다. 예를 들어, 아릴은 6 내지 20개의 탄소 원자, 6 내지 14개의 탄소 원자, 또는 6 내지 12개의 탄소원자를 가질 수 있다. 아릴의 비제한적인 예로는 페닐, 나프틸, 안트릴, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0133] 용어 "헤테로아릴"은 N, O 및 S로부터 선택되는 적어도 하나의 고리 원자를 포함하고, 나머지 고리 원자는 C이며, 적어도 하나의 방향족 고리를 갖는 모노사이클릭 또는 융합된 폴리사이클릭 계를 지칭한다. 바람직하게는, 헤테로아릴은 단일의 4 내지 8원 고리, 특히 5 내지 8원 고리를 갖거나, 또는 6 내지 14개의 고리 원자, 특히 6 내지 10개의 고리 원자를 포함하는 다수의 융합된 고리를 갖는다. 헤테로아릴의 비제한적인 예로는 피롤릴, 푸라닐, 티에닐, 이미다졸릴, 옥사졸릴, 피라졸릴, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 테트라졸릴, 트리아졸릴, 트리아지닐, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 인돌릴, 이소인돌릴 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0134] "유도체" : 모 화합물의 분자 내의 원자 또는 원자 기를 다른 원자 또는 원자 기로 치환하여 형성된 화합물을 모 화합물의 유도체라 지칭한다.
- [0135] 본원에 개시된 화합물 및 중간체는 서로 다른 호변체 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 모든 형태는 본 출원의 범위 내에 포함된다. 용어 "호변이성체" 또는 "호변이성체 형태"는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호전환될 수 있는 상이한 에너지의 구조적 이성체를 의미한다. 예를 들어, 양성자 호변체(양성자성 호변체로도 지칭됨)는 케토-에놀 이성질체화 및 이민-엔아민 이성질체화화 같은 양성자 전달을 통한 상호전환을 포함한다. 양성자 호변체의 구체적인 예로는 양성자가 두 고리의 질소 사이에서 이동할 수 있는 이미다졸 모이어티를 들 수 있다. 원자

가 호변체는 일부 결합 전자의 재조합을 통한 상호전환을 포함한다.

- [0136] 본원에 개시된 화합물은 비대칭일 수 있으며, 예를 들어, 하나 이상의 입체이성질체를 가질 수 있다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 입체이성질체, 예를 들어, 거울상이성질체 및 부분입체이성질체가 포함된다. 본원에 개시된 비대칭 탄소 원자를 갖는 화합물은 광학적으로 순수한 형태 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 광학적으로 순수한 형태는 라세미 혼합물로부터 분리될 수 있거나, 카이랄 원료 또는 카이랄 시약을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0137] 본원에서 표지-합성된 화합물의 임의의 원자는 구체적으로 지정되지 않는 한, 원자의 임의의 안정한 동위원소를 나타낼 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 구조 내의 위치를 H, 즉 수소(H-1)로 정의할 때, 이 위치는 자연 발생 동위원소만을 함유한다. 마찬가지로, 달리 명시되지 않는 한, 구조 내의 위치를 D, 즉 중수소(H-2)로 정의할 때, 이 위치는 자연 발생 동위원소의 양(0.015%)보다 적어도 3340배 많은 양의 동위원소를 함유하고(즉, 중수소 동위원소가 적어도 50.1%); 표지-합성된 화합물의 구조 내의 하나 이상의 위치를 D, 즉 중수소(H-2)로 정의할 때, 구조로 표시되는 화합물의 함량은 적어도 52.5%, 적어도 60%, 적어도 67.5%, 적어도 75%, 적어도 82.5%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%일 수 있다. 본원에서 표지-합성된 화합물의 중수소화비는 표지된 합성 동위원소의 함량 대 자연 발생 동위원소의 함량의 비를 의미한다. 본원에서 표지 합성된 화합물의 지정된 중수소 원자당 중수소화비는 적어도 3500배(52.5%), 적어도 4000배(60%), 적어도 4500배(67.5%), 적어도 5000배(75%), 적어도 5500배(82.5%), 적어도 6000배(90%), 적어도 6333.3배(95%), 적어도 6466.7배(97%), 적어도 6566.7배(98.5%), 적어도 6600배(99%), 또는 적어도 6633.3배(99.5%)일 수 있다. 본원에서 동위원소체(isotopologue)는 화학 구조 상 동위원소 조성만이 다른 화합물을 의미한다. 본원에서 표지-합성된 화합물은 분자의 원자 조성에 있어서 동위원소 변화만 있을 뿐 동일한 화학 구조를 갖는다. 따라서, 특정 위치에 중수소를 갖는 본 원의 표지-합성된 화합물은 또한 이 위치에 수소 동위원소체를 매우 적게 함유하고 있으며, 본원의 표지-합성된 화합물의 특정 위치에 있는 수소 동위원소체의 양은 중수소화체의 중수소 동위원소 순도(D₂O, D₂, NaBD₄, LiAlD₄ 등) 및 중수소 동위원소 도입을 위한 합성 방법의 효율성 등 많은 요인에 따라 달라진다. 다만, 앞서 언급한 바와 같이, 특정 위치에 있는 이러한 수소 동위원소체의 총량은 49.9% 미만일 것이다. 본원의 표지-합성된 화합물의 특정 위치에 있는 수소 동위원소체의 총량은 47.5%, 40%, 32.5%, 25%, 17.5%, 10%, 5%, 3%, 1%, 또는 0.5% 미만일 것이다.
- [0138] 본 발명에서 중수소로 지정되지 않은 임의의 개별 원자는 자연 동위원소 존재비로 존재한다.
- [0139] 본 명세서에서 용어 "방관자 효과"는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 절단성 또는 비-절단성 링커를 통해 접합된 세포독성 약물이 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 방출된 후 세포막을 통해 확산 및 침투하여 인접한 세포를 사멸시키는 능력을 갖는 효과를 의미한다. 세포막을 통해 확산 및 침투하는 능력은 세포독성 약물의 소수성 또는 세포독성 약물과 링커의 조합과 관련된다. 이러한 세포독성 약물은 예를 들어, 에리블린 또는 MMAE 일 수 있다. 방관자 효과는 이중 표적 발현을 갖는 중앙 및 항체 침투가 제한될 수 있는 고품 중앙에서 특히 바람직할 수 있다.
- [0140] 용어 "치료"는 질환 또는 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 개선 또는 제거하기 위하여 본원에 기재된 화합물 또는 약학적 조성물을 투여하는 것을 의미하며, 다음을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [0141] (i) 포유동물에서 질환 또는 질환 상태의 발생을 예방하는 것, 특히 이러한 포유동물이 질환 상태에 취약하지만 아직 이를 갖는 것으로 진단되지 않은 경우;
- [0142] (ii) 질환 또는 질환 상태를 억제하는 것, 즉 질환 또는 질환 상태의 진행을 저지하는 것;
- [0143] (iii) 질환 또는 질환 상태를 완화하는 것, 즉 질환 또는 질환 상태의 퇴행을 야기하는 것; 및
- [0144] (iv) 질환 또는 질환 상태의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과를 감소시키는 것.
- [0145] 용어 "치료적 유효량"은 (i) 특정 질환, 병태 또는 장애를 치료 또는 예방하는 것; (ii) 특정 질환, 병태 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화, 개선 또는 제거하는 것; 또는 (iii) 본원에 기재된 특정 질환, 병태 또는 장애의 하나 이상의 증상의 발병을 예방 또는 지연시키는 것을 목적으로 하는 본원에 개시된 화합물의 양을 의미한다. 본원에 개시된 화합물 또는 약학적 조성물의 "치료적 유효량"을 구성하는 양은 화합물 또는 약학적 조성물, 개체에서 원하는 반응을 도출하는 능력, 질환 상태 및 이의 중증도, 투여 방식, 치료할 포유동물의 연령, 성 및 체중 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 상기 유효량은 또한 당업자의 지식 및 본 개시 내용에 따라 당업자가 통상적으로 결정할 수 있다.

- [0146] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 합리적인 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 제형에 사용된다.
- [0147] 약학적으로 허용 가능한 염은, 예를 들어, 금속염, 암모늄염, 유기 염기로 형성된 염, 무기산으로 형성된 염, 유기산으로 형성된 염, 염기성 또는 산성 아미노산으로 형성된 염 등일 수 있다.
- [0148] 용어 "용매화물"은 화합물과 용매 분자의 결합에 의해 형성된 물질을 지칭한다.
- [0149] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 원하는 생물학적 활성을 보유하는 한, 온전한 단일클론 항체, 다클론 항체, 적어도 두 개의 온전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 다기능성 항체 및 항체를 포함한다.
- [0150] 용어 "인간화 항체"는 비인간 항체로부터 유래된 CDR을 포함하고, 항체 분자의 나머지는 하나 이상의 인간 항체로부터 유래한 항체를 지칭한다.
- [0151] 용어 "돌연변이"는 다음과 같이 펩티드의 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 의미한다: 하나 또는 둘 이상의 아미노산을 원래 펩티드와 다른 아미노산으로 치환, 하나 또는 둘 이상의 야생형 아미노산을 결실, 야생형에 존재하지 않는 하나 또는 둘 이상의 아미노산을 삽입, 및/또는 야생형에 존재하지 않는 아미노산을 야생형의 아미노 말단(N-말단) 및/또는 카르복시 말단(C-말단)에 부가(총칭하여 "돌연변이"라고 함). 본원에서 "삽입"은 "부가"에 포함될 수 있다.
- [0152] 용어 "CDR"(상보성 결정 영역)은 "초가변 영역"이라고도 하며, 서열이 고도로 가변적이고/이거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 천연 4-쇄 항체는 전형적으로 중쇄 가변 영역에 3개, 경쇄 가변 영역에 3개로 6개의 CDR을 포함한다.
- [0153] 용어 "가변 영역"은 항체의 경쇄 또는 중쇄의 N-말단 도메인에 의해 정의된 약 100개 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 도메인을 지칭하고, 주로 항원 인식을 담당한다. 용어 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 가변 영역(VH)은 각각 이들 경쇄 및 중쇄 도메인을 의미한다.
- [0154] 용어 "Fab"는 각각 경쇄의 불변 도메인(CL)과 중쇄의 첫번째 불변 도메인(CH1)을 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인 VL(경쇄 가변 영역) 및 VH(중쇄 가변 영역)을 함께 포함하는 것을 의미한다. 가변 도메인은 항원 결합에 관여하는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.
- [0155] 용어 "scFv"는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠에 존재한다. 일부 실시예에서, scFv는 scFv가 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있게 하는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함한다.
- [0156] 용어 "항체 모이어티"는 항체-약물 접합체에서 항체 모이어티를 지칭한다. 특정 구체적인 실시예에서, 항체 모이어티는 특정 작용기를 통해 중간 링커 모이어티에 연결되고, 항체 모이어티는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0157] 용어 "링커 모이어티"는 항체 모이어티를 세포독성 약물 모이어티에 연결하는 항체-약물 접합체의 부분을 지칭하며, 절단성이거나 비절단성일 수 있고; 절단성 링커는 표적 세포에서 절단되어 세포독성 약물을 방출할 수 있다.
- [0158] 용어 "세포독성 약물 모이어티"는 항체-약물 접합체에서 세포독성 약물 모이어티를 지칭한다. 특정 구체적인 실시예에서, 세포독성 약물 모이어티는 작용기를 통해 중간 링커 모이어티에 연결되어, 세포독성 약물 분자가 종양 세포에서 유리되어 항-종양 효과를 발휘할 수 있다.
- [0159] 용어 "트라스투주맙"(일반명칭)은 인간 표피성장인자 수용체-2(HER2)의 ECD4에 선택적으로 작용하는 재조합 인간화 단일클론 항체를 지칭하며, HER2-양성 암을 치료하는데 사용될 수 있는데, 상품명 헤르셉틴(HERCEPTIN[®])으로 시판되는 치료용 단일클론 항체 제품이 그 예이다.
- [0160] 용어 "파트리투맙"은 완전한 인간 항-HER3 단일클론 항체이고, HER3 단백질을 발현하는 암을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0161] 용어 "HER2"는 EGFR 패밀리의 두 번째 구성원으로서 티로신 키나아제 활성을 가지고 있으며, 여기서 HER2 발현 수준은 면역조직화학 분석으로 검출할 수 있는데; HER2-양성은 IHC3+를 지칭하고, HER2-음성은 IHC1+/0를 지칭

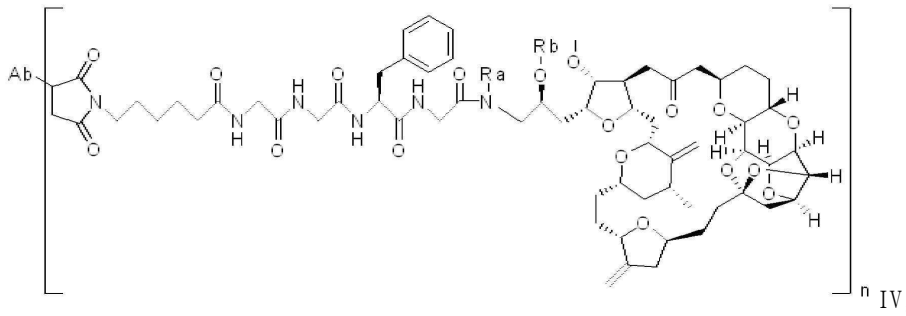
하고, IHC2+의 경우에는 추가 확인을 위해 ISH 분석을 수행해야 한다.

