



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0125970
(43) 공개일자 2024년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 51/1093 (2020.05)
A61K 51/103 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2024-7024103
(22) 출원일자(국제) 2022년12월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/082021
(87) 국제공개번호 WO 2023/122588
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
63/291,910 2021년12월20일 미국(US)

(71) 출원인
퓨전 파마슈티칼즈 인크.
캐나다 엘8피 0에이6 온타리오주 해밀턴 롱우드
로드 사우쓰 270
아스트라제네카 유케이 리미티드
영국 씨비2 0에이에이 캄브릿지 캄브릿지 바이오
메디칼 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1
(72) 발명자
아그헤브리안, 사다프
캐나다 엠8브이0에이9 온타리오 이토비코 리전 로
드 15
그린슈타인, 나탈리
미국 98021 워싱턴 보셀 212쓰 플레이스 에스이
3630
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

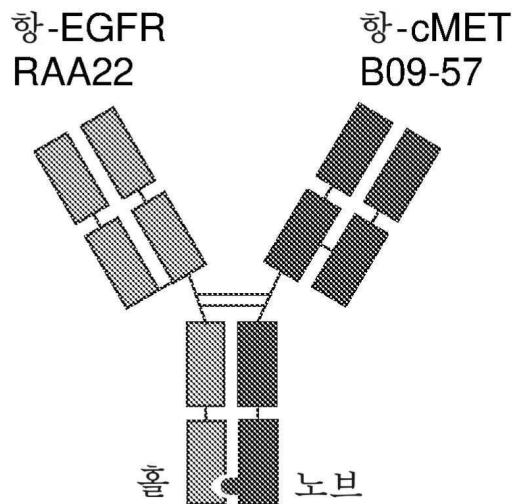
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 EGFR-cMET-표적화 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체, 링커, 및 EGFR과 cMET 둘 모두를 표적화하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 화합물, 예를 들어 방사성면역콘주게이트가 개시된다. 이러한 화합물의 제약 조성물 및 이러한 화합물 또는 제약 조성물을 사용한 병태, 예를 들어 암의 치료 방법이 개시된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 51/109 (2020.05)
A61K 51/1096 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)

(72) 발명자

더피, 이언, 알.

캐나다 엘6엠 0브이2 온타리오 오크빌 엘렌 데이비슨 드라이브 268

코스텔닉, 토마스, 아이.

캐나다 엘8엘 4에스4 온타리오 해밀턴 캐서린 스트리트 엔 199

뷰캐넌, 앤드류, 그리어

영국 씨비21 6지에이치 케임브리지 그랜타 파크 밀스타인 빌딩

마조, 야리브

미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨이

카스투리랑간, 스리나스

미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨이
두, 쿤

미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨이
양, 처닝

미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨이
커머, 프랭크, 어바인

미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨이

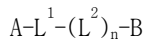
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 구조를 포함하는 화합물, 또는 이의 제약상 허용가능한 염:

[화학식 I]



[여기서,

A는 킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체이고;

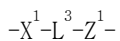
B는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

L^1 은 결합, C=O, C=S, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이고;

n은 1 내지 5의 정수(종점 포함)이고;

L^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식 II:

[화학식 II]



의 구조를 갖고,

여기서,

X^1 은 $-C(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)-$ *, $-C(S)NR^1-$ *, $-NR^1C(S)-$ *, $-OC(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)O-$ *, $-NR^1C(O)NR^1-$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-$ *, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-$ *, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-$ *, $-O-$, 또는 $-NR^1-$ (여기서, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)이고;

L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 알킬 또는 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬이고;

Z^1 은 $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$, 또는 $-NR^2-#$ (여기서, "#"은 B에 대한 부착점을 나타내고, R^2 는 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)이고,

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,

제1 항원 결합 도메인은

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

서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

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

ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

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

를 포함함].

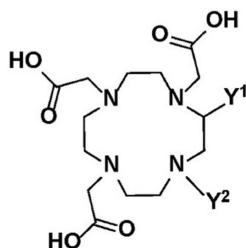
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 킬레이팅 모이어티는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산, DOTAM(1,4,7,10-테트라키스(카르바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸), DOTPA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라 프로피온산), DO3AM-아세트산(2-(4,7,10-트리스(2-아미노-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)아세트산), DOTA-GA 무수물(2,2',2''-(10-(2,6-디옥소테트라히드로-2H-피란-3-일)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-트리일)트리아세트산), DOTP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스폰산)), DOTMP(1,4,6,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라메틸렌 포스폰산), DOTA-4AMP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(아세트아미도-메틸렌포스폰산)), CB-TE2A(1,4,8,11-테트라아자바이시클로[6.6.2]헥사데칸-4,11-디아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산), NOTP(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리(메틸렌 포스폰산)), TETPA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라프로피온산), TETA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라 아세트산), HEHA(1,4,7,10,13,16-헥사아자시클로헥사데칸-1,4,7,10,13,16-헥사아세트산), PEPA(1,4,7,10,13-펜타아자시클로펜타데칸-N,N',N'',N''',N''''-펜타아세트산), H₄octapa(N,N'-비스(6-카르복시-2-피리딜메틸)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산), H₂dedpa(1,2-[[6-(카르복시)-피리딘-2-일]-메틸아미노]에탄), H₆phospa(N,N'-(메틸렌포스포네이트)-N,N'-[6-(메톡시카르보닐)피리딘-2-일]-메틸-1,2-디아미노에탄), TTHA(트리에틸렌테트라민-N,N,N',N'',N''',N''''-헥사아세트산), DO2P(테트라아자시클로도데칸 디메탄포스폰산), HP-DO3A(히드록시프로필테트라아자시클로도데칸트리아세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), 테페록사민, DTPA(디에틸렌트리아민펜타아세트산), DTPA-BMA(디에틸렌트리아민펜타아세트산-비스메틸아미드), 및 포르피린으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서, 하기 화학식 I-a로 표시되거나, 또는 이의 금속 복합체인, 화합물:

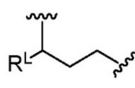
[화학식 I-a]



(여기서, Y¹은 -CH₂OCH₂(L²)_n-B, -C(O)(L²)_n-B, 또는 -C(S)(L²)_n-B이고 Y²는 -CH₂CO₂H이거나; 또는

Y¹은 H이고 Y²는 L¹-(L²)_n-B임).

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, L^1 은  이고, R^L 은 수소 또는 $-CO_2H$ 인, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

금속 복합체는 Bi, Pb, Y, Mn, Cr, Fe, Co, Zn, Ni, Tc, In, Ga, Cu, Re, 란탄족 원소 및 악티늄족 원소로 이루어진 군으로부터 선택되는 금속을 포함하거나; 또는

금속 복합체는 ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{99m}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{117m}Sn , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , 및 ^{229}Th 로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성핵종을 포함하는, 화합물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, Y^1 은 H인, 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X^1 은 $-C(O)NR^1-*$ 또는 $-NR^1C(O)-*$ 이고, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 H인, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Z^1 은 $-CH_2-$ 인, 화합물.

청구항 9

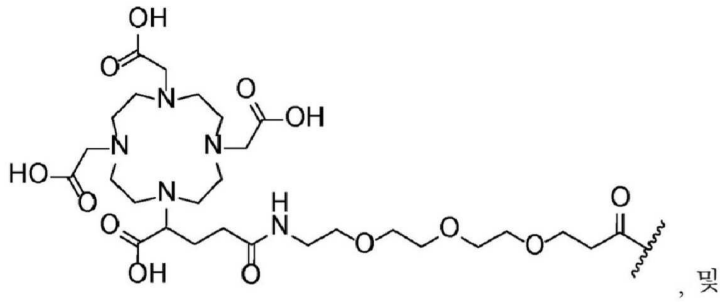
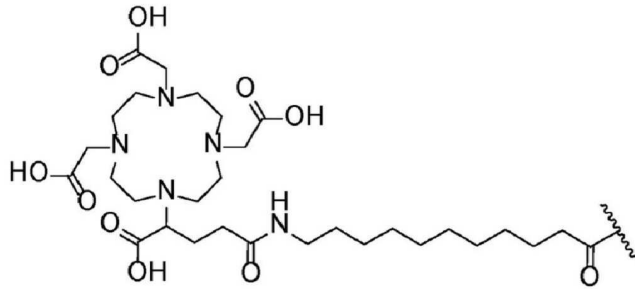
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, n 은 1이고, L^3 은 $(CH_2CH_2O)_{2-20}$ 을 포함하는, 화합물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, n 은 1이고, L^3 은 $(CH_2CH_2O)_m(CH_2)_w$ 이고, m 및 w 는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수(종점 포함)이고, m 및 w 중 적어도 하나는 0이 아닌, 화합물.

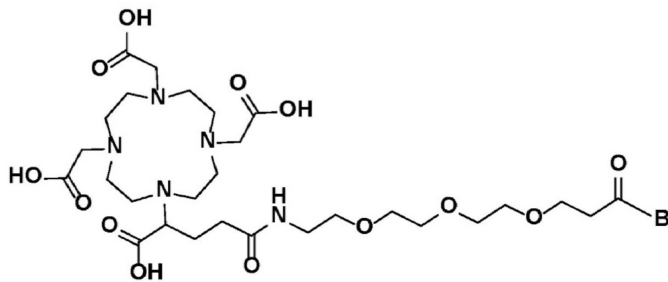
청구항 11

제1항에 있어서, 하기 구조 중 하나, 또는 이의 금속 복합체를 포함하는, 화합물:



청구항 12

제1항에 있어서, 하기 구조, 또는 이의 금속 복합체를 포함하는, 화합물:



청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, A는 킬레이팅 모이어티의 금속 복합체이고, 금속 복합체는 방사성 핵종을 포함하는, 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 방사성핵종은 ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , 또는 ^{225}Ac 인, 화합물.

청구항 15

제13항에 있어서, 방사성핵종은 ^{225}Ac 인, 화합물.

청구항 16

제13항에 있어서, 방사성핵종은 아스타틴-211(^{211}At), 비스무트-212(^{212}Bi), 비스무트-213(^{213}Bi), 악티늄-225(^{225}Ac), 라듐-223(^{223}Ra), 납-212(^{212}Pb), 토륨-227(^{227}Th), 및 테르븀-149(^{149}Tb), 또는 이들의 자손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파 방출체인, 화합물.

청구항 17

제16항에 있어서, 알파 방출체는 ^{225}Ac 또는 이의 자손인, 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 화합물:

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

서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 도메인은 항체 QD6의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열(상기 서열들은 각각 서열 번호 47 및 48에 기재됨)을 포함하는 항원 결합 도메인이 인간 EGFR에 결합할 수 있는 친화도보다 더 낮은 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있는, 화합물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 화합물:

a. 서열 번호 15의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

b. 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 화합물:

i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:

서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

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

ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:

서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,

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

청구항 22

제21항에 있어서, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 화합물:

i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:

서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:

서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 화합물:

a. 서열 번호 31의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

b. 서열 번호 32의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함하는, 화합물:

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

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

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

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

청구항 25

제24항에 있어서, 제1 및 제2 CH 영역은 각각 서열 번호 33의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 화합물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 제1 및 제2 중쇄는 이종이량체를 형성하며, 선택적으로, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 위치 354에 시스테인(C) 잔기와 위치 366에 트립토판(W) 잔기를 포함하고, 다른 중쇄는 위치 349에 시스테인(C) 잔기, 위치 407에 발린(V) 잔기, 위치 366에 세린(S) 및 위치 368에 알라닌(A)을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것인, 화합물.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

a. 변형된 CH 영역(여기서, 변형된 CH 영역은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함); 및

b. 변형된 상응하는 CL 영역(여기서, 변형된 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함)을 포함하며,

- i. 제1 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고 제1 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하거나; 또는
 - ii. 제2 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고 제2 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하고,
- 변형된 CH 영역의 치환된 시스테인과 변형된 상응하는 경쇄의 치환된 시스테인은 디설피드 결합을 형성할 수 있는, 화합물.

청구항 28

제27항에 있어서, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것인, 화합물.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 하나 이상의 Fc γ 수용체에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이를 포함하는, 화합물.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산 및 위치 331에 세린을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것인, 화합물.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. 제1 CH 영역은 서열 번호 39에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- b. 제2 CH 영역은 서열 번호 40에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- c. 제1 CL 영역은 서열 번호 41에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- d. 제2 CL 영역은 서열 번호 34에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 화합물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함하는, 화합물:

- a. 서열 번호 35에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄;
- b. 서열 번호 36에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄;
- c. 서열 번호 37에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄; 및
- d. 서열 번호 38에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.

청구항 33

제32항에 있어서,

- a. 제1 중쇄는 서열 번호 35에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- b. 제2 중쇄는 서열 번호 36에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

- c. 제1 경쇄는 서열 번호 37에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- d. 제2 경쇄는 서열 번호 38에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 화합물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 시노몰구스 EGFR과 결합할 수 있고/있거나;
- b. EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 마우스 EGFR과 결합할 수 있고/있거나;
- c. cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 시노몰구스 cMET와 결합할 수 있고/있거나;
- d. 제1 항원 결합 도메인은 EGFR에 대해 특이적이고/이거나;
- e. 제2 항원 결합 도메인은 cMET에 대해 특이적이고/이거나;
- f. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR 및 cMET와 동시에 결합될 수 있고/있거나;
- g. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 세포 내로 내재화될 수 있고/있거나;
- h. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 시험관 내 세포 생존을 분석에서 측정 시 세포독성 활성을 갖고/갖거나;
- i. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR 및/또는 cMET의 리간드 의존적 신호전달을 차단할 수 있는, 화합물.

청구항 35

제1항에 있어서,

(a) 제1 항원 결합 도메인은

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

서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

- ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하고:

서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3;

(b) 제2 항원 결합 도메인은

- i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:

서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및

- ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역을 포함하는, 화합물:

서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1

서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2

서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 도메인은 다음과 같은 K_d 를 갖는 친화도로 인간 EGFR과 결합할 수 있는, 화합물.

- 10 내지 100 nM;
- 20 내지 80 nM;
- 30 내지 75 nM; 또는
- 35 내지 50 nM.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항원 결합 도메인은 다음과 같은 K_d 를 갖는 친화도로 인간 cMET와 결합할 수 있는, 화합물.

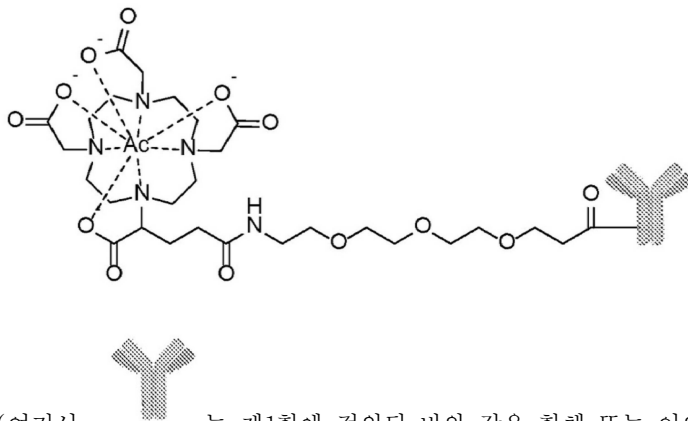
- 10 nM 미만; 또는
- 5 nM 미만.

청구항 38

제19항, 제36 및 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 친화도는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되는, 화합물.

청구항 39

제1항에 있어서, 하기 구조를 포함하는, 화합물:



(여기서, 는 제1항에 정의된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편임).

청구항 40

제39항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 라이신 잔기의 측쇄 아미노 기를 통해 $A-L^1-(L^2)_n$ -에 연결된, 화합물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 화합물 및 제약상 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 42

암의 치료 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제41항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 암은 부신피질 암종, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장직장암, 자궁내막 선암종, 유방 육종, 담낭 암종, 신경교종, 두경부암, 간암, 폐암, 신경모세포종, 신경내분비암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장 세

포 암종, 타액선 선양 양성 암, 정모세포성 정상피종, 및 포도막 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고형 종양 암인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 암은 폐암, 결장직장암, 췌장암, 또는 두경부암인, 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항증식제, 방사선 감작제, 또는 면역조절제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 46

암의 치료 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제41항의 제약 조성물.

청구항 47

암 치료용 의약의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제41항의 제약 조성물의 용도.

발명의 설명

배경 기술

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 12월 20일자로 출원된 미국 가출원 제63/291,910호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 비소세포폐암(NSCLC)은 전 세계적으로 암 관련 사망의 주요 원인으로 남아 있다. EGFR-티로신 키나아제 억제제(TKI)의 개발로 특정 환자의 경우 진행성 NSCLC의 예후가 유의하게 개선되었지만 장기 생존성을 갖는 전이성 NSCLC 환자는 여전히 드물다. Lin 등의 최근 연구에 의하면 에를로티닙 또는 게피티닙으로 치료받은 EGFR-돌연변이 전이성 NSCLC 환자의 5년 유병 생존율은 단지 14.6%임이 나타났다. 항-EGFR TKI는 저항성에 취약하며 근본적인 저항성 메커니즘은 EGFR 돌연변이와 cMET 과발현의 공존인 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 임상에서 테스트되고 있는 하나의 유망한 접근법으로는 비소세포폐암 치료용으로 승인된 인간 EGFR-cMET 이중특이성 항체인 아미반타맙이 있다. EGFR 및 cMET 수용체의 표적화는 암세포에 대한 치료 특이성을 증가시킨다.

[0004] 일반적으로, 항체의 효능은 표적 세포의 수에 따라 달라진다. 더욱이, 약물 저항성은 여전히 표적화 암 요법이 직면한 주요 난제이며, 이때 드노보(de novo) 및 후천적 저항성은 표적화 요법의 장기 효능을 제한한다. 저항성 메커니즘은 2차 돌연변이, 발암성 하류 신호전달 모듈의 활성화, 리간드 상향조절 및 대체 성장 인자 수용체의 증폭을 포함한다.

[0005] 따라서, 상기 단점 없이 EGFR 및 cMET 둘 모두를 표적화할 수 있는 개선된 치료제(예를 들어, 암 치료제)에 대한 필요성이 여전히 남아 있다.

발명의 내용

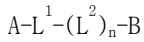
[0006] 본 발명은 EGFR 및 cMET 둘 모두를 표적화하는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트), 이의 제약 조성물, 및 이러한 화합물 또는 제약 조성물을 사용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 네이키드(naked) 항체와 달리 방사성면역콘주게이트는 치료 효능을 갖기 위해 수용체 기능을 차단할 필요가 없으며; 대신 이것은 제한된 범위 내에서 주변 종양 세포를 표적화하는 방사성 입자(예를 들어, 알파 방출체)를 방출하여 임의의 오프-타겟(off-target) 관련 독성을 방지한다. EGFR 및 cMET 과발현 암에 사용되는 EGFR-cMET-표적화 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 암세포 내부에 표적화 방사성핵종을 특이적으로 전달하도록 항체 촉발 내재화되는 EGFR-cMET 복합체의 능력을 활용한다. 정상적인 건강한 조직/세포의 수용체 중 어느 하나에 대한 항체 1가 결합은 내재화로 이어지지 않는다.

[0007] 특정 실시 형태에서, 제공된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 현재 알려진 일부 방사성치료제와 비교하여 증가된 배출 속도(예를 들어, 포유동물에 투여된 후)를 나타내면서도 여전히 치료 효능을 유지한다. 일

부 실시 형태에서, 더 빠른 배출은 화합물이 대상체에 머무르는 시간의 양을 제한함으로써 오프-타겟 독성을 제한할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 제공된 화합물은 감소된 오프-타겟 독성을 나타낸다.

일 양태에서, 하기 구조를 포함하는 화합물, 또는 이의 제약상 허용가능한 염이 제공된다:

[화학식 I]



[여기서,

A는 킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체이고;

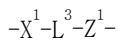
B는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

L^1 은 결합, C=O, C=S, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이고;

n은 1 내지 5의 정수(종점 포함)이고;

L^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식 II:

[화학식 II]



의 구조를 갖고,

여기서,

X^1 은 $-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-$, $-C(S)NR^1-$, $-NR^1C(S)-$, $-OC(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)O-$, $-NR^1C(O)NR^1-$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-$, $-O-$, 또는 $-NR^1-$ (여기서, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)이고;

L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 알킬 또는 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬이고;

Z^1 은 $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$, 또는 $-NR^2-#$ (여기서, "#"은 B에 대한 부착점을 나타내고, R^2 는 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)이고,

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,

제1 항원 결합 도메인은

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

서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

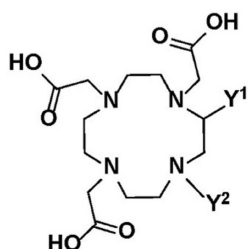
서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2

서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

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

ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

- [0032] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0033] 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0034] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,
- [0035] 또는 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체
- [0036] 를 포함함].
- [0037] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 변수 A는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산, DOTAM(1,4,7,10-테트라키스(카르바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸), DOTPA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라 프로피온산), DO3AM-아세트산(2-(4,7,10-트리스(2-아미노-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)아세트산), DOTA-GA 무수물(2,2',2''-(10-(2,6-디옥소테트라히드로-2H-피란-3-일)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-트리일)트리아세트산), DOTP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스폰산)), DOTMP(1,4,6,10-테트라아자시클로데칸-1,4,7,10-테트라메틸렌 포스폰산), DOTA-4AMP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(아세트아미도-메틸렌포스폰산), CB-TE2A(1,4,8,11-테트라아자바이시클로[6.6.2]헥사데칸-4,11-디아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산), NOTP(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리(메틸렌 포스폰산)), TETPA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라프로피온산), TETA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라 아세트산), HEHA(1,4,7,10,13,16-헥사아자시클로헥사데칸-1,4,7,10,13,16-헥사아세트산), PEPA(1,4,7,10,13-펜타아자시클로펜타데칸-N,N',N'',N''',N''''-펜타아세트산), H₄octapa(N,N'-비스(6-카르복시-2-피리딜메틸)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산), H₂dedpa(1,2-[[6-(카르복시)-피리딘-2-일]-메틸아미노]에탄), H₆phospa(N,N'-(메틸렌포스포네이트)-N,N'-[6-(메톡시카르보닐)피리딘-2-일]-메틸-1,2-디아미노에탄), TTHA(트리에틸렌테트라민-N,N,N',N'',N''',N''''-헥사아세트산), DO2P(테트라아자시클로도데칸 디메탄포스폰산), HP-DO3A(히드록시프로필테트라아자시클로도데칸트리아세트산), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), 데페록사민(Deferoxamine), DTPA(디에틸렌트리아민펜타아세트산), DTPA-BMA(디에틸렌트리아민펜타아세트산-비스메틸아미드), 및 포르피린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이팅 모이어티이다.
- [0038] 특정 실시 형태에서, 화학식 I의 변수 A는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산) 또는 이의 금속 복합체이다.
- [0039] 일부 실시 형태에서, 화합물은 하기 화학식 I-a로 표시되거나 이의 금속 복합체이다:
- [0040] [화학식 I-a]



- [0041]
- [0042] (여기서, Y¹은 -CH₂OCH₂(L²)_n-B, -C(O)(L²)_n-B, 또는 -C(S)(L²)_n-B이고 Y²는 -CH₂CO₂H이거나; 또는
- [0043] Y¹은 H이고 Y²는 L¹-(L²)_n-B임). 특정 실시 형태에서, Y¹은 H이다.

- [0044] 일부 실시 형태에서, L¹은 이고, R^L은 수소 또는 -CO₂H이다.

- [0054] 일부 실시 형태에서, 화학식 I을 참조하면, 변수 A는 킬레이팅 모이어티의 금속 복합체이고, 금속 복합체는 방사성핵종을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 방사성핵종은 ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , 또는 ^{225}Ac 이다. 특정 실시 형태에서, 방사성핵종은 ^{225}Ac 이다. 특정 실시 형태에서, 방사성핵종은 아스타틴-211(^{211}At), 비스무트-212(^{212}Bi), 비스무트-213(^{213}Bi), 악티늄-225(^{225}Ac), 라듐-223(^{223}Ra), 납-212(^{212}Pb), 토륨-227(^{227}Th), 및 테르븀-149(^{149}Tb), 또는 이들의 자손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파 방출체이다. 특정 실시 형태에서, 알파 방출체는 ^{225}Ac 또는 이의 자손이다.
- [0055] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 참조하면, 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0056] i. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:
- [0057] 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0058] 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0059] 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및
- [0060] ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:
- [0061] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0062] 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0063] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.
- [0064] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 참조하면, 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0065] a. 서열 번호 15의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및
- [0066] b. 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.
- [0067] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 참조하면, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0068] i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0069] 서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0070] 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0071] 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,
- [0072] 또는 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및
- [0073] ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0074] 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0075] 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0076] 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3,
- [0077] 또는 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0078] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 참조하면, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

- [0079] i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0080] 서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0081] 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0082] 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및
- [0083] ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0084] 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0085] 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0086] 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.
- [0087] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 참조하면, 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0088] a. 서열 번호 31의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및
- [0089] b. 서열 번호 32의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.
- [0090] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0091] a. 다음을 포함하는, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인:
- [0092] i. 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:
- [0093] 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0094] 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0095] 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및
- [0096] ii. 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:
- [0097] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0098] 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0099] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3; 및
- [0100] b. 다음을 포함하는, cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인:
- [0101] i. 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0102] 서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0103] 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0104] 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및
- [0105] ii. 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0106] 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0107] 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0108] 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.
- [0109] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0110] a. 제1 중쇄(여기서, 제1 중쇄는 제1 항원 결합 도메인의 VH 영역, 및 제1 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함);
- [0111] b. 제1 경쇄(여기서, 제1 경쇄는 제1 항원 결합 도메인의 VL 영역, 및 제1 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의

단편을 포함함);

- [0112] c. 제2 중쇄(여기서, 제2 중쇄는 제2 항원 결합 도메인의 VH 영역, 및 제2 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함); 및
- [0113] d. 제2 경쇄(여기서, 제2 경쇄는 제2 항원 결합 도메인의 VL 영역, 및 제2 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함).
- [0114] 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 CH 영역은 각각 서열 번호 33의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0115] 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 중쇄는 이중이량체를 형성하며, 선택적으로, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 위치 354에 시스테인(C) 잔기와 위치 366에 트립토판(W) 잔기를 포함하고, 다른 중쇄는 위치 349에 시스테인(C) 잔기, 위치 407에 발린(V) 잔기, 위치 366에 세린(S) 및 위치 368에 알라닌(A)을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0116] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0117] a. 변형된 CH 영역(여기서, 변형된 CH 영역은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함); 및
- [0118] b. 변형된 상응하는 CL 영역(여기서, 변형된 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함)을 포함하고,
- [0119] 여기서,
- [0120] i. 제1 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제1 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하거나;
- [0121] ii. 제2 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제2 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하고,
- [0122] 변형된 CH 영역의 치환된 시스테인과 변형된 상응하는 경쇄의 치환된 시스테인은 디설피드 결합을 형성할 수 있다.
- [0123] 일부 실시 형태에서, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0124] 일부 실시 형태에서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 하나 이상의 Fc γ 수용체에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이를 포함한다.
- [0125] 일부 실시 형태에서, 제1 및/또는 제2 CH 영역은 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산 및 위치 331에 세린을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0126] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 다음을 특징으로 한다:
- [0127] a. 제1 CH 영역이 서열 번호 39에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함함;
- [0128] b. 제2 CH 영역이 서열 번호 40에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함함;
- [0129] c. 제1 CL 영역이 서열 번호 41에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함함; 및
- [0130] d. 제2 CL 영역이 서열 번호 34에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함함.
- [0131] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0132] a. 서열 번호 35에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄;
- [0133] b. 서열 번호 36에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%

의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄;

[0134] c. 서열 번호 37에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄; 및

[0135] d. 서열 번호 38에 기재된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.

[0136] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 다음을 특징으로 한다:

[0137] a. 제1 중쇄가 서열 번호 35에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함함;

[0138] b. 제2 중쇄가 서열 번호 36에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함함;

[0139] c. 제1 경쇄가 서열 번호 37에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함함; 및

[0140] d. 제2 경쇄가 서열 번호 38에 기재된 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함함.

[0141] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 다음을 특징으로 한다:

[0142] a. EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인이 시노몰구스 EGFR과 결합할 수 있음;

[0143] b. EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인이 마우스 EGFR과 결합할 수 있음;

[0144] c. cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인이 시노몰구스 cMET와 결합할 수 있음;

[0145] d. 제1 항원 결합 도메인이 EGFR에 대해 특이적임;

[0146] e. 제2 항원 결합 도메인이 cMET에 대해 특이적임;

[0147] f. 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 EGFR 및 cMET와 동시에 결합될 수 있음;

[0148] g. 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 세포 내로 내재화될 수 있음;

[0149] h. 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 시험관 내 세포 생존을 분석에서 측정 시 세포독성 활성을 가짐; 및/또는

[0150] i. 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 EGFR 및/또는 cMET의 리간드 의존적 신호전달을 차단할 수 있음.

[0151] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 제1 항원 결합 도메인이 다음과 같은 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다는 것을 특징으로 한다:

[0152] a. 10 내지 100 nM;

[0153] b. 20 내지 80 nM;

[0154] c. 30 내지 75 nM; 또는

[0155] d. 35 내지 50 nM.

[0156] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 제2 항원 결합 도메인이 다음과 같은 Kd를 갖는 친화도로 인간 cMET에 결합할 수 있다는 것을 특징으로 한다:

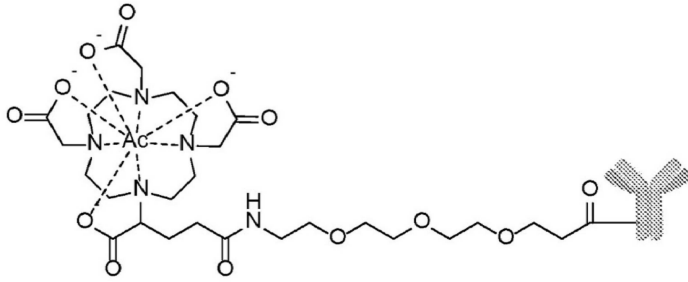
[0157] a. 10 nM 미만; 또는

[0158] b. 5 nM 미만.

[0159] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 제1 항원 결합 도메인이 항체 QD6의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열(상기 서열들은 각각 서열 번호 47 및 48에 기재됨)을 포함하는 항원 결합 도메인의 친화도보다 더 낮은 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다는 것을 특징으로 한다.

[0160] 일부 실시 형태에서, 위에 설명된 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된다.

[0161] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 포함한다:



[0162]

[0163] (여기서,  는 EGFR 및 cMET 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 아래에 설명된 EGFR-cMET 단클론 이중특이성 항체 RAA22/B09 DuetMab)임). 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 라이신 잔기의 측쇄 아미노기를 통해 A-L¹-(L²)_n-에 연결된다.

[0164] 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 상기 기술된 화합물 중 하나 및 제약상 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0165] 암을 치료하는 방법이 여전히 본 발명의 범위 내에 있으며, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간)에게 치료적 유효량의 상기 기술된 화합물 또는 이의 각각의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0166] 일부 실시 형태에서, 암은 부신피질 암종, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장직장암, 자궁내막 선암종, 유잉 육종, 담낭 암종, 신경교종, 두경부암(예를 들어, 두경부 편평 세포 암종 또는 HNSCC), 간암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암 또는 NSCLC), 신경모세포종, 신경내분비암, 난소암, 췌장암(예를 들어, 췌관 선암종 또는 PDAC), 전립선암, 위암, 신장 세포 암종, 타액선 선양 양성 암, 정모세포성 정상피종, 및 포도막 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고형 종양 암이다.

[0167] 일부 실시 형태에서, 암은 폐암, 결장직장암, 췌장암, 또는 두경부암이다.

[0168] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 치료 방법은 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어 인간)에게 항증식제, 방사선 감작제, 면역조절제 또는 면역조정제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0169] 암 치료 방법에 사용하기 위한 상기 기술된 화합물 또는 제약 조성물이 여전히 본 발명의 범위 내에 있다.

[0170] 본 발명은 암 치료용 의약의 제조에 있어서의 상기 기술된 화합물 또는 제약 조성물의 용도를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0171] **도 1a** 및 **도 1b**는 각각 RAA22/B09-57 및 QD6/B09-57 DuetMab의 그래픽 묘사이다. 항-EGFR RAA22 및 QD6의 Fab, 항-cMET B09-57의 Fab, 홀 및 노브 중쇄가 예시되어 있다. 구조적 렌더링은 개별 도메인 구조의 합성물이다.

도 2는 항원 포획 포맷을 사용한 동시 결합 연구를 Octet 분석에 의해 수행하였음을 보여준다. 인간 cMET 항원이 로딩된 센서를 먼저 항체와의 연속적인 결합 및 해리 상호작용에 노출시킨 다음 인간 EGFR 항원과의 상기 상호작용에 노출시켰다. Ass=결합; Diss=해리; NI-NTA=니켈-니트릴로트리아세트산.

도 3a는 EGFR 및 c-Met 중 교차 반응성을 보여주는 ELISA 결과를 보여준다. 높은 친화도의 단일특이성 EGFR IgG인 QD6과 1가 이중특이성 EGFR/cMET DuetMab인 QD6/B09는 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 결합하였다. 낮은 친화도의 단일특이성 EGFR IgG인 RAA22는 QD6에 비해 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 더 약하게 결합했으며, 상응하는 1가 이중특이성 EGFR/c-Met DuetMab인 RAA22/B09는 2가 모 IgG인 RAA22에 비해 인간 및 시노물구스 원숭이 EGFR에 대해 훨씬 더 약한 결합을 나타냈고, 마우스 EGFR에 대해 명목상 결합을 나타냈다. 단일특이성 c-Met IgG인 B09 및 모든 이중특이성 변이체는 인간 및 시노물구스 원숭이 c-Met에 대해 비견되는 결합을 나타냈지만 마우스 c-Met에 대해서는 검출가능한 결합을 나타내지 않았다.

도 3b는 EGFR 및 c-Met 계열 특이성을 보여주는 ELISA 결과를 보여준다. 테스트한 항체 중 어느 것도 임의의 EGFR HER 계열 단백질(HER2, HER3 또는 HER4) 또는 임의의 c-Met 계열 구성원(Ron(CD136) 또는 Semaphorin 3

a)에 대해 감지할 만한 결합을 나타내지 않았다.

도 4는 RAA22/B09 이중특이성 mAb의 내재화 및 산성화된 세포내 구획으로의 트래피킹(trafficking)을 pHAb pH 민감성 염료(Promega)로 표지된 항체를 사용하여 시각화한 것을 보여준다. 대조 항체에는 R347 이소타입 대조 항체 및 1가 이중특이성 대조 항체 항-EGFR RAA22/R347 및 항-cMET B09/R347이 포함되었다. pHAb 표지된 항체를 37°C 및 5% CO₂에서 가습 인큐베이터에서 1.25 µg/mL 농도의 NCI-H1975 폐암 세포와 함께 인큐베이션하였다. Cy3 필터를 사용하여 Operetta High Content Imaging 시스템에서 표시된 시점에 형광 이미지를 캡처하였다. 시간 경과에 따른 세포 형광 강도 증가는 pH 민감성 형광에 의해 측정된 바와 같이 내재화 및 산성 세포내 구획으로의 트래피킹의 증거로 간주되었다.

도 5는 RAA22/B09 이중특이성 mAb의 내재화 및 산성화된 세포내 구획으로의 트래피킹을 pHAb pH 민감성 염료로 표지된 항체를 사용하여 시각화하였으나, 세포는 0.625 µg/mL의 더 낮은 농도의 항체로 처리한 것을 보여준다.

도 6a는 H1975 세포에서의 QD6/B09 및 RAA22/B09 단클론 항체(mAb) 내재화의 동역학을 보여준다. (a) 내재화 시작 시점과 1시간 후 세포질에 대해 CellTracker Blue CMAC(파란색) 및 2.5 µg/mL의 QD6/B09-AlexaFluor647(마젠타색, 상단 패널) 또는 2.5 µg/mL의 RAA22/B09-AlexaFluor-647(마젠타색, 하단 패널)로 표지된 세포의 이미지 오버레이. 세포를 CellTracker Blue CMAC로 표지한 후 2~8°C에서 mAbs-AlexaFluor6457과 결합시키고 다음의 내재화 조건을 적용하였다: (37°C, 70%의 습도 및 5% CO₂).

도 6b는 H1975 세포에서의 QD6/B09 및 RAA22/B09 단클론 항체(mAb) 내재화의 동역학을 보여준다. 알고리즘(재료 및 방법)을 사용하여 동역학 이미지의 정량적 분석에 의해 mAb-AlexaFluor647 내재화의 시간 코스를 결정하였다. 5분 간격으로 촬영한 동역학 이미지를 알고리즘(Vainshtein, 2015)을 사용하여 처리하여 세포질 내 항체 축적을 결정하였다. QD6/B09-AlexaFluor647(빨간색) 대 RAA22/B09-AlexaFluor647(파란색)에 대한 세포 내 항체 형광에 대해 정규화된 세포질 내 항체 신호(세포질 내 분율)가 세 가지 독립적인 실험 중 하나에 대해 예시되어 있다. 내재화 속도 상수(kint)는 식 $F_{cyt}(t) = (1 - e^{-k_{int} \cdot t}) \cdot F_{max, cyt}$ (여기서, $F_{max, cyt}$ 는 세포당 전체 강도에 대한 세포당 세포질 강도의 최대 비임)을 사용한 곡선 피팅을 사용하여 내재화 시간 코스로부터 계산하였다. kint로부터 계산한 T_{1/2}은 QD6/B09의 경우 37.5 ± 10.6분이었고 RAA22/B09의 경우 43.2 ± 15.5였다(n = 3으로부터).

도 7a는 QD6/B09 DuetMab 및 그의 각각의 단일-아암의 대조 항체의 내재화 프로파일을 보여준다. 내재화 프로파일은 각 구축물에 대한 각각의 막 및 세포질 신호의 시간 코스를 통해 표시된다. QD6/B09 세트는 Opera 공초점 형광 현미경을 사용하여 획득하였다.

도 7b는 RAA22/B09 DuetMab 및 그의 각각의 단일-아암의 대조 항체의 내재화 프로파일을 보여준다. 내재화 프로파일은 각 구축물에 대한 각각의 막 및 세포질 신호의 시간 코스를 통해 표시된다. 세트는 Zeiss 회전 디스크 공초점 형광 현미경을 사용하여 획득하였다. QD6/B09 및 QD6/IgG에 대한 동일한 프로파일은 QD6/B09 DuetMab의 EGFR-아암에 의해 구동되는 내재화 모드를 나타내는 반면, RAA22/B09 DuetMab은 효율적인 내재화를 위해 EGFR 및 c-MET 아암 둘 모두의 결속을 필요로 한다.

도 8a는 중간 및 높은 표적 c-MET 및 EGFR 세포 표면 수용체를 발현하는 세포에서의 RAA22/B09의 내재화 프로파일을 보여준다. H1975 세포에서의 RAA22/B09-AF647에 대한 막, 세포질 및 총 신호가 예시되어 있다. 2의 대표적인 실험 하나가 예시되어 있다. H1975 세포는 세포 표면으로부터의 항체의 해리를 나타내는 막 강도 및 전체 강도의 동시 감소를 나타낸다.

도 8b는 HCC827 세포에서의 것임을 제외하고는 **도 8a**와 동일하다. HCC827 세포는 실험 시간 코스에 걸쳐 안정적인 총 신호를 갖는다. 막 신호의 감소는 항체 내재화에서 유래된다.

도 9a는 HCC827 세포에서의 RAA22/B09 단일-아암 대조 항체의 내재화를 보여준다. RAA22/IgG 단일-아암의 강도 프로파일은 단일-아암 결합을 통한 EGFR에 대한 더 약한 결합으로 인해 RAA22/B09보다 약 10배 더 낮다.

도 9b는 B09/IgG 단일-아암이 시간 경과에 따른 총 신호 및 막 신호의 동시 감소에 의해 시사되는 바와 같이 세포막으로부터 해리됨을 보여준다.

도 10a는 킬레이트, 링커 및 가교결합 기를 포함하는 이중작용성 킬레이트의 일반적인 구조를 도시하는 개략도이다.

도 10b는 킬레이트, 링커 및 표적화 모이어티를 포함하는 이중작용성 콘쥬게이트의 일반적인 구조를 도시하는

개략도이다.

도 10c 및 **도 10d**는 본원에 개시된 2가지 예시적인 EGFR-cMET 방사성면역콘주게이트인 [¹⁷⁷Lu]-DOTA-항-EGFR-cMET 및 [²²⁵Ac]-DOTA-항-EGFR-cMET의 구조를 도시하는 개략도이다.

도 11은 이중작용성 킬레이트인 4-{[11-옥소-11-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)운데실]카르바모일}-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-1-일]부탄산(화합물 B)의 합성을 도시하는 개략도이다. 화합물 B의 합성은 실시예 6에 기술되어 있다.

도 12는 이중작용성 킬레이트인 4-{[2-(2-{3-옥소-3-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)프로폭시}에톡시)에틸]카르바모일}-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-1-일]부탄산(화합물 C)의 합성을 도시하는 개략도이다. 화합물 C의 합성은 실시예 7에 기술되어 있다.

도 13은 [¹⁷⁷Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트(예를 들어, 하기 기술된 화합물 E 및 화합물 F)의 합성을 위한 콘주게이션 및 방사성 표지를 도시하는 개략도이다. 실시예 8을 참조한다.

도 14a~도 14b는 4 μM 표지 항체의 부재(전체 결합) 또는 존재(비특이적 결합) 하에 EGFR 및 c-MET의 다양한 발현 수준을 갖는 상이한 세포주들에 대한 화합물 E의 결합을 보여준다. 전체 결합으로부터의 비특이적 결합의 차감에 의해 특이적 결합을 계산하였다. 예시된 값은 평균 ± SEM(n = 3)이다. 실시예 9를 참조한다.

도 15는 인큐베이션 후 2시간 및 24시간에 EGFR 및 c-MET의 다양한 발현 수준을 갖는 HCC827 세포, HT29 세포, H441 세포 및 H1975 세포에서의 화합물 E(10 nM)의 내재화(또는 시험관 내 잔류화)의 결과를 보여준다. 예시된 값은 평균 ± SEM(n = 3)이다. 실시예 10을 참조한다.

도 16a~도 16e는 정맥내 주사 후 명시된 시점에서 피하 이중이식편을 갖는 암컷 balb/c 마우스(n=3)에서 화합물 E(0.7 MBq/2 μg)를 주사한 경우 및 다양한 동물 모델에서 생체분포 연구의 결과를 나타내는 플롯을 보여준다. 조직 1 g당 주사된 용량 백분율(% ID/g)은 x축에 표시되며, 4, 24, 48, 96 및 168시간에 혈액, 뼈, 뇌, 심장, 장, 신장, 폐, 간, 췌장, 비장, 위, 피부, 소변 및 방광, 및 종양에 대해 표시된다. 실시예 11을 참조한다.

도 17a~도 17c는 화합물 F(50~400 nCi/2 μg), 콜드(cold) 항체 및 비히클의 정맥내 주사 후 암컷 balb/c 마우스(n=5)에서의 다양한 동물 모델에서의 생체 내 효능 연구의 결과를 나타내는 플롯을 보여준다. 실시예 12를 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0172] 방사성면역콘주게이트는 질환 상태에서 상향조절되는 단백질 또는 수용체를 표적화하여 방사성 페이로드를 전달 하여 관심 세포를 손상시키고 사멸하도록 설계된다(방사성면역요법). 방사성 페이로드의 전달은 표적화 알파, 베타, 감마 입자 또는 Auger 전자 방출을 초래하며, 이는 DNA에 대한 직접적인 영향(예컨대 단일 또는 이중 가닥 DNA 파단) 또는 간접적인 영향, 예컨대 방관자 효과 또는 십자 포화 효과를 야기할 수 있다.
- [0173] 방사성면역콘주게이트는 전형적으로 생물학적 표적화 모이어티(예를 들어, EGFR 및 cMET 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 방사성핵종(예를 들어, 알파 또는 베타 방출체), 및 이 둘을 연결하는 분자를 함유한다. 콘주게이트는, 표적 친화성을 유지하면서 구조적 변경이 최소화되도록 이중작용성 킬레이트가 생물학적 표적화 모이어티에 부착되는 경우 형성된다. 방사성표지되었으면 최종 방사성면역콘주게이트가 형성된다.
- [0174] 이중작용성 킬레이트는 구조적으로 킬레이트, 링커 및 가교결합 기를 함유한다(**도 10a**). 새로운 이중작용성 킬레이트를 개발할 때 대부분의 노력은 분자의 킬레이팅 부분에 중점을 둔다. 이중작용성 킬레이트의 여러 예가 기술되었으며, 이때 다양한 환형 및 비환형 구조가 표적화 모이어티에 콘주게이션되었다. [Bioconjugate Chem. 2000, 11, 510-519; Bioconjugate Chem. 2012, 23, 1029-1039; Mol Imaging Biol. 2011, 13, 215-221, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 110-115.]
- [0175] 안전하고 효과적인 방사성면역콘주게이트를 개발하는 핵심 요소 중 하나는 정상 조직에서 오프-타겟 독성을 최소화하면서 효능을 최대화하는 것이다. 이 진술은 신약 개발의 핵심 원칙 중 하나이지만, 방사성면역치료제에 적용하는 것은 새로운 난제를 제시한다. 방사성면역콘주게이트는 치료적 효능을 갖기 위해 치료용 항체에서 필요한 경우 수용체를 차단하거나, 또는 항체 약물 콘주게이트("ADC")에 의해 요구되는 경우 세포독성 페이로드를

세포내로 방출할 필요가 없다. 그러나, 독성 입자의 방출은 1차(방사성) 붕괴의 결과로 발생하는 사건이며, 투여 후 체내 어느 곳에서나 무작위로 발생할 수 있다. 방출이 발생하면 방출 범위 내에서 주변 세포에 손상이 발생하여 오프-타겟 독성의 가능성을 초래할 수 있다. 따라서, 정상 조직에 대한 이러한 방출의 노출을 제한하는 것이 새로운 치료용 방사성면역콘주게이트를 개발하는 열쇠이다.

[0176] 오프-타겟 노출을 감소시키는 하나의 잠재적인 방법으로는 신체로부터(예를 들어, 신체의 정상 조직으로부터) 방사능을 보다 효과적으로 제거하는 것이 있다. 하나의 메커니즘으로는 생물학적 표적화제의 제거율을 증가시키는 것이 있다. 이 접근법은 생물학적 표적화제에 대해 잘 설명되지 않은, 생물학적 표적화제의 반감기를 단축하는 방법의 확인을 필요로 할 가능성이 있다. 상기 메커니즘에 관계없이, 약물 제거율의 증가는 또한, 신체로부터의 약물의 더 빠른 제거가 작용 부위에서의 유효 농도를 낮추고 이는 다시 더 높은 총 용량을 필요로 하고 정상 조직에 대한 총 방사성 용량의 감소라는 원하는 결과를 달성하지 못한다는 점에서 약리학/효능에 부정적인 영향을 미친다.

[0177] 다른 노력은 방사성 모이어티를 포함하는 분자의 부분의 대사를 가속화하는 데 중점을 두었다. 이를 위해, "절단가능한 링커"로 칭해진 것을 사용하여 생물학적 표적화제로부터 방사능의 절단 속도를 증가시키려는 일부 노력이 이루어져 왔다. 그러나, 절단가능한 링커는 방사성면역콘주게이트와 관련되므로 다른 의미로 받아들여졌다. Cornelissen 등은 절단가능한 링커를 이중작용성 킬레이트가 환원 시스템을 통해 생물학적 표적화제에 부착된 것으로 기술한 반면, 다른 사람들은 방출을 위해 방사성면역콘주게이트를 절단제/효소와 함께 공동투여해야 하는 효소-절단가능 시스템의 사용을 기술하였다[Mol Cancer Ther. 2013, 12(11), 2472-2482; Methods Mol Biol. 2009, 539, 191-211; Bioconjug Chem. 2003, 14(5), 927-33]. 이들 방법은 시스템 연결의 경우 생물학적 표적화 모이어티의 성질을 변경하거나, 제공된 인용의 경우 2가지 제제의 투여가 필요하기 때문에 약물 개발 관점(효소 절단가능 시스템)에서 실용적이지 않다.

[0178] 본 발명은 특히, 이화작용 및/또는 대사 후에 신체로부터 보다 효과적으로 제거되어 치료적 효능을 유지하면서 신체로부터 방사능을 보다 효과적으로 제거하는 화합물, 예를 들어 방사성면역콘주게이트를 제공한다. 이러한 예상치 못한 우월성은 이중작용성 킬레이트의 링커 영역을 변형함으로써 달성된다.

[0179] 개시된 면역콘주게이트는, 일부 실시 형태에서, 예를 들어 공지된 이중작용성 킬레이트와 비교할 때 온전한 분자의 약동학을 유지하면서 이화작용/대사 생성물의 배출 정도를 증가시킴으로써 전신 방사능의 감소를 달성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 방사능의 이러한 감소는 결합 특이성(시험관 내 결합), 세포 체류, 및 종양 흡수(생체 내)와 같은 다른 시험관 내 및 생체 내 특성에 영향을 주지 않으면서 이화/대사 부산물을 제거하는 것으로 인해 발생한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 제공된 화합물은 온-타겟(on-target) 활성을 유지하면서 인체에서 감소된 방사능을 달성한다.

[0180] 정의

[0181] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 표적화 모이어티의 "결합" 또는 "결합하다"는 본원에 기술된 바와 같이, 표적 분자, 예를 들어 인간 EGFR-cMET와의 또는 이에 대한 적어도 일시적인 상호작용 또는 회합을 의미한다.

[0182] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이중작용성 킬레이트"는 킬레이트, 링커 및 가교결합 기를 포함하는 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 도 10a를 참조한다. "가교결합 기"는 공유 결합에 의해 2개 이상의 분자를 연결할 수 있는, 예를 들어 이중작용성 킬레이트와 표적화 모이어티를 연결할 수 있는 반응기이다.

[0183] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이중작용성 콘주게이트"는 킬레이트 또는 이의 금속 복합체, 링커, 및 표적화 모이어티, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 도 10b를 참조한다.

[0184] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암"은 종양, 신생물, 암종, 육종, 백혈병 및 림프종과 같은 악성 신생물 세포의 증식에 의해 야기되는 임의의 암을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 암은 폐암, 결장직장암, 췌장암 또는 두경부암과 같은 그러나 이에 한정되지 않는, EGFR 및 cMET를 발현하는 세포(예를 들어, 종양 세포)를 포함한다.

[0185] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "킬레이트"는 2개 이상의 지점에서 중심 금속 또는 방사성금속 원자에 결합될 수 있는 유기 화합물 또는 이의 일부를 지칭한다.

[0186] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "콘주게이트"는 킬레이팅 기 또는 이의 금속 복합체, 링커 기를 함유하고 선택적으로 표적화 모이어티, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 분자를 지칭한다.

- [0187] 본원에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, 항체 또는 이의 단편과 관련하여 사용되는 경우 어구 "불변 영역"(예를 들어, IgG1, IgG2 또는 IgG4 불변 영역)은 야생형 불변 영역 및 변이체(예를 들어, 야생형 불변 영역에 대한 기준 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 불변 영역) 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0188] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화합물"은 도시된 구조의 모든 입체이성질체, 기하 이성질체 및 호변이성질체를 포함하려는 것이다.
- [0189] 본원에 언급되거나 기술된 화합물은 비대칭일 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 입체중심을 가짐). 달리 표시되지 않는 한 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체와 같은 모든 입체이성질체가 의도된다. 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 함유하는 본 발명에서 논의된 화합물은 광학 활성 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 라세미 혼합물들의 분할 또는 입체선택적 합성에 의한 것과 같은 광학 활성 출발 물질로부터의 광학 활성 형태의 제조 방법에 대한 방법들은 당업계에 공지되어 있다.
- [0190] 본원에서 사용되는 바와 같이, "검출제"는 항원을 함유하는 세포의 위치를 찾아 질환을 진단하는 데 유용한 분자 또는 원자를 지칭한다. 검출제로 폴리펩티드를 표지하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 검출제의 예는 방사성동위원소 및 방사성핵종, 염료(예컨대 비오틴-스트렙타비딘 복합체 포함), 조영제, 발광제(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트 또는 FITC, 로다민, 란탄족 인광체, 시아닌 및 근적외 염료), 및 자성 제제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0191] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "방사성핵종"은 방사성 붕괴를 겪을 수 있는 원자(예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{229}Th , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{201}Tl)를 지칭한다. 방사성핵종, 방사성동위원소 또는 방사능 동위원소라는 용어가 또한 방사성핵종을 설명하는 데 사용될 수 있다. 방사성핵종은 본원에 기술된 바와 같이 검출제로서 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 방사성핵종은 치료제, 예를 들어 알파 방출 방사성핵종으로 사용될 수 있다.
- [0192] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량"의 제제(예를 들어, 임의의 진술한 콘주게이트)는 임상 결과와 같은 유익하거나 원하는 결과를 달성하기에 충분한 양이며, 따라서 "유효량"은 이것이 적용되고 있는 맥락에 따라 달라진다. 예를 들어, 치료적 응용에서, "유효량"은 장애 및 이의 합병증의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지시키고/시키거나 질환 또는 의학적 병태와 관련된 적어도 하나의 증상을 실질적으로 개선하기에 충분한 양일 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 맥락에서 "유효량"은 투여받는 환자의 일부 분율에서 적어도 일부의 측정 가능한 치료적 반응 또는 원하는 효과를 생성하는 본원에 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트), 예를 들어 Ac-225-방사성면역콘주게이트의 양이다. 예를 들어, 암 치료에서, 질환 또는 병태의 임의의 증상을 감소시키거나, 예방하거나, 지연시키거나, 억제하거나 정지시키는 제제 또는 화합물은 치료적으로 유효할 것이다. 치료적 유효량의 제제 또는 화합물은 질환 또는 병태를 치유하는 데 필요하지 않지만, 예를 들어, 질환 또는 병태의 발병이 지연, 방해, 또는 예방되도록, 질환 또는 병태의 증상이 개선되도록, 또는 질환 또는 병태의 기간이 변경되도록, 질환 또는 병태에 대한 치료를 제공할 수 있다. 예를 들어, 개체에서 질환 또는 병태가 덜 심각해질 수 있고/있거나 회복이 가속화된다. 유효량은 단위 용량 또는 다중(예를 들어, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 또는 적어도 6회) 용량을 투여함으로써 투여될 수 있다.
- [0193] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역콘주게이트"는 표적화 모이어티, 예컨대 항체(또는 이의 항원 결합 단편), 나노바디, 아피바디, 또는 피브로넥틴 유형 III 도메인으로부터의 컨센서스 서열을 포함하는 콘주게이트를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 면역콘주게이트는 표적화 모이어티당 평균 적어도 0.10개의 콘주게이트(예를 들어, 표적화 모이어티당 평균 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 콘주게이트)를 포함한다.
- [0194] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "방사성콘주게이트"는 본원에 기술된 임의의 방사성동위원소 또는 방사성핵종과 같은 방사성동위원소 또는 방사성핵종을 포함하는 임의의 콘주게이트를 지칭한다.
- [0195] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "방사성면역콘주게이트"는 본원에 기술된 임의의 방사성동위원소 또는 방사성핵종과 같은 방사성동위원소 또는 방사성핵종을 포함하는 임의의 면역콘주게이트를 지칭한다. 본 발명에서 제

공되는 방사성면역콘주게이트는 전형적으로 방사성동위원소 또는 방사성핵종으로부터 형성된 금속 복합체를 포함하는 이중작용성 콘주게이트를 지칭한다.

[0196] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "방사성면역요법"은 치료적 효과를 생성하기 위해 방사성면역콘주게이트를 사용하는 방법을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 방사성면역요법은 방사성면역콘주게이트를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서, 방사성면역콘주게이트의 투여는 대상체에서 치료적 효과를 생성한다. 일부 실시 형태에서, 방사성면역요법은 세포에 방사성면역콘주게이트를 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서, 방사성면역콘주게이트의 투여는 세포를 사멸시킨다. 방사성면역요법이 세포의 선택적 사멸을 수반하는 경우, 일부 실시 형태에서 세포는 암을 갖는 대상체에서의 암세포이다.

[0197] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제약 조성물"은 제약상 허용가능한 부형제와 함께 제형화된 본원에 기술된 방사성면역콘주게이트를 함유하는 조성물을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 제약 조성물은 포유동물에서 질환 치료를 위한 치료적 요법의 일부로서 정부 규제 기관의 승인을 받아 제조되거나 판매된다. 제약 조성물은 예를 들어 단위 투여 형태로 경구 투여하기 위한 것으로(예를 들어, 정제, 캡슐, 당의정, 껌 또는 시럽); 국소 투여를 위한 것으로(예를 들어, 크림, 겔, 로션 또는 연고로서); 정맥내 투여를 위한 것으로(예를 들어, 정맥내 사용에 적합한 용매 시스템 중의 그리고 미립자 색전이 없는 멸균 용액으로서); 또는 본원에 기술된 임의의 다른 제형으로 제형화될 수 있다.

[0198] 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용가능한 부형제"는 환자에서 비독성이고 비염증성인 특성을 갖는, 본원에 기술된 화합물 이외의 임의의 성분(예를 들어, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 지칭한다. 부형제는 예를 들어, 부착방지제, 산화방지제, 결합제, 코팅제, 압축 보조제, 봉해제, 염료(착색제), 연화제, 유화제, 충전제(회석제), 필름 형성제 또는 코팅제, 착향제, 향료, 글리탄트(유동 증강제), 활택제, 방부제, 인쇄 잉크, 방사선 보호제, 흡착제, 현탁제 또는 분산제, 감미제 또는 수화수(waters of hydration)를 포함할 수 있다. 예시적인 부형제는 아스코르브산, 히스티딘, 인산염 완충제, 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 탄산 칼슘, 인산칼슘(2염기성), 칼슘 스테아레이트, 크로스카르멜로스, 가교결합 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스폴리돈, 시스테인, 에틸셀룰로오스, 젤라틴, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 락토스, 마그네슘 스테아레이트, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로오스, 메틸 파라벤, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 사전젤라틴화 전분, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 나트륨 시트레이트, 나트륨 전분 글리콜레이트, 소르비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 스테아르산, 수크로스, 활석, 이산화티타늄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 및 자일리톨을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0199] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제약상 허용가능한 염"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 또는 알러지 반응 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 본원에 기술된 화합물의 염을 나타낸다. 제약상 허용가능한 염은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 제약상 허용가능한 염은 다음의 문헌에 기술되어 있다: Berge et al., *J. Pharmaceutical Sciences* 66:1-19, 1977 및 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. 염은 본원에 기술된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 원위치에서 제조될 수 있거나, 유리 염기 기를 적합한 유기 산과 반응시킴으로써 별개로 제조될 수 있다.

[0200] 본 발명의 화합물은 제약상 허용가능한 염으로 제조될 수 있도록 이온화가능한 기를 가질 수 있다. 이들 염은 무기 또는 유기 산을 포함하는 산 부가염일 수 있거나, 본 발명의 화합물의 산성 형태의 경우 염은 무기 또는 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 흔히, 화합물은 제약상 허용가능한 산 또는 염기의 부가 생성물로서 제조된 제약상 허용가능한 염으로 제조되거나 사용된다. 적합한 제약상 허용가능한 산 및 염기는 당업계에 잘 알려져 있다(예컨대 산 부가염을 형성하기 위한 염산, 황산, 브롬화수소산, 아세트산, 락트산, 시트르산, 또는 타르타르산, 및 염기성 염을 형성하기 위한 수산화칼륨, 수산화나트륨, 수산화암모늄, 카페인, 다양한 아민). 적절한 염의 제조 방법은 당업계에 잘 확립되어 있다.

[0201] 대표적인 산 부가염은 특히 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠술포네이트, 벤조에이트, 바이솔페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시트레이트, 시클로헥탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실술포네이트, 에탄술포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미술포네이트, 헵토네이트, 헥사노에이트, 히드로브로마이드, 히드로클로라이드, 히드로요오다이드, 2-히드록시-에탄술포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 술포네이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이

트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼슬페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 술페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 톨루엔술포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리성 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 및 마그네슘과, 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 및 에틸아민을 포함하지만 이에 한정되지 않는 비독성 암모늄, 사차 암모늄, 및 아민 양이온을 포함한다.

[0202] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 서로 부착된 적어도 2개의 아미노산의 스트링을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 적어도 3~5개의 아미노산을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 적어도 하나의 펩티드 결합을 통해 다른 아미노산에 부착된다. 당업자는 폴리펩티드가 하나 이상의 "비천연" 아미노산 또는 다른 엔티티(이는 그룹에도 불구하고 폴리펩티드 사슬에 통합될 수 있음)를 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 글리코실화될 수 있으며, 예를 들어 폴리펩티드는 하나 이상의 공유 연결된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단일 "폴리펩티드"(예를 들어, 항체 폴리펩티드)는 2개 이상의 개별 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있으며, 이는 일부 경우에 예를 들어 하나 이상의 디설피드 결합 또는 다른 수단에 의해 서로 연결될 수 있다.

[0203] "대상체"는 인간 또는 비-인간 동물(예를 들어, 포유동물)을 의미한다.

[0204] "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은 각각, 기준 서열과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드 서열, 또는 각각, 기준 서열 내의 상응하는 위치에서 동일한 특정 백분율의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩티드 서열(상기 두 서열이 최적으로 정렬된 경우)을 의미한다. 예를 들어, 기준 서열과 "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은 기준 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는다. 폴리펩티드의 경우, 비교 서열들의 길이는 일반적으로 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 또는 350개의 연속 아미노산(예를 들어, 전장 서열)일 것이다. 서열 동일성은 기본 설정에서 서열 분석 소프트웨어(예를 들어, 미국 53705 위스콘신주 매디슨 유니버시티 애비뉴 1710 유니버시티 오브 위스콘신 바이오테크놀로지 센터, Genetics Computer Group의 Sequence Analysis Software Package)를 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및 다른 변형에 상동성 정도를 할당함으로써 유사한 서열들을 매칭시킬 수 있다.

[0205] 본원에서 사용되는 바와 같이, 그리고 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이, 병태를 "치료하는 것" 또는 병태(예를 들어, 암과 같이 본원에 기술된 병태)의 "치료"는 임상 결과와 같은 유익한 결과 또는 원하는 결과를 얻기 위한 접근법이다. 유익한 또는 원하는 결과는, 검출가능하든 검출불가능하든, 하나 이상의 증상 또는 병태의 완화 또는 개선; 질환, 장애, 또는 병태의 정도의 감소; 질환, 장애, 또는 병태의 상태의 안정화(즉, 악화되지 않음); 질환, 장애, 또는 병태의 확산 방지; 질환, 장애, 또는 병태의 진행의 지연 또는 둔화; 질환, 장애, 또는 병태의 개선 또는 경감; 및 관해(부분적이든 전체적이든)를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 질환, 장애, 또는 병태를 "경감시킨다"는 것은 질환, 장애, 또는 병태의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상 소견이 치료의 부재 하에서의 정도 또는 시간 코스와 비교하여 감소되고/되거나 그 진행의 시간 코스가 둔화되거나 길어지는 것을 의미한다.

[0206] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대략"은 정량적 값과 관련하여 사용되는 경우, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 인용된 정량적 값 그 자체를 포함한다. 본원에서 사용되는 경우, 용어 "약" 또는 "대략"은 문맥으로부터 달리 추론되거나 표시되지 않는 한, 인용된 정량적 값으로부터의 $\pm 10\%$ 변동을 지칭한다.

[0207] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표적화 모이어티"는 주어진 표적에 결합할 수 있는 임의의 분자 또는 임의의 분자 부분을 지칭한다. 용어 "EGFR-cMET 표적화 모이어티"는 EGFR 및 cMET 둘 모두에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 예를 들어 항-EGFR-cMET 항체를 지칭한다.

[0208] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단편"은 EGFR 또는 cMET 단편을 지칭하는 데 사용되는 경우 N-말단 및/또는 C-말단 절단된 EGFR 또는 cMET 또는 이의 단백질 도메인을 지칭한다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 기술된 실시 형태에 따라 사용되는 EGFR 또는 cMET의 단편은 본 발명에 기술된 바와 같이 EGFR-cMET-표적화 모이어티에 의해 인식되고/되거나 결합되는 전장 EGFR 또는 cMET의 능력을 유지한다.

[0209] 본 발명을 설명하는 맥락에서 (특히 청구범위의 맥락에서) 단수형 용어("a" 및 "an" 및 "the") 및 유사한 지시 대상의 사용은 본원에서 달리 표시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

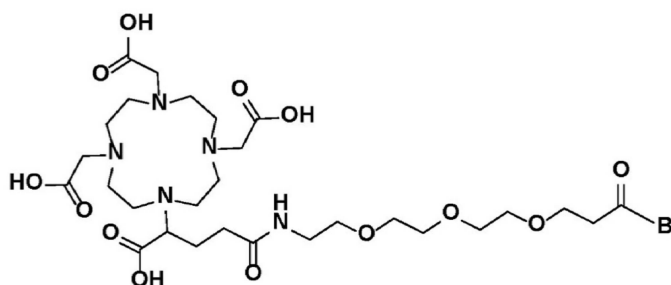
- [0210] 구체적으로 언급되거나, 문맥상 명확하지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해되고, "또는"과 "및" 둘 모두를 포함한다.
- [0211] 본원에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 특정된 특징 또는 구성요소 각각의 특징 개시로 간주되어야 한다.
- [0212] 용어 "포함하는", "갖는", "포함되는" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한, 개방형 용어(즉, "포함되지만 이에 한정되지 않는"을 의미함)로 해석되어야 한다. 용어 "~로 이루어진"은 폐쇄형으로 해석되어야 한다.
- [0213] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체"는 아미노산 서열이 지정된 항원에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 및 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 지칭한다. 본 발명에 따른 항체는 임의의 유형(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM) 또는 하위유형(예를 들어, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)일 수 있다. 당업자는 항체의 특징적인 서열 또는 부분이 항체의 하나 이상의 영역(예를 들어, 가변 영역, 초가변 영역, 불변 영역, 중쇄, 경쇄 및 이들의 조합)에서 발견되는 아미노산을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 당업자는 항체의 특징적인 서열 또는 부분이 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있고, 동일한 폴리펩티드 사슬 또는 상이한 폴리펩티드 사슬들에서 발견되는 서열 요소를 포함할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0214] 본원에서 사용되는 바와 같이 "항원 결합 단편"은 모 항체의 결합 특징의 특이성을 유지하는 항체의 일부를 지칭한다.
- [0215] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단리되고/되거나 실질적으로 정제될 수 있다.
- [0216] **화합물, 예를 들어, 면역곤주게이트 또는 방사성면역곤주게이트**
- [0217] 일 양태에서, 본 발명은 하기 구조를 포함하는 화합물, 예를 들어 면역곤주게이트 또는 방사성면역곤주게이트, 또는 이의 제약상 허용가능한 염을 제공한다:
- [0218] [화학식 I]
- [0219] $A-L^1-(L^2)_n-B$
- [0220] [여기서,
- [0221] A는 킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체이고,
- [0222] B는 EGFR 및 cMET 둘 모두에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 개시된 바와 같은 것을 특징으로 함)이고;
- [0223] L^1 은 결합, C=O, C=S, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이고;
- [0224] n은 1 내지 5의 정수(종점 포함)이고;
- [0225] L^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식 II:
- [0226] [화학식 II]
- [0227] $-X^1-L^3-Z^1-$
- [0228] 의 구조를 갖고,
- [0229] 여기서,
- [0230] X^1 은 $-C(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)-$ *, $-C(S)NR^1-$ *, $-NR^1C(S)-$ *, $-OC(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)O-$ *, $-NR^1C(O)NR^1-$ *, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-$ *, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-$ *, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-$ *, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-$ *, $-O-$ *, 또는 $-NR^1-$ *(여기서, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 또는 선택적 치환 아릴 또는 헤테로아릴임)이고;

[0231] L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 알킬 또는 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬이고;

[0232] Z^1 은 $-CH_2-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-NR^2C(O)-$, $-C(O)NR^2-$, 또는 $-NR^2-$ (여기서, "#"은 B에 대한 부착점을 나타내고, R^2 는 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)임].

[0233] 알킬, 헤테로알킬, 아릴, 또는 헤테로아릴의 전형적인 치환체는 할로(예를 들어, F, Cl, Br, I), OH, CN, 니트로, 아미노, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-8} 시클로알킬, C_{1-6} 헤테로알킬, C_{1-6} 헤테로시클로알킬, 할로알킬(예를 들어, CF_3), 알콕시(예를 들어, OCH_3), 알킬아미노(예를 들어, NH_2CH_3), 술폰일, 아릴, 및 헤테로아릴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

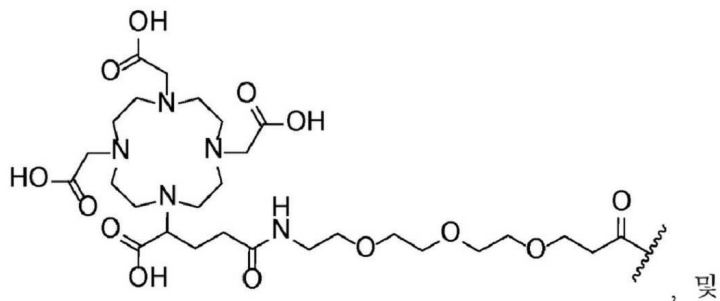
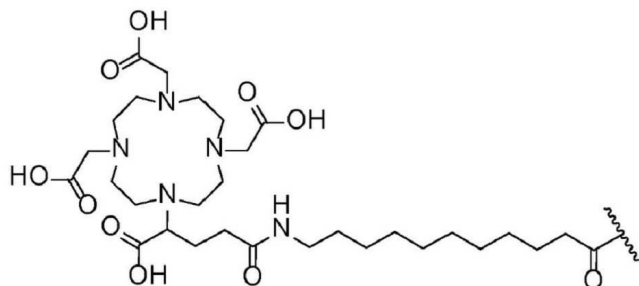
[0234] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)은 하기 예시된 구조 또는 이의 금속 복합체를 갖거나 포함한다:



[0235]

[0236] (여기서, B는 본원에 개시된 EGFR-cMET 항체 또는 이의 항원 결합 단편임).

[0237] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 하기 구조 중 하나, 또는 이의 금속 복합체를 포함한다:



[0238]

[0239] 일부 실시 형태에서, 제공된 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)은 약 25 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 15 nM 이하, 약 12.5 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 7.5 nM 이하, 약 7 nM 이하, 약 6.5 nM 이하, 약 6 nM 이하, 약 5 nM 이하, 약 4 nM 이하, 약 3.5 nM 이하, 약 3 nM, 또는 약 2.5 nM 이하의 K_d 값으로 EGFR 및 cMET의 다양한 발현 수준을 갖는 상이한 세포주들에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제공된 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)은 약 15 nM, 약 12.5 nM, 약 10 nM, 약 7.5 nM,

약 7 nM, 약 6.5 nM, 약 6 nM, 약 5 nM, 약 4 mM, 약 3.5 nM, 약 3 nM, 또는 약 2.5 nM의 Kd 값으로 EGFR 및 cMET의 다양한 발현 수준을 갖는 상이한 세포주들에 결합할 수 있다.

[0240] 일부 실시 형태에서, 본원에 추가로 기술된 바와 같이, 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)은 킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체를 포함하며, 이 금속 복합체는 방사성핵종을 포함할 수 있다. 이러한 일부 화합물에서, 킬레이팅 모이어티 대 EGFR-cMET 표적화 모이어티(예를 들어, EGFR-cMET 항체)의 평균 비 또는 중앙 비는 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 2 이하, 또는 약 1이다. 일부 화합물에서, 킬레이팅 모이어티 대 EGFR-cMET 표적화 모이어티(예를 들어, EGFR-cMET 항체)의 평균 비 또는 중앙 비는 약 1이다.

[0241] 일부 실시 형태에서, 방사성면역콘주게이트를 포유동물에게 투여한 후, (투여되는 방사선의 총량 중) 장 경로, 신장 경로 또는 이들 둘 모두에 의해 배출되는 방사선의 비율은 기준 방사성면역콘주게이트가 투여된 비견되는 포유동물에 의해 배출되는 방사선의 비율보다 더 크다. "기준 면역콘주게이트"는 적어도 (1) 상이한 링커를 갖고/갖거나; (2) 상이한 크기의 표적화 모이어티를 갖고/갖거나 (3) 표적화 모이어티가 결여되어 있다는 점에서 본원에 기술된 방사성면역콘주게이트와는 상이한 공지된 방사성면역콘주게이트를 의미한다. 일부 실시 형태에서, 기준 방사성면역콘주게이트는 [⁹⁰Y]-이브리투모맵 티옥세탄(Zevalin(⁹⁰Y)) 및 [¹¹¹In]-이브리투모맵 티옥세탄(Zevalin(¹¹¹In))으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0242] 일부 실시 형태에서, 주어진 경로 또는 경로 세트에 의해 배출되는 방사선의 비율은 기준 방사성면역콘주게이트가 투여된 비견되는 포유동물이 동일한 경로(들)에 의해 배출하는 방사선의 비율보다 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 더 크다. 일부 실시 형태에서, 배출되는 방사선의 비율은 기준 방사성면역콘주게이트가 투여된 비견되는 포유동물에 의해 배출되는 방사선의 비율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 3.5배, 적어도 4배, 적어도 4.5배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 또는 적어도 10배 더 크다. 배출 정도는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 소변 및/또는 대변의 방사능 측정에 의해 및/또는 소정 기간에 걸친 전신 방사능의 측정에 의해 측정될 수 있다. 또한, 예를 들어 국제 특허 공개 WO 2018/024869를 참조한다.

[0243] 일부 실시 형태에서, 배출 정도는 투여 후 적어도 또는 약 12시간, 투여 후 적어도 또는 약 24시간, 투여 후 적어도 또는 약 2일, 투여 후 적어도 또는 약 3일, 투여 후 적어도 또는 약 4일, 투여 후 적어도 또는 약 5일, 투여 후 적어도 또는 약 6일, 또는 투여 후 적어도 또는 약 7일의 시간대에 측정된다.