- [0162] 용어 "HER3" (인간 표피성장인자 수용체 3, ErbB3로도 알려짐)은 수용체 단백질 티로신 키나아제이며, 수용체 단백질 티로신 키나아제의 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 서브 패밀리에 속하며, HER1 (EGFR이라고도 함), HER2, HER4도 포함한다. HER3은 막관통 수용체로 세포의 리간드 결합 도메인(ECD), ECD 내 이량체화 도메인, 막관통 도메인, 세포내 단백질 티로신 키나아제 도메인(TKD), C-말단 인산화 도메인으로 구성되어 있다. HER3은 여러 유형의 암(예를 들어 유방암, 위장암, 췌장암)에서 과발현되는 것으로 나타났다. HER2/HER3의 발현과 비-침습적 단계로부터 침습적 단계로의 진행 사이의 상관관계가 있는 것으로 나타났다.
- [0163] 용어 "삼중-음성 유방암"이란 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 인간 표피성장인자 수용체-2의 발현이 음성인 유방암을 지칭한다.
- [0164] 용어 "EC₅₀"은 항원-결합 구조체의 최대 반응의 50%를 유도하는 유효 농도를 의미한다. EC₅₀은 ELISA 또는 FACS 분석 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0165] 용어 "동일성"이라는 용어는 일관성이라고도 한다. 아미노산 서열의 "동일성 백분율(%)"은 정렬될 서열이 본원에 제시된 특정 아미노산 서열과 정렬되는 경우, 정렬될 서열에서 본원에 제시된 특정 아미노산 서열과 동일한 아미노산 잔기의 백분율을 지칭하며, 필요한 경우, 서열 동일성의 최대 백분율을 달성하기 위해 갭(gap)을 도입하고, 서열 동일성의 일부로서 보존적 치환을 고려하지 않는다.
- [0166] 동일성을 위한 아미노산 서열의 정렬은 당업계의 기술 내에서 다양한 방식으로, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어로 수행될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 얻기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬에 적합한 파라미터를 결정할 수 있다.
- [0167] 용어 "대상체", "환자" 및 "대상체"는 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 일부 실시예에서, 용어 "대상체", "환자" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 일부 실시예에서, 대상체, 환자 또는 대상체는 마우스이다. 일부 실시예에서, 대상체, 환자 또는 대상체는 인간이다.
- [0168] 본원에서 사용되는 "약"은 특정 값에 대해 당업자에 의해 결정되는 허용 오차 범위 내에 있음을 의미하며, 이는 값이 어떻게 측정되거나 결정되는지, 즉 측정 시스템에 의한 한계에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, "약"은 당업계에서 실시되는 바와 같이, 1 이상의 표준 편차 내에 있음을 의미할 수 있다. 또는, "약"은 최대 ± 5%의 범위, 예를 들어, ± 2%, ± 1% 또는 ± 0.5%가 주어진 특정 수치 범위 내에서 변동하는 범위를 의미할 수 있다. 본 출원 또는 특허 출원의 범위에서 특정 값이 주어지는 경우, 달리 언급하지 않는 한, "약"은 그 특정 값에 대한 허용 오차 범위 내에 있음을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 본 명세서에서, 달리 언급하지 않는 한, 단계의 파라미터 또는 조건의 값은 모두 기본적으로 "약"으로 수정된다.

도면의 간단한 설명

- [0169] 도 1a 내지 1g는 DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체, 파트리투맙-DDDXd-D8 및 파트리투맙의 HER3 발현 수준이 다른 세포에 결합하는 결합 활성을 나타낸 것이다;
- 도 2a 내지 2d는 HER3 발현 수준이 다른 세포에서 DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체, 파트리투맙-DDDXd-D8, 및 파트리투맙의 세포내이입을 나타낸 것이다;
- 도 3a 내지 3i는 DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체와 파트리투맙-DDDXd-D8의 HER3 발현 수준이 다른 세포의 사멸률을 나타낸 것이다;
- 도 4는 DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체, 파트리투맙-DDDXd-D8 및 비히클 대조군의 JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 마우스의 종양 부피 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다;
- 도 5는 DAR값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체, 파트리투맙-DDDXd-D8 및 비히클 대조군의 JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 마우스의 종양 중량 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다; 및
- 도 6은 DAR값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체, 파트리투맙-DDDXd-D8 및 비히클 대조군의 JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 마우스의 체중 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용



[0181]

[0182]

[0183]

[0184]

[0185]

[0186]

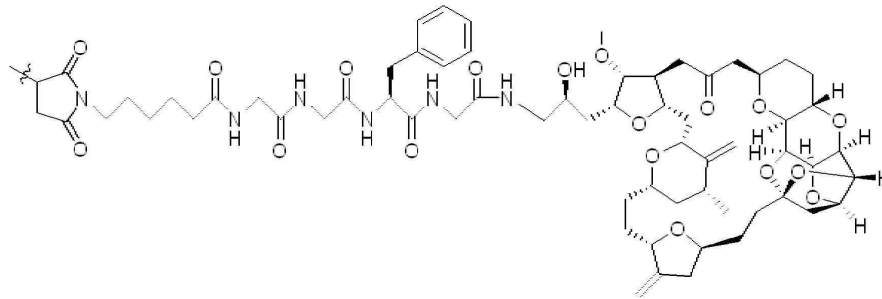
여기서,

Ab는 항체 모이어티를 나타내고, 및

n은 1 내지 10의 정수 또는 소수 중에서 선택된다.

실시예 4. 실시예 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다.

실시예 5. 실시예 1 또는 2에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항체-약물 결합체는 하기 화학식 IIIa-1의 구조를 포함한다:

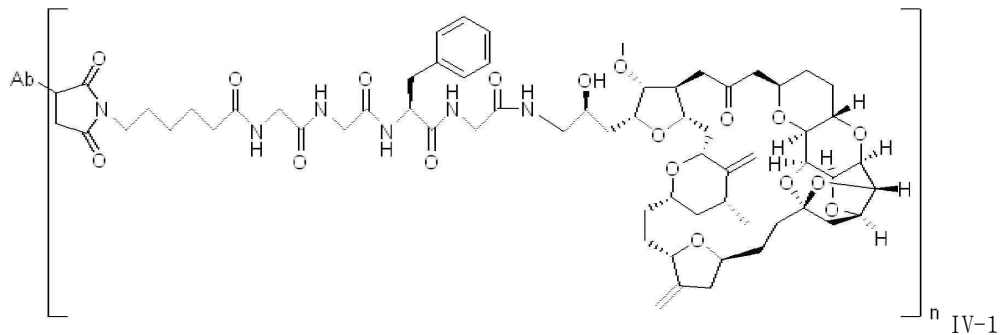


[0187]

IIIa-1.

[0188]

실시예 6. 실시예 3에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항체-약물 결합체는 하기 화학식 IV-1의 구조이다:



[0189]

[0190]

[0191]

[0192]

[0193]

실시예 7. 실시예 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 n은 2-4.8, 2.6-4.8, 3.5-4.8, 4-4.8, 2-4.5, 2.6-4.5, 3.5-4.5, 4-4.5, 3.5-4.2, 3.5-4, 4-4.2, 7-8, 7-7.9, 7-7.6, 7-7.5, 7.1-8, 7.1-7.9, 7.1-7.6, 7.5-8, 7.6-8, 또는 7.6-7.9이다.

실시예 8. 실시예 7에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 n은 약 2.6, 약 4, 약 4.2, 약 4.8, 약 7, 약 7.1, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.9, 또는 약 8이다.

실시예 9. 실시예 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 Ab는 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

실시예 10. 실시예 9에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함한다: 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함

하는 HCDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3.

[0194] 실시예 11. 실시예 10에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0195] 실시예 12. 실시예 10 또는 11에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항-HER3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄는 서열번호 10로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0196] 실시예 13. 실시예 9에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항-HER3 항체는 파트리투맙이다.

[0197] 실시예 14. 실시예 9 내지 13 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물에 있어서, 상기 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 하기 특성 중 하나 또는 여러 가지의 조합을 나타낸다:

[0198] (a) HER3에 결합하는 특성;

[0199] (b) 리간드에 대한 HER3의 결합을 차단하는 특성;

[0200] (c) HER3을 발현하는 세포에서 세포내이입을 나타내는 특성;

[0201] (d) HER3을 발현하는 종양 세포에 대한 사멸 활성을 갖는 특성; 및

[0202] (e) 방관자 효과를 갖는 특성.

[0203] 실시예 15. 실시예 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약학적 조성물에 있어서, 선택적으로, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다.

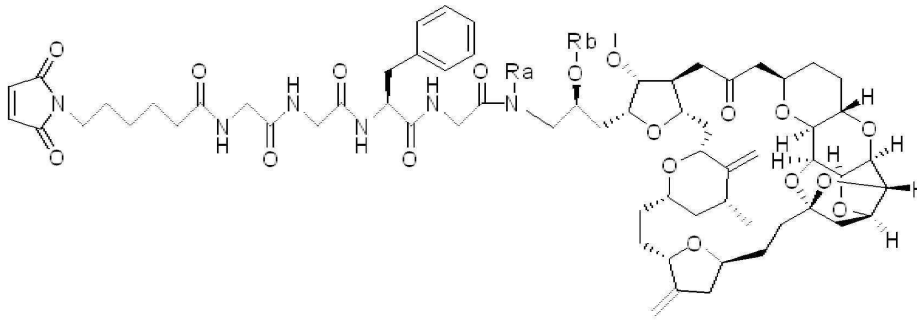
[0204] 실시예 16. 실시예 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 실시예 15에 따른 약학적 조성물의 암 치료용 약제의 제조 용도에 있어서, 바람직하게는, 상기 암은 HER3 양성 암이고; 바람직하게는, 상기 암은 담도암, 암육종, 식도암, 식도위 접합암, 유방암, 위암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁암, 흑색종, 인두암, 구강암, 피부암, 폐암, 다형성 교모세포종, 교모세포종, 요로상피암종, 전립선암, 방광암, 위장관 기질 종양, 편평세포암, 복막암, 간암, 타액선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 항문암 또는 음경암이다.

[0205] 실시예 17. 실시예 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 항체-약물 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 실시예 15에 따른 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 암은 HER3-양성 암이다.

[0206] 실시예 18. 실시예 17에 따른 암 치료 방법에 있어서, 종양 세포를 항체-약물 결합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 약학적 조성물과 접촉시켜, 상기 종양 세포를 사멸하거나 상기 종양 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다.

[0207] 실시예 19. 실시예 17 또는 18에 따른 암 치료 방법에 있어서, 상기 암은 담도암, 암육종, 식도암, 식도위 접합암, 유방암, 위암, 췌장암, 두경부암, 결장직장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁암, 흑색종, 인두암, 구강암, 피부암, 폐암, 다형성 교모세포종, 교모세포종, 요로상피암종, 전립선암, 방광암, 위장관 기질 종양, 편평세포암, 복막암, 간암, 타액선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 항문암 또는 음경암이다.

[0208] 실시예 20. 화학식 III의 구조를 가지는 링커-약물 중간체 화합물에 있어서:



III,

[0209]

[0210]

[0211]

[0212]

[0213]

[0214]

[0215]

[0216]

[0217]

[0218]

여기서,

R^a 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되고;

R^b 는 수소 원자, 중수소 원자, 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 임의로 치환된 C_{3-7} 헤테로사이클릴, 임의로 치환된 C_{6-10} 아릴, 및 임의로 치환된 C_{5-12} 헤테로아릴 중에서 선택되거나; 또는,

R^a 및 R^b 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의로 치환된 5 내지 8원 헤테로사이클릴을 형성한다.

실시예 21. 실시예 20에 따른 링커-약물 중간체 화합물에 있어서, 상기 R^a 및 R^b 는 각각 독립적으로 수소 원자, 메틸, 에틸, 프로필, 및 아이소프로필 중에서 선택된다.