[0244] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)이 포유동물에게 투여된 후, 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)은 기준 화합물(예를 들어, 기준 콘주게이트, 예를 들어, 기준 면역콘주게이트, 예컨대 기준 방사성면역콘주게이트)과 비교하여 감소된 오프-타겟 결합 효과(예를 들어, 독성)를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 이러한 감소된 오프-타겟 결합 효과는 본원에 기술된 바와 같이 더 큰 배출 속도를 또한 나타내는 화합물(예를 들어, 면역콘주게이트 또는 방사성면역콘주게이트)의 특징이다.

[0245] 표적화 모이어티

[0246] 표적화 모이어티는 주어진 표적, 예를 들어, EGFR 또는 cMET, 또는 EGFR-cMET에 결합할 수 있는(예를 들어, 특이적으로 결합할 수 있거나, 특이적으로 결합하는 등) 임의의 분자 또는 임의의 분자 부분을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 나노바디, 아피바디, 및 피브로넥틴 유형 III 도메인(예를 들어 Centyrins 또는 Adnect ins)으로부터의 컨센서스 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 모이어티는 표적화 모이어티이자 치료적 모이어티이며, 즉, 모이어티는 주어진 표적에 결합할 수 있고 또한 치료적 이점도 제공한다.

[0247] 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 적어도 50 kDa, 적어도 75 kDa, 적어도 100 kDa, 적어도 125 kDa, 적어도 150 kDa, 적어도 175 kDa, 적어도 200 kDa, 적어도 225 kDa, 적어도 250 kDa, 적어도 275 kDa, 또는 적어도 300 kDa의 분자량을 갖는다.

[0248] 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 EGFR 및 cMET 둘 모두에 특이적으로 결합할 수 있고 이를 억제한다. "억제하다"는 표적화 모이어티가 EGFR, cMET 또는 이들 둘 모두의 하나 이상의 기능을 적어도 부분적으로 억제함

을 의미한다. 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 EGFR, cMET, 또는 이들 둘 모두의 하류 신호전달을 손상시키며, 예를 들어 EGFR 및 cMET의 다양한 발현 수준을 갖는 종양 세포의 성장 억제를 초래한다.

[0249] 표적

[0250] EGFR

[0251] 인간 EGFR(전암유전자 c-ErbB-1, 수용체 티로신-단백질 키나아제 erbB-1 및 EC 2.7.10.1로도 알려짐)은 UniProt P00533에 의해 식별된 단백질이다. 인간 EGFR 유전자(ERBB, ERBB1 및 HER1로도 알려짐)에 의해 코딩된 mRNA의 대안적인 스플라이싱으로 다음의 4가지의 이소형이 생성된다: 이소형 1(UniProt: P00533-1, v2(최종 서열 업데이트: 1997년 11월 1일)); 이소형 1에 대한 치환 F404L 및 L405S를 포함하고 이소형 1의 위치 406 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 2(UniProt: P00533-2, v1); 이소형 1의 위치 628 내지 705에 치환을 포함하고 이소형 1의 위치 706 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 3(UniProt: P00533-3, v1); 및 이소형 1에 대한 치환 C628S를 포함하고 이소형 1의 위치 629 내지 1210에 상응하는 아미노산 서열이 결여된 이소형 4(UniProt: P00533-4).

[0252] EGFR의 구조와 기능은 예를 들어, Ferguson, Annu Rev Biophys. (2008) 37: 353-373에 검토되어 있다. EGFR은 표피 성장 인자 계열(EGF 계열) 구성원에 대한 수용체인 막관통 단백질이다. 수용체는 큰 세포외 영역, 단일 스페닝 막관통 도메인, 세포내 막근접 도메인, 티로신 키나아제 도메인 및 C-말단 조절 영역을 포함한다. EGFR이 리간드에 결합하면 EGFR의 C-말단 조절 영역에 있는 여러 티로신 잔기(Y992, Y1045, Y1068, Y1148 및 Y1173)의 수용체 이량체화 및 자가인산화가 유도된다.

[0253] 비정상적인 EGFR 발현/활성은 신경계 장애 및 많은 암을 포함한 많은 질환과 관련이 있다.

[0254] 본 명세서에서 "EGFR"은 임의의 종으로부터의 EGFR을 지칭하며 임의의 종으로부터의 EGFR 이소형, 단편, 변이체 또는 동족체를 포함한다.

[0255] cMet

[0256] 인간 cMET(간세포 성장 인자 수용체(HGFR) 또는 티로신-단백질 키나아제 Met로도 알려짐)는 UniProt P08581에 의해 식별된 단백질이다. 인간 MET 유전자에 의해 코딩된 mRNA의 대안적인 스플라이싱으로 다음의 3가지의 이소형이 생성된다: 이소형 1(UniProt: P08581-1, v4(최종 서열 업데이트: 2009년 7월 7일)); 이소형 1의 위치 755에 아미노산 서열 "STWWKEPLNIVSFLFCFAS"가 삽입된 이소형 2(UniProt: P08581-2); 및 이소형 1의 위치 755 내지 764에 상응하는 아미노산 서열이 "RHVNIALIQR"로 치환되고 이소형 1의 위치 765 내지 1390에 상응하는 아미노산 서열이 추가로 결여된, 가용성 met 변이체 4로도 알려진 이소형 3(UniProt: P08581-3).

[0257] cMET의 구조는 예를 들어 Gherardi, 2003에서 검토되어 있으며, 이는 본원에 그 전체가 참고로 포함된다. cMET는 디설피드 결합된 알파 사슬(50 kDa)과 베타 사슬(145 kDa)로 구성된 이종이량체이다. cMET는 간세포 성장 인자(HGF) 및 세포내 키나아제 도메인에 대한 결합을 매개하는 N-말단 Sema 도메인을 포함한다. 세포 표면에서의 리간드 결합은 하류 신호전달 분자에 대한 도킹 부위를 제공하는 세포내 도메인에서의 cMET의 자가인산화 및 여러 신호전달 캐스케이드의 활성화를 유도한다.

[0258] cMET는 상피 세포 표면 상에서 정상 조직에서 발현된다. cMET 과발현은 많은 인간 종양 및 암에서 관찰되며, 이는 빈번하게는 전이성 표현형 및 불량한 예후와 관련된다. 높은 수준의 cMET 발현이 관찰된 암의 예는 비소세포 폐암, 췌장암, 결장직장암, 두경부 편평 세포 암종, 유방암 및 식도-위암을 포함한다. 이들 암에서는 EGFR과 cMET의 공동발현이 종종 관찰된다.

[0259] 항체 또는 이의 항원 결합 단편

[0260] 용어 "항체"는 천연이든 부분적으로 또는 전체적으로 합성에 의해 생성되든 상관없이 면역글로불린을 설명한다. 항체는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 항체는 바람직하게는 단클론 항체이다. 항체의 예로는 면역글로불린 이소타입, 예컨대 면역글로불린 G(IgG), 및 이의 이소타입 하위클래스, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와, 이들의 단편이 있다.

[0261] 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 관련 표적 분자(들)에 대한 결합을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fv, scFv, Fab, scFab, F(ab')₂, Fab₂, 디아바디, 트리아바디, scFv-Fc, 미니바디 및 단일 도메인 항체(예를 들어, VhH) 등이 포함된다. 따라서, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 "항체 또는 이의 단편"과 동일하다.

- [0262] 항체 및 이의 구축 및 사용 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005)에 기술되어 있다. 단클론 항체 및 기타 항체를 취하고 재조합 DNA 기술의 기법을 사용하여 원래 항체의 특이성을 보유하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생산하는 것이 가능하다. 이러한 기술은 하나의 항체의 CDR 또는 가변 영역을 다른 항체에 도입하는 것을 포함할 수 있다(EP-A-184187, GB 2188638A 및 EP-A-239400).
- [0263] 단클론 항체 기술과 관련된 오늘날의 기술을 고려하면 대부분의 항원에 대한 항체를 제조할 수 있다. 항원 결합 도메인은 항체의 일부(예를 들어 Fab 단편) 또는 합성 항체 단편(예를 들어 단쇄 Fv 단편(ScFv))일 수 있다. 선택된 항원에 대한 적합한 단클론 항체는 공지된 기술, 예를 들어 "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) 및 "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)에 개시된 것들에 의해 제조될 수 있다. 키메라 항체는 Neuberger, 1988에서 논의되어 있다.
- [0264] 본 발명에 따른 항체는 항원 결합 도메인을 포함한다. "항원 결합 도메인"은 표적 항원의 전부 또는 일부에 결합하는 분자의 일부를 설명한다. 항원이 큰 경우, 항체는 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있는데, 이 부분은 에피토프로 칭해진다. 항체 항원 결합 부위는 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 항체 항원 결합 부위는 바람직하게는 경쇄 가변(VL) 영역 및 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다. 항원 결합 도메인의 VH 및 VL 영역은 함께 Fv 영역을 구성한다.
- [0265] 항원 결합 도메인은 일반적으로 6개의 상보성 결정 영역(CDR), 즉, VH 영역에서 다음의 3개: HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 VL 영역에서 다음의 3개: LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 6개의 CDR은 함께, 표적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인의 일부인 항원 결합 도메인의 파라토프를 정의한다.
- [0266] VH 영역 및 VL 영역은 각 CDR의 양쪽에 프레임워크 영역(FR)을 포함하며, 이는 CDR에 대한 스캐폴드를 제공한다. N-말단에서 C-말단으로, VH 영역은 다음의 구조를 포함하고: N-말단-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-C-말단; VL 영역은 다음의 구조를 포함한다: N-말단-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-C-말단.
- [0267] 항체 CDR 및 FR을 정의하는 데에는 Kabat, 1991, Chothia, 1987에 기술된 것들, LeFranc, 2015에 기술된 바와 같은 IMGT 넘버링 및 Retter, 2005에 기술된 VBASE2와 같은 여러 가지 다른 관례가 있다. 본원에 기술된 항체의 VH 영역 및 VL 영역의 CDR 및 FR은 Kabat(Kabat, 1991)에 따라 정의되었다.
- [0268] 각각이 다른 표적에 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체는 "이중특이성 항체"로 칭해질 수 있다. 이와는 대조적으로, 단일 표적(예를 들어, EGFR 또는 cMET)에만 결합하는 항체는 "단일특이성 항체"로 칭해진다. 본 발명은 EGFR에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 방사성면역 콘쥬게이트)을 제공한다.
- [0269] 항-EGFR 항원 결합 도메인
- [0270] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항체의 CDR을 포함한다. 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항체의 FR을 추가로 포함한다. 즉, 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항체의 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.
- [0271] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 EGFR 결합 항체 클론 RAA22의 VH/VL 영역이거나 나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.
- [0272] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 항-EGFR 항체 클론 RAA22의 3개의 HCDR 또는 3개의 LCDR, 바람직하게는 3개의 VH CDR 및 3개의 VL CDR을 포함한다. 항체 RAA22의 VH 및 VL 도메인 서열이 본원에 기술되어 있으며, 따라서 상기 항체의 3개의 VH 도메인 CDR 및 3개의 VL 도메인 CDR이 상기 서열로부터 결정될 수 있다.
- [0273] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (1)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0274] (1) 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0275] 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1

- [0276] 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0277] 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3.
- [0278] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (1)에 따른 VH 영역을 포함하고, 여기서, VH 영역은 다음을 추가로 포함한다: 아래 (2)에 따른 FR:
- [0279] (2) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HFR1
- [0280] 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 HFR2
- [0281] 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 HFR3
- [0282] 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 HFR4,
- [0283] 또는 HFR1, HFR2, HFR3, 또는 HFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0284] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (3)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0285] (3) (1)에 따른 CDR 및 (2)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0286] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (4)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0287] (4) 서열 번호 15의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.
- [0288] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (5)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0289] (5) 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0290] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0291] 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0292] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.
- [0293] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (5)에 따른 VL 영역을 포함하고, 여기서, VL 영역은 다음을 추가로 포함한다: 아래 (6)에 따른 FR:
- [0294] (6) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 LFR1
- [0295] 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 LFR2
- [0296] 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 LFR3
- [0297] 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 LFR4,
- [0298] 또는 LFR1, LFR2, LFR3, 또는 LFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0299] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (5)에 따른 CDR 및 위의 (6)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역을 포함한다.
- [0300] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (7)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0301] (7) 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.
- [0302] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (5) 내지 (7) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항원 결합 도메인은 (1), (3) 및 (4) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 (5) 및 (7) 중 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.
- [0303] 항-cMET 항원 결합 도메인

- [0304] cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 cMET에 결합할 수 있는 항체의 CDR을 포함한다. 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 cMET에 결합할 수 있는 항체의 FR을 추가로 포함한다. 즉, 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 cMET에 결합할 수 있는 항체의 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.
- [0305] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 본원에 기술된 cMET 결합 항체 클론(즉, 항-cMET 항체 클론 B09-GL)의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.
- [0306] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 cMET 결합 항체 클론 B09-GL의 3개의 HCDR 또는 3개의 LCDR, 바람직하게는 3개의 VH CDR 및 3개의 VL CDR을 포함한다. 항체 B09-GL의 VH 및 VL 도메인 서열이 본원에 기술되어 있으며, 따라서 상기 항체의 3개의 VH 도메인 CDR 및 3개의 VL 도메인 CDR이 상기 서열로부터 결정될 수 있다.
- [0307] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (8)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0308] (8) 하기 CDR을 포함하는 VH 영역:
- [0309] 서열 번호 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0310] 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0311] 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3.
- [0312] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (8)에 따른 VH 영역을 포함하고, 여기서, VH 영역은 다음을 추가로 포함한다: 아래 (9)에 따른 FR:
- [0313] (9) 서열 번호 23의 아미노산 서열을 갖는 HFR1
- [0314] 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 HFR2
- [0315] 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 HFR3
- [0316] 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 HFR4,
- [0317] 또는 HFR1, HFR2, HFR3, 또는 HFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0318] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (10)에 따른 VH를 포함한다:
- [0319] (10) (8)에 따른 CDR 및 (9)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.
- [0320] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (11)에 따른 VH 영역을 포함한다:
- [0321] (11) 서열 번호 31의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.
- [0322] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (12)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0323] (12) 하기 CDR을 포함하는 VL 영역:
- [0324] 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0325] 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0326] 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.
- [0327] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (12)에 따른 VL 영역을 포함하고, 여기서, VL 영역은 다음을 추가로 포함한다: 아래 (13)에 따른 FR:
- [0328] (13) 서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 LFR1
- [0329] 서열 번호 28의 아미노산 서열을 갖는 LFR2
- [0330] 서열 번호 29의 아미노산 서열을 갖는 LFR3

- [0331] 서열 번호 30의 아미노산 서열을 갖는 LFR4,
- [0332] 또는 LFR1, LFR2, LFR3, 또는 LFR4 중 하나 이상의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0333] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (14)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0334] (14) (12)에 따른 CDR 및 (13)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.
- [0335] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 아래 (15)에 따른 VL 영역을 포함한다:
- [0336] (15) 서열 번호 32의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.
- [0337] 일부 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위의 (8) 내지 (11) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (12) 내지 (15) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.
- [0338] *이중특이성 항체의 항원 결합 도메인*
- [0339] 본 발명은 방사성 페이로드에 콘주게이션된 항체(즉, 이중특이성 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)을 제공하며, 여기서, 방사성면역콘주게이트의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR에 결합할 수 있는 항원-결합 도메인의 CDR을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 cMET에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인의 CDR을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 항원 결합 도메인은 EGFR에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인의 CDR 및 FR을 포함하고, 제2 항원 결합 도메인은 cMET에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인의 CDR 및 FR을 포함한다. 즉, 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 항원 결합 단편은 EGFR에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역을 포함하는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0340] 일부 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 EGFR 결합 항체 클론 RAA22의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함하고, cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 cMET 결합 항체 클론 B09-GL의 VH/VL 영역이거나 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다. 이러한 이중특이성 항체는 "RAA22/B09" 또는 "RAA22/B09 이중특이성 항체"로 칭해질 수 있다.
- [0341] 일부 실시 형태에서, 제1 항원 결합 도메인은
- [0342] 위의 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (5) 내지 (7) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함하고;
- [0343] 제2 항원 결합 도메인은
- [0344] 위의 (8) 내지 (11) 중 어느 하나에 따른 VH 영역 및 위의 (12) 내지 (15) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.
- [0345] 특정 실시 형태에서, 본 발명의 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0346] 표피 성장 인자 수용체(EGFR)와 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인; 및
- [0347] cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인
- [0348] (여기서, 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함함:
- [0349] (i) 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:
- [0350] 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1
- [0351] 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2
- [0352] 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및
- [0353] (ii) 하기 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

- [0354] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1
- [0355] 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2
- [0356] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3).
- [0357] 특정 실시 형태에서, 제1 항원 결합 도메인은
- [0358] 서열 번호 15의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및
- [0359] 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하고/하거나,
- [0360] 제2 항원 결합 도메인은
- [0361] 서열 번호 31의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및
- [0362] 서열 번호 32의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.
- [0363] 불변 영역
- [0364] 일부 실시 형태에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 변역글로불린 중쇄 불변(CH) 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, CH는 IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD, IgE 또는 IgM의 중쇄 불변 서열이거나 이로부터 유래된다.
- [0365] 일부 실시 형태에서, CH 영역은 인간 변역글로불린 G1 불변(IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; 서열 번호 33) 또는 이의 단편이다.
- [0366] 일부 실시 형태에서, CH 영역은 서열 번호 39 또는 40의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0367] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 기술된 바와 같은 VH 영역 및 본원에 기술된 바와 같은 CH 영역을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄를 포함한다.
- [0368] 일부 실시 형태에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 변역글로불린 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시 형태에서, CL 영역은 서열 번호 34에 기재된 카파 CL 영역이거나 이로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, CL 영역은 서열 번호 41에 기재된 람다 CL 영역이거나 이로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다: 서열 번호 34에 기재된 카파 CL 영역이거나 이로부터 유래된 제1 CL 영역; 및 서열 번호 41에 기재된 람다 CL 영역이거나 이로부터 유래된 제2 CL 영역.
- [0369] 일부 실시 형태에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0370] 제1 중쇄(여기서, 제1 중쇄는 제1 항원 결합 도메인의 VH 영역, 및 제1 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함);
- [0371] 제1 경쇄(여기서, 제1 경쇄는 제1 항원 결합 도메인의 VL 영역, 및 제1 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함);
- [0372] 제2 중쇄(여기서, 제2 중쇄는 제2 항원 결합 도메인의 VH 영역, 및 제2 중쇄 불변(CH) 영역 또는 이의 단편을 포함함); 및
- [0373] 제2 경쇄(여기서, 제2 경쇄는 제2 항원 결합 도메인의 VL 영역, 및 제2 경쇄 불변(CL) 영역 또는 이의 단편을 포함함).
- [0374] 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제1 VH 영역과 제1 CH 영역을 포함하는 경우, 이들 영역은 함께 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제1 중쇄를 형성한다는 것, 즉 제1 VH 영역과 제1 CH 영역이 서로 연결된다는 것이 이해될 것이다. 이와 유사하게, 제2 VH 영역 및 제2 CH 영역은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제2 중쇄를 형성하고; 제1 VL 영역 및 제1 CL 영역은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제1 경쇄를 형성하고; 제2 VL 영역 및 제2 CL

영역은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제2 경쇄를 형성한다.

- [0375] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제1 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서,
- [0376] (i) 제1 중쇄는 서열 번호 35에 기재된 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0377] (ii) 제2 중쇄는 서열 번호 36에 기재된 중쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0378] 일부 실시 형태에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 기술된 바와 같은 VL 영역 및 본원에 기술된 바와 같은 CL 영역을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄를 포함한다.
- [0379] 일부 실시 형태에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제1 및 제2 경쇄를 포함하고, 여기서,
- [0380] (i) 제1 경쇄는 서열 번호 37에 기재된 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0381] (ii) 제2 경쇄는 서열 번호 38에 기재된 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 70%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0382] 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 CH, CL, 중쇄 및/또는 경쇄는 예를 들어 아래에 더 자세히 기술된 바와 같이 Fc 이펙터 기능을 폐지하거나 감소시키고/시키거나, 이중이량체 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 형성을 촉진하고/하거나, 동계 중쇄 및 경쇄 쌍형성의 효능을 증가시키고/시키거나 콘주게이트 형성을 보조하기 위한 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형이 가해진 CH, CL, 중쇄 및 경쇄는 각각 변형된 CH, CL, 중쇄 및 경쇄로 지칭될 수 있다.
- [0383] 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 Fc γ 수용체, 예컨대 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII 및/또는 보체에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 감소시키거나 폐지하기 위해 중쇄(들)의 CH 영역(들)에 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 Fc 이펙터 기능을 폐지하거나 감소시킨다. 하나 이상의 Fc γ 수용체 및 보체에 대한 항체의 결합을 감소시키거나 폐지하기 위한 돌연변이는 공지되어 있으며, 예를 들어 Organesyan, 2008에 기술된 L234F/L235E/P331S의 "삼중 돌연변이" 또는 "TM"을 포함한다. 항체 이펙터 기능을 조절하는 것으로 알려진 다른 돌연변이는 예를 들어 Wang, 2018에 기술되어 있다.
- [0384] 삼중 돌연변이를 포함하는 CH 영역의 예로는 서열 번호 39 및 40이 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 서열 번호 39에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CH 영역을 포함하고, 다른 중쇄는 서열 번호 40에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CH 영역을 포함하며, 상기 CH 영역들 중 하나 또는 둘 모두(바람직하게는 둘 모두)는 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산, 및 위치 331에 세린을 포함하고, 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0385] 삼중 돌연변이를 함유하는 CH 영역을 포함하는 본 발명의 중쇄의 예로는 서열 번호 35 및 36이 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 하나는 서열 번호 35에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖고, 다른 중쇄는 서열 번호 36에 기재된 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지며, 상기 중쇄들 중 하나 또는 둘 모두(바람직하게는 둘 모두)는 위치 234에 페닐알라닌, 위치 235에 글루탐산, 및 위치 331에 세린을 포함하고, 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0386] 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VL 및 CL 영역, 및 VH 영역 및 CH1 영역은 함께 Fab 영역을 구성한다. 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 나머지 항체 또는 이의 항

원 결합 단편은 Fc 영역을 구성한다.

- [0387] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 기술된 바와 같은 아미노산 서열, 치환, 결실 및 삽입의 위치를 포함하는 불변 도메인의 아미노산 잔기 위치는 EU 넘버링에 따라 넘버링된다(Edelman, 2007).
- [0388] 이중특이성 형식
- [0389] 본 발명은 본원에 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 내의 비대칭 IgG-유사 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 비대칭 이중특이성 분자는 전형적으로 각 표적에 대해 1가이다. 예를 들어, Klein, 2012에 기술된 바와 같이, 1가 이중특이성 IgG의 개념은 (i) 수용체 동종이량체화를 유발하지 않고, (ii) 잠재적으로, 각 항원에 대한 친화력 상실로 인해 비표적 조직에 대해 감소된 독성을 갖고, (iii) 두 항원이 모두 표적 세포 상에서 선별적으로 제한되거나 풍부하게 발현되는 경우 더 나은 선택성을 갖는다는 점에서 고유한 치료적 틈새를 갖는 것으로 여겨진다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 비대칭 IgG-유사 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0390] 비대칭 IgG-유사 이중특이성 항체는 2개의 개별 중쇄의 이종이량체화 및 동계 경쇄 및 중쇄의 정확한 쌍형성을 포함한다. 중쇄의 이종이량체화는 여러 기술, 예컨대 노브-인투-홀(knob-into-hole), CH3의 정전기 조정, CH3 가닥 교환 조작 도메인 및 류신 지퍼에 의해 처리될 수 있다. 정확한 경쇄 및 중쇄의 쌍형성은 일반적인 경쇄, CH1과 CL 간의 도메인 교차, 링커에 의한 중쇄와 경쇄의 커플링, 두 개의 별개 단클론으로부터의 중쇄-경쇄 이량체의 시험관 내 조립, 전체 Fab 도메인의 계면 조작 또는 CH1/CL 계면의 디설파이드 조작의 사용과 함께 이러한 중쇄 이종이량체화 기술 중 하나를 사용하여 보장될 수 있다.
- [0391] 비대칭 IgG-유사 이중특이성 항체의 특정 예시 형식은 "DuetMab"으로 지칭된다. DuetMab 항체는 2개의 별개의 중쇄의 이종이량체화를 위한 KIH 기술을 사용하고, CH1-CL 계면 중 하나의 천연 디설파이드 결합을 조작된 디설파이드 결합으로 대체하여 동계 중쇄 및 경쇄 쌍형성의 효율성을 증가시킨다. DuetMab과 관련된 개시내용은 예를 들어, 미국 특허 제9,527,927호 및 Mazor, 2015에서 찾아볼 수 있고, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0392] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0393] (a) 변형된 CH 영역(여기서, 변형된 중쇄는 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함); 및
- [0394] (b) 변형된 상응하는 CL 영역(여기서, 변형된 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함함)을 포함하고,
- [0395] 여기서,
- [0396] (i) 제1 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제1 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함하거나;
- [0397] (ii) 제2 중쇄는 변형된 CH 영역을 포함하고, 제2 경쇄는 변형된 상응하는 CL 영역을 포함한다.
- [0398] 일부 실시 형태에서, 천연 비-시스테인 아미노산이 시스테인 아미노산으로 치환되어 발생하는 변형된 CH 영역의 치환된 시스테인, 및 천연 비-시스테인 아미노산이 시스테인 아미노산으로 치환되어 발생하는 변형된 상응하는 CL 영역의 치환된 시스테인은 디설파이드 결합을 형성할 수 있다.
- [0399] 일부 실시 형태에서, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인으로의 치환을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0400] 일부 실시 형태에서, 변형된 CH 영역은 위치 126에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환 및 위치 219에서 천연 시스테인 아미노산의 비-시스테인 아미노산, 예를 들어, 발린으로의 치환을 포함하고; 변형된 상응하는 CL 영역은 위치 121에서 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인으로의 치환 및 위치 214에서 천연 시스테인 아미노산의 비-시스테인 아미노산, 예를 들어, 발린으로의 치환을 포함하며, 여기서, 불변 영역의 넘버링은 EU 인덱스에 따른 것이다.
- [0401] 일부 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제2 CH 영역 및 상응하는 제2 경쇄를 포함하며, 여기서, 제2 CH 영역 및 상응하는 제2 CL은 천연 비-시스테인 아미노산의 시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하지 않고, 천연 시스테인의 비-시스테인 아미노산으로의 치환을 포함하지 않는다.
- [0402] 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 기능적 특성

- [0403] *결합 친화도*
- [0404] 본원에 기술된 방사성면역конjugate의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR에 대해 특정 친화도를 갖는 EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인 및/또는 cMET에 대해 특정 친화도를 갖는 cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 특징으로 할 수 있다. 인간, 마우스 또는 시노몰구스 EGFR 또는 cMET와 같은 동계 항원에 대한 화합물(예를 들어, 방사성면역конjugate)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합 친화도는 예를 들어 Biacore를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도는 예를 들어 EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이성 항체의 일부로서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정될 수 있다. 대안적으로, 결합 친화도는 EGFR 또는 cMET에 대해 단일특이성인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 결합 친화도는 해당 분야에 공지되거나 본원에 제공된 바와 같이 BIAcore를 사용하여 결정된다.
- [0405] 결합 친화도는 전형적으로 Kd(항원 결합 도메인과 이의 항원 사이의 평형 해리 상수)로 측정된다. 잘 이해되는 바와 같이, Kd 값이 낮을수록 항원 결합 도메인의 결합 친화도가 높다. 예를 들어, 10 nM의 Kd로 표적에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 100 nM의 Kd로 동일한 표적에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인보다 더 높은 친화도로 상기 표적과 결합하는 것으로 간주된다.
- [0406] 인간 EGFR에 대한 언급은 서열 번호 42에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것과 같이 EGFR의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 마우스 EGFR에 대한 언급은 SinoBiological에서 카탈로그 번호 51091-M08H로 입수가능한 분자로부터 생산된 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 시노몰구스 EGFR에 대한 언급은 서열 번호 46에 기재된 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 인간 cMET에 대한 언급은 서열 번호 43에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 마우스 cMET에 대한 언급은 SinoBiological에서 카탈로그 번호 50622-M08H로 입수가능한 분자로부터 생산된 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 시노몰구스 cMET에 대한 언급은 서열 번호 44에 기재된 아미노산 서열을 지칭할 수 있다.
- [0407] *EGFR 친화도*
- [0408] 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역конjugate)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 낮은 친화도로 EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "낮은 친화도"는 10 nM 이상의 해리 상수(Kd)로 인간 EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인을 지칭한다. 이러한 낮은 친화도의 EGFR 항원 결합 도메인을 포함하는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역конjugate)의 항체 또는 항원 결합 단편은 피부 독성과 같은 정상 조직에서의 온-타겟 독성의 감소를 나타낼 수 있으므로 인간 EGFR과 "더 높은 친화도"로 결합할 수 있는 EGFR 항원 결합 도메인을 포함하는 конjugate와 비교하여 개선된 안전성 프로파일을 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "더 높은 친화도" 또는 "높은 친화도"는 10 nM 미만의 Kd로 인간 EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인을 지칭한다.
- [0409] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM 또는 40 nM 이상의 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 10 내지 100 nM, 20 내지 100 nM, 30 내지 100 nM, 40 내지 100 nM, 10 내지 80 nM, 20 내지 80 nM, 30 내지 80 nM, 40 내지 80 nM, 10 내지 70 nM, 20 내지 70 nM, 30 내지 70 nM, 40 내지 70 nM, 10 내지 60 nM, 20 내지 60 nM, 30 내지 60 nM, 40 내지 60 nM, 10 내지 50 nM, 20 내지 50 nM, 30 내지 50 nM, 또는 40 내지 50 nM의 Kd로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0410] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 각각 서열 번호 47 및 48에 기재된 바와 같은, 항체 QD6의 중쇄 가변(VH) 영역 서열 및 경쇄 가변(VL) 영역 서열을 포함하는 항원 결합 도메인의 친화도보다 더 낮은 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0411] 예를 들어, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 각각 서열 번호 47 및 48에 기재된 항체 QD6의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 항원 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배 또는 7배 더 높은 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 각각 서열 번호 47 및 48에 기재된 항체 QD6의 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 항원 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd보다 2배 내지 10배, 3배 내지 10배, 4배 내지 10배, 5배 내지 10배, 6배 내지 10배, 7배 내지 10배, 2배 내지 9배, 3배 내지 9배, 4배 내지 9배, 5배 내지 9배, 6배 내지 9배, 7배 내지 9배, 2배 내지 8배, 3배 내지 8배, 4배 내지 8배, 5배 내지 8배, 6배 내지 8배, 7배 내지 8배 더 높은 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.

- [0412] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 각각 서열 번호 15 및 16에 기재된 항체 RAA22의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항원 결합 도메인의 친화도와 유사한 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 각각 서열 번호 15 및 16에 기재된 항체 RAA22의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항원 결합 도메인이 인간 EGFR과 결합하는 Kd와 5배 미만, 4배 미만, 3배 미만, 2배 미만, 1배 미만 또는 0.5배 미만의 차이가 있는 Kd를 갖는 친화도로 인간 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0413] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 또한 시노물구스 EGFR과 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 700 nM 미만, 600 nM 미만, 500 nM 미만, 400 nM 미만, 300 nM 미만, 또는 250 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 시노물구스 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 100 내지 700 nM, 100 내지 600 nM, 100 내지 500 nM, 100 내지 400 nM, 100 내지 300 nM, 150 내지 250 nM, 100 내지 200 nM의 Kd를 갖는 친화도로 시노물구스 EGFR에 결합할 수 있다. EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 항원 결합 도메인이 인간 EGFR에 결합하는 Kd보다 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배 더 높은 Kd 이하인 Kd로 시노물구스 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0414] EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 또한 마우스 EGFR과 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 1 μ M 미만, 900 nM 미만, 800 nM 미만, 700 nM 미만, 600 nM 미만, 또는 650 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 마우스 EGFR에 결합할 수 있다. 대안적으로, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 100 nM 내지 1 μ M, 200 내지 900 nM, 300 내지 800 nM, 400 내지 700 nM, 400 내지 600 nM, 또는 450 내지 550 nM의 Kd로 마우스 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0415] 바람직하게는, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 인간 EGFR 및 시노물구스 EGFR과 결합할 수 있다. 이러한 교차 반응성은 전임상 개발 동안 시노물구스 원숭이에서 항체 및 콘주게이트의 투여 및 안전성 테스트를 수행할 수 있게 하므로 유리하다. 훨씬 더 바람직하게는, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 인간 EGFR, 시노물구스 EGFR 및 마우스 EGFR과 결합할 수 있다. 예를 들어, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위에 제시된 Kd 값으로 인간 EGFR, 시노물구스 EGFR 및 마우스 EGFR(예를 들어 10 내지 100 nM의 Kd로 인간 EGFR, 100 내지 700 nM의 Kd로 시노물구스 EGFR 및 100 nM 내지 1 μ M의 Kd로 마우스 EGFR)와 결합할 수 있다.
- [0416] *cMET* 친화도
- [0417] cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 20 nM, 15 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM 또는 2.5 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 인간 cMET에 결합할 수 있다. 대안적으로, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 1 내지 20 nM, 1 내지 15 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 9 nM, 1 내지 8 nM, 1 내지 7 nM, 1 내지 6 nM, 1 내지 5 nM, 1 내지 4 nM, 1 내지 3 nM, 1 내지 2.5 nM, 또는 2 내지 2.5 nM의 Kd를 갖는 친화도로 인간 cMET에 결합할 수 있다.
- [0418] cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 시노물구스 cMET와 결합할 수 있다. 예를 들어, cMET와의 결합이 가능할 수 있는 항원 결합 도메인은 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM 또는 2.5 nM 미만의 Kd를 갖는 친화도로 시노물구스 cMET에 결합할 수 있다. 대안적으로, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 1 내지 20 nM, 1 내지 15 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 9 nM, 1 내지 8 nM, 1 내지 7 nM, 1 내지 6 nM, 1 내지 5 nM, 1 내지 4 nM, 1 내지 3 nM, 1 내지 2.5 nM, 또는 2 내지 2.5 nM의 Kd를 갖는 친화도로 시노물구스 cMET에 결합할 수 있다. cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은, 항원 결합 도메인이 인간 cMET에 결합하는 Kd보다 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 더 높은 Kd 이하인 Kd를 갖는 친화도로 시노물구스 cMET에 결합할 수 있다.
- [0419] 바람직하게는, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 인간 cMET 및 시노물구스 cMET와 결합할 수 있다. 이러한 교차 반응성은 전임상 개발 동안 시노물구스 원숭이에서 항체의 투여 및 안전성 테스트를 수행할 수 있게 하므로 유리하다. 예를 들어, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 위에 제시된 Kd 값으로 인간 cMET 및 시노물구스 cMET(예를 들어, 1 내지 20 nM의 Kd로 인간 cMET 및 1 내지 20 nM의 Kd로 시노물구스 cMET)와 결합하는 것이 가능할 수 있다.
- [0420] *특이적 결합*
- [0421] 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR과 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 항원 결합 단편은 cMET와 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본

원에 기술된 항체 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 항원 결합 단편은 EGFR과 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인인, EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인, 및 cMET와 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인인, cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0422] "특이적"이라는 용어는 항원 결합 도메인이 이의 특이적 결합 파트너(들), 여기서는 EGFR 또는 cMET 이외의 분자에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는 상황을 지칭할 수 있다. 이러한 분자는 "비표적 분자"로 지칭된다. "특이적"이라는 용어는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 다수의 항원에 의해 운반되는 특정 에피토프, 예컨대, EGFR 또는 cMET 상의 에피토프에 특이적인 경우에도 적용가능하며, 이 경우 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 에피토프를 운반하는 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다.

[0423] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 비표적 분자에 대한 결합 정도가 예를 들어 ELISA, SPR, 바이오층 간섭측정(BLI), 마이크로규모 열영동(MicroScale Thermophoresis, MST) 또는 방사성면역측정법(RIA)에 의해 측정된 표적에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합의 약 10% 미만인 경우, 비표적 분자에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는 것으로 간주된다. 대안적으로, 결합 특이성은 결합 친화도의 관점에서 반영될 수 있으며, 여기서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다른 비표적 분자에 대한 친화도보다 적어도 0.1 자릿수 더 큰 친화도로 EGFR 및/또는 cMET에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또 다른 비표적 분자에 대한 친화도보다 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 또는 2.0 자릿수 초과 중 하나인 친화도로 EGFR 및/또는 cMET에 결합할 수 있다.

[0424] EGFR은 다음의 밀접하게 관련된 4개의 수용체 티로신 키나아제의 서브패밀리인 ErbB 계열의 수용체의 구성원이다: EGFR, HER2, HER3 및 HER4. RAA22 항원 결합 도메인은 HER2, HER3 및 HER4에 대한 결합을 나타내지 않았는데, 이는 이 항원 결합 도메인이 EGFR과 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 실시 형태에서, EGFR과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 HER2, HER3 또는 HER4에 결합하지 않거나 이에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는다.

[0425] cMET는 Ron 및 Sema 4a를 포함하는 수용체 티로신 키나아제의 서브패밀리의 구성원이다. B09-GL 항원 결합 도메인은 Ron 및 Sema 4a에 대한 결합을 나타내지 않았는데, 이는 이 항원 결합 도메인이 cMET와 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 실시 형태에서, cMET와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 Ron, Sema 4a에 결합하지 않거나 이에 대해 어떠한 유의미한 결합도 나타내지 않는다.

[0426] 동시 결속

[0427] 본원에 기술된, EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 항원 결합 도메인들 둘 모두가 그의 각각의 EGFR 및 cMET 표적과 동시에 결속되는 능력을 특징으로 할 수 있다. EGFR 및 cMET와 동시에 결속되는 능력을 갖는 본 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 유리할 것으로 예상되는데, 이는 수많은 종양이 EGFR 및 cMET 둘 모두를 공동발현하는 것으로 알려져 있으므로 본 발명의 화합물에 의해 표적화될 수 있기 때문이다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR 및 cMET와 동시에 결속될 수 있다.

[0428] 동시 결속을 측정하는 이러한 방법에 대한 자세한 내용은 실시예에서 확인할 수 있다.

[0429] 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 내재화

[0430] 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 효율적인 내재화를 매개하는 능력을 특징으로 할 수 있다.

[0431] 세포에 의한 항체 또는 이의 항원 결합 단편(또는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트))의 내재화는 생세포를 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키고, 내재화를 위한 충분한 시간 후 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)을 검출함으로써 분석될 수 있다. 내재화는 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 국소화의 검출에 의해 결정될 수 있다. 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)이 세포 표면 상에 남아 있는 경우(예를 들어, 세포 표면 상에서 검출되고/되거나 세포 내부에서 검출되지 않음), 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘

쥬게이트)은 내재화되지 않은 것으로 결정된다. 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)이 세포 내부에서 검출되는 경우(예를 들어, 세포 소기관에 국소화됨), 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)은 내재화된 것으로 결정된다.

[0432] 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)이 효율적인 내재화를 매개할 수 있는지를 시각화하기 위한 예시적인 방법은 산성 pH에서 형광을 나타내는 pH 민감성 염료로 항체를 표지하는 단계 및 이들 표지된 항체 또는 콘쥬게이트를 세포에 첨가하는 단계를 포함한다. 세포 내로의 내재화는 형광을 모니터링하여 검출할 수 있다. 관찰된 형광이 특정 기간, 예를 들어 48시간에 걸쳐 표지된 비결합 대조 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)의 형광보다 큰 경우, 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 또는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)은 내재화 및 리소솜으로의 전달을 매개할 수 있는 것으로 간주된다. 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 내재화를 시각화하는 이 방법에 대한 추가의 자세한 내용은 실시예에서 확인할 수 있다.

[0433] EGFR과 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 cMET와 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EGFR 또는 cMET 단일특이성 대조군과 비교할 때 더 효율적인 내재화를 매개하는 능력을 특징으로 할 수 있다. 이러한 특성을 나타내는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 두 표적 모두를 공동 발현하는 종양 세포에 대해 더 큰 선택성을 나타낼 것으로 예상되고 유의한 수준의 공동 발현을 나타내지 않는 정상 조직에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 영향을 최소화할 수 있기 때문에 유리할 것으로 예상된다.

[0434] 일부 실시 형태에서, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 면역콘쥬게이트 또는 방사성면역콘쥬게이트)이 본원에서 제공되며, 여기서, 중쇄 가변 도메인은 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하며, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 아래 제공된 서열 부록에 설명된 항체의 것이다.

[0435] 일부 실시 형태에서, 서열 부록에 예시된 항체의 변이체인 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 면역콘쥬게이트 또는 방사성면역콘쥬게이트)이 제공되며, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 CDR당 3개 이하의 아미노산 잔기(예를 들어, 3개 또는 2개 또는 1개의 아미노산 잔기(들))가 서열 부록에 설명된 항체의 CDR 서열과 상이한 CDR 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 서열 부록에 예시된 항체의 변이체인 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 면역콘쥬게이트 또는 방사성면역콘쥬게이트)이 제공되며, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 부록에 설명된 항체의 CDR과 집합적으로 3개 이하의 아미노산 잔기(예를 들어, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 잔기)만큼 서열이 상이한 6개의 CDR의 세트를 갖는다.

[0436] 일부 실시 형태에서, 서열 부록에 설명된 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 면역콘쥬게이트 또는 방사성면역콘쥬게이트)이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 서열 부록에 예시된 항체의 변이체인 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 화합물(예를 들어, 면역콘쥬게이트 또는 방사성면역콘쥬게이트)이 제공되며, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 (1) 서열 부록에 설명된 항체의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 87.5%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 도메인; 및 (2) 서열 부록에 있는 상기 항체의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 87.5%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 도메인을 갖는다.

[0437] 서열 부록

[0438] 항-EGFR 항체 클론 RAA22에 대한 CDR 서열

[0439] HCDR1 - DNDFS (서열 번호 1)

[0440] HCDR2 - AIVAVFRTETYAQKFQD (서열 번호 2)

[0441] HCDR3 - RLMSAISGPGAPLLM (서열 번호 3)

[0442] LCDR1 - TGTSSDVGGYNYVS (서열 번호 4)

- [0443] LCDR2 - DVSKRPS (서열 번호 5)
- [0444] LCDR3 - SSYTSSDTLEI (서열 번호 6)
- [0445] 항-EGFR 항체 클론 RAA22에 대한 FR 서열
- [0446] HFR1 - QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFS (서열 번호 7)
- [0447] HFR2 - WVRQAPGQGLEWMG (서열 번호 8)
- [0448] HFR3 - RVKITADISTRITTYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 번호 9)
- [0449] HFR4 - WGQGTLVTVSS (서열 번호 10)
- [0450] LFR1 - QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (서열 번호 11)
- [0451] LFR2 - WYQQHPGKAPKLMY (서열 번호 12)
- [0452] LFR3 - GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (서열 번호 13)
- [0453] LFR4 - FGGGTKLTVL (서열 번호 14)
- [0454] 항-EGFR 항체 클론 RAA22의 중쇄 가변(VH) 영역의 아미노산 서열(서열 번호 15)
- QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF
RTETYAQKFQDRVKITADISTRITTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLL
MWGQGTLVTVSS
- [0455]
- [0456] 항-EGFR 항체 클론 RAA22의 경쇄 가변(VL) 영역의 아미노산 서열(서열 번호 16):
- QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRP
SGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL
- [0457]
- [0458] 항-c-Met 항체 클론 B09-GL에 대한 CDR 서열
- [0459] HCDR1 - DYYIH (서열 번호 17)
- [0460] HCDR2 - WMNPNSGNTGYAQKFQG (서열 번호 18)
- [0461] HCDR3 - GQGYTHS (서열 번호 19)
- [0462] LCDR1 - RASEGIYHWLA (서열 번호 20)
- [0463] LCDR2 - KASSLAS (서열 번호 21)
- [0464] LCDR3 - QQYSNYPPT (서열 번호 22)
- [0465] 항-c-Met 항체 클론 B09-GL에 대한 FR 서열
- [0466] HFR1 - QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (서열 번호 23)

[0467] HFR2 - WVRQATGQGLEWMG (서열 번호 24)

[0468] HFR3 - RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR (서열 번호 25)

[0469] HFR4 - WGQGTMTVTVSS (서열 번호 26)

[0470] LFR1 - DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIC (서열 번호 27)

[0471] LFR2 - WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호 28)

[0472] LFR3 - GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC (서열 번호 29)

[0473] LFR4 - FGGGTKLEIK (서열 번호 30)

[0474] 항-c-Met 항체 클론 B09-GL의 중쇄 가변(VH) 영역의 아미노산 서열(서열 번호 31):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVTVSS

[0475]

[0476] 항-c-Met 항체 클론 B09-GL의 경쇄 가변(VL) 영역의 아미노산 서열(서열 번호 32):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIK

[0477]

[0478] 인간 면역글로불린 G1 중쇄 불변(CH) 영역의 아미노산 서열(서열 번호 33):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0479]

[0480] 야생형 인간 면역글로불린 카파 불변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 34):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0481]

[0482] "EGFR-cMET TM" 항체의 항-EGFR의 중쇄의 아미노산 서열(서열 번호 35):

[0483] 하기 치환은 볼드체로 표시되고 밑줄이 그어져 있다:

[0484] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "노브" 돌연변이(T366W); 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C)(여기서, 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름).

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF
RTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLL
MWGQGTLTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
YDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0485]

[0486] "EGFR-cMET TM" 항체의 항-c-Met의 중쇄의 아미노산 서열(서열 번호 36):

[0487] 하기 치환은 볼드체로 표시되고 밑줄이 그어져 있다:

[0488] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스테인 돌연변이(Y349C)(여기서, 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름).

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPN
SGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQG
TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK
AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0489]

[0490] "EGFR-cMET TM" 항체의 항-EGFR의 경쇄의 아미노산 서열(서열 번호 37):

[0491] 하기 치환은 볼드체로 표시되고 밑줄이 그어져 있다:

[0492] S121C 및 C214V(여기서, 넘버링은 EU 인덱스에 따름).

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLLMIYDVSKRP
SGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPK
AAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ
SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEYS

[0493]

[0494] "EGFR-cMET TM" 항체의 항-c-Met의 경쇄의 아미노산 서열(서열 번호 38):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0495]

[0496] "노브" 돌연변이, 안정화 디설피드 가교체를 형성하는 시스테인을 포함하도록 변형되고, 시스테인 삽입이 없고 TM은 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열 번호 39):

[0497] 하기 치환은 볼드체로 표시되고 밑줄이 그어져 있다:

[0498] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "노브" 돌연변이(T366W); 채간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V); 안정화 시스테인 돌연변이(S354C)(여기서, 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름).

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAP
EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0499]

[0500] "홀" 돌연변이, 안정화 디설피드 가교체를 형성하는 시스템을 포함하도록 변형되고, 시스템인 삽입이 없고 TM은 있는 인간 면역글로불린 G1 CH 영역의 아미노산 서열(서열 번호 40):

[0501] 하기 치환은 볼드체로 표시되고 밑줄이 그어져 있다:

[0502] 삼중 돌연변이(TM; L234F, L235E 및 P331S); "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V); 및 안정화 시스템인 돌연변이(Y349C)(여기서, 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따름).

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPR
EPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0503]

[0504] S121C 및 C214V 치환을 포함하도록 변형된 인간 면역글로불린 램다 불변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 41):

GQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS

[0505]

[0506] 인간 EGFR 세포의 도메인의 아미노산 서열(서열 번호 42):

LEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNNEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKT
IQEVAGYVLIANTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMR
NLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHGSCQKCDPSCP
NGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVC
RKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGS
CVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT
SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL
EIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFG
TSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKC
NLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPA
GVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

[0507]

[0508] 인간 *c-Met* 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열 번호 43):

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV
 AEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDITYDDQLISCGSVN
 RGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFF
 VGNTINSSYFPDHLPHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFES
 NNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIIRFCSINSLHSHMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVF
 NILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAPIKYVN
 DFFNKIVNKNNVRCLQHFYGNHEHCFNRITLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVD
 LFMGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDLSDHPVS
 PEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKC
 VRSEECLESGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTR
 VLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVIT
 SISPKYGPMAAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQITISTEF
 AVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVH
 EAGRNFVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNP
 VFVKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTV
 PNDLLKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFT

[0509]

[0510] 시노물구스 원숭이 *c-Met* 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열 번호 44):

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV
 AEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDITYDDQLISCGSVN
 RGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPNQPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFF
 VGNTINSSYFPHHPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFES
 NNFIYFLTVQRETLNAQTFHTRIIRFCSLNSGLHSHMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVF
 NILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAPIKYVN
 DFFNKIVNKNNVRCLQHFYGNHEHCFNRITLLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRV
 DLFMGQFSEVLLTSISTFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDLSDHP
 VSPEVIVEHPLNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCH
 DKCVRSEECPSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKK
 TRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPII
 TSISPKYGPMAAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQITISTE
 FAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLHSVSVPRMVINV
 HEAGRNFVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVH
 NPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLC
 TVPNDLLKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFT

[0511]

[0512] 시노물구스 원숭이 EGFR 세포외 도메인의 아미노산 서열(서열 번호 46):

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKT
IQEVAGYVLIANTVERIPLNLQIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMR
NLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNLHLGSCQKCDPSCP
NGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVC
RKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGS
CVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCT
SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL
EIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFG
TSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKC
NILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPA
GVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPS

[0513]

[0514] 항-EGFR 항체 클론 QD6의 VH 영역의 아미노산 서열(서열 번호 47):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVV
RTETYAQKFQDRVKITADISTRTTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLL
MWGQGTLVTVSS

[0515]

[0516] 항-EGFR 항체 클론 QD6의 VL 영역의 아미노산 서열(서열 번호 48):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIVDSERP
SGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCFSYTSSTLEIFGGGTLTLTVL

[0517]

[0518] 킬레이팅 모이어티 또는 이의 금속 복합체

[0519] 킬레이팅 모이어티

[0520] 적합한 킬레이팅 모이어티의 예는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DOTMA(1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산, DOTAM(1,4,7,10-테트라키스(카르바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸), DOTPA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라 프로피온산), DO3AM-아세트산(2-(4,7,10-트리(2-아미노-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)아세트산), DOTA-GA 무수물(2,2',2''-(10-(2,6-디옥소테트라히드로-2H-피란-3-일)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-트리(일)트리아세트산), DOTP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스폰산)), DOTMP(1,4,6,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라메틸렌 포스폰산), DOTA-4AMP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(아세트아미도-메틸렌포스폰산), CB-TE2A(1,4,8,11-테트라아자바이시클로[6.6.2]헥사데칸-4,11-디아세트산), NOTA(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산), NOTP(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리(메틸렌 포스폰산)), TETPA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라프로피온산), TETA(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라 아세트산), HEHA(1,4,7,10,13,16-헥사아자시클로헥사데칸-1,4,7,10,13,16-헥사아세트산), PEPA(1,4,7,10,13-펜타아자시클로펜타데칸-N,N',N'',N''',N''''-펜타아세트산), H₄octapa(N,N'-비스(6-카르복시-2-피리딜메틸)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산), H₂dedpa(1,2-[[6-(카르복시)-피리딘-2-일]-메틸아미노]에탄), H₆phospa(N,N'-(메틸렌포스포네이트)-N,N'-[6-(메톡시카르보닐)피리딘-2-일]-메틸-1,2-디아미노에탄), TTHA(트리에틸렌테트라민-N,N,N',N'',N''',N''''-헥사아세트산), DO2P(테트라아자시클로도데칸 디메탄포스폰산), HP-DO3A(히드록시프로필테트라아자시클로도데칸트리아세트산), 에페록사민, DTPA(디에틸렌트리아민펜타아세트산), DTPA-BMA(디에틸렌트리아민펜타아세트산-비스메틸아미드), 옥타덴테이트-HOPO(옥타덴테이트 히드록시피리디논), 또는 포르피린을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0521] 바람직하게는, 킬레이팅 모이어티는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), DOTMA

(1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산, DOTAM(1,4,7,10-테트라키스(카르바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸), DO3AM-아세트산(2-(4,7,10-트리스(2-아미노-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)아세트산), DOTP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(아세트아미도-메틸렌포스포산)), DOTA-4AMP(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(아세트아미도-메틸렌포스포산)), NOTA(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산), 및 HP-DO3A(10-(2-히드록시프로필)-1,4,7-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-트리아세트산)로부터 선택된다.

[0522] 일부 실시 형태에서, 킬레이팅 모이어티는 DOTA이다.

[0523] 일부 실시 형태에서, 화합물은 킬레이팅 모이어티의 금속 복합체를 포함한다. 예를 들어, 킬레이팅 기는 망간, 철, 및 가돌리늄과 같은 금속 및 동위원소(예를 들어, 60 내지 10,000 keV의 일반적인 에너지 범위의 동위원소), 예컨대 본원에서 논의된 임의의 방사성동위원소 및 방사성핵종과의 금속 킬레이트 조합에 사용될 수 있다.

[0524] 일부 실시 형태에서, 킬레이팅 모이어티는 검출체로서 유용하며, 따라서 이러한 검출가능한 킬레이팅 모이어티를 포함하는 화합물은 진단제 또는 치료진단제로서 사용될 수 있다.

[0525] 방사성동위원소 및 방사성핵종

[0526] 일부 실시 형태에서, 금속 복합체는 방사성핵종을 포함한다. 적합한 방사성동위원소 및 방사성핵종의 예는 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{82}Rb , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , $^{227\text{Th}}$, 및 $^{229\text{Th}}$ 를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0527] 일부 실시 형태에서, 금속 복합체는 ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , $^{227\text{Th}}$, 및 $^{229\text{Th}}$ 로부터 선택되는 방사성핵종을 포함한다.

[0528] 특정 실시 형태에서, 금속 복합체는 ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu , 및 ^{225}Ac 로부터 선택되는 방사성핵종을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 금속 복합체는 ^{177}Lu 또는 ^{225}Ac 의 방사성핵종을 포함한다.

[0529] 일부 실시 형태에서, 방사성핵종은 알파 방출체, 예를 들어, 아스타틴-211(^{211}At), 비스무트-212(^{212}Bi), 비스무트-213(^{213}Bi), 악티늄-225(^{225}Ac), 라듐-223(^{223}Ra), 납-212(^{212}Pb), 토륨-227($^{227\text{Th}}$), 또는 테르븀-149(^{149}Tb), 또는 이들의 자손이다. 일부 실시 형태에서, 알파 방출체는 악티늄-225(^{225}Ac), 또는 이의 자손이다.

[0530] 특정 실시 형태에서, 금속 복합체는 ^{225}Ac 또는 이의 자손의 알파 방출체를 포함한다.

[0531] 링커

[0532] 본 발명의 화합물은 하기 화학식 I의 구조를 포함한다:

[0533] [화학식 I]

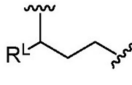
[0534] $\text{A-L}^1-(\text{L}^2)_n\text{-B}$

[0535] (여기서, 각각의 변수는 위의 [발명의 내용] 섹션에서 정의됨).

[0536] 화학식 I의 각각의 화합물은 $-\text{L}^1-(\text{L}^2)_n$ -으로서의 링커 모이어티를 포함하며, 여기서,

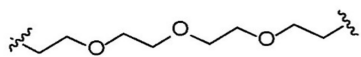
[0537] L^1 은 결합, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, 선택적 치환 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬, 선택적 치환 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이고;

[0538] n 은 1 내지 5의 정수(종점 포함)이고;

- [0539] 각각의 L^2 는 독립적으로, 하기 화학식 II의 구조를 갖는다:
- [0540] [화학식 II]
- [0541] $-X^1-L^3-Z^1-$
- [0542] [여기서,
- [0543] X^1 은 $-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-$, $-C(S)NR^1-$, $-NR^1C(S)-$, $-OC(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)O-$, $-NR^1C(O)NR^1-$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-$, $-O-$, 또는 $-NR^1-$ (여기서, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 또는 선택적 치환 아릴 또는 헤테로아릴임)이고;
- [0544] L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 알킬 또는 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬(예를 들어, $(CH_2CH_2O)_{2-20}$)이고;
- [0545] Z^1 은 $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$, 또는 $-NR^2-#$ (여기서, "#"은 B에 대한 부착점을 나타내고, R^2 는 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴임)임].
- [0546] 일부 실시 형태에서, L^1 은 선택적 치환 C_1-C_6 알킬 또는 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬이다. 특정 실시 형태에서, L^1 은 치환 C_1-C_6 알킬 또는 치환 C_1-C_6 헤테로알킬이고, 치환체는 헤테로아릴 기(예를 들어, 6원 질소 함유 헤테로아릴)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, L^1 은 C_1-C_6 알킬이다. 예를 들어, L^1 은 $-CH_2CH_2-$ 이다. 일부 실시 형태
- 에서, L^1 은 결합이다. 일부 실시 형태에서, L^1 은  이고, 여기서, R^1 은 수소 또는 $-CO_2H$ 이다.
- [0547] 일부 실시 형태에서, X^1 은 $-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-$, 또는 $-NR^1-$ 이고, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소, 선택적 치환 C_1-C_6 알킬, 선택적 치환 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이다. 일부 실시 형태에서, X^1 은 $-C(O)NR^1-$ 이고, "*"는 L^3 에 대한 부착점을 나타내고, R^1 은 수소이다.
- [0548] 일부 실시 형태에서, L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 알킬(예를 들어, C_3-C_{30} 알킬, C_3-C_{25} 알킬, C_3-C_{20} 알킬, C_3-C_{15} 알킬, C_3-C_{10} 알킬, C_5-C_{30} 알킬, C_5-C_{25} 알킬, C_5-C_{20} 알킬, C_5-C_{15} 알킬, 및 C_5-C_{10} 알킬) 또는 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬(예를 들어, C_3-C_{30} 헤테로알킬, C_3-C_{25} 헤테로알킬, C_3-C_{20} 헤테로알킬, C_3-C_{15} 헤테로알킬, C_3-C_{10} 헤테로알킬, C_5-C_{30} 헤테로알킬, C_5-C_{25} 헤테로알킬, C_5-C_{20} 헤테로알킬, C_5-C_{15} 헤테로알킬, 및 C_5-C_{10} 헤테로알킬)이다. 예시적인 C_1-C_{50} 헤테로알킬로는 C_5-C_{30} 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, C_5-C_{25} 폴리에틸렌 글리콜, C_5-C_{20} 폴리에틸렌 글리콜, C_5-C_{15} 폴리에틸렌 글리콜)이 있다. 특정 실시 형태에서, L^3 은 C_5-C_{25} 폴리에틸렌 글리콜, C_5-C_{20} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 C_5-C_{15} 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0549] 일부 실시 형태에서, L^3 은 선택적 치환 C_1-C_{50} 헤테로알킬(예를 들어, C_1-C_{40} 헤테로알킬, C_1-C_{30} 헤테로알킬, C_1-C_{20} 헤테로알킬, C_2-C_{18} 헤테로알킬, C_3-C_{16} 헤테로알킬, C_4-C_{14} 헤테로알킬, C_5-C_{12} 헤테로알킬, C_6-C_{10} 헤테로알킬, C_8-C_{10} 헤테로알킬, C_4 헤테로알킬, C_6 헤테로알킬, C_8 헤테로알킬, C_{10} 헤테로알킬, C_{12} 헤테로알킬, C_{16} 헤테로알킬, C_{20} 헤테로알킬, 또는 C_{24} 헤테로알킬)이다.
- [0550] 일부 실시 형태에서, L^3 은 1~20개의 옥시에틸렌($-O-CH_2-CH_2-$) 단위, 예를 들어, 2개의 옥시에틸렌 단위(PEG2), 3개의 옥시에틸렌 단위(PEG3), 4개의 옥시에틸렌 단위(PEG4), 5개의 옥시에틸렌 단위(PEG5), 6개의 옥시에틸렌

단위(PEG6), 7개의 옥시에틸렌 단위(PEG7), 8개의 옥시에틸렌 단위(PEG8), 9개의 옥시에틸렌 단위(PEG9), 10개의 옥시에틸렌 단위(PEG10), 12개의 옥시에틸렌 단위(PEG12), 14개의 옥시에틸렌 단위(PEG14), 16개의 옥시에틸렌 단위(PEG16), 또는 18개의 옥시에틸렌 단위(PEG18)를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 포함하는 선택적 치환 C₁-C₅₀ 헤테로알킬이다.

[0551] 특정 실시 형태에서, L³은 1~20개의 옥시에틸렌(-O-CH₂-CH₂-) 단위 또는 이의 일부를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 포함하는 선택적 치환 C₁-C₅₀ 헤테로알킬이다. 예를 들어, L³은 아래 예시된 바와 같은 PEG3을 포함한다:



[0552]

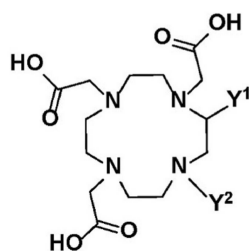
[0553] 일부 실시 형태에서, L³은 (CH₂CH₂O)_m(CH₂)_w이고, m 및 w는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수(종점 포함)이고, m 및 w 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0554] 일부 실시 형태에서, L³은 치환 C₁-C₅₀ 알킬 또는 치환 C₁-C₅₀ 헤테로알킬이고, 치환체는 헤테로아릴 기(예를 들어, 6원 질소 함유 헤테로아릴)를 포함한다.

[0555] 일부 실시 형태에서, Z¹은 CH₂, C=O, 또는 NR¹이고; 여기서, R¹은 H, 선택적 치환 C₁-C₆ 알킬, 선택적 치환 C₁-C₆ 헤테로알킬, 선택적 치환 아릴, 또는 선택적 치환 헤테로아릴이다.

[0556] 특정 실시 형태에서, A-L¹-(L²)_n-B는 하기 화학식 I-a로 표시되거나, 또는 이의 금속 복합체일 수 있다:

[0557] [화학식 I-a]



[0558]

[0559] (여기서, Y¹은 -CH₂OCH₂(L²)_n-B, -C(O)(L²)_n-B, 또는 -C(S)(L²)_n-B이고, Y²는 -CH₂CO₂H이거나; 또는 Y¹은 H이고 Y²는 L¹-(L²)_n-B임).

[0560] **가교결합 기**

[0561] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 킬레이팅, 링커, 및 가교결합 기를 포함하는 이중작용성 킬레이팅을 사용하여 합성된다. 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)이 형성되면, 가교결합 기는 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)에 없을 수 있다.

[0562] 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 표적화 모이어티 대신에 또는 그에 추가하여 가교결합 기를 포함한다(예를 들어, 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 B는 가교결합 기를 포함한다).

[0563] 가교결합 기는 공유 결합에 의해 2개 이상의 분자를 연결할 수 있는 반응성 기이다. 가교결합 기는 링커 및 킬레이팅 모이어티를 치료적 모이어티 또는 표적화 모이어티에 부착하는 데 사용될 수 있다. 가교결합 기는 또한 링커 및 킬레이팅 모이어티를 생체 내에서 표적에 부착하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 가교결합 기는 아미노 반응성, 메티오닌 반응성 또는 티올 반응성 가교결합 기이거나, 소르타아제 인식 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노 반응성 또는 티올 반응성 가교결합 기는 활성화된 에스테르, 예를 들어 히드록시숙신이미드 에스테르, 2,3,5,6-테트라플루오로페놀 에스테르, 4-니트로페놀 에스테르 또는 이미테이트, 무수물, 티올, 디술피드, 말레이미드, 아지드, 알킨, 변형된 알킨, 변형된 알켄, 할로젠, 술포네이트, 할로아세틸, 아민, 히드라지드, 디아지린, 포스핀, 테트라진, 이소티오시아네이트, 또는 옥사지리딘을 포함한다. 일부 실시

형태에서, 소르타아제 인식 서열은 말단 글리신-글리신-글리신(GGG) 및/또는 LPTXG 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 여기서, X는 임의의 아미노산이다. 당업자는 가교결합 기의 사용이 본원에 개시된 특정 구조물에 한정되지 않으며 오히려 다른 공지된 가교결합 기를 포함할 수 있음을 이해할 것이다.

[0564] 제약 조성물

[0565] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 화합물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 제약 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에서의 사용용으로 제형화될 수 있다. 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체가 적절한 제형화를 위해 제약 조성물에 또한 포함될 수 있다. 본 발명과 함께 사용하는 것에 대해 양립가능한 적합한 제형의 비제한적 예는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed., 1985에 기술된 것을 포함한다. 약물 전달 방법에 대한 간략한 검토에 대해서는, 예를 들어, Langer (Science, 249:1527-1533, 1990)을 참조한다.

[0566] 제약 조성물은 본원에 논의된 다양한 투여 경로 중 임의의 것을 위한 것으로 제형화될 수 있다(예를 들어 본원에서 "투여 및 투여량" 하위섹션 참조). 데포 주사 또는 부식성 임플란트 또는 성분과 같은 수단에 의한 지속 방출 투여가 고려된다. 따라서, 본 발명은 특히, 허용가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체, 예를 들어 물, 완충수, 식염수 또는 PBS에 용해되거나 현탁된 본원에 개시된 제제(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 제약 조성물은 특히, pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제, 습윤제 또는 세제와 같은 생리학적 조건과 비슷해지게 하기 위한 제약상 허용가능한 보조 물질을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 제약 조성물은 경구 전달용으로 제형화되고, 정제 또는 캡슐과 같은 단위 투여 형태의 제형화를 위한 결합제 또는 충전제와 같은 불활성 성분을 선택적으로 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제약 조성물은 국소 투여용으로 제형화되고, 크림, 연고, 젤, 페이스트 또는 점안액의 제형화를 위한 용매 또는 유화제와 같은 불활성 성분을 선택적으로 함유할 수 있다.

[0567] 일부 실시 형태에서, 제공된 제약 조성물은 통상적인 멸균 기술에 의해 멸균되며, 예를 들어 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수성 용액은 그대로 사용하기 위한 것으로 패키징되거나, 또는 동결건조될 수 있다. 동결건조된 제조물은 예를 들어 투여 전에 멸균 수성 담체와 조합될 수 있다. 제조물의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 가장 바람직하게는 6 내지 7, 예컨대 6 내지 6.5일 것이다. 고체 형태의 생성된 조성물은 예를 들어 정제 또는 캡슐의 밀봉된 패키지에서와 같이 각각이 고정량의 상기 언급된 제제(들)을 함유하는 다중 단위 용량 단위로 패키징될 수 있다. 고체 형태의 제약 조성물은 또한 국소 적용가능 크림 또는 연고용으로 설계된 짜낼 수 있는 튜브와 같은 유연한 양을 위한 용기에 패키징될 수 있다.

[0568] 치료 방법

[0569] 일 양태에서, 본 발명은 치료 방법을 제공하며, 본 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 바와 같은 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)을 투여하는 단계를 포함한다.

[0570] 대상체

[0571] 일부 개시된 방법에서, 요법제(예를 들어, 치료제를 포함함)가 대상체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어 인간이다.

[0572] 일부 실시 형태에서, 대상체는 암을 앓고 있거나 암이 발병할 위험이 있다. 예를 들어, 대상체는 암으로 진단되었을 수 있다. 예를 들어, 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 대상체는 암의 임의의 병기, 예를 들어 I기, II기, III기 또는 IV기(림프절 침범이 있거나 없고 전이가 있거나 없음)를 가질 수 있다. 제공된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 및 조성물은 암의 추가 성장을 예방하거나 감소시킬 수 있고/있거나 그렇지 않으면 암을 개선할 수 있다(예를 들어, 전이를 예방하거나 감소시킴). 일부 실시 형태에서, 대상체는 암을 앓고 있지 않지만, 예를 들어 환경 노출, 하나 이상의 유전자 돌연변이 또는 변이체, 가족력 등과 같은 하나 이상의 위험 인자의 존재로 인해 암이 발생할 위험이 있는 것으로 결정되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 암으로 진단되지 않았다.

[0573] 일부 실시 형태에서, 암은 EGFR 및 cMET를 발현하는 세포를 포함하는 임의의 암이다. 특정 실시 형태에서, 암은 폐암, 결장직장암, 췌장암 또는 두경부암이다.

[0574] 투여 및 투여량

[0575] 본원에 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 및 이의 제약 조성물은 전신 및 국소 투여 경로를 포

합하는 임의의 다양한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0576] 진신 투여 경로는 비경구 경로 및 장 경로를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 또는 이의 제약 조성물은 비경구 경로, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 두개내 또는 피내로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 또는 이의 제약 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 또는 이의 제약 조성물은 장 투여 경로, 예를 들어 경위장관 경로로 또는 경구로 투여된다.

[0577] 국소 투여 경로는 종양주위 주사 및 종양내 주사를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0578] 제약 조성물은 방사선 치료 계획, 진단적, 및/또는 치료적 치료를 위해 투여될 수 있다. 방사선 치료 계획 또는 진단 목적으로 투여되는 경우, 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)은 진단적 유효 용량으로 및/또는 치료적 유효 용량을 결정하는 데 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 제약 조성물은 장애 및 그의 합병증의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 이미 병태(예를 들어, 암)를 앓고 있는 대상체(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 이러한 목적을 달성하기에 적절한 양은 질환 또는 의학적 병태와 관련된 적어도 하나의 증상을 실질적으로 개선하기에 충분한 화합물의 양인 "치료적 유효량"으로 정의된다. 예를 들어, 암 치료에서, 질환 또는 병태의 임의의 증상을 감소시키거나, 예방하거나, 지연시키거나, 억제하거나 정지시키는 제제 또는 화합물은 치료적으로 유효할 것이다. 치료적 유효량의 제제 또는 화합물은 질환 또는 병태를 치유하는 것이 요구되지는 않지만, 예를 들어, 질환 또는 병태의 발병이 지연, 방해, 또는 예방되도록, 질환 또는 병태의 증상이 개선되도록, 또는 질환 또는 병태의 기간이 변경되도록, 질환 또는 병태에 대한 치료를 제공할 수 있다. 예를 들어, 개체에서 질환 또는 병태가 덜 심각해질 수 있고/있거나 회복이 가속화된다. 일부 실시 형태에서, 대상체에게 제1 용량의 화합물(예를 들어 방사성면역콘주게이트) 또는 조성물을 방사선 치료 계획에 유효한 양으로 투여하고, 그 후 제2 용량 또는 용량 세트의 화합물(예를 들어 방사성면역콘주게이트) 또는 조성물을 치료적 유효량으로 투여한다.

[0579] EGFR 및 cMET를 발현하는 세포를 포함하는 암을 치료하기 위해, 본 발명의 방법은 전형적으로, 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어 인간)에게 상기 제공된 화합물 또는 조성물의 제1 용량을 방사선 치료 계획에 유효한 양으로 투여하는 단계, 이어서 상기 제공된 화합물 또는 조성물의 후속 용량을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0580] 일부 실시 형태에서, 제1 용량으로 투여되는 화합물 또는 조성물과 제2 용량으로 투여되는 화합물 또는 조성물은 동일하다.

[0581] 일부 실시 형태에서, 제1 용량으로 투여되는 화합물 또는 조성물과 제2 용량으로 투여되는 화합물 또는 조성물은 상이하다.

[0582] 치료적 유효량은 질환 또는 병태의 중증도 및 대상체의 기타 특성(예를 들어, 체중)에 따라 달라질 수 있다. 대상체(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에 대한 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트) 및 조성물의 치료적 유효량은 개인차(예를 들어, 대상체의 연령, 체중 및 상태의 차이)를 고려하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0583] 일부 실시 형태에서, 개시된 화합물(예를 들어, 방사성 면역콘주게이트)은 암세포를 표적화하는 향상된 능력을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 개시된 화합물(예를 들어, 방사성면역콘주게이트)의 유효량은 콘주게이션되지 않은, 및/또는 방사성표지되지 않은 표적화 모이어티의 치료적 효과를 위한 등가 용량보다 낮다(예를 들어, 이의 약 90%, 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.1% 이하임).

[0584] 유효량을 포함하는 본원에 개시된 제약 조성물의 단회 또는 다회 투여는 치료하는 의사에 의해 선택되는 용량 수준 및 패턴으로 수행될 수 있다. 용량 및 투여 일정은 대상체에서의 질환 또는 병태의 중증도에 따라 결정되고 조정될 수 있으며, 이는 임상이가 일반적으로 실시하는 방법 또는 본원에 기술된 방법에 따라 치료 과정 전반에 걸쳐 모니터링될 수 있다.

[0585] 하기 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며 어떠한 방식으로든 개시내용의 나머지 부분을 제한하지 않는다.