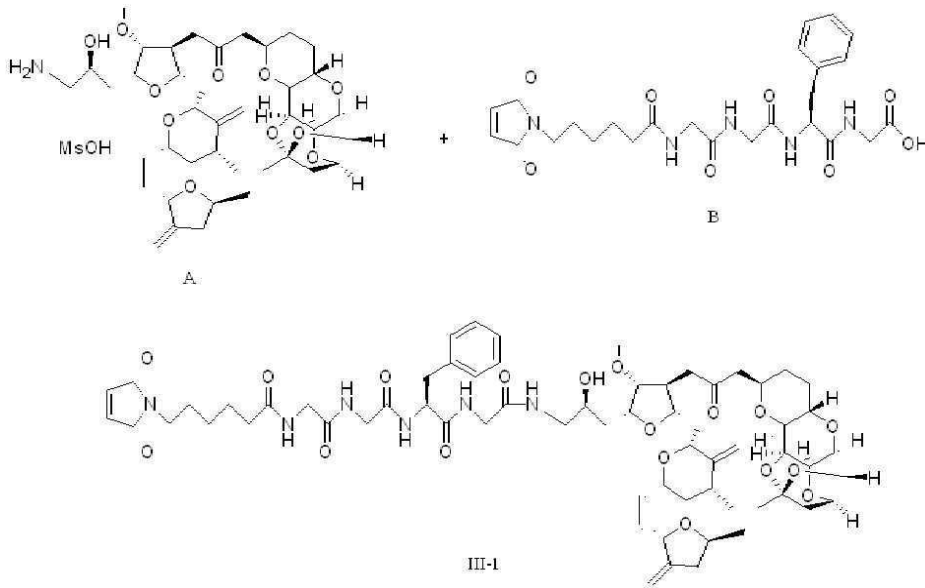
명확성을 위해, 하기 실시예를 통해 본 발명을 추가로 설명하나, 본 출원의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에 사용된 시약은 시판되고 있으며, 추가 정제 없이 사용될 수 있다.

본 출원의 실시예에서 사용된 파트리투맘은 항체에 대한 기존의 방법에 따라 제조되었는데, 즉, 발현 벡터(예를 들어 CN107001463A에 개시된 pcDNA3.1 벡터, CN109422811A 등에 개시된 pCH01.0 벡터를 포함)를 제작하여 발현을 위해 Expi-CHO 숙주 세포에 형질감염시킨 후, 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제하였고; 파트리투맘의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 각각 서열번호 9 및 10로 표시하였다. 중수소화된 MC-GGFG-DXd(MC-GGFG-DDDXd)의 합성을 위해, 특허 공개 W02022033578A1의 실시예 14의 방법을 참조한다.

본 출원의 실험예에 관련된 세포와 그 출처를 다음 표에 나타내었다:

세포	출처
NCI-N87	중국 과학원 세포 은행
BT474	중국 과학원
SKBR3	크라운 바이오 사이언스
SK-OV3	중국 과학원 세포 은행
JIMT-1	ATCC
Capan1	베이나 바이오(Beina Bio)
MCF-7	중국 과학원 세포 은행
KYSE410	상하이 야지 바이오테크놀로지 주식회사
MDA-MB-468	베이나 바이오(Beina Bio)
HCC1569	난징 코바이오어(Nanjing Cobioer)
SW620	난징 코바이오어(Nanjing Cobioer)
A549	중국 의학원, 기초의학연구원, 세포 배양 센터
WiDr	난징 코바이오어(Nanjing Cobioer)

[0219] **실험예 1: 화합물 III-1의 제조**



[0220]

[0221] 화합물 A 100 mg (0.12 mmol)과 화합물 B 75 mg (0.145 mmol)의 무게를 측정하여 20 mL 반응관에 넣고 (화합물 A CAS No.: 2413428-36-9; 화합물 B CAS No.: 441045-17-6), *N,N*-디메틸포름아미드 2 mL를 첨가하였다. 혼합물을 0° C로 냉각시킨 후, 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (0.18 mmol) 70 mg과 *N,N*-디아이소프로필에틸아민 (0.36 mmol) 49 mg을 첨가하였다. 혼합물을 0° C에서 1시간 동안 반응시키고 분취용 액체 크로마토그래피로 정제하여 약 70 mg의 화합물 III-1(MC-GGFG-에리블린)을 얻었다. 화합물 III-1은 ESI-MS로 분석한 바 1241.72[M+H]⁺의 M/z를 갖는다. 화합물 III-1의 수소 스펙트럼은 다음과 같다:

[0222]

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.22 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.99 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.30-7.21 (m, 4H), 7.18 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 5.02 (d, J = 26.0 Hz, 2H), 4.79 (d, J = 38.9 Hz, 2H), 4.65-4.60 (m, 2H), 4.56 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.50-4.42 (m, 1H), 4.26 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 4.10 (s, 3H), 4.05-3.98 (m, 1H), 3.86-3.64 (m, 8H), 3.60-3.45 (m, 4H), 3.37-3.30 (m, 2H), 3.26 (s, 4H), 3.17-3.09 (m, 1H), 3.08-2.99 (m, 2H), 2.84 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 2.86-2.66 (m, 3H), 2.56-2.50m, 1H), 2.37-2.18 (m, 5H), 2.15-2.05 (m, 3H), 2.05-1.96 (m, 2H), 1.95-1.84 (m, 4H), 1.75-1.57 (m, 6H), 1.55-1.38 (m, 6H), 1.35-1.25 (m, 3H), 1.23-1.12 (m, 3H), 1.03 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.00-0.92 (m, 1H).

[0223]

실험예 2: 항체-약물 접합체의 제조

[0224]

시약:

[0225]

용액 A: pH 7.4 PBS 완충액

[0226]

용액 B: 10 mM 수성 TCEP (트리스(2-카복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드)

[0227]

용액 C: DMSO

[0228]

용액 D: 히스티딘 완충액 (0.89 mg/mL L-히스티딘 및 4.04 mg/mL L-히스티딘 하이드로클로라이드 모노하이드레이트 함유)

[0229]

용액 E: 700 mg/mL 수크로스 용액 (용액 D로 제조)

[0230]

용액 F: 20 mg/mL Tween 80 (용액 D로 제조)

[0231]

실험 절차:

[0232]

1. 항체의 완충액 교환

[0233]

a. 용액 A를 사용하여 30KD 한외여과(ultrafiltration) 원심분리관을 완전히 적셨다;

[0234]

b. 항체를 용액 A로 완충액-교환하였다;

[0235] c. 항체 농도를 조정하기 위해 적정량의 용액 A를 첨가하였다.

[0236] 2. 항체 환원

[0237] a. 항체의 몰 중량을 계산하여 N1로 기록하였다;

[0238] b. 반응 시스템에서 TCEP의 몰 중량이 N2가 되도록 항체 용액에 적정량의 용액 B를 첨가하였다;

[0239] c. 한외여과 원심분리관을 알루미늄 호일로 감싸고 회전배양기에 놓고, 저속(20rpm)으로 흔들고 37° C 어두운 곳에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0240] 3. 접합

[0241] a. 최종 농도를 10 mg/mL로 맞추기 위해 적정량의 링커-페이로드를 DMSO에 녹인다;

[0242] b. 항체 농도를 5%로 맞추기 위해 항체 용액에 DMSO를 첨가한 후, 몰 중량을 N3으로 맞추기 위해 적정량의 링커-페이로드 용액을 첨가하였다;

[0243] c. 한외여과 원심분리관을 알루미늄 호일로 감싸고 회전배양기에 놓고 저속(20rpm)으로 흔들고 22° C 어두운 곳에서 1.5시간 동안 반응시켰다.

[0244] 4. 접합 종료

[0245] a. 한외여과 원심분리관을 용액 D를 사용하여 적셨다;

[0246] b. 항체를 용액 D로 완충액-교환하고, 적정량의 용액 E와 용액 F를 첨가하여 -80° C에서 동결 보존하였다.

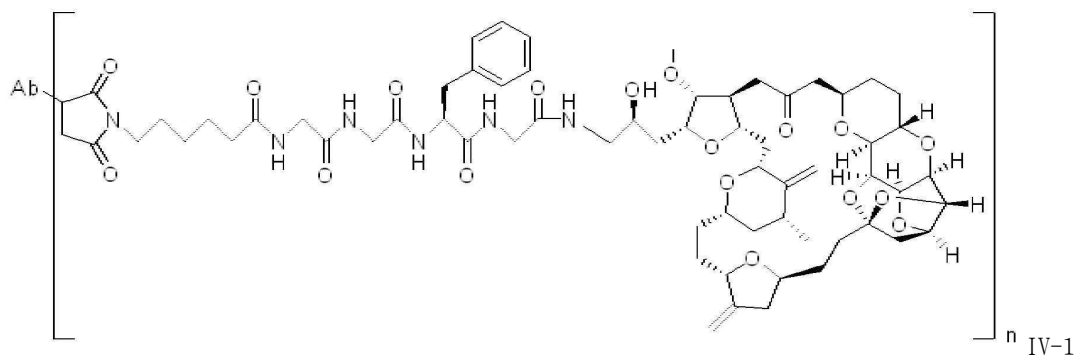
[0247] **항체-약물 접합체의 DAR 값(항체 분자당 연결된 약물의 평균 개수)의 측정**

[0248] DAR 값은 LC-MS 방법으로 측정하였다. ADC 시료 50 µg을 글리코시다제 PNGase F(RHINO BIO, China) 1 µL에 넣고, 상기 혼합물을 37° C에서 20시간 동안 배양하였다. 실험에 사용된 질량분석기는 고해상도 Xevo G2-XS(Waters, USA)였다. 시료의 농도를 5 µM로 맞추고 질량 스펙트럼 데이터는 직접 샘플링 방법을 채택하여 양이온 모드로 수집하였다. 수집된 비-변성 질량 스펙트럼 데이터를 소프트웨어 UNIFI 1.8.2.169(Waters, USA)를 이용하여 분석 및 처리하였다.

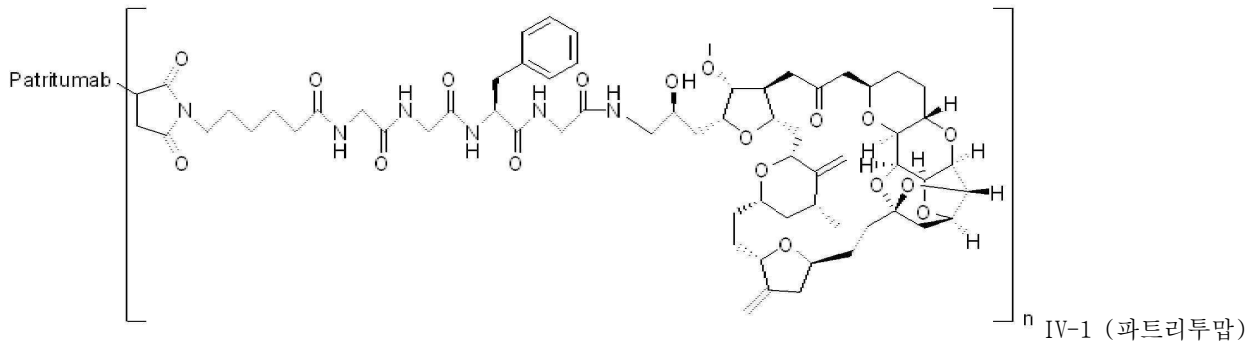
[0249] **항체-약물 접합체 단백질 농도의 측정**

[0250] 단백질 농도는 로우리(Lowry) 방법으로 검출하였다. OD₆₅₀ 파장의 시료의 흡광도 값을 마이크로플레이트 리더를 이용하여 검출하고, 표준 곡선을 맞추고 시료의 흡광도 값을 표준 곡선으로 각각 치환하여, 단백질 농도를 계산하였다.

[0251] 상기 방법에 따라 화학식 IV-1(IV-1(파트리투맷) 포함)의 항체-약물 접합체와 화학식 IV 시리즈의 다른 항체-약물 접합체를 제조하였다:



[0252]



[0253]

[0254]

[0255]

[0256]

[0257]

[0258]

[0259]

[0260]

[0261]

[0262]

[0263]

[0264]

[0265]

[0266]

[0267]

[0268]

시료 1 (DAR=4.8, 단백질 농도=1.71mg/mL)과 시료 2(DAR=7.1, 단백질 농도=1.65mg/mL)를 따로 제조하였다.