[0586] **실시예**

- [0587] 실시예 1 - RAA22/B09 DuetMab 설계 및 구축
- [0588] 이 실시예는 EGFR과 c-Met 둘 모두와 결합할 수 있는 이중특이성 항체 분자의 생성을 설명한다.
- [0589] 1.1 항-cMET 항체 0021U3-B09의 단리 및 확인
- [0590] cMET-특이성 scFv 항체는 본질적으로 기술된 바와 같이 재조합 포유동물 발현 비오틀화 단량체 인간 cMET(MedImmune)에 대한 일련의 반복된 패닝 선별 사이클에서 대규모 나이트 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리하였다(Vaughan, 1996). 상기 선별 출력의 라운드 2로부터의 scFv를 박테리아 주변세포질에서 발현시키고 HGF:cMET HTRF®(균일 시간 분할 형광) 리간드 수용체 억제 결합 분석에서 인간 cMET 수용체와 HGF 리간드의 결합을 억제하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 강력한 억제 효과를 나타내는 상위 히트를 선별하고 DNA 서열결정을 수행하였다. 그 후 고유한 유전자를 인간 면역글로불린 G2(IgG2) 항체로 전환시켜 본질적으로 기술된 바와 같이 포유동물 세포에서 생산하였다(Persic, 1997). 그 후, 정제된 항체를 HGF:cMET HTRF® 결합 분석에서 그의 억제 효과를 기초로 하여 순위를 매겼다. 추가 특성화를 위해 가장 강력한 항체인 0021U3-B09를 선별하였다.
- [0591] 1.2 항-cMET 항체 0021U3-B09의 최적화.
- [0592] 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위해, 0021U3-B09의 가변 프레임워크 영역에 있는 비-Vernier 프레임워크 잔기(Foote and Winter 1992)를 특이적으로 표적화하고 가장 가까운 인간 생식세포계열 서열과 매칭되도록 변경하였다. VH 영역에서는 기준 인간 생식세포계열 서열 IGHV1-8*01과 매칭되도록 7개의 아미노산 잔기가 돌연변이되었다. VL 영역에서는 기준 인간 생식세포계열 서열 IGKV1-5*03과 매칭되도록 3개의 잔기가 돌연변이되었다. VH 및 VL 영역의 모든 잔기는 활성 손실 없이 성공적으로 생식세포계열 잔기로 변경되었다. 0021U3-B09는 본질적으로 기술된 바와 같은 혼성화 기반 돌연변이 유발 방법을 사용하여 친화도 최적화되었다(Kunkel 1985). 0021U3-B09 서열로부터 유래된 대규모 scFv 라이브러리는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 VH 상보성 결정 영역 3(CDR3)의 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이 유발에 의해 생성되었다. 라이브러리에 친화도 기반 용액 상 선별을 적용하여 인간 및 시노몰구스 cMET 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 변이체를 선별하였다. CDR 표적화 선별 출력으로부터의 조 scFv 함유 주변세포질 추출물을 HGF:cMET HTRF® 결합 분석에서 개선된 억제 활성에 대해 스크리닝하였다. 모 0021U3-B09에 비해 상당히 개선된 억제 효과를 나타내는 변이체를 DNA 서열결정하고 고유한 유전자를 인간 IgG2로 전환시켰다. 그 후, 정제된 항체를 그의 억제 효과를 기초로 하여 순위를 매겼다. 추가 특성화를 위해 가장 강력한 항체인 B09-57을 선별하였다.
- [0593] 1.3 항-EGFR 항체 Tdev-0004의 단리 및 확인.
- [0594] EGFR-특이성 scFv 항체는 본질적으로 기술된 바와 같이 재조합 포유동물 발현 비오틀화 단량체 인간 EGFR(MedImmune)에 대한 일련의 반복된 패닝 선별 사이클에서 대규모 나이트 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리하였다(Vaughan, 1996). 선별 출력의 라운드 3으로부터의 scFv 디스플레이 파지를 ELISA에서 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 교차 반응성을 보이는 상위 히트를 선별하고 DNA 서열결정을 수행하였다. 그 후 고유한 유전자를 인간 면역글로불린 G1(IgG1) 항체로 전환시켜 본질적으로 기술된 바와 같이 포유동물 세포에서 생산하였다(Persic, 1997). 그 후, 정제된 항체를 유세포 분석법에 의해 EGFR 발현 세포주 A431과의 결합을 기준으로 순위를 매겼다. 특이적 세포 결합을 나타내는 항체 Tdev-0004를 추가 특성화를 위해 선별하였다.
- [0595] 1.4 항-EGFR 항체 Tdev-0004의 최적화.
- [0596] 변이체 RAA22 및 QD6은 항-EGFR Tdev-0004 mAb를 최적화하여 유도되었다. Tdev-0004의 VL 프레임워크는 기준 인간 생식세포계열 서열 IGLV2-11*01/IGLJ2와 100% 매칭되었지만 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGLV2-11*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p 참조), VH 프레임워크는 가장 가까운 인간 생식세포계열 서열 IGHV1-69*01/JH4와 79%의 상동성을 가졌다 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGHV1-69*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p 참조). 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위해, VH 영역은 처음에 13개의 비-생식세포계열 프레임워크 잔기를 모두 돌연변이시켜 완전히 생식세포계열화하였다. 생식세포계열화 시, 완전히 생식세포계열화된 변이체와 시노몰구스 EGFR의 결합은 상당히 손상되었다. 시노몰구스 EGFR과의 결합을 복원하기 위해 4개의 비-생식세포계열 잔기 K68, I73, R76 및 T78을 선별적으로 역돌연변이시켰다. 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링 체계(Kabat and Wu 1991)에 의해 넘버링된다. H4로 명명된, 생성된 부분

적 생식세포계열화 변이체를 친화도 최적화를 위한 주형 서열로 사용하였다. 변이체 H4는 제조업체의 지침에 따라 QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent)를 사용하여 6개 CDR 모두의 간소한 돌연변이 유발에 의해 친화도 최적화되었다. 단일 아미노산 돌연변이 유발된 VH 및 VL 라이브러리를 박테리아에서 Fab 단편으로 발현시키고 ELISA에서 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 향상된 결합에 대해 스크리닝하였다. 모 H4에 비해 개선된 결합을 나타내는 변이체를 DNA 서열결정하고 고유한 유전자를 인간 IgG1로 전환시켰다. 변이체 RAA22를 CDRH3에서의 단일 돌연변이에 의해 확인하였다. 친화도를 더욱 향상시키기 위해 개별 양성 돌연변이를 조합하여 조합 라이브러리를 생성하고, 이를 인간 및 시노몰구스 EGFR에 대한 결합이 향상된 변이체에 대해 스크리닝하였다. 변이체 QD6을 CDRL2, CDRL3 및 CDRH3에서의 4개의 조합된 돌연변이에 의해 확인하였다.

[0597] 1.5 1가 이중특이성 항-EGFR/cMET DuetMab 항체의 생성.

[0598] 항-cMET mAb B09-57 및 항-EGFR mAb RAA22 및 QD6의 가변 도메인은 DuetMab 플랫폼의 백본에서 1가 이중특이성 항-EGFR/cMET 항체의 구축을 위해 활용되었다(Mazor, 2015). 구체적으로, 항-cMET B09-57의 VH 유전자를 "노브" 돌연변이(T366W) 및 대안적인 쇄간 시스테인 돌연변이(F126C 및 C219V)를 운반하는 인간 감마-1 불변 중쇄에 삽입하였다. B09-57의 VL 유전자는 "노브" 중쇄와 쌍을 형성하도록 설계된 상응하는 대안적인 쇄간 시스테인 돌연변이(S121C 및 C214V)를 운반하는 인간 카파 불변 도메인에 인 프레임(in frame)으로 삽입되었다. 이와 유사하게, 항-EGFR RAA22 및 친화도 최적화된 QD6의 VH 유전자는 "홀" 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V)를 운반하는 인간 감마-1 불변 중쇄에 삽입된 반면, RAA22 및 B09-57의 VL 유전자는 "홀" 중쇄와 쌍을 형성하도록 설계된 인간 람다 불변 도메인에 인 프레임으로 삽입되었다. 또한, "노브" 및 "홀" 중쇄의 CH3 도메인에 있는 2개의 잔기가 시스테인으로 돌연변이되어("노브"의 S354C 및 "홀"의 Y349C) 안정화 디설피드 가교체를 형성하였다. Fc 도메인은 말레이미드 함유 세포독성 약물의 부위 특이적 콘주게이션을 가능하게 하도록 설계된 세린 239 뒤의 시스테인 삽입(C239i/"Maia")을 보유하도록 추가로 조작되었다(Dimasi, 2017). 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링 체계(Kabat and Wu 1991)에 의해 넘버링된다. 조립된 1가 이중특이성 항-EGFR/cMET DuetMab 항체를 RAA22/B09-57 및 QD6/B09-57로 명명하였다(도 1). DuetMab 항체는 이전에 기술된 바와 같이(Mazor, 2017) 포유동물 세포로부터 생산하였다.

[0599] 또한, Fc 백본의 이펙터 기능이 감소되거나 제거될 경우 면역 독성을 완화하고 약동학을 개선시키는 것이 가능할 수 있음을 인식하였다. 따라서, 이전에 항체 분자에서 Fc 이펙터 기능을 감소시키는 것으로 나타난 L234F/L235E/P331S(EU 넘버링)의 "삼중 돌연변이체(TM)"(Organesyan, 2008; Hay, 2016)를 도입하였다. 이들 TM 구조물은 c-MET 아암이 "홀" 돌연변이를 운반하고 EGFR 아암이 "노브" 돌연변이를 운반하도록 조작되었다.

[0600] TM이 도입된 RAA22 및 B09로부터의 가변 영역을 포함하는 생성된 "EGFR-cMET TM" DuetMab는 하기 표에 기재된 아미노산 서열을 갖는다:

	"EGFR-cMET TM"
EGFR 중쇄	35
c-Met 중쇄	36
EGFR 경쇄	37
c-Met 경쇄	38

[0601] 실시예 2 - 생화학적 및 생물물리학적 특성

[0602] 이 실시예에서는 RAA22, QD6 및 B09-57 단클론 항체와 RAA22/B09-57 및 QD6/B09-57 이중특이성 항체 분자(각각 EGFR 및 c-Met에 대한 결합 친화도 및 두 항원과 동시에 결합하는 능력 포함)의 다양한 생화학적 및 생물물리학적 특성을 테스트한다.

[0603] 2.1 EGFR 및 cMET에 대한 DuetMab 및 모 mAb의 결합 친화도.

[0604] 제조합 인간, 시노몰구스 원숭이 및 무린 EGFR 및 cMET 항원에 대한 EGFR-cMET DuetMab의 동역학 속도 상수(k_{on} 및 k_{off}) 및 평형 해리 상수(Kd)는 BIAcore T200 기기(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)에서 항체 포획 분석을 사용하여 SPR에 의해 25℃에서 결정하였다. 마우스 항-인간 IgG를 약 2000의 공명 단위(RU)의 최종 표면 밀도를 갖는 CM4 센서 칩에 고정하였다. 동일한 고정 프로토콜을 사용하여 이 센서 칩 상의 기준 유동 셀 표면도 준비하였다. 테스트 및 대조 항목 항체는 기기 완충액(HBS-EP 완충액; 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM

EDTA 및 0.005% P-20) 중 정제된 EGFR(0.27~200 nM 인간, 0.4~900 nM 시노 및 4~1000 nM 뮌) 또는 cMET 단백질(0.27~66 nM 인간 및 0.27~22 nM 시노)의 3배 연속 희석물과 함께, 기기 완충액 중 5~20 nM로 제조하였다. 동역학 측정을 위해 순차적 접근법을 활용하였다. 먼저 항체를 포획 표면 위에 10 μ L/분의 유량으로 주입하였다. 포획된 항체의 결합이 안정화되면 단일 농도의 피분석물을 포획 표면과 기준 표면 모두에 75 μ L/분의 유량으로 주입하였다. 생성된 결합 반응 곡선은 결합 단계 데이터를 산출하였다. 피분석물 주입 후, 이어서 해리 단계 데이터 수집을 허용하기 위해 흐름을 15분 동안 기기 완충액으로 다시 전환한 다음, 10 mM 글리신(pH 1.5)을 1분간 펄스로 제공하여 칩 상에 항체 포획 표면을 재생성하였다. 테스트 및 대조 항목 항체에 대한 결합 반응은 각 피분석물 농도의 2회 주입으로부터의 것을 기록하였다. 또한 주입 시리즈 전반에 걸쳐 여러 번의 완충액 주입이 산재되어 있었다. 주입 아티팩트 및/또는 비특이적 결합 상호작용에 대해 원시 데이터 세트를 보정하기 위해 기준 셀 반응과 함께 선택 완충액 주입을 사용했는데, 이는 일반적으로 "이중 참조"라고 한다. 보정된 결합 데이터를 전반적으로 1:1 결합 모델(Biacore T200 평가 소프트웨어 2.0, GE Healthcare, Pittsburgh, PA)에 피팅하였다. 계산된 동역학 매개변수(k_{on} 및 k_{off})와 k_{off}/k_{on} 으로 결정된 K_d 가 표 1에 제시되어 있다.

[표 1]

EGFR 및 cMET 항원에 대한 DuetMab 및 모 IgG의 동역학

항체	항원	$K_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
RAA22 IgG	인간 EGFR	4.41×10^4	2.06×10^{-3}	46.6
	시노몰구스 원숭이 EGFR	3.54×10^4	6.01×10^{-3}	169.8
	마우스 EGFR	4.03×10^4	1.90×10^{-2}	488.0
	인간 cMET			
	시노몰구스 원숭이 cMET	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		
	마우스 cMET			
QD6 IgG	인간 EGFR	1.48×10^5	2.92×10^{-4}	2.0
	시노몰구스 원숭이 EGFR	1.14×10^5	2.88×10^{-4}	2.5
	마우스 EGFR	1.67×10^5	7.35×10^{-4}	4.4
	인간 cMET			
	시노몰구스 원숭이 cMET	ND		
	마우스 cMET			
B09-57 IgG	인간 EGFR			
	시노몰구스 원숭이 EGFR	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		

RAA22/B09-57 DuetMab	마우스 EGFR			
	인간 cMET	5.63×10^5	8.82×10^{-4}	1.6
	시노물구스 원숭이			
	cMET	1.04×10^6	1.94×10^{-3}	1.9
	마우스 cMET	200 nM에서 결합이 검출되지 않음		
	인간 EGFR	4.47×10^4	2.01×10^{-3}	45.0
	시노물구스 원숭이			
	EGFR	2.78×10^4	5.48×10^{-3}	197.0
QD6/B09-57 DuetMab	마우스 EGFR	3.54×10^4	2.06×10^{-2}	575.4
	인간 cMET	4.43×10^5	9.86×10^{-4}	2.2
	시노물구스 원숭이			
	cMET	9.74×10^5	2.12×10^{-3}	2.2
	마우스 cMET	ND		
	인간 EGFR	6.35×10^4	3.74×10^{-4}	5.9
	시노물구스 원숭이			
	EGFR	2.10×10^5	5.85×10^{-4}	2.8
	마우스 EGFR	1.26×10^5	7.80×10^{-4}	6.2
	인간 cMET	4.25×10^5	6.96×10^{-4}	1.6
	시노물구스 원숭이			
	cMET	9.58×10^5	2.06×10^{-3}	2.2
	마우스 cMET	ND		

[0608]

[0609] ^aND: 미결정. EGFR 및 cMET의 가용성 단량체 형태에 대한 동역학 측정은 BIACore 기기를 사용하여 수행하였다. Kd는 데이터의 비선형 피팅으로부터 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산하였다.

[0610] 상기 데이터에서 볼 수 있듯이, 이중특이성 항체 분자 QD6/B09-57은 높은 친화도(약 2 nM Kd)로 인간 cMet 및 높은 친화도(약 6 nM Kd)로 인간 EGFR과 결합하는 반면, 이중특이성 항체 분자 RAA22/B09-57은 유사하게 높은 친화도(약 2 nM Kd)로 인간 cMET와 결합하지만 QD6/B09-57에 비해 감소된 친화도(약 45 nM Kd)로 인간 EGFR과 결합한다.

[0611] 2.2 EGFR 및 cMET에 대한 DuetMab의 동시 결합.

[0612] 제조합 인간 EGFR 및 cMET 단백질에 대한 동시 결합 연구는 본질적으로 기술된 바와 같이 Octet384 기기에서 생물층 간섭계로 측정하였다(Mazor, 2015). 간략하게는, 분석 완충액[PBS pH 7.2, 3 mg/mL 소 혈청 알부민(BSA), 0.05% (v/v) Tween 20] 중 5 µg/mL의 His 태그가 붙은 cMET 항원을 처음에 NI-NTA 바이오센서에 포획하였다. 임의의 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척 단계에 이어, 각각의 로드된 바이오센서에 먼저 66 nM의 항체를 사용하고 그 다음에는 500 nM의 EGFR 항원을 사용하여 연속적인 결합 및 해리 상호작용을 시켰다. 결합 및 해리 곡선은 Octet384 소프트웨어 v.9.0을 사용하여 데이터의 비선형 피팅으로부터 계산하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, DuetMab은 두 항원 모두에 대한 동시 결합을 입증한 반면, 모 항-cMET IgG는 cMET에만 특이적 결합을 나타냈고, 2개의 항-EGFR IgG는 cMET 로드된 센서에 대한 결합을 나타내지 않았다.

[0613] 2.3 EGFR 및 cMet 특이성

[0614] EGFR 및 cMET 중 파라로그 및 밀접하게 관련된 계열 구성원에 대한 특이성을 ELISA에 의해 결정하였다. 간략하게는, 항원 용액을 PBS 중에 1 µg/mL로 제조하고 50 µL를 절반 영역 ELISA 분석 플레이트에 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 0.005% Tween-20을 함유하는 PBS(PBS-T) 중 1% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 웰을 PBS-T로 4회 세척하였다. 도 3에 제시된 바와 같이, 사용된 1차 항체는 다음과 같았다: R374(비결합 IgG1 이소

타입 대조 항체), B09(항-cMET 항체), QD6(항-EGFR 항체), RAA22(항-EGFR 항체), QD6/B09(이중특이성 EGFR/cMET DuetMab), RAA22/B09(이중특이성 EGFR/cMET DuetMab), PaniX(항-EGFR 항체), MetMab(항-cMET 항체) 및 Mab11311(항-HER4 항체). HER4 결합 mAb 대조군인 MAB1131(이 시리즈는 1 µg/mL에서 시작함)을 제외하고 10 µg/mL에서 시작하여 0.002 µg/mL에서 끝나는 1:3 희석 시리즈로 PBS-T에 희석된 표시된 1차 항체 50 µL와 함께 웰을 인큐베이션하였다. 웰을 PBS-T로 4회 세척한 후, PBS-T에서 1:5000으로 희석된 염소 항-인간 Fab HRP-표지된 2차 항체 50 µL를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50 µL의 TMB 기질 용액을 모든 웰에 첨가하고 양성 대조 웰에서 강한 신호가 관찰될 때까지 실온에서 5-30분 동안 인큐베이션하였다. 50 µL의 TMB 정지 용액을 모든 웰에 첨가하고 SpectraMax M5 마이크로플레이트 판독기에서 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. 데이터는 SoftMax Pro 5 소프트웨어에서 분석되었고, GraphPad Prism 7 그래프 소프트웨어를 사용하여 도표화하였다.

[0615] 종 교차 반응성을 결정하기 위해, ELISA 분석을 위에서 설명한 대로 수행하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 고 친화도 EGFR IgG, QD6 및 1가 이중특이성 EGFR/cMET DuetMab, QD6/B09는 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 결합하여 ELISA 분석에서 강력한 신호를 제공하였다. 대조적으로, 낮은 친화도의 EGFR IgG, RAA22는 QD6에 비해 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 EGFR에 더 약하게 결합하였다. 마우스 EGFR에 대한 결합은 약했지만 검출가능하였다. 상응하는 1가 이중특이성 EGFR/cMET DuetMab, RAA22/B09는 2가 모 IgG, RAA22에 비해 인간 및 시노물구스 원숭이 EGFR에 대해 여전히 더 약한 결합 및 마우스 EGFR에 대한 명목상 결합을 보여주었다. cMET IgG, B09 및 모든 이중특이성 변이체는 인간 및 시노물구스 원숭이 cMET에 대해 비견되는 결합을 보여주었다. 마우스 cMET에 대한 임의의 항체의 검출가능한 결합은 없었다. 이러한 결과는 BIAcore 기기에서 표면 플라즈몬 공명 측정에 의해 결정된 결합 동역학과 일치한다(위의 표 1).

[0616] 도 3b에 도시된 바와 같이, 모 IgG 또는 유도체 이중특이성 항체 중 어느 것도 EGFR HER 계열 단백질, HER2, HER3 또는 HER4 중 어느 것에도 주목할만한 결합을 나타내지 않았다. 이와 유사하게, 어떠한 항체도 cMET 계열 구성원인 Ron(CD136) 또는 Semaphorin 3a에 대해 유의한 결합을 나타내지 않았다.

[0617] 이러한 결과는 모 IgG와 생성된 이중특이성 항체가 밀접하게 관련된 계열 종에 대한 검출가능한 결합 없이 동계 표적에 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다.

[0618] 실시예 3 - pH 민감성 염료를 사용한 항체 내재화 및 산성화된 구획으로의 트래피킹의 모니터링

[0619] 정상, 비-종양 조직에서의 표적 발현은 표적 조직으로의 페이로드 전달을 감소시킴으로써 항체 콘쥬게이트의 치료적 원도를 감소시키는 독성으로 이어질 수 있다. 본 발명의 화합물(예를 들어, 방사성면역콘쥬게이트)의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 설계는 표적의 공동발현을 거의 또는 전혀 나타내지 않는 정상 조직에서 콘쥬게이트의 영향을 최소화하면서 두 표적을 공동발현하는 종양 세포에 대한 항체 분자(즉, 페이로드 전달 비히클)의 전달을 최대화하도록 의도된다. EGFR 친화도가 감소된 이중특이성 항체인 RAA22/B09를 사용한 이중표적화가 단일 표적 결속에 비해 선택성 이점을 제공하는지 평가하기 위해, 본 발명자들은 pH 민감성 염료 표지 항체를 사용하여 이중특이성을 포함하는 1가 모 항체 대비 이중특이성 mAb의 내재화 효율을 비교하는 연구를 수행하였다.

[0620] pHAb pH 민감성 염료(Promega)로 표지된 항체를 사용하여 항체의 내재화와 리소솜 및 엔도솜과 같은 산성화된 세포내 구획으로의 트래피킹을 시각화하는 것이 용이해졌다. 이 염료는 pH > 7에서 매우 낮은 형광을 나타내지만 산성 pH에서는 강한 형광을 나타내어 대략 pH 5에서 최대값에 도달한다. 간략하게는, 제조업체의 권장 사항에 따라 항체를 pHAb 아민 반응성 염료로 표지하였다. 표지된 항체는 다음과 같다: R347 IgG1 이소타입 대조군, 1가 이중특이성 대조 항체 항-EGFR 항체 RAA22/R347 및 항-cMET B09/R347 및 EGFR/cMET 1가 이중특이성 항체 RAA22/B09. 중간 정도의 수준의 EGFR(약 33,000의 상대 수용체 밀도) 및 cMET(약 50,000의 상대 수용체 밀도)를 공동 발현하는 NCI-H1975 폐암 세포를 바닥이 투명한 검은색 벽의 96웰 분석 플레이트에 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 성장 배지 중 2×10^5 개 세포/mL의 밀도로 100 마이크로리터 부피로 플레이트하였다. 플레이트를 37 °C 및 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 밤새 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 얼음 위에서 30분 동안 냉각시킨 후 미리 냉각된 성장 배지에 pHAb 표지된 이중특이성 및 1가 대조 항체를 다양한 농도로 첨가하였다. 배양물을 얼음 위에서 30분 더 냉각시킨 다음 Cy3 필터를 사용하여 Operetta High Content Imaging 시스템에서 형광을 판독하고 이 초기 판독값을 시간 0으로 지정하였다. 플레이트를 다시 37 °C 인큐베이터로 옮기고 3, 6, 24, 30 및 48시간에 추가 판독값을 취하였다.

[0621] NCI H1975 세포를 처리하기 위해 1.25 µg/mL의 pHAb 표지 mAb를 사용한 대표적인 내재화 실험이 도 4에 제시되

어 있다. 비결합 IgG1 이소타입 대조 항체인 R347은 어느 시점에서든 검출가능한 형광을 나타내지 않았다. EGFR/cMET 이중특이성 항체인 RAA22/B09는 처리 후 3시간까지 세포내 형광을 나타냈고 형광 강도는 처리 후 48 시간까지 계속 증가하였다. 1가 EGFR 결합 대조 항체인 RAA22/R347은 24시간부터 매우 약한 형광을 보였으며, 이는 48시간까지 급격히 증가하지 않았다. 1가 단일특이성 cMET 결합 대조 항체인 B09/R347은 24시간에 중간 정도의 형광을 보였으며, 48시간까지 추가로 증가하였다. 그럼에도, 단일특이성 cMET 항체의 형광 신호 강도는 이중특이성 RAA22/B09에 비해 중간 정도였는데, 이는 이중특이성 항체가 여기서 테스트한 이중 표적 발현 세포주에서 단일특이성 모 항체보다 더 큰 내재화 효율을 가짐을 시사한다. 세포를 0.625 μ g/mL의 pHAb 표지 mAb로 처리한 경우, 이중특이성 항체와 단일특이성 대조군 사이의 차이는 훨씬 더 두드러졌다(도 5). 단일특이성 항체는 48시간에도 매우 적은 형광을 보인 반면, 이중특이성 RAA22/B09 항체는 처리 후 3시간까지 다시 세포내 형광을 보였으며 형광 강도는 처리 후 48시간까지 계속 증가하였다. 이러한 결과는 이중 표적화 이중특이성 항체가 EGFR 및 cMET 둘 모두를 공동 발현하는 세포로의 효율적인 내재화를 매개한다는 가설과 일치한다. 동시에, 단일특이성 모 항체는 이중특이성 항체에 비해 감소된 흡수 및 형광 강도를 나타낸다. 이러한 결론의 논리적 확장은 이중특이성 항체가 하나의 표적만 발현하고, 일반적으로 EGFR 및 cMET에 해당되는 두 표적 모두를 발현하지 않는 조직에서 단일특이성 항체와 더 유사하게 거동할 수 있음을 시사하는 것이다. 특히 주목할 점은 pHAb로 표지된, 낮아진 친화도의 EGFR 대조 mAb인 RAA22/R347이 무시할만한 흡수 및 형광을 나타냈다는 점이다. EGFR에 대한 이러한 감소된 결합은, 상당한 수준의 EGFR을 발현하지만 cMET는 거의 또는 전혀 발현하지 않는 피부와 같은 정상 조직에서 항체 콘จู게이트의 영향을 최소화할 수 있다.

[0622] 실시예 4 - 공초점 현미경을 사용한 항체 내재화 모니터링

[0623] 표지된 DuetMab:RAA22/B09 및 QD6/B09 항체의 내재화 동역학을 생세포 공초점 형광 현미경을 사용하여 시험관 내에서 평가하였다.

[0624] 4.1 재료 및 방법

[0625] H1975 및 HCC827 세포는 ATCC에서 입수하였다. RAA22/B09, QD6/B09 및 단일-아암 유도체는 MedImmune에서 입수하였다. QD6/B09 및 단일-아암 특이적 대조군 QD6/IgG 및 B09/IgG(IgG Fab 아암은 비특이적 인간 IgG1 NMGC에서 유래됨)는 MedImmune에서 입수하였다. RAA22/B09 및 비특이적 인간 IgG1 R347에서 유래된 단일-아암 특이적 대조군 RAA22/IgG 및 B09/IgG는 MedImmune에서 입수하였다. RPMI(11875-093), HEPES(15630106), 피루브산나트륨(11360070), AlexaFluor® 647(A-20186) 단클론 항체 표지 키트, Zeba™ 스핀 탈염 컬럼(87767) 및 CellTracker™ Blue CMAC(C2110)은 Life Technologies(Carlsbad, CA)에서 입수하였다. 아큐타아제 세포 탈리 용액(Accutase Cell Detachment Solution, 423201)은 BioLegend(San Diego, CA)에서 입수하였다. HyClone 열불활성화 소 태아 혈청(SH30071.03HI)은 GE Life Sciences(Marlborough, MA)에서 입수하였다. PBS(21-040)는 Corning Incorporated(Corning, NY)에서 입수하였다. FcR 차단 시약(130-059-901)은 Miltenyi Biotec Inc.(Auburn, CA)에서 입수하였다. 폴리프로필렌 둥근 바닥 튜브(352063)는 BD Biosciences(San Jose, CA)에서 입수하였다. CellCarrier 384웰 마이크로플레이트는 PerkinElmer Inc.(Cat# 6007550, Waltham, MA)에서 입수하였다.

[0626] AlexaFluor 콘จู게이트의 제조

[0627] 제조업체 지침에 따라 항체 표지 키트를 사용하여 단클론 항체를 AlexaFluor-647 염료와 접합시켰다. 간략하게는, 중탄산나트륨 완충액(pH=8.3)에 들어 있는 항체 50~100 마이크로그램을 실온에서 1시간 동안 부드럽게 교반하면서 반응성 염료 시약과 함께 인큐베이션하였다. 제조업체의 지침에 따라 1X PBS로 평형화된 40K MWCO가 포함된 Zeba™ 스핀 탈염 컬럼을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피에 의해 포함되지 않은 염료를 제거하였다.

[0628] 배양 및 염색을 위한 세포 준비

[0629] 부착성 H1975 또는 HCC827 세포를 초기 접종 후 80~90%의 컨플루언시까지 10% 소 태아 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI-1640 배지를 사용하여 CO₂ 인큐베이터에서 T-75 플라스크에서 배양하였다. 실험 당일 T-75 플라스크에서 성장한 부착성 단층을 아큐타아제를 사용하여 세포 현탁액으로 해리시켰다. 탈리된 세포를 300xg에서의 5분 동안의 원심분리를 사용하여 1x PBS로 두 번 세척하였다. 그 후 세포를 2 x 10⁶개 세포/mL의 농도로 페놀 무함유 RPMI에 재현탁하고 염색에 사용하였다.

[0630] 이미징을 위한 세포 염색

[0631] 2×10⁶개 세포/mL의 세포 현탁액을 CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 페놀 무함유 RPMI 중에 제조된 1 μ M

CellTracker™ Blue CMAC와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 포함되지 않은 CellTracker™ Blue CMAC 염료는 4℃에서의 5분 동안의 300xg에서의 원심분리를 사용하여 페놀 무함유 RPMI로 2회 세척하여 제거하였다. 그 후 세포를 얼음 위에서 냉각시키고 1x10⁶개 세포당 10 ul의 FeR 차단 시약으로 15분 동안 차단하였다. 2x10⁵개의 세포를 5 mL의 둥근 바닥 튜브에 분주하고 최종 농도 2.5 µg/mL의 형광 항체와 함께 인큐베이션하였다. 4℃에서 원심분리에 의해 결합되지 않은 형광 시약을 제거한 후, 세포를 100 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨 및 1% FBS를 함유하는, 페놀 무함유 RPMI에 재현탁시켰다. 세포를 웰당 5,000개 세포의 밀도로 384웰 이미징 플레이트의 여러 웰로 옮기고 이미지 획득 전에 4℃에서 2분 동안 2,200 rpm으로 간단히 원심분리하였다.

[0632] 공초점 형광 현미경을 이용한 세포 이미지 획득

[0633] 이미징 플레이트(384웰 형식)의 염색된 세포는 이전에 설명한 대로(Vainshtein, 2015) Opera 공초점 형광 이미징 시스템에서 이미징하거나 40X/1.2NA LCIPlan Apo 대물렌즈가 있는 Zeiss Axio Observer.Z1 도립 현미경(Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY)으로 옮겼다. Zeiss 현미경을 사용한 실험의 경우, 이미징 환경은 Incubator XLMulti S DARK(PeCon GmbH, Erbach, Germany)를 사용하여 5% CO₂ 및 70% 습도에서 37℃에서 유지되었다. 샘플은 405, 488, 561 및 63 nm의 고상 레이저(Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY)로 조명되었다. Evolve 512 EMCCD(Photometrics, Tuscon, AZ)와 함께 Yokogawa CSU-X1 Spinning Disk Unit(Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan)을 사용하여 표시된 시간에 일련의 이미지를 획득하였다. 이미지를 획득하기 전에 레이저 출력, 노출 시간, 카메라 게인 등과 같은 노출 매개변수를 염색된 세포의 분취량을 사용하여 결정하였다. 이미지는 ZEN 2.3(Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY)을 사용하여 처리하고 Columbus 소프트웨어(PerkinElmer, Waltham, MA)를 사용하여 분석하였다.

[0634] 내재화 이미지 분석 알고리즘

[0635] 항체 내재화의 정량화에 사용되는 알고리즘은 이전에 설명되었으며(Vainsthein, 2015), 다음의 업데이트 및 수정이 이루어졌다. 반복적인 이미지 처리에 사용되는 기준 채널은 세포의 CellTracker™ Blue CMAC(CTB) 염색에서 유래되었다. 신호 채널은 이미지의 항체-AlexaFluor-647 채널에서 여전히 유래되었다. 이미지는 알고리즘 정의의 매개변수를 사용하여 알고리즘에 의해 처리되었으며, 이 매개변수는 초기에 기본값으로 설정된 후 각 세포 유형 및 실험에 대해 최적화되었다. 이미지의 CTB 염색은 임계값 미만의 형광 강도 신호가 있는 영역을 제외하고 주변 기반보다 더 높은 강도를 갖는 이미지의 영역을 검출하기 위해 임계값을 사용하여 세포를 확인하는 데 사용되었다. 나머지 확인된 세포 개체는 "전체 세포"로 지정되었다. 형태 특성 영역(120~600 µm² 사이의 개체) 및 진원도(>0.5)를 기준으로 필터링하여 세포를 추가로 선택하였다. 그런 다음 허용된 세포의 "막 영역"과 "세포질 영역"을 알고리즘 정의의 매개변수를 사용하여 개체 경계 주위에 구축하였다. 각 영역의 형광 강도를 사용하여 항체 관련 AlexaFluor-647 신호를 모니터링하였다. 각 영역의 형광 강도는 허용된 세포의 모든 픽셀 합계의 평균으로 보고되었다.

[0636] 세포질에서 항체 관련 형광의 축적을 사용하여 항체 내재화의 동역학을 정량화하였다. 세포 염색 및 형광 강도의 가변성으로 인한 결과의 비교가능성을 보장하기 위해 세포질 신호를 각 시점의 전체 세포 신호로 정규화하고 다음 식을 사용하여 내재화된 분율로 지정하였다: 내재화된 분율 = 강도(세포질)/(강도(세포질) + 강도(막)). 내재화 속도 상수 kint는 다음 식을 사용하여 데이터의 곡선 피팅을 통해 내재화 시간 코스로부터 계산하였다: $F_{cyt}(t) = (1 - e^{-kint \cdot t}) \cdot F_{max, cyt}$ (F_{max, cyt}는 세포당 전체 강도에 대한 세포당 세포질 강도의 최대 비임). 데이터의 곡선 피팅은 Graphpad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA)을 사용하여 수행되었다. 내재화 반감기(T_{1/2})는 ln(2)와 kint의 비로 계산하였다.

[0637] 4.2 RAA22/B09 및 QD6/B09의 시험관 내 내재화

[0638] AlexaFluor647(AF647) 1차 표지된 DuetMab:RAA22/B09 및 QD6/B09 항체의 내재화 동역학을 EGFR 및 c-MET 발현 세포주인 H1975를 사용하여 시험관 내에서 평가하였다. 각 항체는 세포에 미리 결합되었고 세포 표면에서 세포질로의 항체 전위는 생세포 공초점 형광 현미경을 사용하여 모니터링되었다. 도 6은 내재화 조건을 적용하기 전(T=0) 세포 표면에 주로 국소화되고 1시간 후(T= 1h) 세포질 영역(파란색)으로 전위된 두 항체 모두를 보여준다. 내재화의 시간 코스에 따라 5분마다 동역학 이미지를 촬영하고 정량적 알고리즘(위 참조)을 사용하여 처리하여 내재화 동역학 상수 및 반감기를 결정하였다. 도 6b는 반감기가 각각 37.5 ± 10.6분 및 43.2 ± 15.5분인 QD6/B09 및 RAA22/B09에 대해 매우 유사한 내재화 동역학을 보여준다.

[0639] 항체 내재화 방식을 평가하고 DuetMab의 전체 내재화에 대한 각 아암의 기여도를 조사하기 위해, 본 발명자들은

듀엣 QD6/B09에 대해 단일-아암 특이적 대조 항체 분자인 QD6/IgG 및 B09/IgG, 그리고 EGFR과 c-MET를 모두 발현하는 H1975 세포에서 듀엣 RAA22/B09에 대해 RAA22/IgG 및 B09/IgG의 내재화를 평가하였다. 오직 하나의 아암만이 표적 수용체에 특이적이기 때문에, 대조 항체는 내재화 모드로서 이중 수용체 표적화 및 가교결합을 제거하는 하나의 수용체를 통해서만 내재화할 수 있다.

[0640] QD6/B09(도 7a) 및 RAA22/B09(도 7b)의 내재화 프로파일은 내재화에 대한 전형적인 프로파일인, 세포질에서의 각각의 mAb-AF647 신호 증가와 함께 막 mAb-F1647 신호의 일치하는 감소의 매우 유사한 패턴을 나타냈다. 그러나 이들의 단일-아암 구축물은 매우 상이한 내재화 프로파일을 보여주었다. 단일-아암 QD6/IgG는 QD6/B09 DuetMab(도 7a, 왼쪽 및 중간)과 거의 동일한 내재화 시간 경과를 나타냈으며, 이는 QD6/B09 듀엣의 내재화가 B09-아암의 최소한의 기여와 함께 분자의 EGFR-아암에 의해 대부분 유도되었음을 나타낸다. 실제로, B09/IgG 구축물은 매우 낮은 수준의 내재화를 보여주었다(도 7b, 오른쪽). 막 신호의 빠르고 광범위한 감소는 세포질 신호의 매우 완만한 증가에 해당하며, 이는 아마도 세포 표면의 c-MET 수용체로부터 미리 결합된 B09/IgG의 광범위한 해리로 인한 것 같다. 이후 항체의 해리로 인해 B09/IgG가 보통 정도로 내재화되었다. 이러한 결과는 QD6/B09 듀엣의 내재화가 B09-아암의 최소한의 기여와 함께 분자의 EGFR-아암에 의해 대부분 유도되었음을 보여주었다.

[0641] 대조적으로, RAA22/B09 DuetMab은 단일-아암 대조 항체와 비교할 때 매우 상이한 내재화 프로파일을 보여주었다. 도 7b에서 볼 수 있듯이, 세포질 강도 값은 RAA22-IgG 및 B09-IgG보다 RAA22/B09 DuetMab에 대해 각각 10.98배 및 4.70배 더 높았다. B09/IgG의 비효율적인 내재화는 뚜렷한 해리(위에서 논의됨)에 기인할 수 있지만 RAA22/IgG는 빠른 내재화를 거쳤다. 그러나 EGFR-아암의 낮은 친화도로 인해 RAA22/IgG 분자의 수는 RAA22-B09 DuetMab에 비해 10.98배 적었다(형광 강도 기준). 단일-아암 구축물과 대조적으로 세포질에 유입되는 듀엣 RAA22/B09 mAb의 양이 현저히 증가한 것은 두 항체 아암이 내재화를 유도하기 위해 표적 수용체와 결속되어야 함을 입증하였다. 이 발견은 QD6/B09 및 RAA22/B09 DuetMab이 서로 다른 내재화 메커니즘을 가지고 있음을 보여주며, QD6/B09는 주로 EGFR-아암에 의해 유도되지만 RAA22/B09는 결속을 위해 EGFR 및 cMET 아암이 모두 필요하다.

[0642] 4.3 다양한 수준의 표적 수용체를 갖는 세포주에서 RAA22/B09의 내재화

[0643] 표적 수용체에 대한 EGFR 및 c-MET 아암의 결합은 H1975 세포에서 RAA22/B09 수용체 내재화를 촉진했기 때문에 본 발명자들은 증가된 수의 EGFR 및 c-MET 수용체가 내재화 특성에 영향을 미치는지를 조사하였다. 웨스턴 블롯에 의해 결정된 각각의 수용체 수준은 H1975 세포에서 EGFR의 경우 약 33,000, c-MET의 경우 약 50,000, HCC827 세포에서 EGFR의 경우 약 790,000, c-MET의 경우 약 523,000이었다. H1975(중간 수용체) 및 HCC827(높은 수용체) 세포에서 RAA22/B09의 내재화 프로파일은 HCC827 세포에서 현저하게 증가된 내재화를 보여준다(도 8).

[0644] EGFR 및 c-MET RAA22/B09의 전체 수준이 각각 23.9배 및 10.4배 증가한 것에 상응하여 예상된 바와 같이, HCC827 세포에 대한 결합은 H1975보다 평균 8.9배 더 높았다($T=0$, 3.1×10^7 MFI 대 3.5×10^6 MFI). 내재화 수준(최고 세포질 강도로 판단)은 HCC827 세포에서 21.7배 더 높았으며, 이는 높은 수준의 표적 수용체를 발현하는 세포에서 유의하게 더 높은 농도의 항체가 세포질로 유입됨을 시사한다. 중요한 것은 현저하게 다른 강도 외에도 내재화 프로파일(시간 경과에 따른 막 및 세포질 신호)도 HCC827과 H1975 세포 간에 크게 구별된다는 점이다. 고발현 HCC827 세포에서, RAA22/B09-AF647 막 신호의 감소는 RAA22-B09 세포질 신호의 상호 증가와 합치하였으며, 시간 코스에 따라 전체 RAA22/B09 신호는 유지되었는데, 이는 두 수용체 모두와의 강력한 이중 아암 항체 상호작용 및 후속 내재화를 나타낸다. H1975 세포에서는 전체 강도와 막 강도가 동시에 감소했는데, 이는 미리 결합된 항체의 일부가 세포 표면에서 해리되어 세포 내부로 내재화되지 못했을 수 있다는 것을 나타낸다. 단일-아암 결속이 효과적인 결합을 제공하지 않고 해리되기 쉬운 HCC827 세포에서 RAA22/IgG 및 B09/IgG의 내재화에 대해 해리를 나타내는 유사한 프로파일이 관찰되었다(도 9a 및 도 9b). 이 데이터는 RAA22/B09가 H1975 세포에서 내재화될 때 수용체 상호작용의 혼합 모드(단일 아암 및 이중 아암 결속)가 존재함을 시사했다. 종합하면, 이러한 데이터는 표적 세포 수용체 발현 수준이 RAA22/B09 내재화의 정도와 효율을 결정하는 중요한 결정 요인임을 시사한다.

[0645] 실시예 5. 방사성 의약품에 대한 일반 재료 및 방법

[0646] 루테튬-177은 ITM Medical Isotopes로부터 0.05 N 염산 용액 중 삼염화루테튬으로 입수할 수 있고; 인듐-111은 BWXT로부터 0.05 N 염산 용액 중 삼염화인듐으로서 입수할 수 있고; 악티늄-225는 Oak Ridge National Laboratories로부터 악티늄-225 삼질산염으로서 또는 Canadian Nuclear Laboratories로부터 악티늄-225 삼염화

물로서 입수할 수 있다.

- [0647] 분석용 HPLC-MS는 Waters Acquity Binary Solvent Manager, Waters Acquity Sample Manager (10℃까지 냉각된 샘플), Water Acquity Column Manager (컬럼 온도 30℃), Waters Acquity Photodiode Array Detector (254 nm 및 214 nm에서 모니터링), 전자분무 이온화를 사용하는 Waters Acquity TQD 및 Waters Acquity BEH C18, 2.1X50 (1.7 μm) 컬럼으로 구성된 Waters Acquity HPLC-MS 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 분취용 HPLC는 Waters 1525 Binary HPLC 펌프, Waters 2489 UV/Visible Detector (254 nm 및 214 nm에서 모니터링) 및 Waters XBridge Prep 패널 또는 C18 19X100 mm (5 μm) 컬럼으로 구성된 Waters HPLC 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0648] HPLC 용리 방법 1: Waters Acquity BEH C18 2.1X50 mm (1.7 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량 = 0.3 mL/min; 초기 = 90% A, 3~3.5 min = 0% A, 4 min = 90% A, 5 min = 90% A.
- [0649] HPLC 용리 방법 2: Waters XBridge Prep Phenyl 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 80% A, 13 min = 0% A.
- [0650] HPLC 용리 방법 3: Waters Acquity BEH C18 2.1X50 mm (1.7 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량 = 0.3 mL/min; 초기 = 90% A, 8 min = 0% A, 10 min = 0% A, 11 min = 90% A, 12 min = 90% A.
- [0651] HPLC 용리 방법 4: Waters XBridge Prep C18 OBD 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 80% A, 3 min = 80% A, 13 min = 20% A, 18 min = 0% A.
- [0652] HPLC 용리 방법 5: Waters XBridge Prep C18 OBD 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 90% A, 3 min = 90% A, 13 min = 0% A, 20 min = 0% A.
- [0653] HPLC 용리 방법 6: Waters XBridge Prep C18 OBD 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 75% A, 13 min = 0% A, 15 min = 0% A.
- [0654] HPLC 용리 방법 7: Waters XBridge Prep C18 OBD 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 80% A, 12 min = 0% A, 15 min = 0% A.
- [0655] HPLC 용리 방법 8: Waters XBridge Prep C18 OBD 19X100 mm (5 μm) 컬럼; 이동상 A: H₂O (0.1% v/v TFA); 이동상 B: 아세트ونی트릴 (0.1% v/v TFA); 유량: 10 mL/min; 초기 = 90% A, 12 min = 0% A, 15 min = 0% A.
- [0656] 분석용 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 Waters 1525 Binary HPLC 펌프, Waters 2489 UV/Visible Detector (280 nm에서 모니터링), Bioscan Flow Count 방사선 검출기 (FC-3300) 및 TOSOH TSKgel G3000SWxl, 7.8X300 mm 컬럼으로 구성된 Waters 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 등용매 SEC 방법은, 0.1 M 인산염, 0.6 M NaCl, 0.025% 소듐 아지드, pH = 7의 이동상으로, 예를 들어 mL/min의 유량을 가질 수 있다.
- [0657] MALDI-MS (양이온)은 MALDI Bruker Ultraflexextreme Spectrometer를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0658] 라디오 박층 크로마토그래피 (radioTLC)는 Bioscan AR-2000 Imaging Scanner를 사용하여 수행될 수 있으며, iTLC-SG 유리 마이크로섬유 크로마토그래피 종이 (Agilent Technologies, SGI0001) 플레이트 상에서 시트레이트 완충제(0.1 M, pH 5.5)를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0659] 실시예 6. 4-([11-옥소-11-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)운데실]카르바모일)-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일]부탄산 (화합물 B)의 합성
- [0660] 이중작용성 킬레이트, 4-([11-옥소-11-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)운데실]카르바모일)-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일]부탄산 (화합물 B)를 도 11에 제공된 도식에 따라 합성할 수 있다. ACN (2.0 mL) 중 5-(tert-부톡시)-5-옥소-4-(4,7,10-트리스(2-(tert-부톡시)-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)헨탄산 (DOTA-GA-(tBu)₄, 50 mg, 0.07 mmol)의 용액에, DSC (50 mg,

0.21 mmol)를 첨가한 후에, 피리딘, (0.20 mL, 2.48 mmol)을 첨가한다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반한다. 반응 혼합물에, 실온에서 11-아미노운데칸산, (70 mg, 0.36 mmol) 후에 PBS 용액 (1.0 mL)을 첨가한다. 반응물을 실온에서 72시간 동안 교반한다. 반응 혼합물을 주사기 필터로 여과하고, 방법 6을 사용하여 Prep-HPLC로 직접 정제하여 중간체 2-A를 수득한다.

[0661] ACN (1.0 mL) 중 중간체 2-A (40 mg, 0.03 mmol), TFP (90 mg, 0.54 mmol) 및 EDC (40 mg, 0.27 mmol)의 용액에 실온에서 피리딘 (0.05 mL, 50 mg, 0.62 mmol)을 첨가한다. 용액을 실온에서 24시간 동안 교반한다. 반응물을, 방법 7을 사용하여 Prep-HPLC로 직접 정제하고, Biotage V10 Rapid Evaporator를 사용한 농축 후에 왁스로서 중간체 2-B를 제공한다.

[0662] 중간체 2-B를 DCM / TFA (1.0 mL / 2.0 mL)에 용해시키고 실온에서 24시간 동안 교반되게 두었다. 반응물을 공기 스트림으로 농축시키고 방법 8을 사용하여 Prep-HPLC로 직접 정제하여, 농축 후에 투명한 왁스로서 화합물 B를 수득한다. 분취량을 HPLC-MS 용리 방법 3으로 분석한다.

[0663] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.99 - 7.88 (m, 1H), 7.82 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.78 (넓은 s, 4H), 3.43 (넓은 s, 12H), 3.08 (넓은 s, 4H), 3.00 (m, 3H), 2.93 (넓은 s, 3H), 2.77 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (넓은 s, 2H), 1.88 (넓은 s, 2H), 1.66 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.36 (m, 4H), 1.32 - 1.20 (m, 9H).

[0664] 실시예 7. 4-([2-(2-{2-[3-옥소-3-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)프로폭시] 에톡시}에톡시)에틸]카르바모일)-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일]부탄산 (화합물 C)의 합성

[0665] 이중작용성 킬레이트, 4-([2-(2-{2-[3-옥소-3-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)프로폭시] 에톡시}에톡시)에틸]카르바모일)-2-[4,7,10-트리스(카르복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일]부탄산 (화합물 C)를 도 12에 제공된 도식에 따라 합성한다.

[0666] ACN (8.0 mL) 중 5-(tert-부톡시)-5-옥소-4-(4,7,10-트리스(2-(tert-부톡시)-2-옥소에틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1-일)펜탄산 (DOTA-GA(tBu)₄, 100 mg, 0.143 mmol)의 용액에 DSC (73 mg, 0.285 mmol) 및 피리딘 (0.80 mL, 9.89 mmol)을 첨가한다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 90분 동안 교반한다. 이 용액을 100 mL 둥근 바닥 플라스크에서 아미노-PEG3-산의 세미-용액 (1.2 mL의 DMF 중 63 mg, 0.285 mmol)에 첨가한다. 주위 온도에서 4시간 후에, 공기 스트림 하에서 건조 상태까지 농축시켜 반응을 마무리한다. 조 물질을 HPLC 용리 방법 2로 정제한다 (조 물질을 6 mL의 20% ACN/H₂O에 용해시킴). 생성물을 함유하는 분획들을 모으고 진공 하에서 농축시킨 다음 ACN (3 x 2 mL)와 함께 동시 증발시킨다.

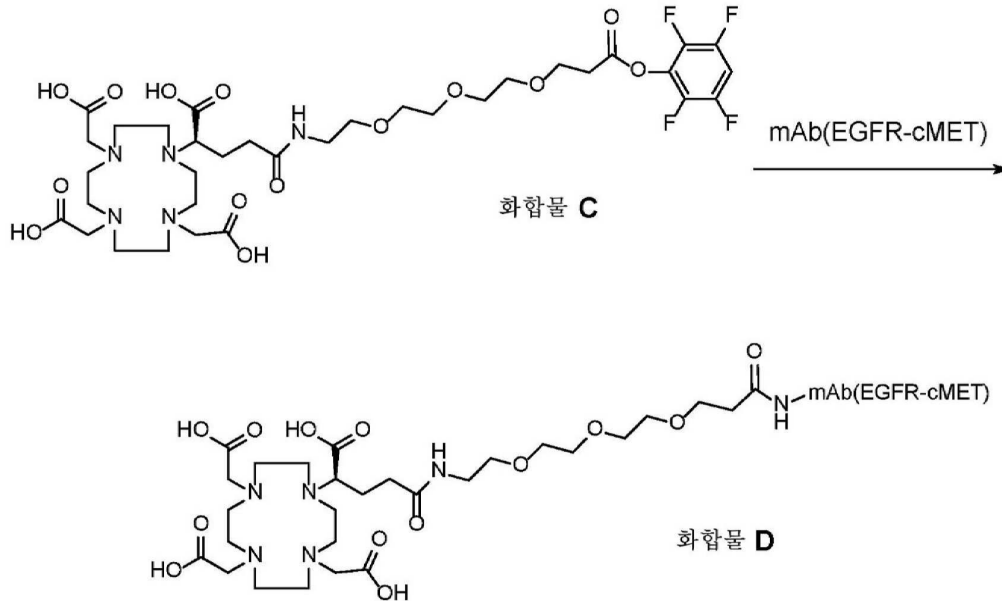
[0667] 중간체 1-A (82 mg, 60 μ mol)가 담긴 바이알에 ACN (2 mL), NEt₃ (50 μ L, 360 μ mol, 6 당량), HBTU (23 mg, 60 μ mol, 1 당량) 및 TFP 용액 (250 μ L의 ACN에 용해된 50 mg, 300 μ mol, 5 당량)을 첨가한다. 생성된 투명한 용액을 주위 온도에서 3시간 동안 교반한다. 공기 스트림 하에서 용액을 건조 상태까지 농축시켜 반응을 마무리한 다음, ACN/H₂O (1:1, 총 3 mL)로 희석하고 용리 방법 4를 사용하여 분취용 HPLC로 정제한다. 생성물을 함유하는 분획들을 모으고 진공 하에서 농축시킨 다음 ACN (3 x 2 mL)와 함께 동시 증발시킨다. 중간체 1-B를 투명한 잔사로서 얻는다.

[0668] 중간체 1-B (67 mg, 64 μ mol)가 담긴 바이알에 DCM (2 mL) 및 TFA (2 mL)를 첨가한다. 생성된 용액을 주위 온도에서 16시간 동안 교반한다. 추가의, TFA (2 mL)를 첨가하고, 반응물을 주위 온도에서 6시간 동안 교반한다. 반응물을 공기 스트림 하에서 건조 상태까지 농축시키고, 조 생성물을 마지막으로 ACN/H₂O (1 mL의 10% ACN/H₂O)에 용해시킨다. 이어서 조 반응 용액을, 용리 방법 5를 사용하여 분취용 HPLC로 정제한다. 생성물을 함유하는 분획들을 모으고, 냉동하고, 동결건조시킨다. 화합물 C를 백색 고체로서 얻는다. 분취량을 HPLC-MS 용리 방법 3으로 분석한다.

[0669] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 7.97-7.91 (m, 2H), 3.77 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.58-3.55 (m, 2H), 3.53-3.48 (m, 8H), 3.44-3.38 (m, 10H), 3.23-3.08 (m, 11H), 3.02 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.93 (넓은 s, 4H), 2.30 (넓은 s, 2H), 1.87 (넓은 s, 2H).

[0670] 실시예 8. EGFR-cMET 항체를 포함하는 방사성면역콘주게이트의 합성을 위한 콘주게이션 및 방사성 표지

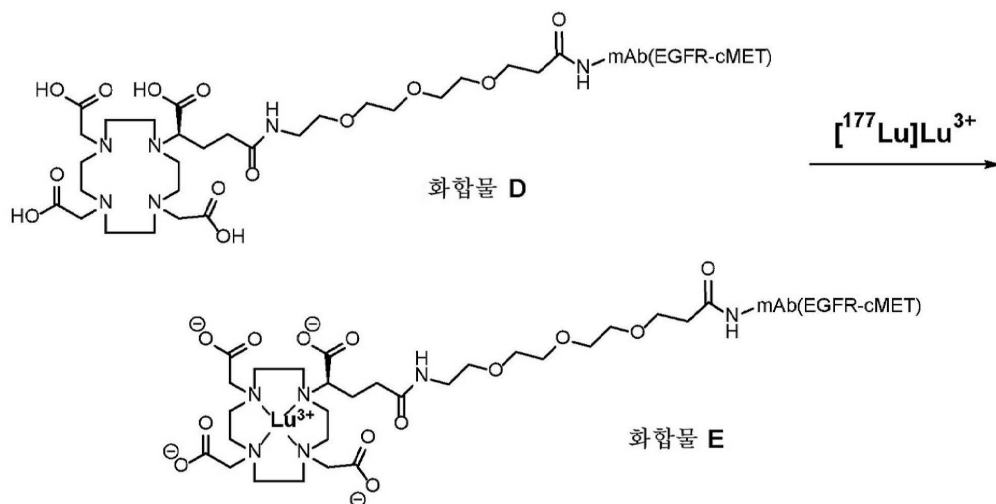
[0671] 8.1. 면역콘쥬게이트 화합물 D의 합성



[0672]

[0673] 133 mL의 멸균 용액 용기에 EGFR-cMET 단클론 이중특이성 항체 RAA22/B09 DuetMab (58.8 mL; 5.1 mg/mL; 300 mg)의 PBS (인산염 완충 염수) 용액을 충전한 후에, 5.88 mL 탄산염 완충제 (1.0 M, pH 9.5) 및 2.83 mL의 화합물 C의 0.001 M HCl 용액 (7.7 당량; 3.00 mL 중 17.3 mg; 이 용액은 사용 직전에 제조하였음)을 충전하였다. 생성된 혼합물의 pH는 pH 스트립에 의해 약 9.5~10인 것으로 결정되었다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 반응하게 두었다. 아세트산암모늄 (28.1 g)을 반응 혼합물에 첨가한 다음, 생성된 용액을 5 mL Cytiva HiTrap Butyl HP (HIC) 카트리지에 로딩하였다 (HIC 카트리지는 먼저 tween (SABST; 50 mL)을 갖는 아세트산나트륨 완충 염수로, 그 후에 아세트산암모늄 용액 (50 mL; 0.42 g/mL)으로 전처리하였음). HIC 카트리지를 아세트산암모늄 용액 (10 mL)으로 세척하고, 이어서 생성물을 SABST (약 10 mL)로 용리시켰다. 생성물 용액을 SABST로 약 15 mL까지 희석하고, SABST (250 mL)로 전처리된 Cytiva 15 mL HiPrep 26/10 Desalting 카트리지 상에 로딩하였다. 생성물 분획을 SABST (약 16 mL)로 용리시켜 무색투명한 액체를 얻었고, 크기 배제 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피 (SEC-HPLC)를 사용한 분석은 화합물 D (15.9 mL, 14.8 mg/mL, 234.9 mg, 78 %)의 형성을 나타냈다. 5.3의 킬레이트-대-항체 비 (CAR)가 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간 (MALDI-TOF) 질량 분석법을 사용하여 결정되었으며 EGFR-cMET 항체와 면역콘쥬게이트 화합물 D 사이의 질량 대 전하 비의 차이로부터 계산되었다.

[0674] 8.2 방사성면역콘쥬게이트 화합물 E의 방사성합성

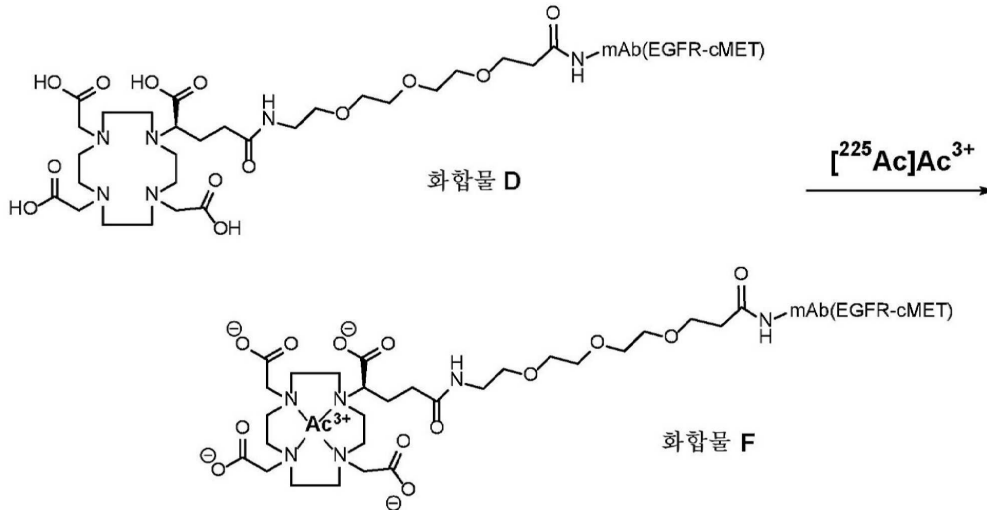


[0675]

[0676] 1.5 mL Eppendorf 튜브에 화합물 D (0.100 mL; 2.00 mg/mL; 0.200 mg)의 SABST 용액을 충전한 후에,

[^{177}Lu] LuCl_3 (2.2 mCi)의 0.04 M HCl 용액을 충전하였다. 실온에서 20 min 후에, 반응 혼합물의 iTLC 분석 (실리카 젤 (SG) 플레이트, 이동상으로서 0.02 M 시트레이트 완충제 (5 % MeOH))은 >97%의 방사화학 전환율 (radiochemical conversion, RCC)을 나타냈다. Sephadex G50 수지 (SABST로 수화됨)로 패키징된 1 mL 컬럼을 사용하여 정제를 수행하였다. SABST를 사용하여 생성물 분획들을 용리시키고 합하였다. 소듐 L-아스코르베이트와 디에틸렌트리아민-펜타아세트산 칼슘 트리소듐 염 수화물 (DTPA)의 SABST 용액을 첨가하였고, 생성된 제형 (약 10 mM 소듐 L-아스코르베이트, 1 mM DTPA)을 합성 종료(end-of-synthesis, EOS) 시에 iTLC 및 SEC-HPLC로 분석한 결과, 화합물 E (364 μL , 0.431 mg/mL, 10.1 mCi/mg 특이적 활성, >95% 방사화학적 순도, 및 >99% 화학적 순도)가 형성된 것으로 나타났다.

[0677] 8.3 방사성면역콘주게이트 화합물 F의 방사성합성



[0678]

[0679] 1.5 mL Eppendorf 튜브에 화합물 D (0.193 mL; 2.07 mg/mL; 0.400 mg)의 SABST 용액을 충전한 후에, [^{225}Ac] $\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ (24 μCi)의 0.001 M HCl 용액을 충전하였다. 35° C에서 120 min 후에, DTPA (2 μL 의 0.1 M SABST 용액)를 첨가하여 반응을 켜었다. 반응 혼합물의 iTLC 분석 (SG-플레이트, 이동상으로서 0.02 M 시트레이트 완충제 (5% MeOH))은 99%의 RCC를 나타냈다. G50 수지 (SABST로 수화됨)로 패키징된 1 mL 컬럼을 사용하여 정제를 수행하였다. SABST를 사용하여 생성물 분획들을 용리시키고 합하였다. 소듐 L-아스코르베이트와 DTPA의 SABST 용액을 첨가하였고, 생성된 제형 (약 10 mM 소듐 L-아스코르베이트, 1 mM DTPA)을 EOS 시에 iTLC 및 SEC-HPLC로 분석한 결과, 화합물 F (448 μL , 0.680 mg/mL, 0.053 mCi/mg 특이적 활성, >99 % 방사화학적 순도, 및 >99% 화학적 순도)가 형성된 것으로 나타났다.

[0680] 실시예 9. [^{177}Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트의 시험관 내 결합

[0681] [^{177}Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트, 즉, 화합물 E의 수용체 결합 친화도를 평가하기 위한 연구를 4개의 상이한 세포주를 이용하여 수행하였다: HCC827 세포, HT29 세포, H441 세포, 및 H1975 세포. 본 연구는 하기 설명된 절차를 따랐다.

[0682] 본 분석의 목적은 방사성면역콘주게이트가 HT29, H441, HT29, HCC827, 및 H1975를 포함하는 EGFR 및/또는 cMET 발현 세포주에서 천연 항체의 결합 특징을 유지하였는지를 확인하는 것이었다. 실험 1일 전에, 세포($1.5 \sim 2 \times 10^5$ 개)를 500 μL 보충된 배지에서 48웰 마이크로플레이트에 시딩하였다. 분석 시작 시에, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 이어서 4 μM 콜드 항체의 부재 및 존재[각각 전체 결합(TB) 및 비특이적 결합(NSB)] 하에서 증가하는 농도의 화합물 E(0.05 nM 내지 100 nM)로 처리하였다. 플레이트를 부드럽게 진탕하면서 4° C에서 약 3시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 이어서 1 % 트리톤(Triton)-X-100으로 용해시켰다. 용해물을 감마 카운팅 튜브에 옮기고, 위자드(Wizard) 1470 감마 카운터 상에서 화합물 E 표준물을 따라 실행하여 각각의 용해물에 대한 방사능의 양을 분당 카운트(CPM) 단위로 결정하였다. 각각의 웰로부터의 나머지 용해물(25 μL)은 표준 단백질 정량화 분석을 사용하여 단백질 함량을 분석하는 데 사용하였다.

[0683] 총, 특이적, 및 비특이적 결합 값(fmol/mg)을 도 14a~14b에 제시된 바와 같이 콘주게이트 농도에 대해 플롯팅하

였다. Kd, 및 Bmax를 단일-부위 쌍곡선 모델에 대한 특이적 결합 데이터의 곡선 적합에 의해 유도하였다(그래프패드 프리즘 소프트웨어(Graph Pad Prism Software), 버전 9). 결합 데이터는 Kd에 대한 바람직한 값을 보여주었다. 가장 높은 Bmax(fmol/mg)는 HCC827(2861 ± 207) 및 HT29(2351 ± 237)에서 관찰되었으며, 그 다음은 H441(1195 ± 153) 및 H1975(498 ± 42)였다.

[0684] EGFR-cMET 콘주게이트, 즉, 화합물 E는 HCC827 세포의 경우 약 9.9 nM, HT29 세포의 경우 약 5.7 nM, H441 세포의 경우 약 15.5 nM, 및 H1975 세포의 경우 약 6.0 nM의 높은 결합 친화도를 나타내었음이 관찰되었다.

[0685] 실시예 10. [^{177}Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트의 내재화 평가

[0686] 본 내재화 분석은 방사성표지된 - 링커 항체 유도체의 세포 체류의 정도를 결정하기 위해 설계되었다. 분석은 항체에 결합되는 경우 EGFR-cMET 수용체가 내재화되는 내재적 능력 및 방사성표지된 화합물을 추적하는 능력에 좌우된다. 여기서, 일정한 양의 방사성면역콘주게이트를 4개의 상이한 세포주와 고정된 지속시간 동안 인큐베이션하고, 내재화된 방사능의 양을 총 세포-관련 활성의 백분율로서 계산함으로써 잔류화를 결정한다.

[0687] [^{177}Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트, 즉, 화합물 E의 내재화를 평가하기 위한 연구를 HCC827 세포, HT29 세포, H441 세포, 및 H1975 세포의 4개의 상이한 세포주를 이용하여 하기 설명된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0688] 본 분석은 방사성면역콘주게이트 화합물 E의 세포 체류의 정도를 결정하기 위해 설계되었다. 간략하게, 상기 언급된 세포주를 완전 배지에서 3×10^5 개 세포/웰의 농도로 3개의 24웰 플레이트에 시딩하였다(0 h, 2 h 및 24 h 인큐베이션 시간 동안). 다음 날, 배지를 디캔팅하고, 세포를 멸균 PBS로 1회 세척하고, 이어서 화합물 E(10 nM)로 37°C에서 2~3시간 동안 처리하였다. 인큐베이션 후, 모든 플레이트를 즉시 얼음 상에 놓고, 배지를 사전-표지된(비-결합된) 감마 카운팅 튜브 내로 폐기하였다. 세포를 멸균 PBS로 1회 세척하고, 부드럽게 진탕하고, (비-결합된 표지된) 감마 튜브 내로 디캔팅하였다. 강산 세척 완충액(pH 2.5, 500 μL)을 0-시간 시점 내로 4°C에서 5분 동안 첨가하고, 이어서 완충액을 사전-표지된(막-결합된) 감마 카운팅 튜브 내로 수집하였다. 이어서 세포를 300 μL 1 % 트리톤 X-100으로 실온에서 30분 동안 부드럽게 진탕하면서 용해시켰다. 250 μL 의 세포 용해물을 감마 카운팅 튜브 내로 옮기고, 10분 동안 카운팅하였다. 약산 세척 완충액(pH 4.6, 500 μL)을 2-시간 및 24-시간 플레이트에 4°C에서 15분 동안 첨가하였다. 이어서 완충액을 사전-표지된(막-결합된) 감마 카운팅 튜브 내로 수집하였다. 37°C에서 각각 2시간 및 24시간 동안 추가의 인큐베이션을 위해 1 mL의 가운데 배지를 플레이트에 첨가하였다. 규정된 인큐베이션 시간 후, 플레이트를 얼음 상에 놓고, 하기 방식으로 프로세싱하고, 배지를 디캔팅하고, 사전-표지된(유출) 감마 튜브 내로 수집하였다. 이어서 플레이트를 1 mL 저온 PBS로 1회 세척하고, 유출 튜브 내로 첨가하였다. 강산 세척 완충액을 모든 웰에 첨가하고, 플레이트를 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 산 세척 분획을 사전-표지된(재생된) 감마 튜브 내로 수집하였다. 세포를 300 μL 1 % 트리톤 X - 100으로 실온에서 30분 동안 용해시켰다. 250 μL 의 세포 용해물을 사전-표지된(보유된) 감마 카운팅 튜브 내로 옮기고, 10분 동안 카운팅하였다. 25 μL 의 세포 용해물 분획을 단백질 정량화(피어스(Pierce) BCA 단백질 분석)를 위해 96웰 플레이트에 옮겼다.

[0689] 내재화 연구로부터의 결과는 도 15에 제시된다. 퍼센트 잔류화를 CPM(용해물) 또는 CPM(유출 + 재생된 + 용해물)으로서 결정하였다. 인큐베이션 후 24시간에 가장 낮은 %유출은 HCC827에서 관찰되었으며, 그 다음은 HT29, H441 및 H1975였다(각각 약 25%, 30%, 35%, 및 45%). 이 경우에 EGFR+cMET 수용체의 발현 수준과 세포 체류 사이에 상관관계가 있는 것으로 보였다.

[0690] 실시예 11. 다양한 동물 모델에서의 [^{177}Lu]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트의 생체 내 생체분포

[0691] 5개의 상이한 세포주 이종이식 마우스 모델을 사용하여 [^{177}Lu]-DOTA-항-EGFR-cMET 콘주게이트, 즉, 화합물 E의 생체 내 생체분포를 하기 프로토콜에 따라 평가하였다.

[0692] 종양 접종: 세포를 PBS로 세척하고, 0.25% 트립신 EDTA로 탈착시켰다. 수확된 세포를 PBS 및 마트리지엘(Matrigel)(BD, 캐나다 온타리오주 오크빌)의 1:1 혼합물에 하기 농도로 재현탁시켰다:

[0693] HCC827: 50×10^6 개 세포/mL

[0694] HT29: 20×10^6 개 세포/mL

[0695] H1975: 50×10^6 개 세포/mL

- [0696] H292: 30×10^6 개 세포/mL
- [0697] H441: 50×10^6 개 세포/mL
- [0698] 5 내지 7-주령 암컷 Balb/c NCI 무흉선 NCr-nu/nu 마우스(찰스 리버 래버러토리스(Charles River Laboratories))에게 100 μ L의 혼합물을 우측 옆구리 내로 피하로 주사하였다. 방사성 주사는 종양 부피가 $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ 에 도달한 때에 접종 후 약 7~10일에 시작하였으며, 접종 후 3주에 동일한 크기에 도달한 HCC827 이종이식의 경우는 예외였다.
- [0699] 생체분포 연구: 피하 종양을 갖는 3마리의 마우스(상기 설명됨)의 5개의 군에게 대략 0.74 MBq의 ^{177}Lu (약 2 μ g의 항체)를 함유하는 화합물 E 200 μ L를 측부 꼬리를 통해 정맥내로 주사하였다. 주사 후 명시된 시점(4 h, 24 h, 48 h, 96 h, 및 168 h)에서, 시점당 1개의 군을 이소플루란으로 마취시키고, 심장 천공을 통해 배혈하고, 이어서 해부에 의한 혈액 및 상이한 기관 수집을 위해 안락사시켰다. 종양 및 기관의 임의의 잔류 혈액을 PBS로 세정하고, 닦아내어 건조시키고, 사전-칭량된 감마 카운팅 튜브 내로 수집하였다. 조직 샘플에 함유된 분당 방사선 카운트를 감마 카운터를 사용하여 측정하고, 이어서 보정 표준을 사용하여 붕괴 보정 μCi 의 활성도로 변환하였다. 활성도 측정 및 샘플 중량을 사용하여 조직 중량의 그래당 주사된 용량의 퍼센트(%ID/g)를 계산하였다.
- [0700] 결과는 조직의 그래당 주사된 용량의 백분율(% ID/g)로서 표현되며, **도 16a~16e**에 도시된다. 화합물 E의 생체분포 연구는 정상 기관에서 허용가능한 수준의 흡수를 갖는 IgG에 대한 전형적인 생체분포 프로파일을 보여주었다. 가장 높은 종양 흡수(%ID/g)는 H292> H441> HT29 및 H1975 이종이식편[각각 약 75%(96 h, 168 h), 약 35%(48 h, 96 h), 약 29%(48 h, 96 h), 및 약 20%(48 h, 96 h)]에서 관찰되었다. 종양 흡수(%ID/g)는 HCC827 이종이식 모델에서 약 25% 화합물 E로 48h에서 피크였으며, 주사 후 96 h, 및 168 h에서 약 17%까지 감소하였다. HCC827 이종이식 모델은 느린 종양 성장 속도로 인해 요법 연구를 진행하지 않았다.
- [0701] 실시예 12. 다양한 동물 모델에서의 [^{225}Ac]-화합물 C-항-EGFR-cMET 콘주게이트의 생체 내 효능
- [0702] 콜드 항체 클론 및/또는 비히클 대조군과 비교하여, 상이한 용량의 악티늄-225 표지된 방사성면역콘주게이트, 화합물 F에 대한 효능을 평가하기 위한 연구를 설계하였다.
- [0703] 4개의 증가하는 용량의 화합물 F(^{225}Ac 방사성표지된 EGFR-cMET 항체)로 효능 연구를 수행하고, 콜드 항체 및/또는 비히클 대조군과 비교하였다. H441, HT29 및 H1975 종양 이종이식편을 사용하여 치료 효능 연구를 수행하였다. 각각의 연구에 대해, 종양-보유 동물의 6~7개의 군($n = 5$)에게 200 μ L의 화합물을 측부 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 주사하였다. 20 mM 시트르산나트륨 pH 5.5, 0.82 % NaCl, 및 0.01 % 트윈(Tween) - 80 완충액에서 제제화된 화합물 F를 50 ~ 400 나노큐리에(nCi)의 활성도로 투여하였다. 대조군으로서, 비-방사성표지된 비-콘주게이트된 항체를 연구에서 테스트된 화합물 F의 가장 높은 방사능 용량에 상응하는 단백질 질량 당량으로 투여하였다. 종양 측정을 적어도 60일 동안 주 2~3회 버니어 캘리퍼스 2차원으로 취하였다. 종양 길이는 가장 긴 치수로 정의하고, 폭은 종양 길이에 수직으로 측정하였다. 동시에 동물을 칭량하였다. 전반적 신체 상태 및 일반적인 행동을 매일 평가하였다. 종양 부피(mm)를 타원체로서 캘리퍼스 측정으로부터 계산하였다: 종양 성장은 X 일차에 측정한 종양 부피를 투여일에 측정한 종양 부피로 나눈 것인 상대 종양 부피(RTV)로서 표현하였다. 모든 모델에서, 200 nCi 및 400 nCi는 모든 마우스에서 장기 종양 퇴행을 유발하였다(**도 17a~17c**). 가장 우수한 반응은 H441모델에서 관찰되었으며, 몇몇 마우스에서는 50 nCi 및 100 nCi 용량 둘 모두가 종양 억제 및 퇴행을 보여주었다. H1975 모델에서, 50 nCi는 모든 마우스에서 종양 성장을 유의하게 지연시켰으며, 100 nCi-처리된 군은 지연된 종양 성장, 종양 억제 및 퇴행을 포함하는 혼합 반응을 보여주었다. HT29 모델에서, 100 nCi에서 종양 억제를 나타낸 1마리의 마우스를 제외하고는, 50 nCi, 또는 100 nCi 용량에서 효능이 관찰되지 않았다.
- [0704] 참고문헌
- [0705] 본 개시내용 및 본 개시내용과 관련된 분야의 기술 수준을 더욱 충분히 설명하고 개시하기 위하여 다수의 간행물을 위에 인용하였다. 이러한 참고문헌에 대한 전체 인용은 아래에 제공된다. 이러한 참고문헌 각각의 전체가 본원에 포함된다.