실험예 3: 소분자 세포독성 화합물과 항체-약물 접합체의 세포 생존율

소분자 세포독성 화합물을 배지로 35,000 ng/mL-0.0896 ng/mL로 희석하여, 9개의 농도점을 얻었다. 로그 성장 단계의 종양 세포를 수집하여 밀도를 1×10^5 세포/mL로 맞추고, 웰당 100 μ L로 도포하고 세포가 없는 공백 웰을 대조군으로 설정하였다. 상기 연속 희석한 시료를 웰당 50 μ L씩 첨가하였다. 플레이트를 37° C의 인큐베이터에서 5일 동안 5% CO₂와 함께 배양하였다. 배양액을 버리고 CCK-8(Dojindo, 일본, Cat.No: CCK04) 작업액을 웰당 100 μ L씩 첨가하였다. 플레이트는 발색을 위해 4-5시간 동안 배양하였고 마이크로플레이트 리더기(제조사: Thermo, 모델: VarioskanFlash)에 놓았다. 450nm의 파장에서의 흡광도 값을 630nm의 참조 파장을 사용하여 읽고 기록하였다. 종양 세포에 대한 증식 억제율을 계산하였다.

항체-약물 접합체를 배지로 5000 ng/mL-0.0128 ng/mL로 희석하여, 9개의 농도점을 얻었다. 로그 성장 단계의 종양 세포를 수집하여 밀도를 2×10^4 세포/mL로 맞추고, 웰당 100 μ L로 도포하고 세포가 없는 공백 웰을 대조군으로 설정하였다. 상기 연속 희석한 시료를 웰당 50 μ L씩 첨가하였다. 플레이트를 37° C의 인큐베이터에서 5% CO₂와 함께 배양하였다. 배양액을 버리고 CTG-검출배지(Promega, Cat No: G7572)를 웰당 100 μ L씩 첨가하였고, 플레이트는 발색을 위해 10분 동안 배양하였고 마이크로플레이트 리더기(제조사: Thermo, 모델: VarioskanFlash)에 놓고 화학 발광 값을 읽었다. 종양 세포에 대한 증식 억제율을 계산하였다.

IV-1(파트리투맵)의 세포 활성:

세포주	EC ₅₀ (nM)	
	DAR=4.8	DAR=7.1
MCF-7	0.08	0.05
BT474	0.07	0.04
SKBR3	0.17	0.08

실험예 4: 항체-약물 접합체의 제조

시약:

용액 G: 히스티딘/히스티딘 하이드로클로라이드 완충액(1.43 mg/mL L-히스티딘, 2.27 mg/mL L-히스티딘 하이드로클로라이드 모노하이드레이트);

용액 H: 10 mM 수성 TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드);

용액 I: DMSO(디메틸 설포사이드);

용액 J: 500 mg/mL 수크로스 용액 (용액 G로 제조);

용액 K: 30 mg/mL Tween 80 (용액 G로 제조);

용액 L: 10% DMSO를 함유하는 용액 G;

용액 M: 0.3 M Na₂HPO₄;

- [0269] 항체: 파트리투맵;
- [0270] 링커-페이로드(링커-약물 중간체 화합물): 예시 1에서 화학식 III-1의 구조를 갖는 화합물인, MC-GGFG-에리블린(파트리투맵-에리블린 접합체의 제조에 사용됨); MC-GGFG-DDDXd(파트리투맵-DDDXd 접합체의 제조에 사용됨).
- [0271] (1) DAR이 2.6 또는 7.6인 파트리투맵-에리블린 접합체를 다음과 같은 실험 절차에 따라 분리하여 제조하며, 각각 파트리투맵-에리블린-D2 및 파트리투맵-에리블린-D8로 명명하였고; DAR이 7.9인 파트리투맵-DDDXd 접합체를 다음과 같은 실험 절차에 따라 제조하여 파트리투맵-DDDXd-D8로 명명하였다:
- [0272] **실험 절차**
- [0273] 1. 항체의 완충액 교환:
- [0274] 용액 G를 사용하여 30 KD 한외여과 원심분리관을 완전히 적셨고, 항체를 용액 G로 완충액-교환하고, 항체의 농도를 10 mg/mL로 조정하기 위해 적정량의 용액 G를 첨가하였고; 항체 용액의 pH를 약 7.0으로 조정하기 위해 적정량의 용액 M을 첨가하였다.
- [0275] 2. 항체 환원:
- [0276] 항체의 몰 중량을 계산하여 N1로 기록하였고; 반응 시스템에서 TCEP의 몰 중량이 N2가 되도록 항체 용액에 적정량의 용액 H를 첨가하였고; 생성된 혼합물을 37° C 어두운 곳에서 1시간 동안 흔들어 항체의 이황화 결합을 환원시켜 반응 용액 1을 얻었다.
- [0277] 3. 링커-약물 중간체 화합물에 대한 항체의 접합:
- [0278] 최종 농도를 10 mg/mL로 맞추기 위해 적정량의 링커-페이로드를 50% 아세톤 수용액에 녹인 후, 용액 I을 반응 용액 1(용액 I: 반응 용액 1(v/v) = 1:10)에 첨가하여 잘 혼합한 후, 링커-페이로드의 몰 중량을 N3으로 맞추기 위해 아세톤 수용액에 녹인 상기 링커-페이로드 용액을 적정량 첨가하고; 22° C 어두운 곳에서 1시간 동안 반응 혼합물을 흔들어 반응 용액 2를 얻었다.
- [0279] 4. 접합 종료:
- [0280] 용액 L을 사용하여 한외여과 원심분리관을 적셨다; 반응 용액 2에 20배 부피의 용액 L과 20배 부피의 용액 G를 연속적으로 사용하여 한외여과를 실시하고, 적정량의 용액 J와 용액 K를 첨가하여 -80° C에서 동결 보존하였다.
- [0281] 실험 조건 및 그룹은 하기 표 1-1에 나타내었다.
- [0282] 표 1-1. 실험 조건 및 그룹

ADC	항체	링커-페이로드	N1:N2	N1:N3
파트리투맵-D2	파트리투맵	MC-GGFG-에리블린	1:2	1:3
파트리투맵-에리블린-D8	파트리투맵	MC-GGFG-에리블린	1:8.5	1:10.5
파트리투맵-DDDXd-D8	파트리투맵	MC-GGFG-DDDXd	1:8.5	1:10.5

- [0283]
- [0284] (2) DAR이 4.0-4.2인 파트리투맵-에리블린 접합체를 다음과 같은 실험 절차에 따라 제조하여 파트리투맵-에리블린-D4로 명명하였다:
- [0285] **실험 절차:**
- [0286] 1. 항체의 완충액 교환:
- [0287] 용액 G를 이용하여 30 KD 한외여과 원심분리관을 완전히 적셨고, 항체를 용액 G로 완충액-교환하고, 항체의 농도를 10 mg/mL로 조정하기 위해 적정량의 용액 G를 첨가하였고; 항체 용액의 pH를 약 7.0으로 조정하기 위해 적정량의 용액 M을 첨가하였다.
- [0288] 2. 항체 환원:
- [0289] 항체의 몰 중량을 계산하여 N1로 기록하였고; 반응 시스템에서 TCEP의 몰 중량이 N2가 되도록 항체 용액에 적정량의 용액 H를 첨가하였고; 생성된 혼합물을 5-10° C 어두운 곳에서 6시간 동안 반응시켜 항체의 이황화 결합을 환원시켜 반응 용액 3을 얻었다.

[0290] 3. 링커-약물 중간체 화합물에 대한 항체의 접합:

[0291] 최종 농도를 10 mg/mL로 맞추기 위해 적정량의 링커-페이로드를 50% 아세톤 수용액에 녹인 후, 링커-페이로드의 몰 중량을 N3으로 맞추기 위해 아세톤 수용액에 녹인 상기 링커-페이로드 용액을 반응 용액 3에 적정량 첨가하고; 5-10° C 어두운 곳에서 40분 동안 반응 혼합물을 반응시켜 반응 용액 4를 얻었다.

[0292] 4. 접합 종료:

[0293] 용액 L을 이용하여 한외여과 원심분리관을 적셨다; 반응 용액 4에 20배 부피의 용액 L과 20배 부피의 용액 G를 연속적으로 사용하여 한외여과를 실시하고, 적정량의 용액 J와 용액 K를 첨가하여 -80° C에서 동결 보존하였다.

[0294] 실험 조건 및 그룹은 하기 표 1-2에 나타내었다.

[0295] 표 1-2. 실험 조건 및 그룹

ADC	항체	링커-페이로드	N1:N2	N1:N3
파트리투맵-에리블린 -D4	파트리투맵	MC-GGFG-에리블린	1:2.58	1:5.1

[0296]

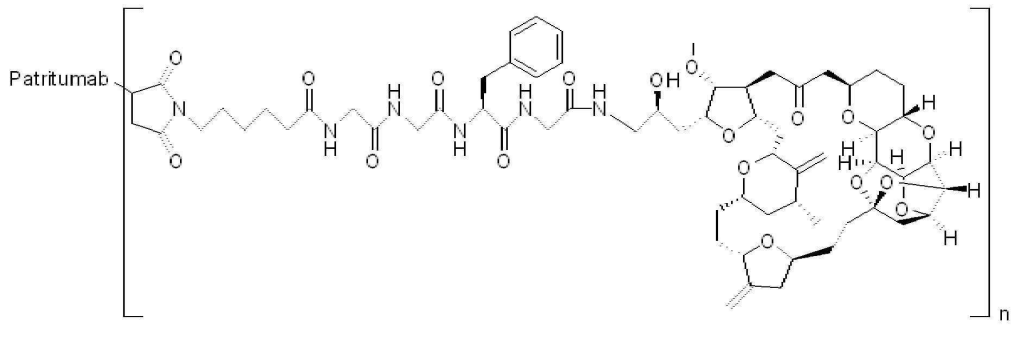
[0297] **실험예 5: 항체-약물 접합체의 DAR 값의 측정**

[0298] 상기 실험예 4에서 제조된 파트리투맵-에리블린 접합체의 성분은 부틸-결합 비다공성 폴리스티렌/디바이닐벤젠 (PS/DVB) 패키징을 사용하여 분리하였다. 중성 고-염 이동상을 사용하여 단백질 분자의 소수성 특성을 개선하여, 크로마토그래피 컬럼에서 소수성 결합을 가능하게 한 후, 염 농도를 점차적으로 낮추고 아이소프로판올의 비율을 점차적으로 높여 용출시켰는데, 소수성이 적은 성분이 먼저 용출되고 소수성이 많은 성분이 나중에 용출되었다.

[0299] 크로마토그래피 컬럼의 사양은 Sepax HIC-Butyl, 4.6×100mm, 5µm, 컬럼 온도는 25° C였다. 이동상 A는 pH 7.0에서 10mM 인산 완충 식염수-1.5M 황산 암모늄(무수 인산 수소 이나트륨 1.42g, 황산 암모늄 198.21g의 무게를 측정하여, 약 800mL의 초순수에 첨가하고, 교반하여 완전히 녹인 후, 인산으로 pH를 7.0±0.1로 조정하고, 부피를 1L로 만들고, 혼합물을 잘 혼합하여 0.22µM 여과막을 통해 여과하였다)이다. 이동상 B는 pH 7.0에서 10mM 인산 완충 식염수(무수 인산 수소 이나트륨 1.42g의 무게를 측정하여, 약 800mL의 초순수에 첨가하고, 교반하여 완전히 녹인 후, 인산으로 pH를 7.0±0.1로 조정하고, 부피를 1L로 만들고, 혼합물을 잘 혼합하여 0.22µM 여과막을 통해 여과하였다)이다. 이동상 C는 100% 아이소프로판올이다. 유속은 0.5mL/min으로 기울기 (gradient) 용출을 30분 동안 실시하였으며, 이동상의 파라미터는 다음과 같았다: 이동상 A 75% + 이동상 B 25%에서 이동상 B 75% + 이동상 C 25% 까지 0-15분, 이동상 B 75% + 이동상 C 25% 까지 15-20분, 이동상 A 75% + 이동상 B 25% 까지 20-30분. 파트리투맵-에리블린 접합체는 0분에 초기 이동상을 2배 희석하여 시험액을 얻고, 파트리투맵-에리블린 접합체의 농도에 따라 적재 부피를 조정하여 50µg의 단백질을 적재하였다. 280nm 파장에서 흡광도 값을 검출하였다.

[0300] 데이터를 처리하고, 면적 정규화 방법을 이용하여 결과를 정량 분석하였다. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8개의 세포독성 약물을 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율을 별도로 계산하고, DAR 값을 계산하였다. 계산식은 다음과 같다: DAR 값 = (세포독성 약물 0개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 0 + 세포독성 약물 1개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 1 + 세포독성 약물 2개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 2 + 세포독성 약물 3개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 3 + 세포독성 약물 4개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 4 + 세포독성 약물 5개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 5 + 세포독성 약물 6개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 6 + 세포독성 약물 7개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 7 + 세포독성 약물 8개를 포함하는 ADC 피크 면적의 백분율 × 8)/100%.