Ariyawutyakorn, 2016	Ariyawutyakorn, W., S. Saichaemchan, and M. Varella-Garcia, <i>Understanding and Targeting MET Signaling in Solid Tumors - Are We There Yet?</i> Journal of Cancer, 2016. 7(6): p. 633-649.
Arteaga, 2014	Arteaga, C.L. and J.A. Engelman, <i>ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics</i> . Cancer Cell, 2014. 25(3): p. 282-303.
Bachleitner-Hofmann, 2008	Bachleitner-Hofmann, T., et al., <i>HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells</i> . Mol Cancer Ther, 2008. 7: p. 3499-3508.
Bardelli, 2013	Bardelli, A., et al., <i>Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer</i> . Cancer Discovery, 2013. 3(6): p. 658-673.
Bean, 2007	Bean, J., et al., <i>MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104(52): p. 20932-20937.
Belalcazar, 2010	Belalcazar, A., et al., <i>Targeting the Met pathway in lung cancer</i> . Expert review of anticancer therapy, 2012. 12(4): p. 519-528.
Benedettini, 2010	Benedettini, E., et al., <i>Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis</i> . The American journal of pathology, 2010. 177(1): p. 415-423.
Bertotti, 2015	Bertotti, A. and F. Sassi, <i>Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies</i> . Clinical Cancer Research, 2015.
Birchmeier, 2003	Birchmeier, C., et al., <i>Met, metastasis, motility and more</i> . Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4: p. 915-925.
Boccaccio, 2014	Boccaccio, C., P. Luraghi, and P.M. Comoglio, <i>MET-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors: An Old Liaison Rooted in Colorectal Cancer Stem Cells</i> . 2014. p. 3647-3651.

[0706]

Bouattour, 2018	Bouattour, M., et al., <i>Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma</i> . Hepatology (Baltimore, Md.), 2018. 67 (3): p. 1132-1149.
Cappuzzo, 2009	Cappuzzo, F., et al., <i>Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (10): p. 1667-74.
Chan, 2017	Chan, D.L.H., et al., <i>Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer</i> . Cochrane Database Syst Rev, 2017. 6 : p. CD007047.
Chong, 2013	Chong, C.R. and P.A. Janne, <i>The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer</i> . Nature medicine, 2013. 19 (11): p. 1389-1400.
Chothia, 1987	Chothia, C. and Lesk, A.M., <i>Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins</i> . J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917
Choueiri, 2017	Choueiri, T.K., et al., <i>Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer</i> . J Clin Oncol, 2017. 35 (26): p. 2993-3001.
Corso, 2010	Corso, S., et al., <i>Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition</i> . Molecular Cancer, 2010. 9 (1): p. 121.
Cunningham, 2004	Cunningham, D., et al., <i>Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer</i> . N Engl J Med, 2004. 351 (4): p. 337-45.
De Bacco, 2012	De Bacco, F., et al., <i>The MET Oncogene Is a Functional Marker of a Glioblastoma Stem Cell Subtype</i> . Cancer research, 2012. 72 (17): p. 4537-4550.
Dimasi, 2017	Dimasi et al. <i>Efficient Preparation of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Cysteine Insertion</i> . Mol Pharmaceuticals, 2017, 14(5) 1501-1516
Dokala, 2005	Dokala, A. and S.S. Thakur, <i>Extracellular region of epidermal growth factor receptor: a potential target for anti-EGFR drug discovery</i> . Oncogene, 2016. 36 : p. 2337.
Engelman, 2007	Engelman, J.A., et al., <i>MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling</i> . Science, 2007. 316 : p. 1039-1043.
Garber, 2014	Garber, K., <i>MET inhibitors start on road to recovery</i> . Nature reviews. Drug discovery, 2014. 13 (8): p. 563-565.
Gherardi, 2013	Gherardi et al., <i>Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor</i> . Proc Natl Acad Sci U.S.A, 2003, 100(21): 12039-12044
Giordano, 1989	Giordano, S., et al., <i>Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein</i> . Nature, 1989. 339 : p. 155-156.

[0707]

Gisterek, 2011	Gisterek, I., et al., <i>Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients</i> . Rep Pract Oncol Radiother, 2011. 16 (5): p. 173-7.
Gou, 2016	Gou, L.Y., et al., <i>The coexistence of MET over-expression and an EGFR T790M mutation is related to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer</i> . Oncotarget, 2016.
Guo, 2008	Guo, A., et al., <i>Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105 (2): p. 692-697.
Guo, 2014	Guo, B., et al., <i>Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures</i> . PLoS One, 2014. 9 (6): p. e99399.
Haura, 2013	Haura, E.B. and M.A. and Smith, <i>Signaling Control by Epidermal Growth Factor Receptor and MET: Rationale for Cotargeting Strategies in Lung Cancer</i> . Journal of Clinical Oncology, 2013. 31 (32): p. 4148.
Hay, 2016	Hay et al., <i>Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447</i> . Oncoimmunology, 2016 5 (8):e1208875.
Huang, 2014	Huang, L., et al., <i>MET expression plays differing roles in non-small-cell lung cancer patients with or without EGFR mutation</i> . Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2014. 9 (5): p. 725-728.
Jimeno, 2009	Jimeno, A., et al., <i>KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (7): p. 1130-6.
Jun, 2013	Jun, H.J., R.T. Bronson, and A. Charest, <i>Inhibition of EGFR induces a c-MET driven stem cell population in Glioblastoma</i> . Stem cells (Dayton, Ohio), 2013.
Kabat, 1991	Kabat, E.A. et al. <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991
Karamouzis, 2009	Karamouzis, M.V., P.A. Konstantinopoulos, and A.G. Papavassiliou, <i>Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors</i> . The Lancet Oncology, 2009. 10 (7): p. 709-717.
Kim, 2017a	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (68): p. 113120-113128.
Kim, 2017b	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (43): p. 75478-75487.
Kim, 2017c	Kim, J.H., et al., <i>Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (52): p. 90351-90357.

[0708]

Klein, 2012	Klein et al. <i>Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies</i> . MAbs, 2012, 4:653-63
Knickelbein, 2015	Knickelbein, K. and L. Zhang, <i>Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer</i> . Genes Dis, 2015. 2(1): p. 4-12.
Kondo, 2013	Kondo, S., et al., <i>Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma</i> . International journal of clinical oncology, 2013. 18(2): p. 207-213.
Lacouture, 2006	Lacouture, M.E., <i>Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors</i> . Nature reviews.Cancer, 2006. 6(10): p. 803-812.
LeFranc, 2015	LeFranc, M.P. et al., <i>IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on.</i> , Nucleic Acids Res. 2015, 43(Database issue):D413-22.
Li, 2011	Li, C., et al., <i>c-Met Is a Marker of Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Target</i> . Gastroenterology, 2011. 141(6): p. 2218-2227.e5.
Liska, 2011	Liska, D., et al., <i>HGF Rescues Colorectal Cancer Cells from EGFR Inhibition via MET Activation</i> . Clinical Cancer Research, 2011. 17(3): p. 472-482.
Liu, 2015	Liu, Y., et al., <i>Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis</i> . World J Gastroenterol, 2015. 21(12): p. 3706-10.
Luraghi, 2014	Luraghi, P., et al., <i>MET Signaling in Colon Cancer Stem-like Cells Blunts the Therapeutic Response to EGFR Inhibitors</i> . Cancer research, 2014. 74(6): p. 1857-1869.
Madoz-Gürpide, 2016	Madoz-Gürpide, J., et al., <i>Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer</i> . 2016. p. 1-13.
Marano, 2015	Marano, L., et al., <i>c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge</i> . Cancer letters, 2015. 365(1): p. 30-36.
Mazor, 2017	Mazor, Y., et al., <i>Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence</i> . Sci Rep, 2017. 7: p. 40098.
Mazor, 2015	Mazor, Y., et al., <i>Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity</i> . MAbs, 2015. 7(3): p. 461-9.
McDermott, 2010	McDermott, U., et al., <i>Acquired Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to MET Kinase Inhibition Is Mediated by a Switch to Epidermal Growth Factor Receptor Dependency</i> . Cancer research, 2010. 70(4): p. 1625-1634.
Miyamoto, 2011	Miyamoto, M., et al., <i>Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma</i> . British journal of cancer, 2011. 105(1): p. 131-138.
Mo, 2017	Mo, H.N. and P. Liu, <i>Targeting MET in cancer therapy</i> . Chronic Dis Transl Med, 2017. 3(3): p. 148-153.

[0709]

Moore, 2016	Moore, S.L., et al., <i>A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet that is Effective Against EGFR Inhibitor- Resistant Lung Tumors</i> . Cancer research, 2016.
Neuberger, 1988	Neuberger et al., 1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799
Nicholson, 2001	Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, <i>EGFR and cancer prognosis</i> . Eur J Cancer, 2001. 37 : p. 9-15.
Organ, 2011	Organ, S.L. and M.S. Tsao, <i>An overview of the c-MET signaling pathway</i> . Therapeutic advances in medical oncology, 2011. 3 (1 Suppl): p. S7-S19.
Organesyan, 2008	Organesyan et al. <i>Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions</i> . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 ;64(Pt 6):700-4.
Ou, 2016	Ou, S.-H.I., N. Agarwal, and S.M. Ali, <i>High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression</i> . Lung Cancer, 2016. 98 (Supplement C): p. 59-61.
Persic, 1997	Persic et al. <i>An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries</i> . Gene, 1997, 187: 9-18.
Peters, 2012	Peters, S. and A.A. Adjei, <i>MET: a promising anticancer therapeutic target</i> . Nature reviews.Clinical oncology, 2012. 9 (6): p. 314-326.
Prat, 1991	Prat, M., et al., <i>The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors</i> . International journal of cancer.Journal international du cancer, 1991. 49 (3): p. 323-328.
Puri, 2008	Puri, N. and R. Salgia, <i>Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer</i> . J Carcinog, 2008. 7 : p. 9.
Remon, 2018	Remon, J., et al., <i>Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients</i> . Ann Oncol, 2018. 29 (suppl_1): p. i20-i27.
Retter, 2005	Retter, I., et al., <i>"VBASE2, an integrative V gene database."</i> Nucl. Acids Res. 2005, 33 (suppl 1): D671-D674
Rho, 2009	Rho, J.K., et al., <i>The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors</i> . Molecular cancer research : MCR, 2009. 7 (10): p. 1736-1743.
Rocha-Lima, 2007	Rocha-Lima, C.M., et al., <i>EGFR targeting of solid tumors</i> . Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center, 2007. 14 (3): p. 295-304.
Sacco, 2015	Sacco, J.J. and M.J. Clague, <i>Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: implications for drug targeting and resistance</i> . Transl Lung Cancer Res, 2015. 4 (3): p. 242-52.

[0710]

Saltz, 2004	Saltz, L.B., et al., <i>Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor</i> . J Clin Oncol, 2004. 22 (7): p. 1201-8.
Seshacharyulu, 2012	Seshacharyulu, P., et al., <i>Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. 16 (1): p. 15-31.
Sierra, 2011	Sierra, J.R. and M.-S. Tsao, <i>c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer</i> . Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011. 3 (1 suppl): p. S21-S35.
Sohn, 2014	Sohn, J., et al., <i>cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer</i> . Journal of Cancer, 2014. 5 (9): p. 745-753.
Suda, 2010	Suda, K., et al., <i>Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. 16 (22): p. 5489-5498.
Troiani, 2016	Troiani, T., et al., <i>Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence</i> . ESMO open, 2016. 1 (5): p. e000088.
Trusolino, 2010	Trusolino, L., A. Bertotti, and P. Comoglio, <i>MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer</i> . Nature reviews.Molecular cell biology, 2010. 11 (12): p. 834.
Vainshtein, 2015	Vainshtein et al., <i>Quantitative measurement of the target-mediated internalization kinetics of biopharmaceuticals</i> , Pharm Res., 2015. 32 : 286–299.
Vaughan, 1996	Vaughan, et al., <i>Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library</i> , Nat Biotechnol., 1996. 14 : p. 309
Vecchione, 2011	Vecchione, L., et al., <i>EGFR-targeted therapy</i> . Special Issue - Gastroenterology, 2011. 317 (19): p. 2765-2771.
Vsiansky, 2018	Vsiansky, V., et al., <i>Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis</i> . Scientific Reports, 2018. 8 (1): p. 10370.
Wang, 2018	Wang, X. et al., <i>IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions</i> Protein Cell . 2018; 9 (1):63-73
Wu, 2017	Wu, Y.-L., et al., <i>Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer?</i> Cancer Treatment Reviews, 2017. 61 : p. 70-81.
Xu, 2016	Xu, Y.P., et al., <i>C-Met as a Molecular Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Clinical Outcome</i> . Journal of Cancer, 2016. 7 (5): p. 587-594.

Yan, 2015	Yan, S., et al., <i>Prognostic significance of c-Met in breast cancer: a meta-analysis of 6010 cases</i> . Diagn Pathol, 2015. 10 : p. 62.
Zhang, 2016	Zhang, Y., Z. Du, and M. Zhang, <i>Biomarker development in MET-targeted therapy</i> . Oncotarget, 2016. 7 (24): p. 37370-37389.
Zhang, 2015	Zhang, Y.W., <i>Promise and challenges on the horizon of MET-targeted cancer therapeutics</i> . World J Biol Chem, 2015. 6 (2): p. 16-27.
Zucali, 2008	Zucali, P.A., et al., <i>Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors</i> . Annals of Oncology, 2008. 19 (9): p. 1605-1612.

표준 분자 생물학 기술에 대해서는 Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press를 참조한다.

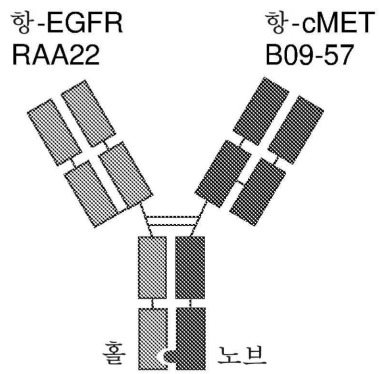
기타 실시 형태

본 발명은 본 발명의 구체적인 실시 형태와 관련하여 기술되었지만 추가의 변형이 가능하고, 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고, 본 발명이 속하는 당해 분야에 공지되거나 관습적인 실시의 범위 내에 속하는 그리고 본원에 기술된 필수적인 특징들에 적용될 수 있는, 본 개시내용을 벗어난 사항들을 포함하는 본 발명의 임의의 변경

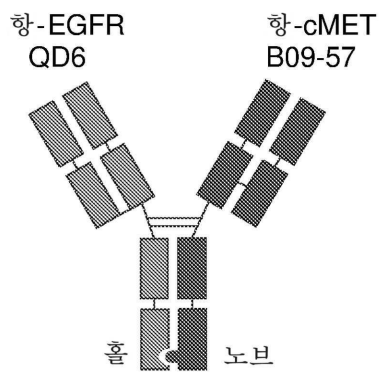
들, 용도들 또는 수정들도 본 출원이 망라하고자 하는 것으로 이해해야 할 것이다.