[0301] 파트리투맵-에리블린 접합체는 각각 실험예 4 와 5의 방법으로 제조하여 분석하였고, 하기와 같은 구조를 가졌으며:



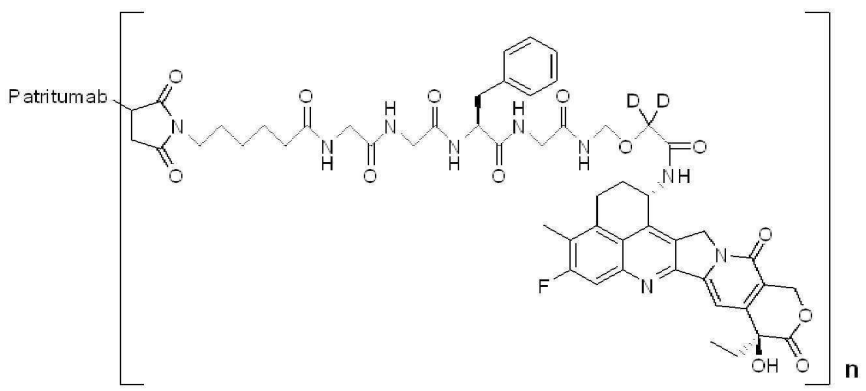
[0302]

[0303]

여기서, 파트리투맵-에리블린-D2의 측정된 DAR 값은 2.6이었고, 파트리투맵-에리블린-D4의 측정된 DAR 값은 4-4.2이었고, 파트리투맵-에리블린-D8의 측정된 DAR 값은 7.6이었다.

[0304]

파트리투맵-DDXd-D8은 각각 실험에 4와 5의 방법으로 각각 제조하여 분석하였고, 하기와 같은 구조를 가졌으며:



[0305]

[0306]

여기서, 측정된 DAR 값은 7.9이었다.

[0307]

실험예 6: 항체-약물 접합체에 대한 응집 확인

[0308]

상기 실험예 4에서 제조된 파트리투맵-약물 접합체의 성분을 겔 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 분리하였다. 이동상으로 10% 아이소프로판올을 함유한 중성 완충액을 사용하여 용출을 실시하였으며, 성분은 분자량에 따라 내림차순으로 용출하였다. 사용된 겔 크로마토그래피 컬럼은 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column 200Å, 1.7 μ×300mm, 컬럼 온도는 25° C였다. 이동상은 pH 7.0에서 50mM 인산 완충 식염수-200mM 염화나트륨-10% 아이소프로판올(12.53g의 인산 수소 이나트륨 도데카하이드레이트, 2.33g의 인산 이수소 나트륨 디하이드레이트, 11.69g의 염화나트륨의 무게를 측정하여, 약 800mL의 초순수에 첨가하고, 교반하여 완전히 녹인 후, 초순수를 첨가하여 용액을 위해 부피를 1000mL로 만들고, 상기 용액에 아이소프로판올 100mL를 첨가하여 부피를 1000mL로 만들고, 혼합물을 잘 혼합하여 0.22 μm 여과막을 통해 여과하였다)이었다. 파트리투맵-약물 접합체 20 μg의 무게를 측정하여, 액체 크로마토그래피에 주입하고 280 nm 파장에서 검출하였다. 유속은 0.3mL/min으로 등용매(isocratic) 용출을 15분 동안 실시하였다.

[0309]

데이터를 처리하고 면적 정규화 방법을 이용하여 결과를 정량적으로 분석하였다. 응집체, 면역글로불린 단량체, 저분자량 불순물에 대한 피크 면적 백분율을 계산하였다. 응집체 피크는 면역글로불린 단량체를 나타내는 주요 피크 앞에 나타났으며, 저분자량 불순물 피크는 주요 피크 뒤에 나타났다. 파트리투맵-약물 접합체의 단량체, 응집체, 저분자량 불순물의 함량 백분율을 표 2에 나타내었다.

[0310] 표-2. 파트리투맵-약물 접합체의 단량체, 응집체, 저분자량 불순물의 함량

명칭	파트리투맵-에리블린-D2	파트리투맵-에리블린-D4	파트리투맵-에리블린-D8	파트리투맵-DDDXd-D8
응집체	0.29%	0.52%	0%	0.95%
단량체	98.36%	97.85%	97.44%	97.55%
저분자량 단편	1.35%	1.62%	2.56%	1.5%

[0311]

[0312] **실험예 7: 항체-약물 접합체의 세포 결합 활성**

[0313] FACS 방법을 기반으로 파트리투맵-DDDXd-D8과 파트리투맵을 대조군으로 사용하여, 실험예 4에서 제조한 파트리투맵-에리블린 접합체의 HER3 발현 수준이 높은 MCF-7, HCC1569, BT474 세포, HER3 발현 수준이 중간인 MDA-MB-468, JIMT-1 세포, HER3 발현 수준이 낮은 SW620 세포, HER3-음성 A549 세포를 포함하는 HER3 발현 수준이 다른 세포들과의 결합 활성을 분석하였다.

[0314] 96-웰 세포 배양 플레이트의 각 웰에 1×10^5 개의 세포를 첨가하고, FACS 완충액(Miltenyi Biotec, Cat No: 130-091-221)를 이용하여 파트리투맵-에리블린 접합체를 각각 135.14 nM(4배 희석, 9 농도 기울기)의 초기 농도로 희석하였다. 세포를 4° C에서 60분간 배양한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 미리 냉각된 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후, 1:200(v/v)로 희석된 염소 항-인간 IgG-Fc γ 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, Cat. No: 109-116-170)를 100 μ l/웰로 첨가한 후, 4° C에서 30분간 배양하였다. 세포를 미리 냉각된 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후 PBS(pH 7.4) 100 μ l에 재현탁한 후, 유세포 분석기(Sartorius, iQUE)를 이용하여 형광 신호를 분석하고 검출하였다. 파트리투맵-에리블린 접합체 및 상기 세포 각각에 대한 대조군의 결합 활성은 염색의 평균 형광 강도(MFI)로 측정하였다. 데이터는 GraphPad Prism5를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 1a 내지 1g에 나타냈고, 계산된 EC₅₀ 값은 하기 표 3에 나타내었다. 상기 결과는 DAR 값이 다른 파트리투맵-에리블린 접합체의 HER3의 발현 수준이 높은, 중간인, 낮은 세포와의 결합 활성은 파트리투맵의 결합 활성과 동일하고, 파트리투맵-에리블린 접합체는 HER3-음성 A549 세포와 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

[0315] 표 3 .파트리투맵-에리블린 접합체의 HER3 발현 수준이 다른 세포와의 결합 활성

	EC ₅₀ (nM)					
	MCF-7	BT474	HCC1569	MDA-MB-468	JIMT-1	SW620
파트리투맵-에리블린-D2	0.8554	3.049	1.416	1.564	1.588	1.888
파트리투맵-에리블린-D4	0.9318	2.776	1.486	1.671	1.04	1.28
파트리투맵-에리블린-D8	1.019	2.854	1.487	3.307	1.729	1.744
파트리투맵-DDDXd-D8	0.7703	2.68	1.164	1.7	1.304	1.37
파트리투맵	0.807	3.017	*	1.299	1.515	1.465

*: 검출되지 않음.

[0316]

[0317] **실험예 8: 항체-약물 접합체의 세포내이입 분석**

[0318] FACS 방법을 기반으로 파트리투맵-DDDXd-D8과 파트리투맵을 대조군으로 사용하여, 상기 실험예 4에서 제조한 파트리투맵-에리블린 접합체를 HER3 발현 수준이 높은 MCF-7, BT474 세포, HER3 발현 수준이 중간인 NCI-N87 세포, HER3 발현 수준이 낮은 SW620 세포를 포함하는 HER3 발현 수준이 다른 세포에서의 세포내이입에 대해 분석하였다.

[0319] 세포 밀도를 1×10^6 세포/ml로 조정하고 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 50 μ l/웰로 첨가하였다. 시료 준비: 파트리투맙-에리블린 접합체를 각각 20 μ g/ml 농도로 희석하여 S1로 표지한 후, 3배 기울기 희석하여 9개의 시료 S1-S9를 얻었다; 기울기 희석 후 얻어진 시료 용액을 세포 배양 플레이트에 50 μ l/웰로 첨가하고, 혼합물을 4° C에서 30분간 배양하였다. 배양 후, 96-웰 세포 배양 플레이트를 꺼내어 4° C에서 4분간 400 g로 원심분리한 후, 상층액을 버렸다. 1:200(v/v)로 희석된 pHrodo™ Green Maleimide(녹색 말레이미드; Invitrogen, Cat. No: P35370)-표지된 AffiniPure 염소 항-인간 IgG, Fc γ 단편 특이적(염소 항-인간 IgG; Fc 단편 특이적 항체, Jackson Immuno, Cat. No: 109-005-190)을 50 μ l/웰로 첨가하고 4° C에서 배양하였다. 30분 후, 세포를 세척한 후, 세포 배양 배지를 50 μ l/웰로 첨가하였다. 혼합물을 잘 섞고, 37° C에서 2시간 동안 내재화 후 유세포 분석기(Sartorius, iQUE)에 넣어 BL1 채널의 형광 관독 값을 측정하였다. 데이터는 GraphPad Prism5를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 2a 내지 2d에 나타내었고, 계산된 EC₅₀ 값은 하기 표 4에 나타내었다. 결과는 DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체는 HER3 발현 수준이 높은, 중간인 세포에서 유의미한 세포내이입을 보이며, 발현 수준이 낮은 SW620 세포에서는 세포내이입이 상대적으로 약하다는 것을 보여준다.

[0320] 표 4. HER3 발현 수준이 다른 세포에서 파트리투맙-에리블린 접합체의 세포내이입

	EC ₅₀ (nM)		
	MCF-7	BT474	NCI-N87
파트리투맙-에리블린 -D2	0.5801	1.07	4.495
파트리투맙-에리블린 -D4	0.7968	0.9615	4.721
파트리투맙-에리블린 -D8	1.255	0.9306	9.463
파트리투맙-DDDXd-D8	0.869	0.8587	56.82
파트리투맙	0.5088	0.8208	~4.479E18

[0321]

[0322] **실험예 9: 항체-약물 접합체의 세포 사멸 활성**

[0323] 상기 실험예 4에서 제조된 파트리투맙-에리블린 접합체의 종양 세포에 대한 증식 억제 효과를 시험하고자, 사멸 활성 분석을 위해 HER3 발현 수준이 높은 BT474, MCF-7, HCC1569 세포, HER3 발현 수준이 중간인 SKBR3, NCI-N87, JIMT-1, MDA-MB-468 세포, HER3 발현 수준이 낮은 SW620, WiDr 세포를 포함하는 HER3 발현 수준이 다른 세포들을 사용했고, 파트리투맙-DDDXd-D8을 대조군으로 사용하였다.

[0324] 로그 성장 단계의 세포를 96-웰 플레이트에 100 μ l/웰로 넣고 세포 밀도는 1×10^4 /ml 또는 2×10^4 /ml로 하였다. 부착성 배양은 37° C와 5% CO₂에서 밤새 수행하였다. 시료 준비: 파트리투맙-에리블린 접합체를 각각 10% FBS(5 μ g/mL의 초기 농도, 5배 기울기 희석, 9 구배)를 함유한 기본 배지를 이용하여 시험 시료로 제형화하였다. 밤새 부착성 배양을 받은 세포를 꺼냈다. 실험군의 경우, 희석된 시험시료를 50 μ l/웰로 첨가하고, 대조군의 경우, 10% FBS가 포함된 기초배지를 50 μ l/웰로 첨가하였다. 이후 96h, 120h, 또는 144h 동안 배양한 후 CellTiter-Glo Luminescent Cell kit(Promega, Cat No: G7572)를 이용하여 분석하였다. 96-웰 플레이트를 꺼내어, CTG 검출 용액(Promega, Cat No: G7572)을 75 μ L/웰로 넣고, 혼합물을 흔들어 잘 섞고 상은 어두운 곳에서 10분 동안 배양하였다. 이후 각 웰로부터 180 μ l의 용액을 피펫팅하여 불투명한 백색 플레이트로 옮기고 기포를 제거하고 화학 발광 값을 읽고 사멸율을 계산하였다.

[0325] 사멸율(%) = (1 - 실험군의 화학 발광 값/대조군의 화학 발광 값) × 100%.

[0326] 데이터는 Graphpad Prism5를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 3a 내지 3i에 나타내었고, 계산된 EC₅₀ 값을 하기 표 5-1과 5-2에 나타내었다. 결과는 HER3 발현 수준이 높은, 중간인, 낮은 세포의 경우, DAR 값이 클수록 파트리투맙-에리블린 접합체의 사멸 활성이 강하고, DAR 값이 다른 파트리투맙-에리블린 접합체의 사멸 활성이 파트리투맙-DDDXd-D8보다 우수함을 보여준다.

[0327] 표 5-1. HER3 발현 수준이 높은 세포에 대한 파트리투맙-에리블린 접합체의 사멸 활성

	EC ₅₀ (nM)		
	BT474	MCF-7	HCC1569
파트리투맙-에리블린-D2	9.345E-02	1.173	3.600
파트리투맙-에리블린-D4	3.982E-02	9.942E-02	7.780E-01
파트리투맙-에리블린-D8	1.807E-02	3.613E-02	2.457E-01
파트리투맙-DDDXd-D8	1.045E+01	/	1.829E+01

[0328]

[0329] 표 5-2. HER3 발현 수준이 중간인 세포에 대한 파트리투맙-에리블린 접합체의 사멸 활성

	EC ₅₀ (nM)			
	SKBR3	NCI-N87	JIMT-1	MDA-MB-468
파트리투맙-에리블린-D2	1.937E-01	/	1.047E+01	1.209E+01
파트리투맙-에리블린-D4	4.299E-02	1.386E+01	3.266E+00	1.413E+00
파트리투맙-에리블린-D8	2.319E-02	6.905E-01	9.462E-01	3.206E-01
파트리투맙-DDDXd-D8	5.785E+01	3.709E-01	/	/

[0330]

[0331] **실험예 10. JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 항체-약물 접합체의 약동학적 평가**

[0332] 상기 실험예 4에서 제조된 파트리투맙-에리블린 접합체의 생체 내(*in vivo*) 효능은 트라스투주맙-내성 세포주인, JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델을 통해 평가하였다.

[0333] SPF-등급 암컷 누드 마우스(창저우 카벤스 연구소 동물 주식회사로부터)를 마우스당 우측 겨드랑이에 2×10^6 개의 JIMT-1 세포를 피하 접종하였다. 평균 종양 부피가 100-300 mm³에 도달했을 때, 동물을 6마리씩 5개 군으로 나누고, 구체적인 군 분류 및 투여 방식을 표 6에 나타내었다.

[0334] 표 6. 군 분류 및 투여 방식

군	약물	투여 (mg/kg)	투여 경로	투여 주기
1	비히클 대조군	N/A	꼬리 정맥 주사	Q1W
2	파트리투맙-DDDXd-D8	3	꼬리 정맥 주사	Q1W
3	파트리투맙-에리블린-D2	3	꼬리 정맥 주사	Q1W
4	파트리투맙-에리블린-D4	3	꼬리 정맥 주사	Q1W
5	파트리투맙-에리블린-D8	3	꼬리 정맥 주사	Q1W

Q1W: 매주 1회.

[0335]

[0336] 군 분류일은 d0이고, 군 분류 후 d1일에 꼬리 정맥 투여를 실시하였다. 종양 부피는 일주일에 2-3회 측정하였으며, 한편, 마우스의 체중을 측정하여 기록하였으며; 매일 마우스의 일반적인 행동을 관찰하고 기록하였다. 실험이 완료된 후, 종양을 제거하고, 체중을 측정하고, 촬영하였다.

[0337] 검출 지표는 다음을 포함한다:

[0338] 종양 부피 $TV(mm^3) = 1/2 \times (a \times b^2)$, (여기서, a는 장경, b는 단경);

[0339] 상대 종양 부피 $RTV = TV_t / TV_0$, 여기서 TV_0 는 d0에서의 종양 부피, TV_t 는 각 측정에서의 종양 부피;

[0340] 상대 종양 증식률 $T/C(\%) = (T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$, 여기서 T_{RTV} 는 치료군의 RTV, C_{RTV} 는 대조군의 RTV;

[0341] 종양 성장 억제율: $1 - T/C$;

[0342] 종양 억제율 $TGI(\%) = (1 - TW / TW_0) \times 100\%$, 여기서 TW는 치료군의 종양 중량, TW_0 는 대조군의 종양 중량;

[0343] 체중 변화율 $WCR(\%) = (Wt_t - Wt_0)/Wt_0 \times 100\%$, 여기서 Wt_0 는 d0에서의 동물의 체중, Wt_t 는 각 측정에서의 동물의 체중.

[0344] 각 약물이 마우스의 종양 부피, 종양 중량 및 체중에 미치는 영향을 도 4 내지 6에 나타내었으며, 검출 지표의 결과를 하기 표 7에 나타내었다. 실험이 d21에서 끝났을 때, 동물이 사망하지 않았고, 각 치료군의 마우스의 체중 증가는 모델군의 체중 증가와 동등하며, 약물은 유의한 독성 효과를 나타내지 못하고 안전성이 좋았다. DAR 값이 다른 파트리투맵-에리블린 접합체는 생체 내(*in vivo*) 종양 증식 억제 활성이 우수하며, 파트리투맵-에리블린의 DAR 값이 클수록, 생체 내(*in vivo*) 종양 증식 억제 활성이 강하다.

[0345] 표 7. JIMT-1 인간 유방암 세포의 누드 마우스 이종이식 종양 모델에서 파트리투맵-에리블린 접합체의 종양 억제 효과

군	종양 성장 억제율 1 - T/C	종양 억제율 TGI
2	24.4%	26.6%
3	36.6%	41.1%
4	65.9%	68.9%
5	82.9%	84.3%

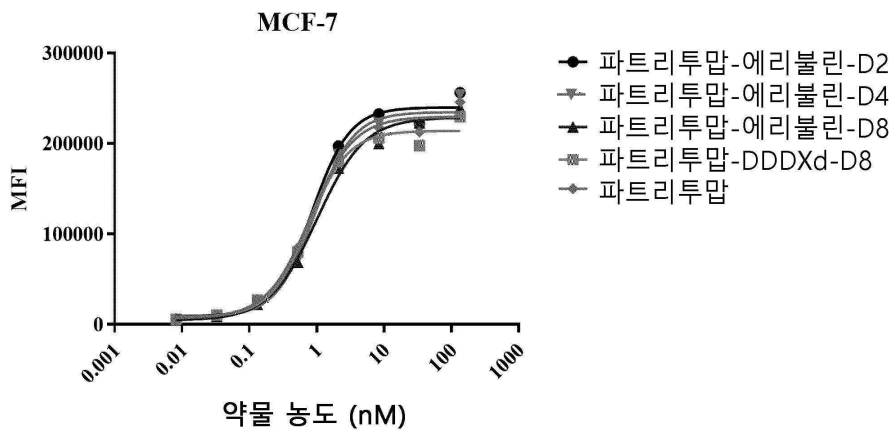
[0346]

[0347] 본 발명의 내용에 따르면, 본 발명의 방법은 바람직한 실시예의 측면에서 설명되었다. 그러나, 당업자라면 본 발명의 개념, 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 명세서에 기재된 방법 및 단계 또는 단계의 순서에 변경을 적용할 수 있다.

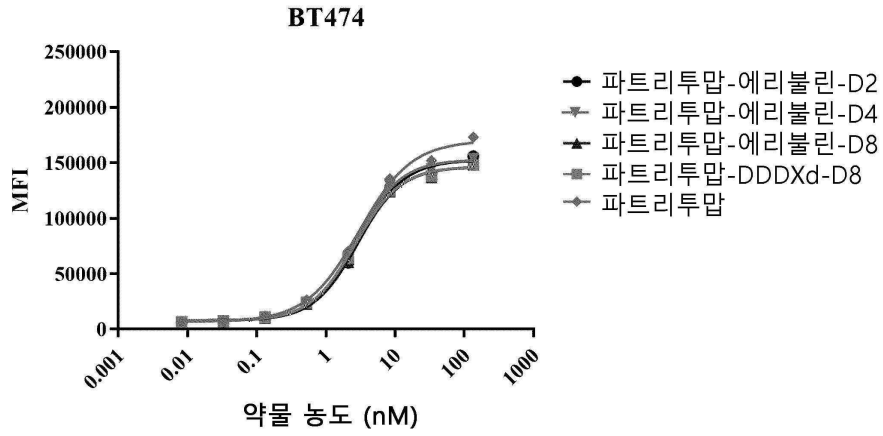
[0348] 여기에 인용된 모든 문헌의 개시 내용은 여기에 기술된 내용을 보완하는 예시, 절차 및 추가 세부 사항을 제공하는 범위 내에서 참조용으로 포함된다.