도면

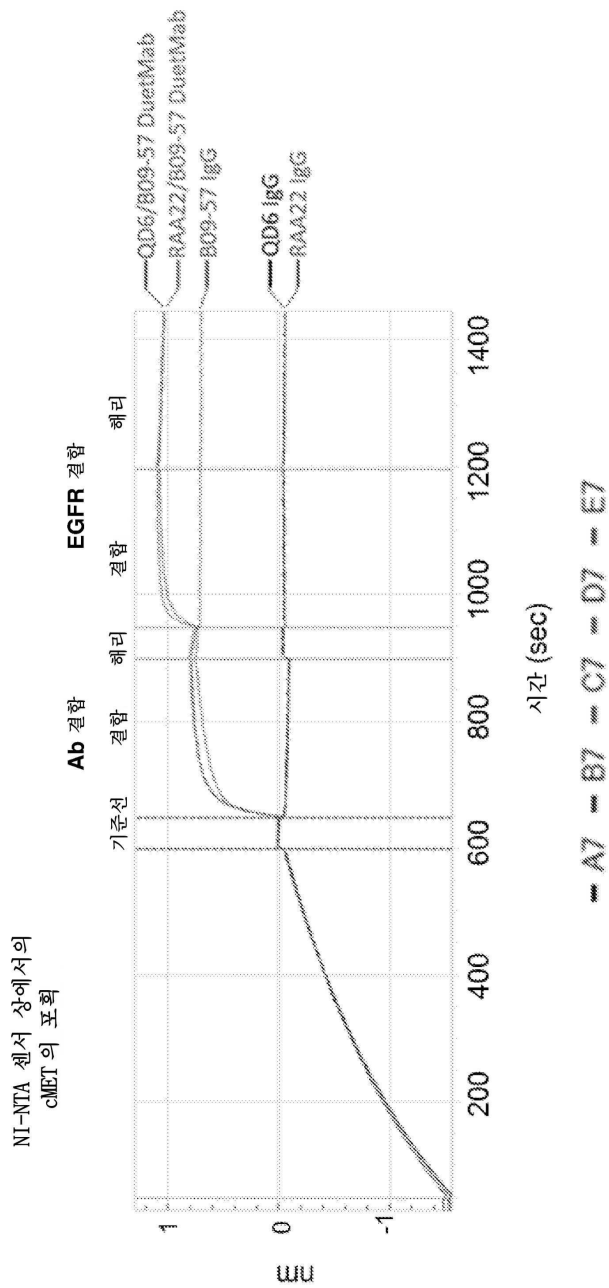
도면1a



도면1b

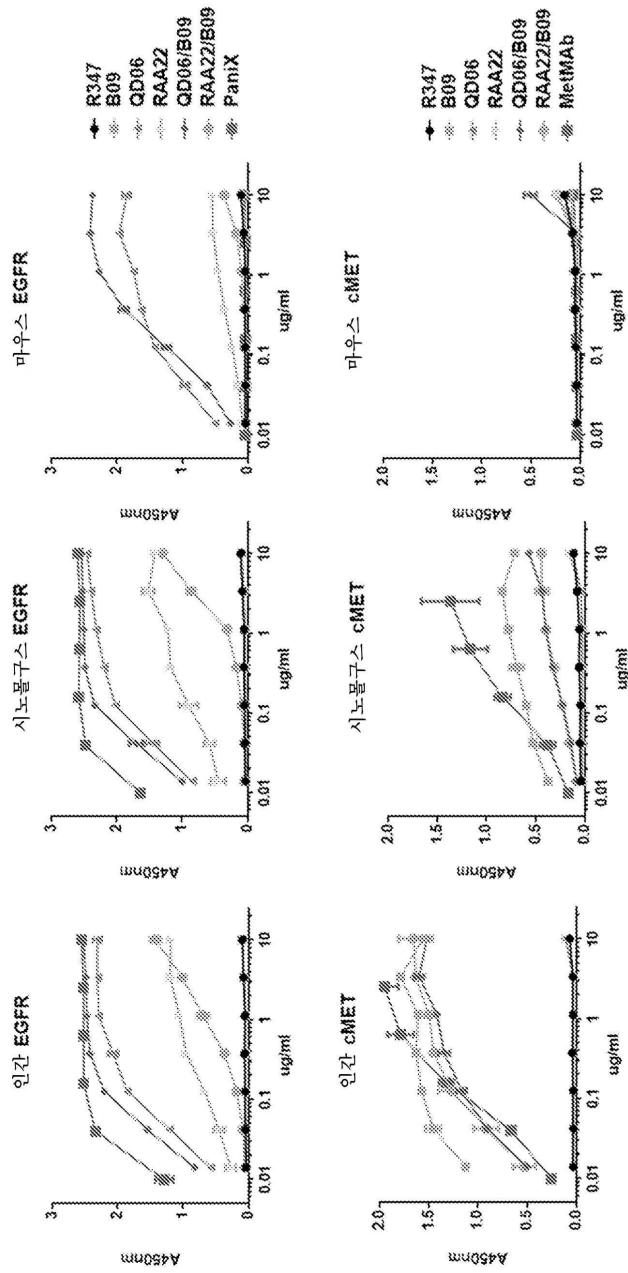


도면2



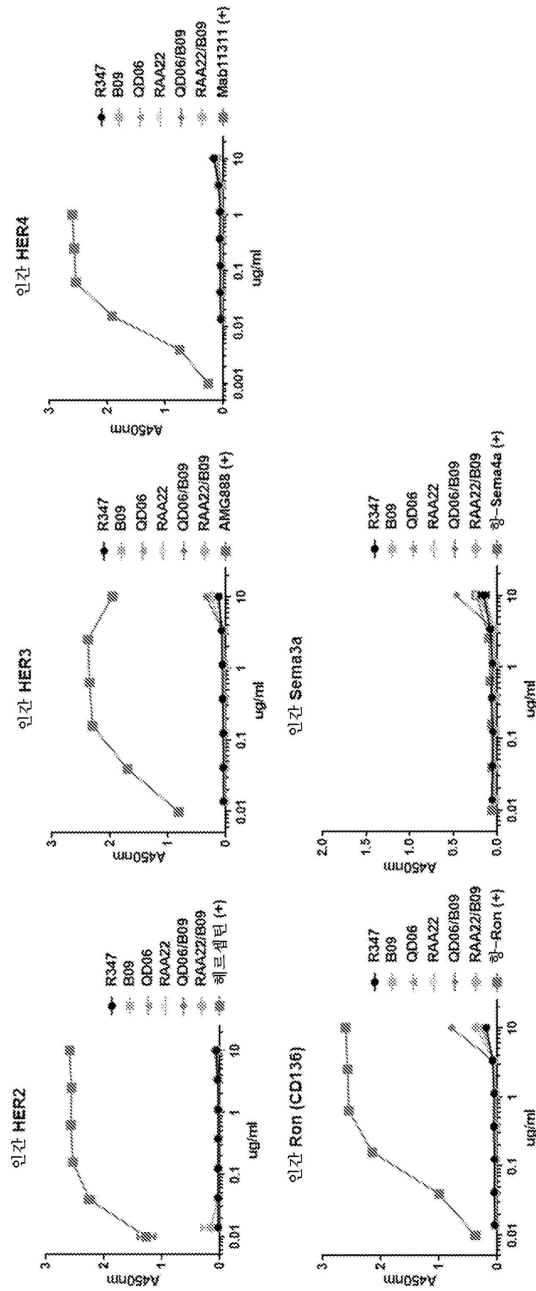
도면3a

EGFR 및 cMET 중 특이성

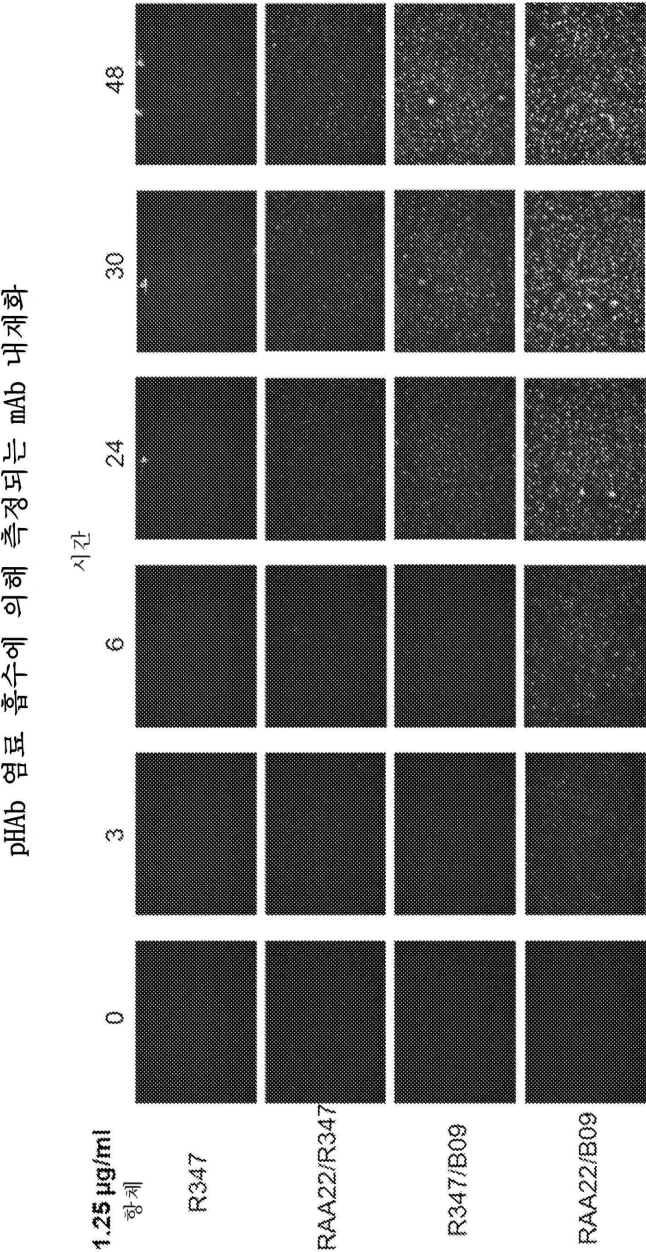


도면3b

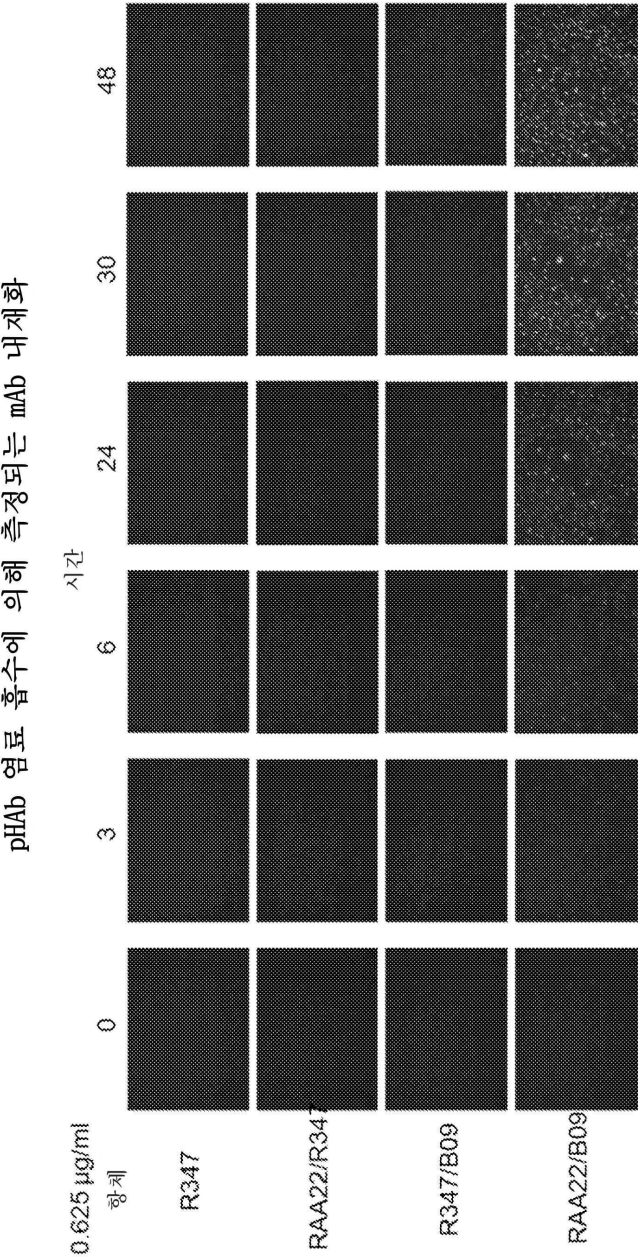
EGFR 및 cMET 계열 특이성



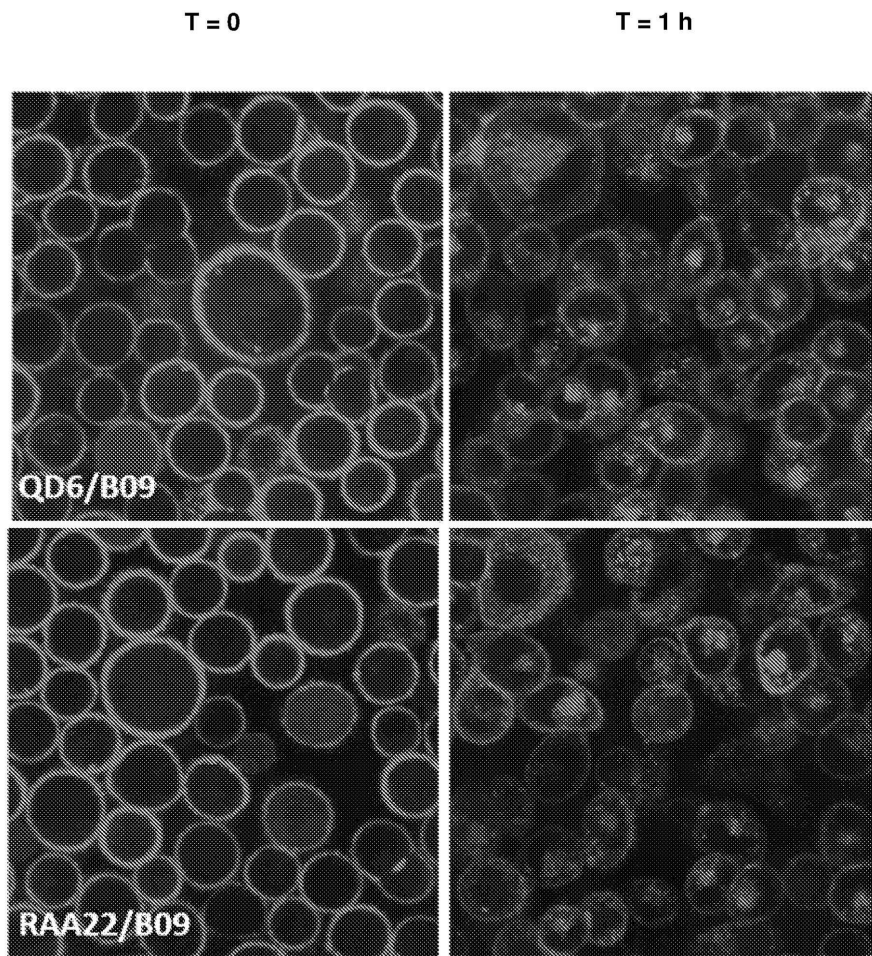
도면4



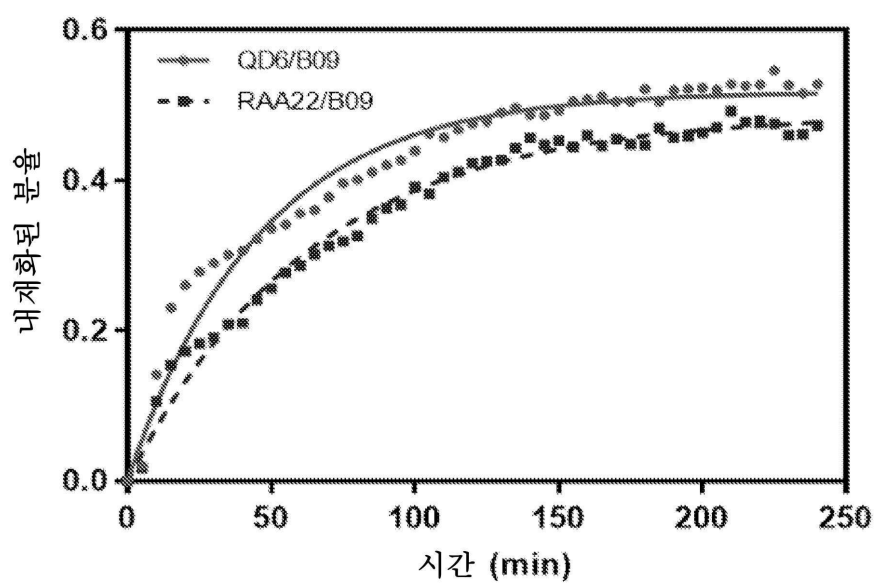
도면5



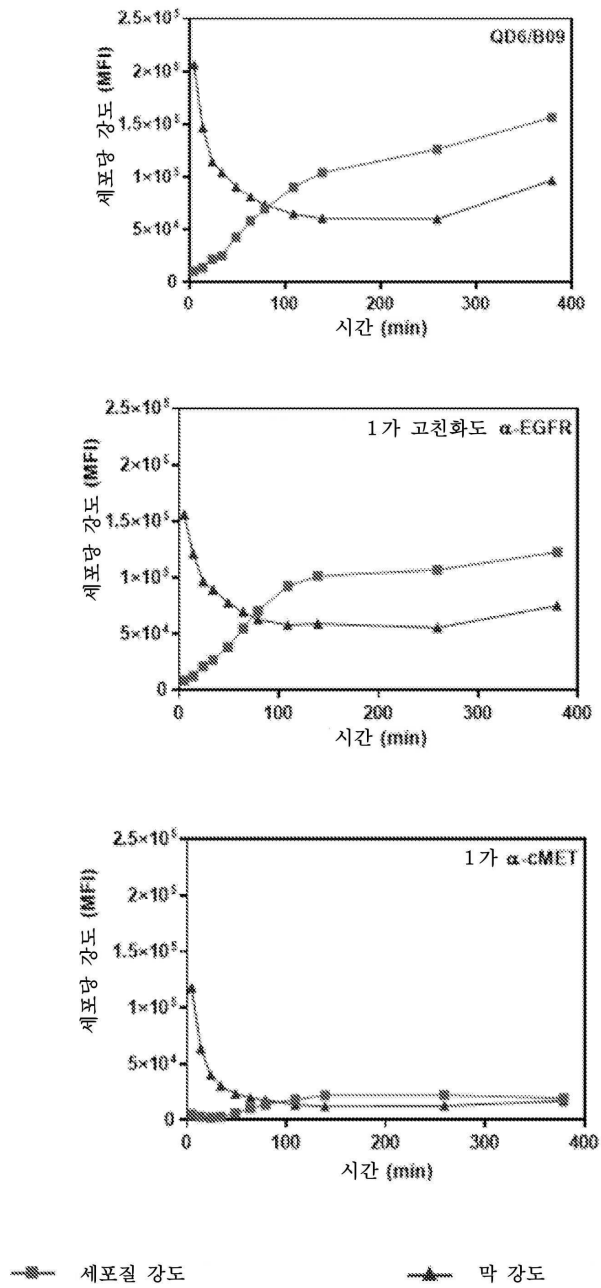
도면6a



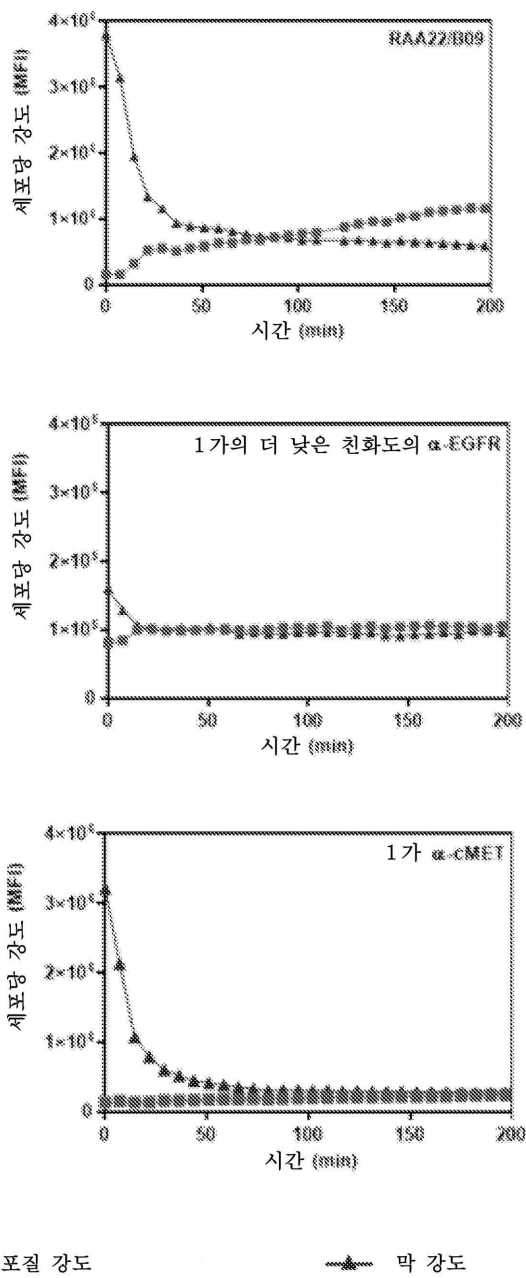
도면6b



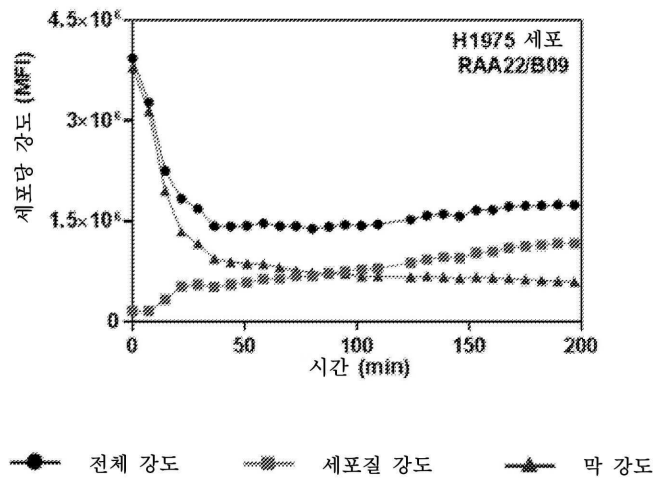
도면7a



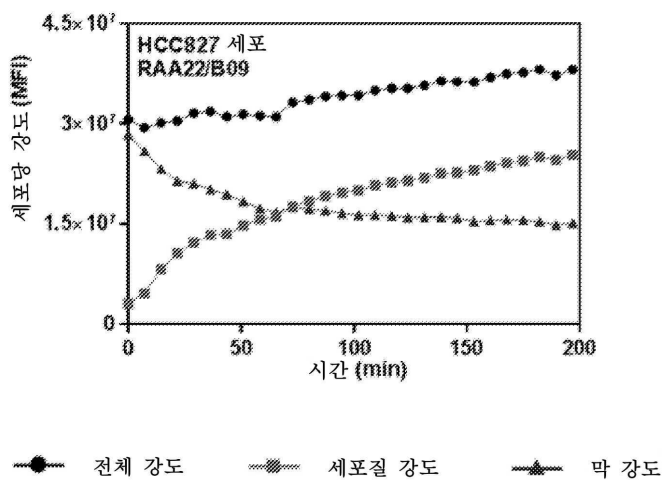
도면 7b



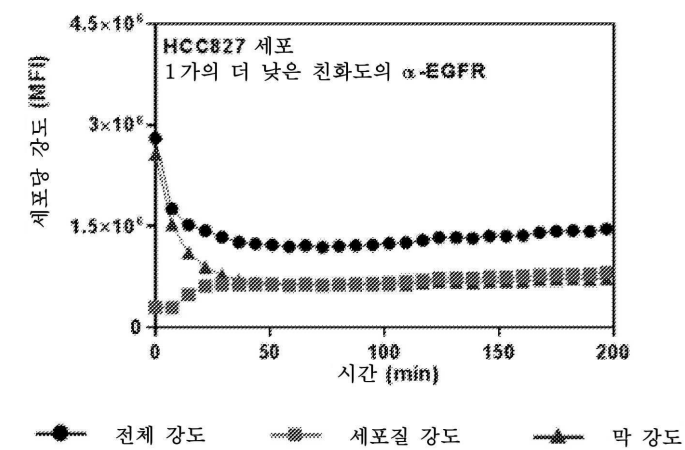
도면8a



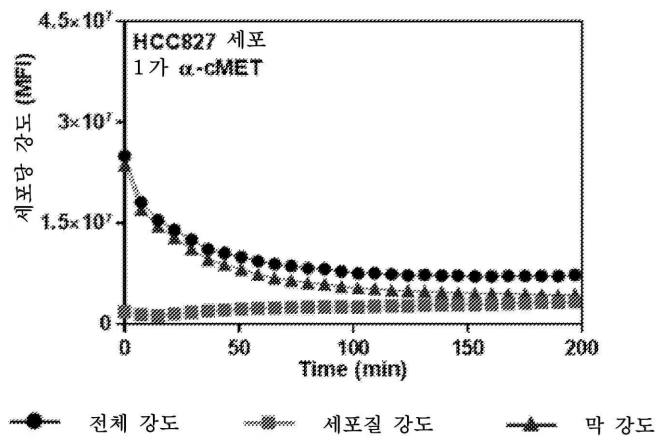
도면8b



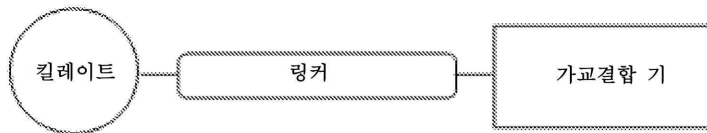
도면9a



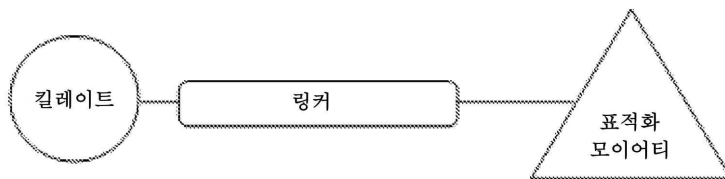
도면9b



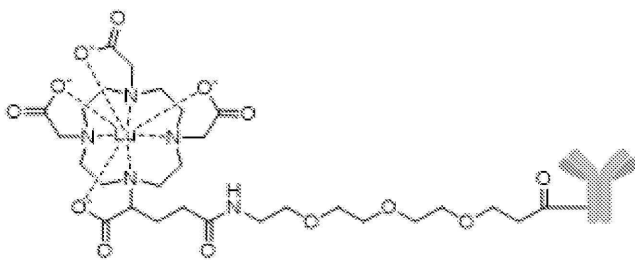
도면10a



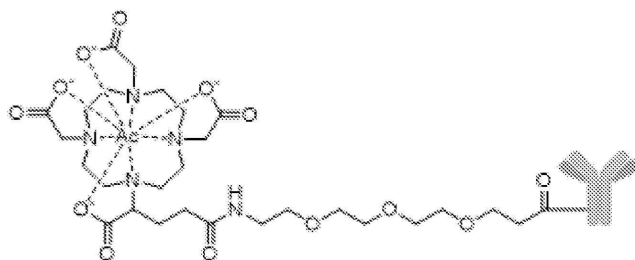
도면10b



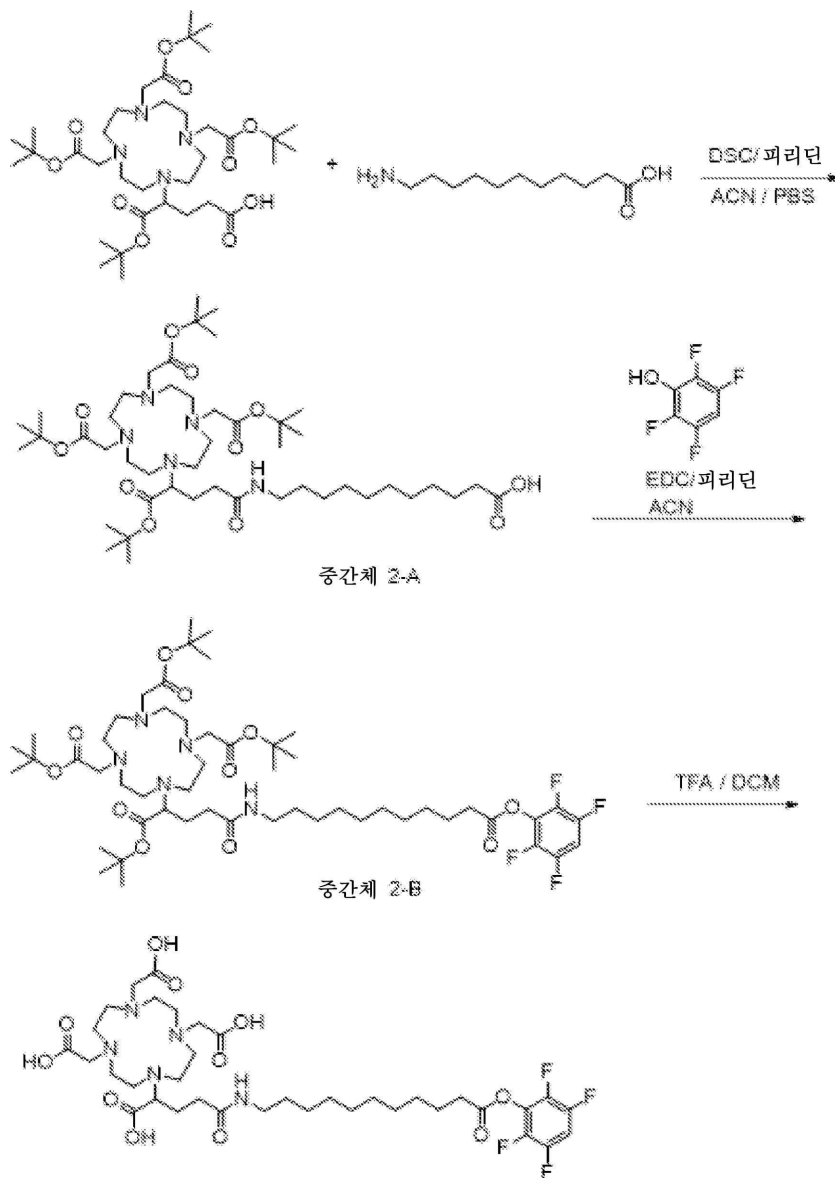
도면10c



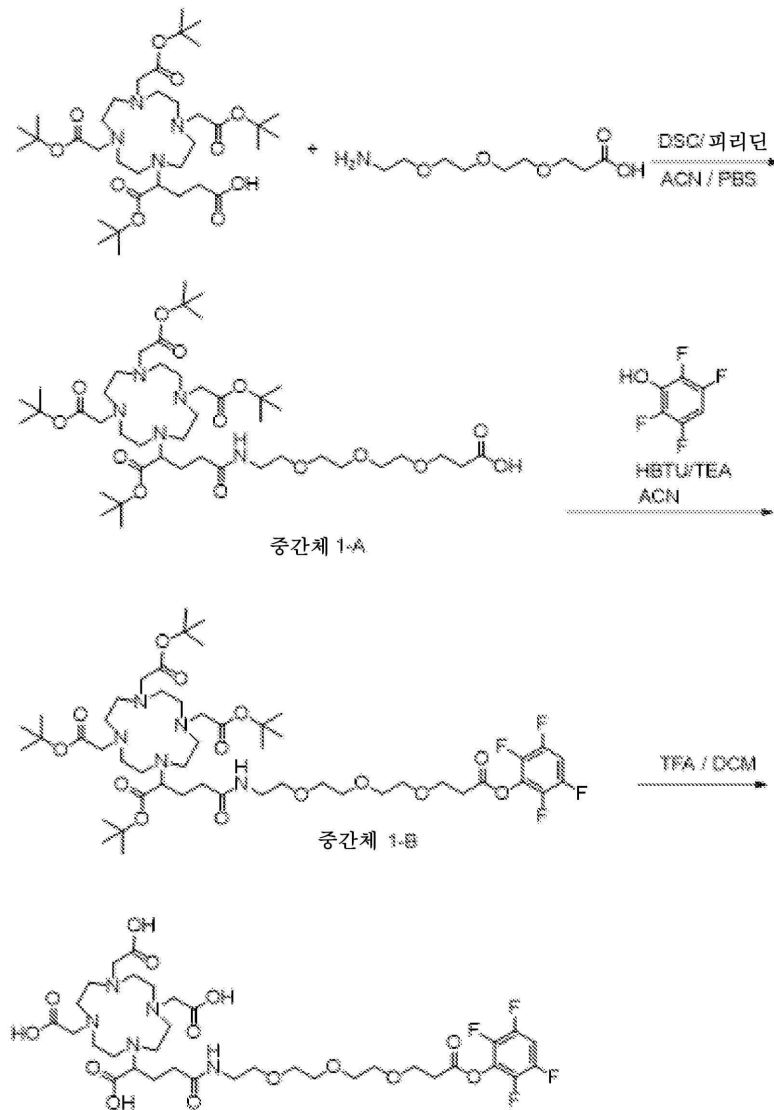
도면10d



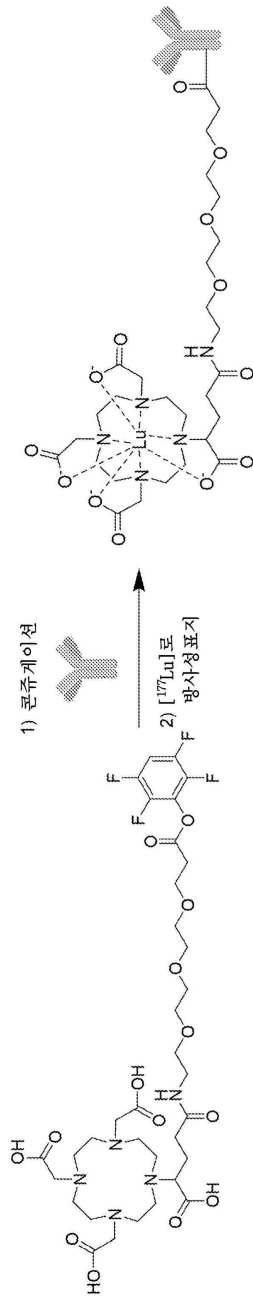
도면11



도면12



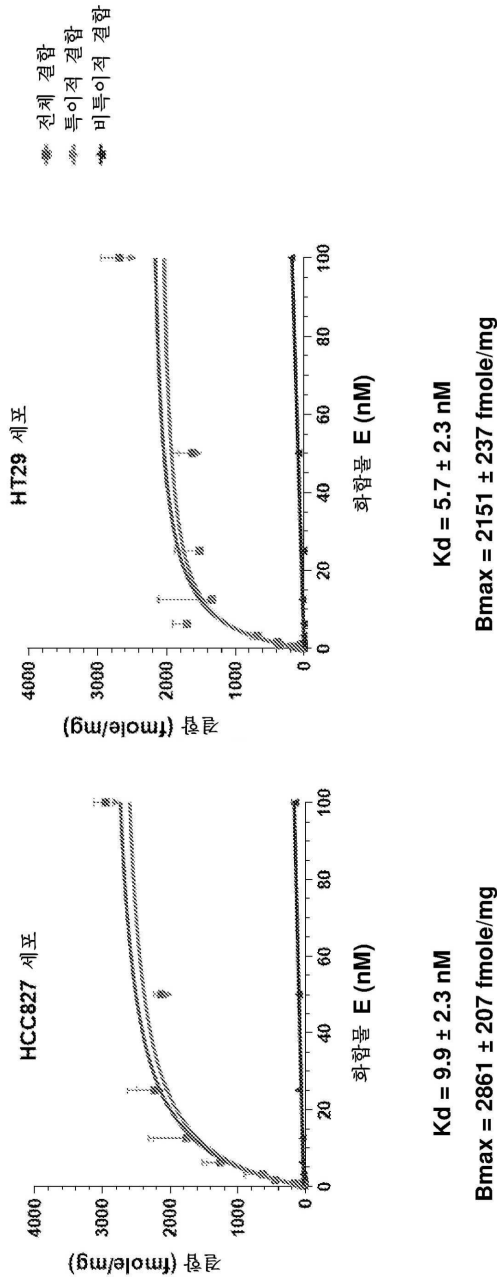
도면13



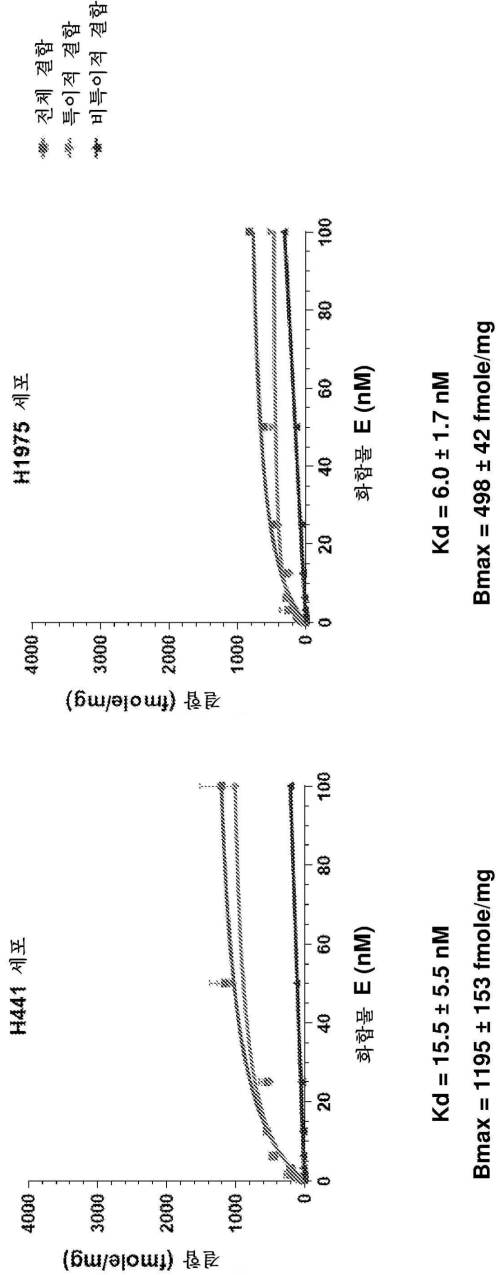
상기 항체는 라이신 잔기의 측쇄 아미노기를 통해 화합물 C에 콘쥬게이션됨.

는 EGFR 및 cMET에 특이적으로 결합하는 RAA22/B09 DuetMab을 나타내며, 여기서,

도면14a

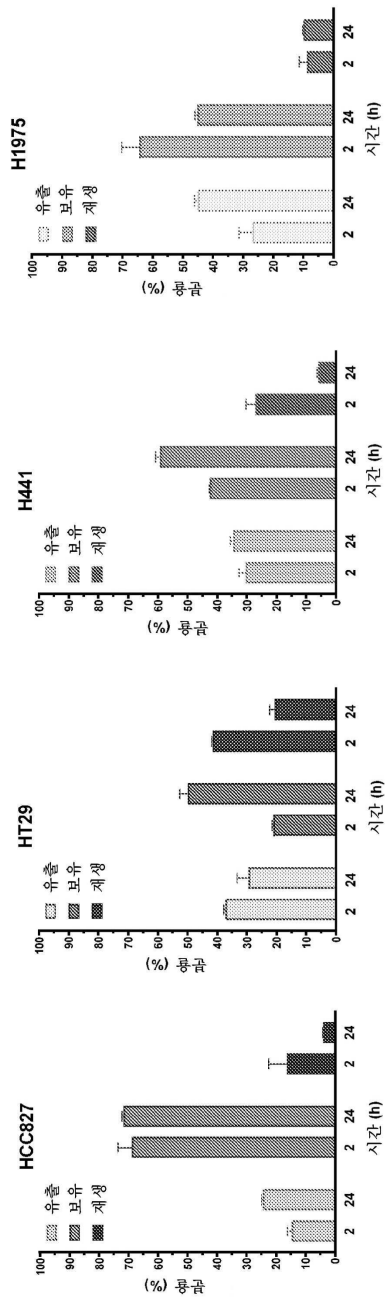


도면14b

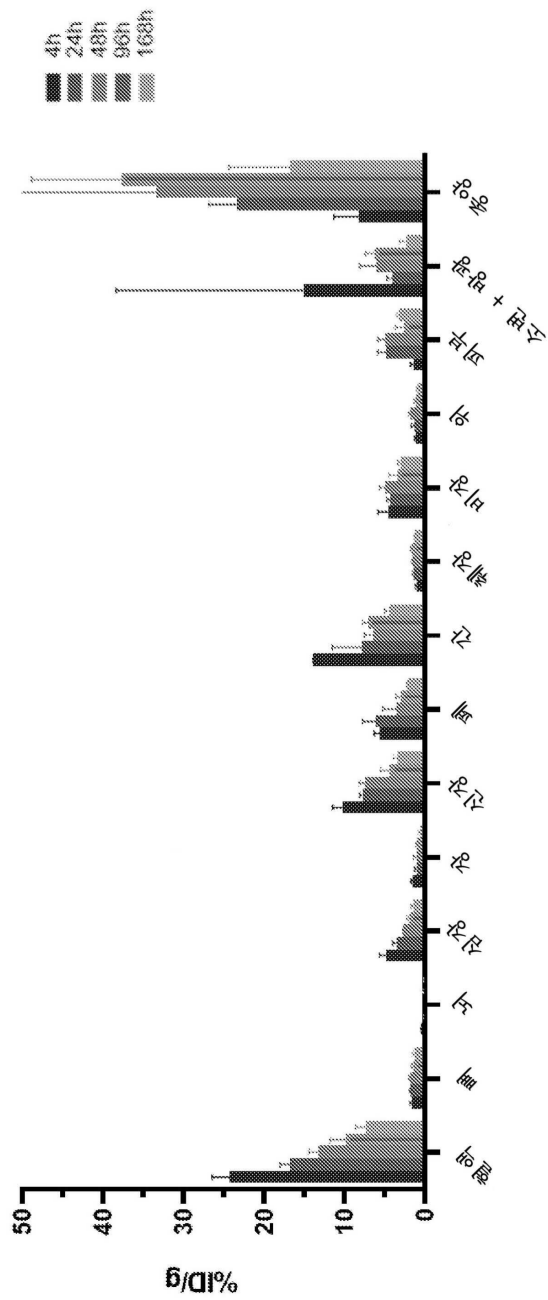


도면15

화합물 E 내재화

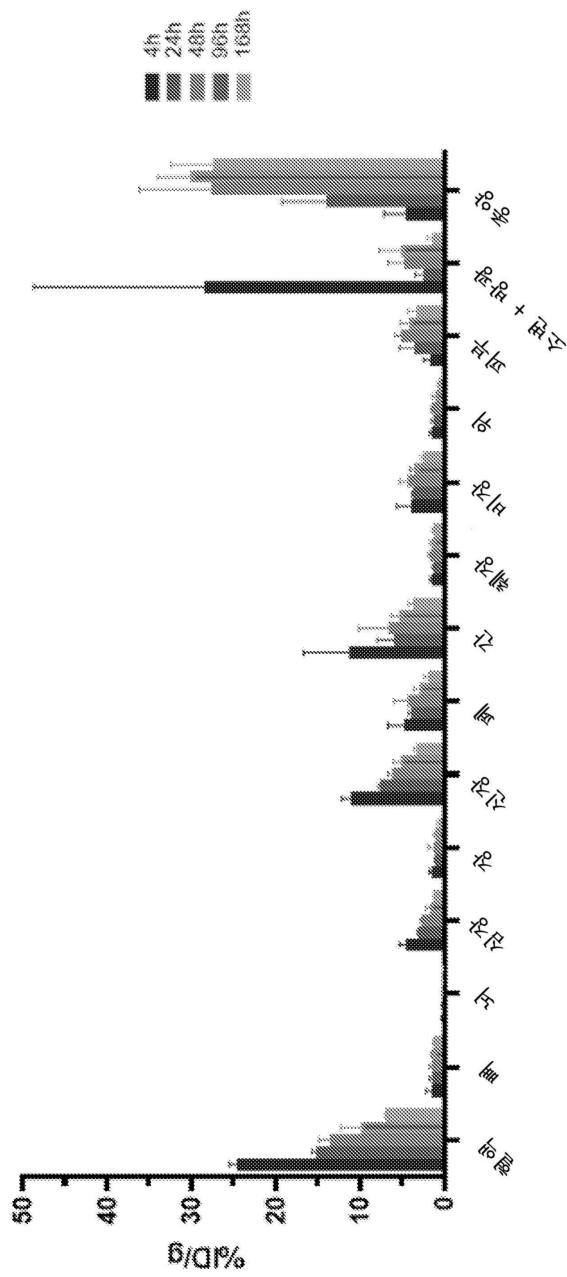


도면 16a



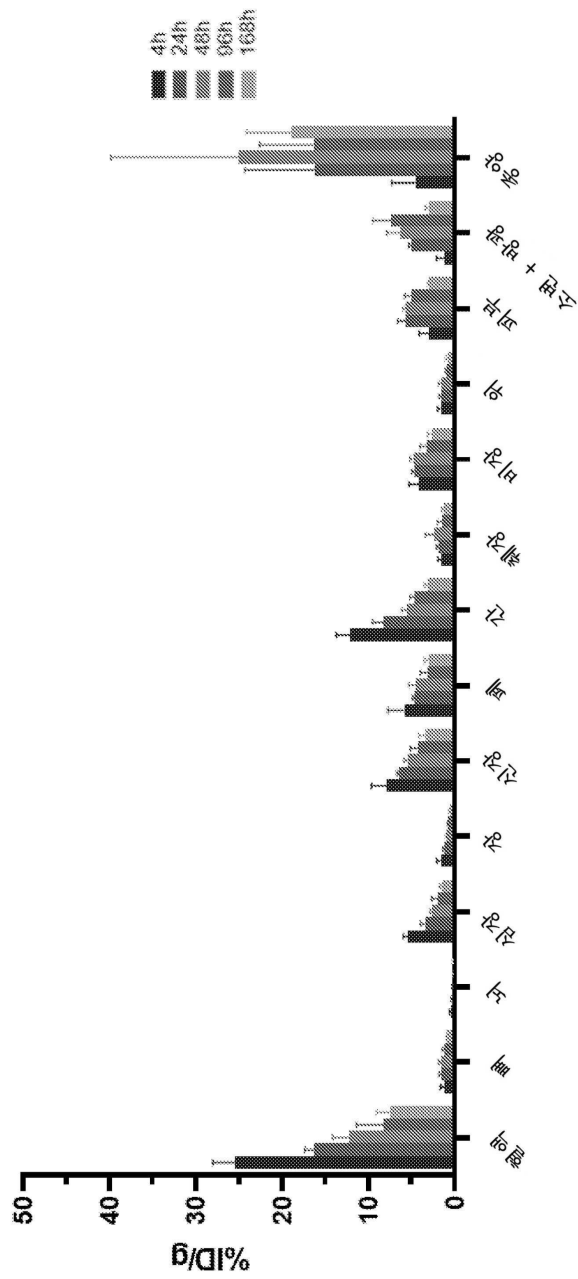
도면16b

HT29 모델에서의 화합물 E 생체분포 연구



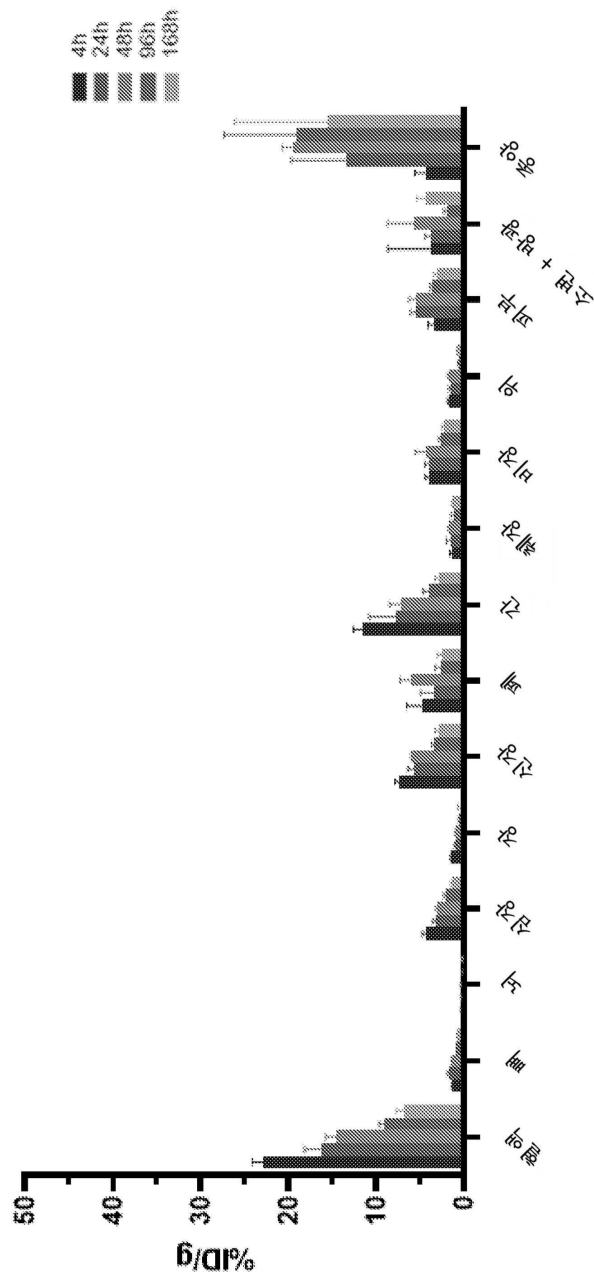
도면16c

HCC827 모델에서의 화합물 E 생체분포 연구



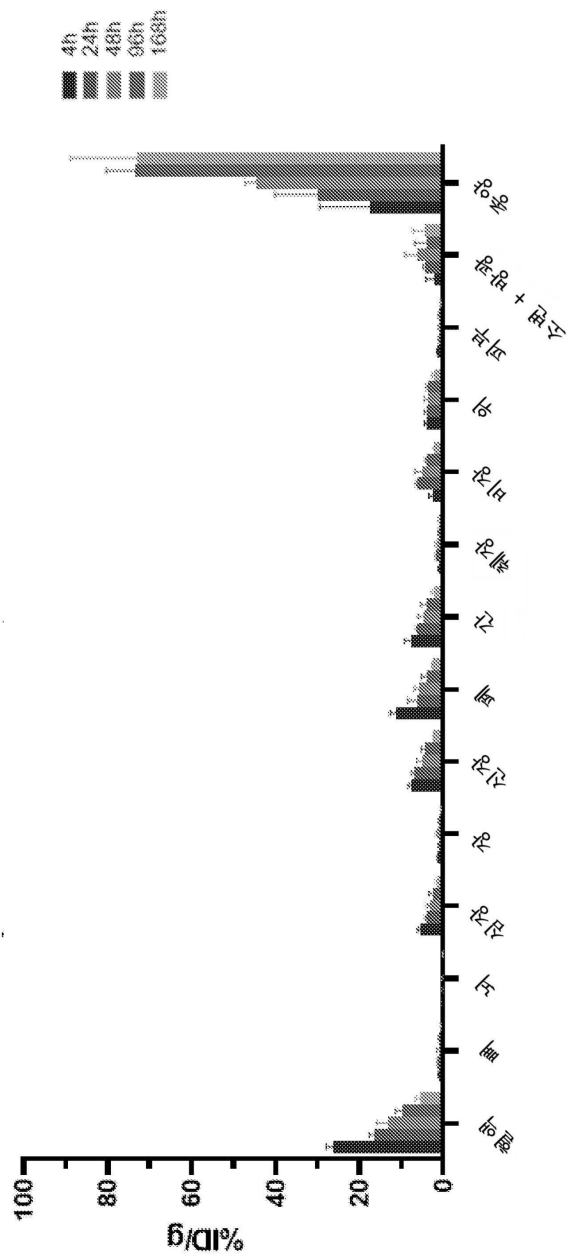
도면 16d

H1975 모델에서의 하합물 E 생체분포 연구



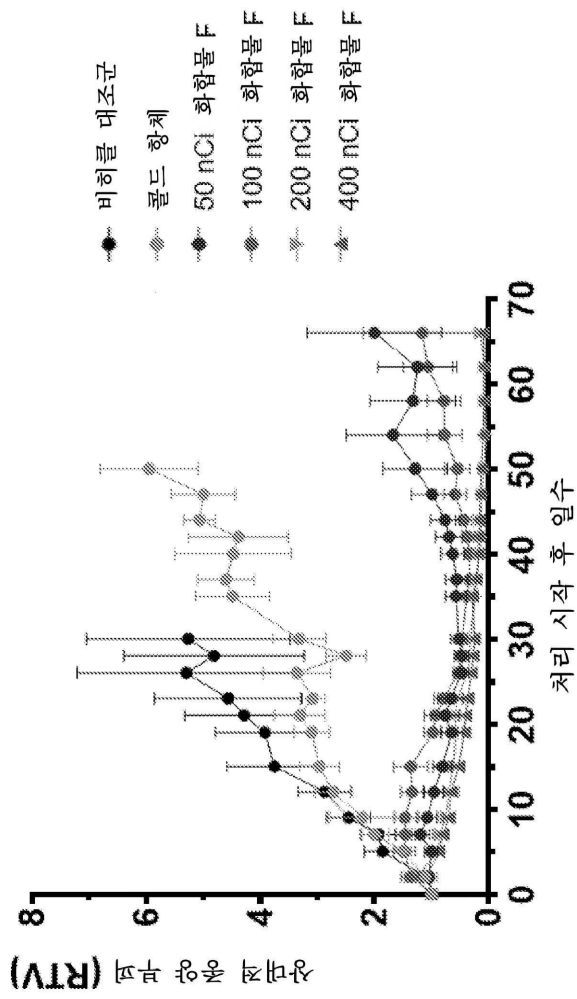
도면16e

H292 모델에서의 화합물 E 생체분포 연구



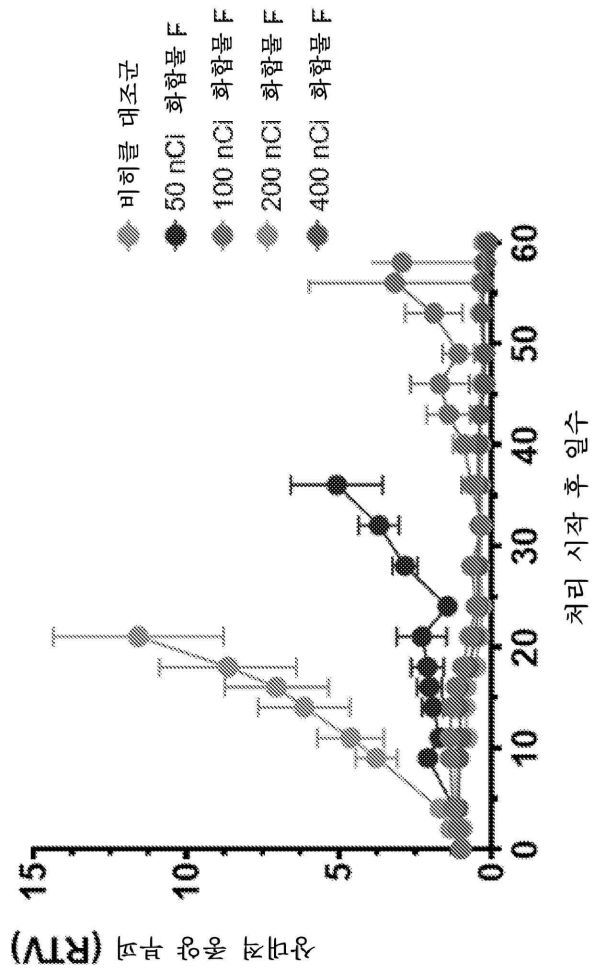
도면17a

H441 이중이식 모델에서의 화합물 F의 효능



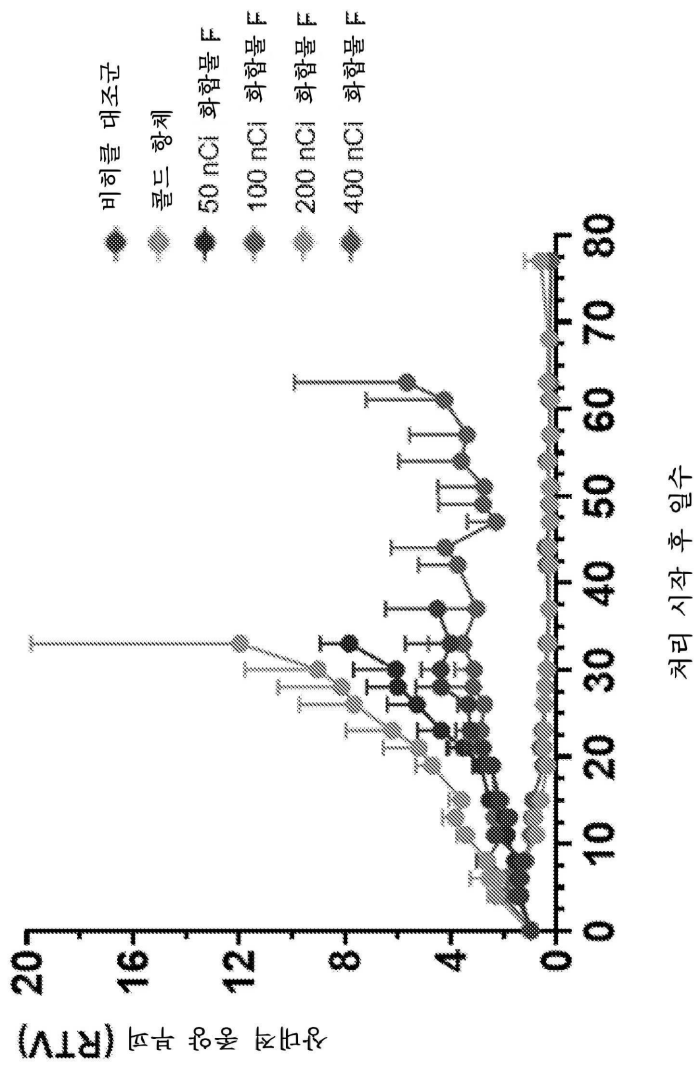
도면17b

H1975 이종이식 모델에서의 화합물 F의 효능



도면17c

HT29 이종이식 모델에서의 화합물 F의 효능



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.