도면

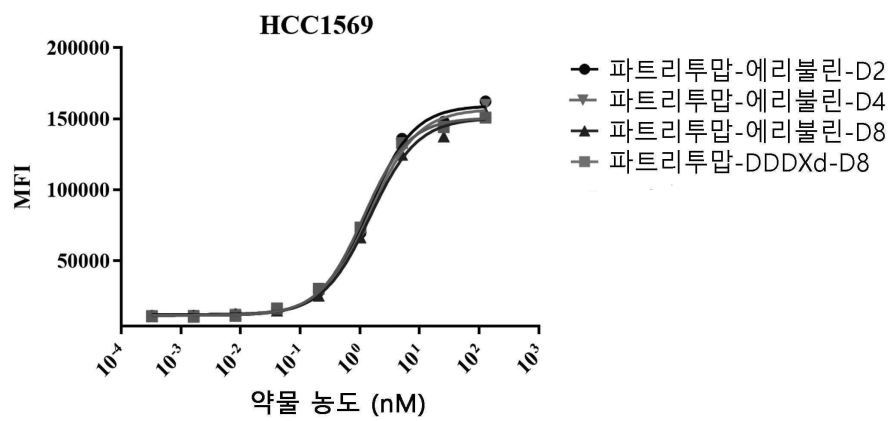
도면1a



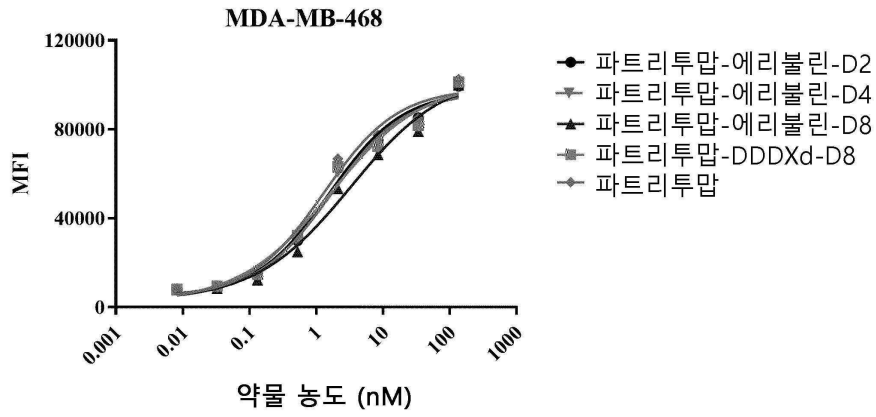
도면1b



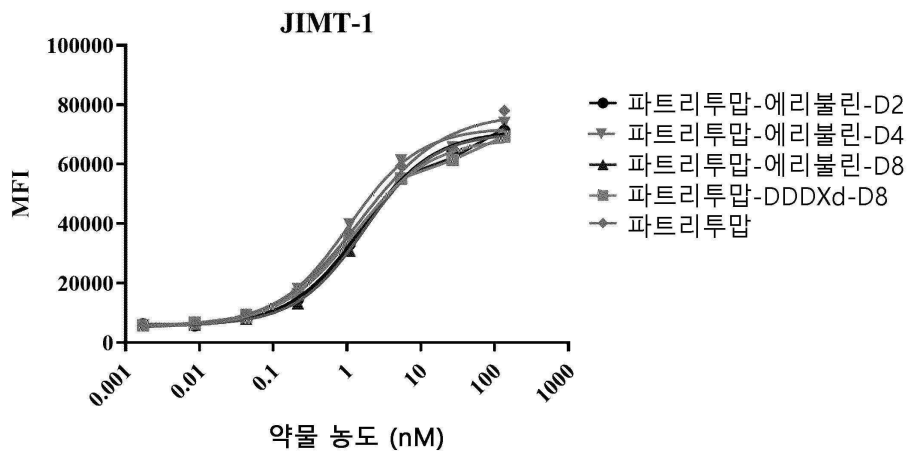
도면1c



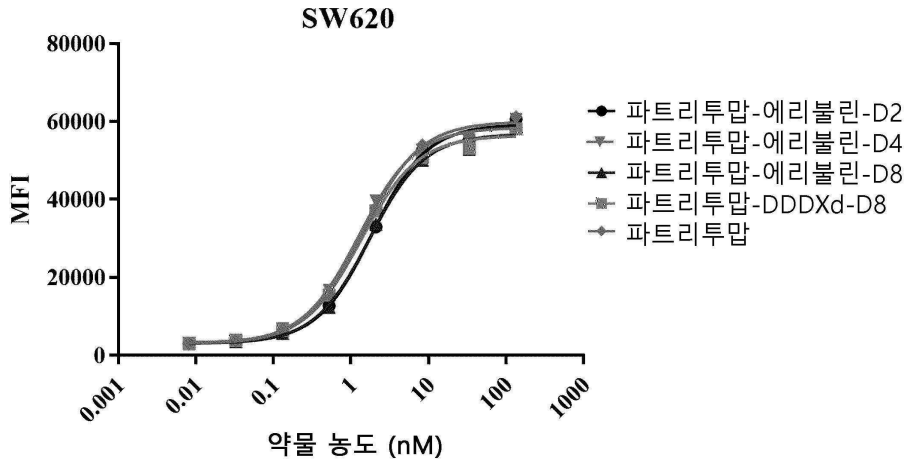
도면1d



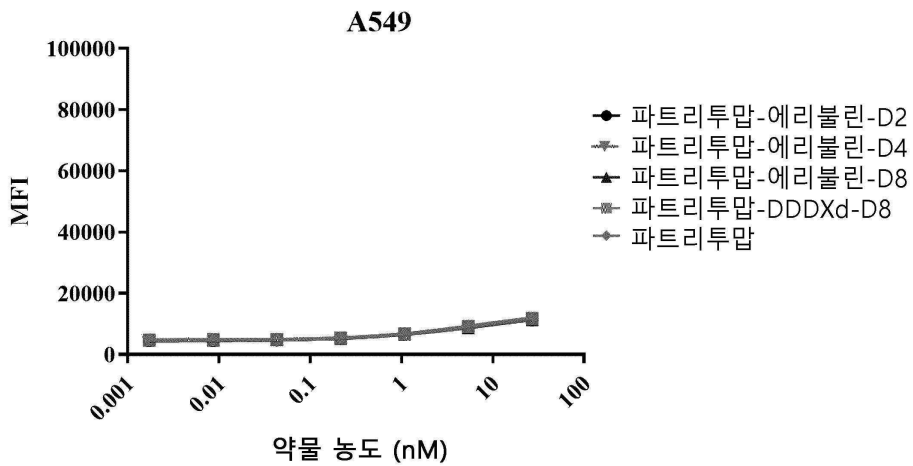
도면1e



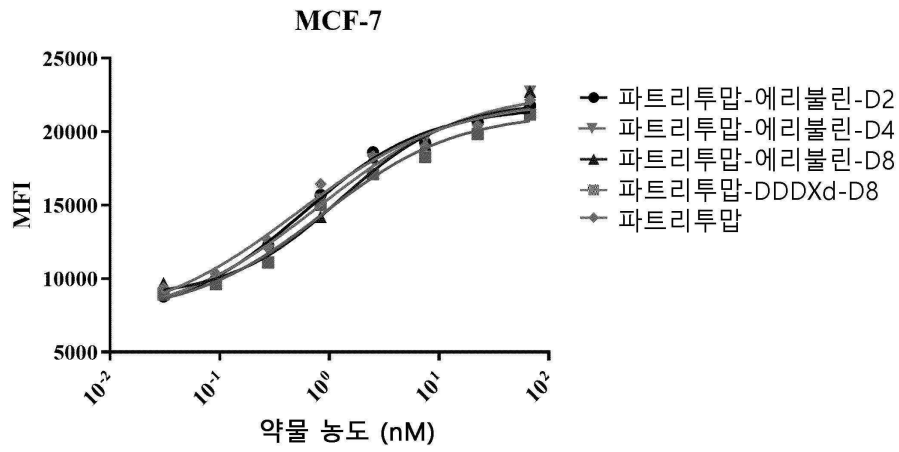
도면1f



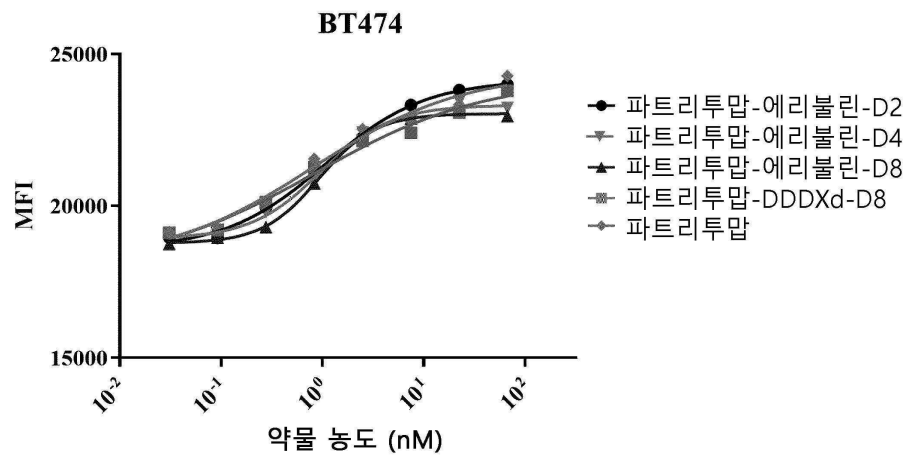
도면1g



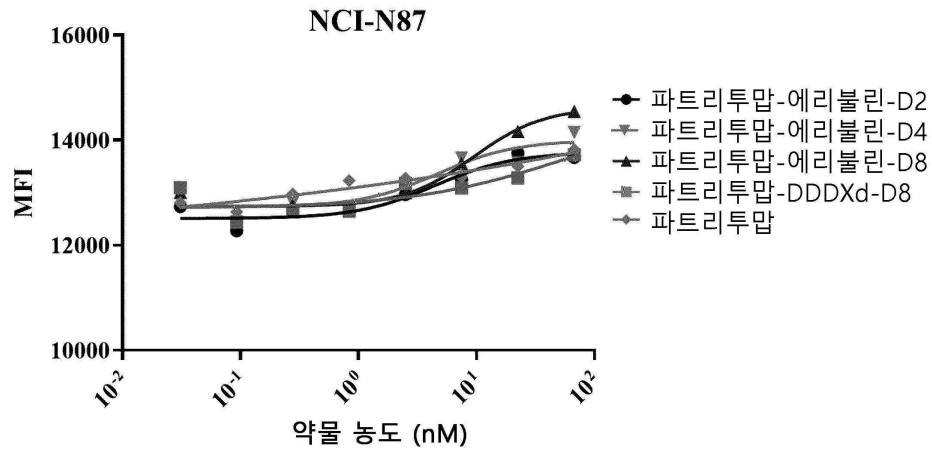
도면2a



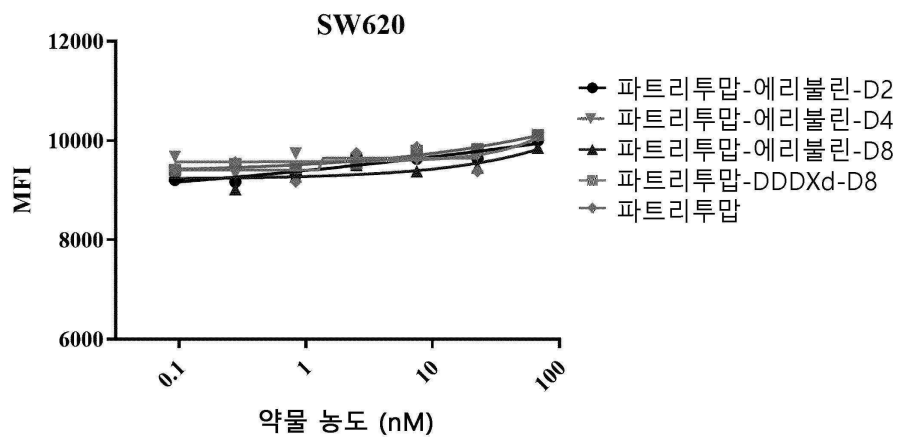
도면2b



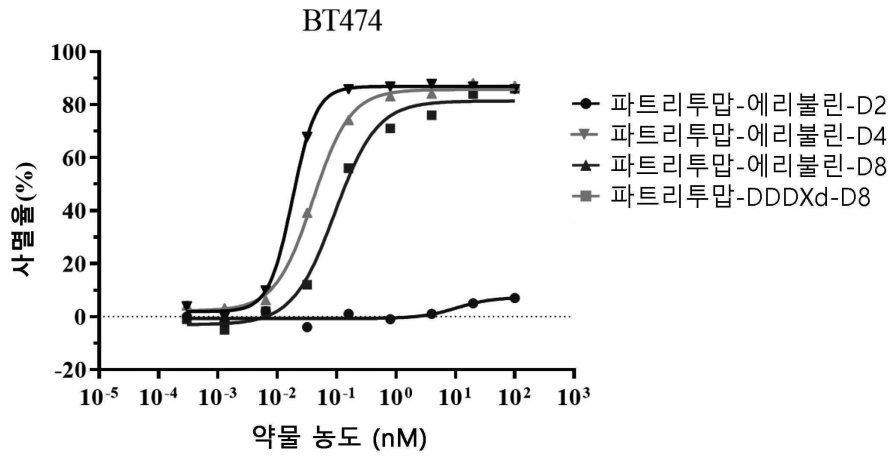
도면2c



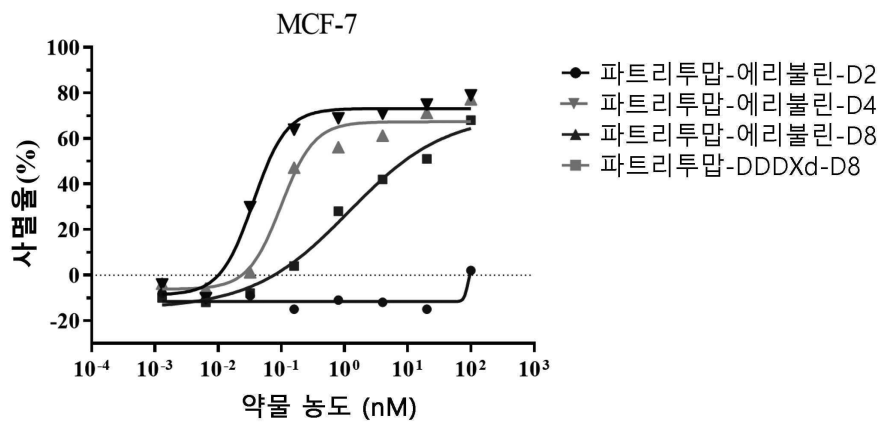
도면2d



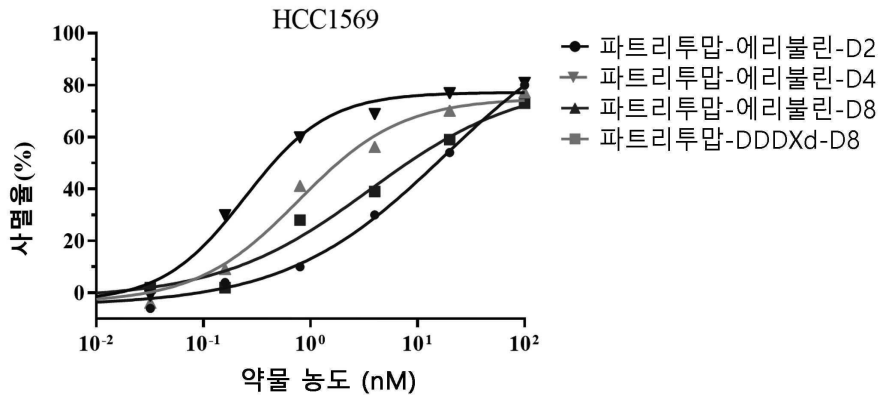
도면3a



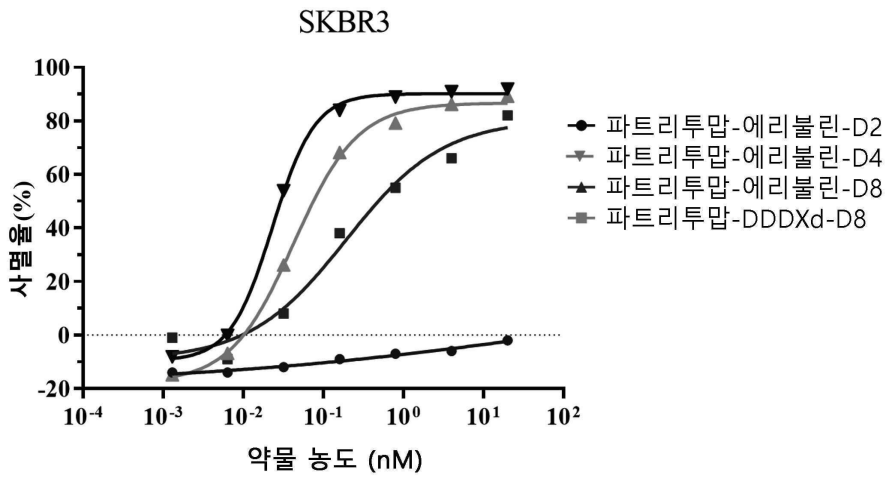
도면3b



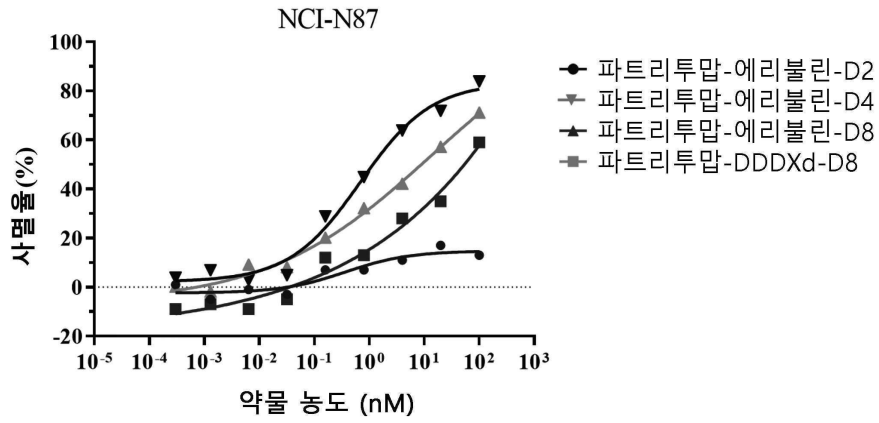
도면3c



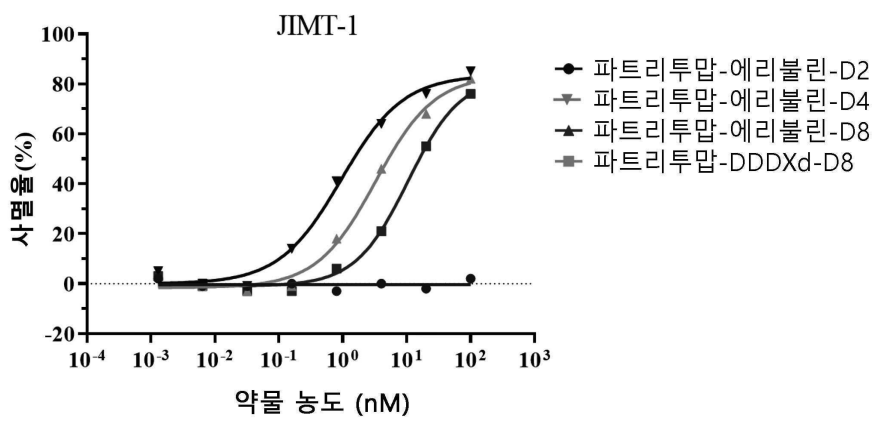
도면3d



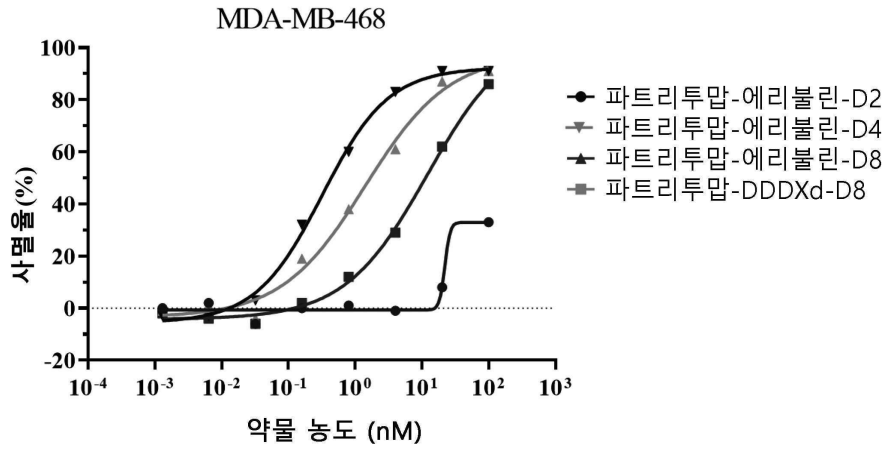
도면3e



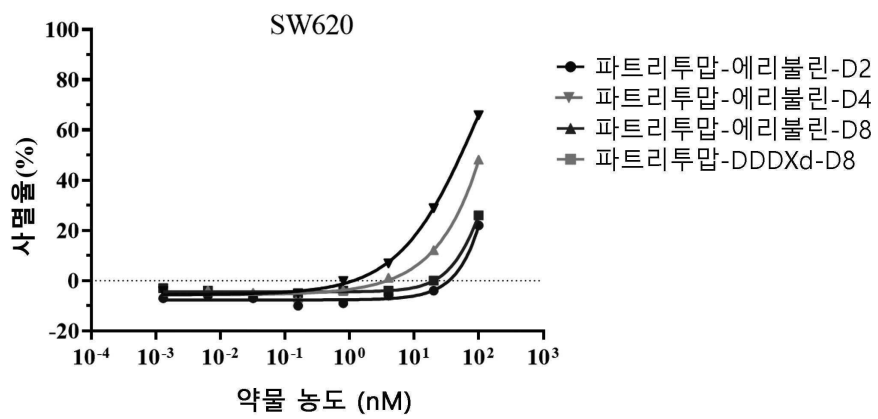
도면3f



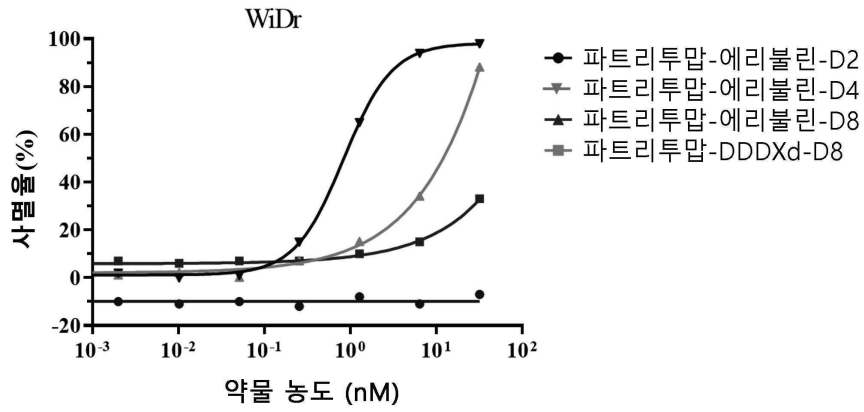
도면3g



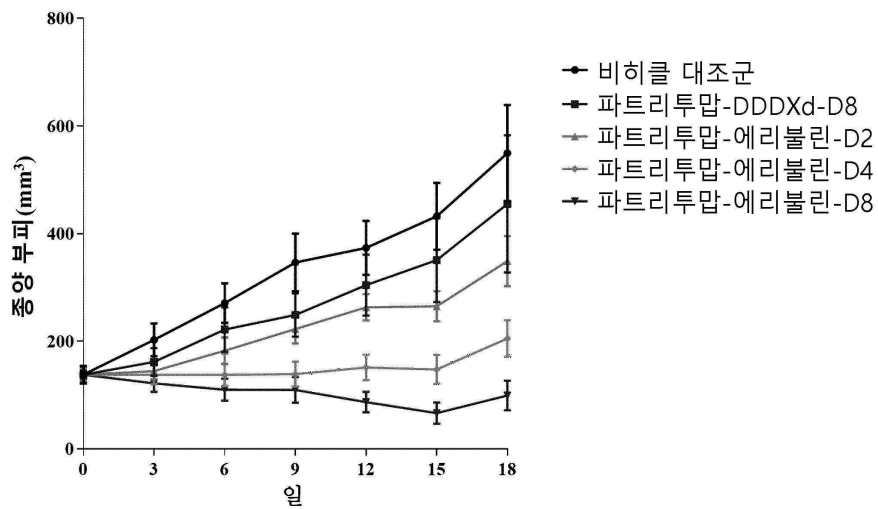
도면3h



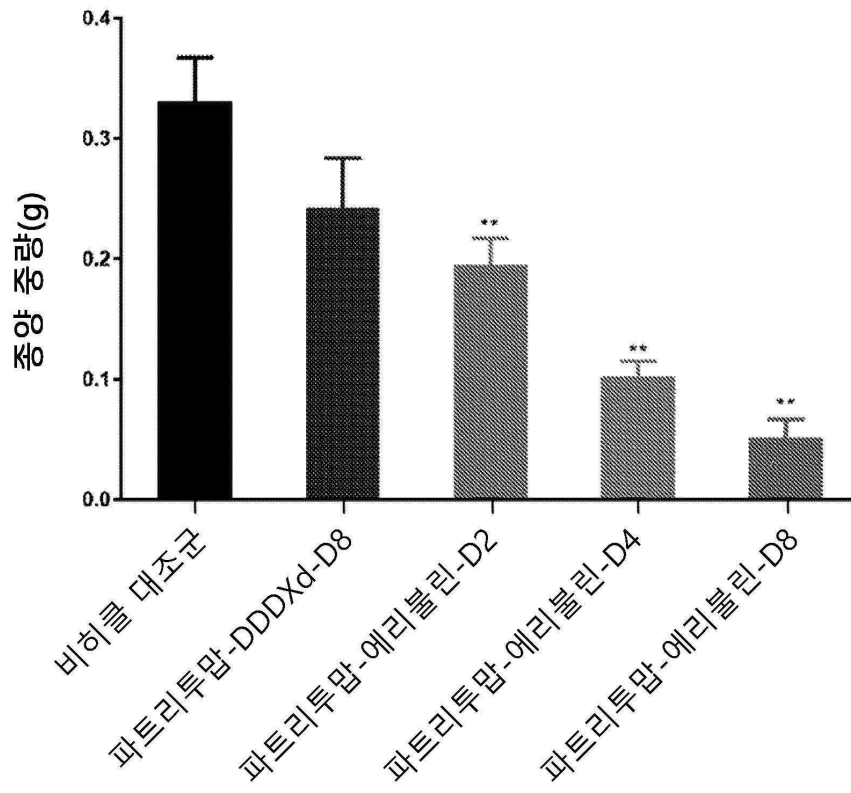
도면3i



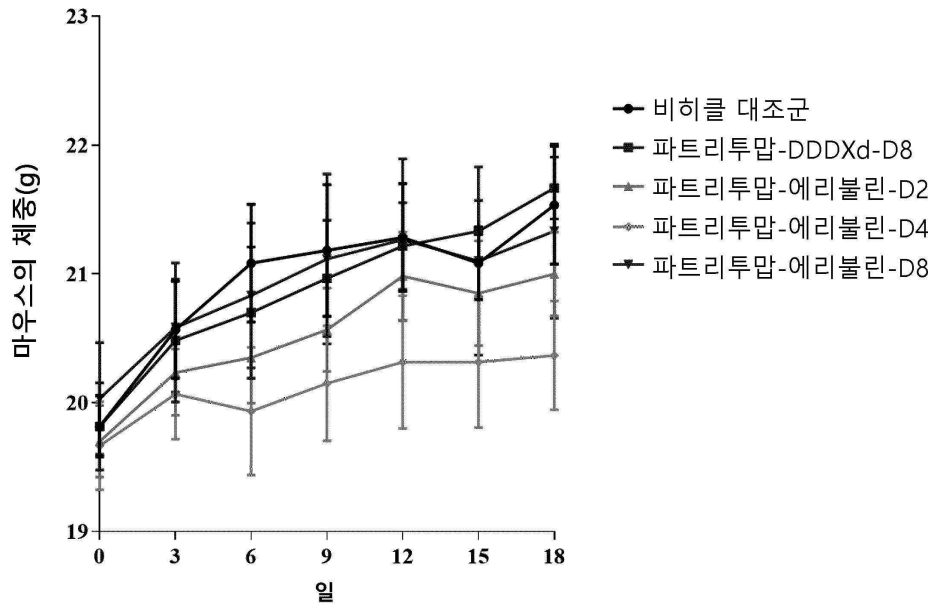
도면4



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.