



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137076
(43) 공개일자 2024년09월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7028454
- (22) 출원일자(국제) 2023년01월17일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년08월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/072657
- (87) 국제공개번호 WO 2023/143263
국제공개일자 2023년08월03일
- (30) 우선권주장
202210089838.7 2022년01월25일 중국(CN)

- (71) 출원인
메디링크 테라퓨틱스 (쑤저우) 컴퍼니, 리미티드
중국, 지양수 215000, 쑤저우, 쑤저우 에어리어
오브 차이나(지양수) 파일럿 프리 트레이드 존,
쑤저우 인더스트리얼 파크, 218 싱후 스트리트,
바이오테크 인더스트리얼 파크, 블락 비3, 유닛
101
- (72) 발명자
카이 지아치양
중국, 지양수 215000, 쑤저우, 쑤저우 에어리어
오브 차이나 (지양수) 파일럿 프리 트레이드 존,
쑤저우 인더스트리얼 파크, 218 싱후 스트리트,
바이오테크 인더스트리얼 파크, 블락 비3, 유닛
101
- (74) 대리인
특허법인한얼

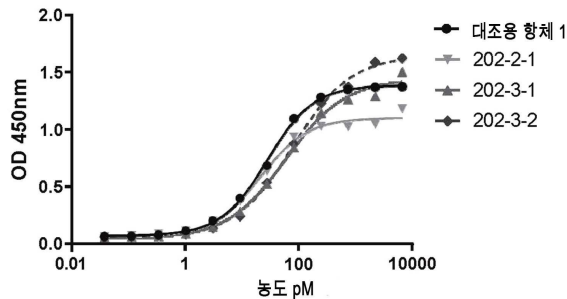
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 Her3에 대한 항체, 접합체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-Her3 항체, 이의 제조 방법, 이의 접합체 및 이의 용도, 및 특히 Her3에 결합하여 항-종양 활성을 나타내는 항체 및 이의 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체와 ADC의 조성물 및 이의 사용 방법을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Her3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 하기에 나타난 바와 같은 상보성 결정 영역 CDR을 포함하고:

(a) 서열번호 23, 25, 또는 27에 제시된 중쇄 가변 영역 VH에 포함된 바와 같은 HCDR1 또는 이의 서열의 변이체, HCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 HCDR3 또는 이의 서열의 변이체; 및/또는

(b) 서열번호 24, 26, 또는 28에 제시된 경쇄 가변 영역 VL에 포함된 바와 같은 LCDR1 또는 이의 서열의 변이체, LCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 LCDR3 또는 이의 서열의 변이체;

바람직하게는, 서열의 변이체가, 상기 변이체가 유래된 CDR과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가, 예를 들어 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 CDR이고; 더욱 바람직하게는, 치환(들)이 보존적 치환(들)인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이:

(1) Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의되는 VH 및/또는 VL로서:

(a) VH가 서열번호 1의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 2의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 3의 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하고; 및/또는

VL이 서열번호 7의 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 8의 서열로 이루어지는 LCDR2, 서열번호 9의 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하고;

(b) VH가 서열번호 12의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 13의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 14의 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하고; 및/또는

VL이 서열번호 18의 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 19의 서열로 이루어지는 LCDR2, 서열번호 20의 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하는

VH 및/또는 VL; 또는

(2) IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의되는 VH 및/또는 VL로서:

(a) VH가 서열번호 4의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 5의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 6의 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하고; 및/또는

VL이 서열번호 10의 서열로 이루어지는 LCDR1, AAS의 서열로 이루어지는 LCDR2, 서열번호 9의 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하고;

(b) VH가 서열번호 15의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 16의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 17의 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하고; 및/또는

VL이 서열번호 21의 서열로 이루어지는 LCDR1, AAS의 서열로 이루어지는 LCDR2, 서열번호 20의 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하는

VH 및/또는 VL

을 포함하고;

임의로, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하기의 중쇄 가변 영역 VH 및/또는 경쇄 가변 영역 VL을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역 VH 및/또는 경쇄 가변 영역 VL의 적어도 하나의 CDR이 Kabat 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된 CDR(들)과 비교하여 돌연변이를 포함하고, 여기서 상기 돌연변이(들)가 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부

가 또는 이들의 조합이고, 바람직하게는 치환(들)이 보존적 치환(들)이고, 보다 바람직하게는, 인간 Her3, 원숭이 Her3 및/또는 래트(rat) Her3에 결합하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이:

(a) 서열번호 23, 25 또는 27 중 어느 하나에 제시된 VH, 및/또는 서열번호 24, 26 또는 28 중 어느 하나에 제시된 VL;

(b) (a)의 VH 중 어느 하나와 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 VH; 및/또는 (a)의 VL 중 어느 하나와 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL; 또는

(c) (a)의 VH 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 VH; 및/또는 (a)의 VL 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 VL

을 포함하고; 바람직하게는 치환(들)이 보존적 치환(들)인,

항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열번호 23에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 24에 제시된 서열로 이루어지는 VL;

(b) 서열번호 25에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 26에 제시된 서열로 이루어지는 VL;

(c) 서열번호 27에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 28에 제시된 서열로 이루어지는 VL;

(d) VH 및 VL로서, 여기서 VH가 (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 VH 및 VL과 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖고; 및/또는 VL이 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는, VH 및 VL; 또는

(e) VH 및 VL로서, 여기서 VH가 (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 VH 및 VL과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합을 갖고; 및/또는 VL이 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합을 갖는, VH 및 VL

을 포함하고, 바람직하게는 치환(들)이 보존적 치환(들)인,

항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

결합에 대해 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하고, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 상이한; 바람직하게는 결합에 대해 항체 202-2-1과 경쟁하는, 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편이 아니고 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편과 상이한 CDR(들)을 갖는 것을 특징으로 하고;

임의로, 항체 202-2-1과 경쟁적으로 인간 Her3의 도메인(domain) 3에 결합하고, 바람직하게는 서열번호 31에 제시된 인간 Her3의 328-499번 위치의 아미노산에 결합하며; 바람직하게는, 항체 202-2-1과 경쟁적으로 하기의 공간 에피토프(spatial epitope)에 결합하고: 서열번호 31에 제시된 인간 Her3의 466번 위치의 히스티딘, 470번 위치의 트립토판, 471번 위치의 트레오닌, 478번 위치의 트레오닌, 483 내지 487번 위치의 (아스파르트산-이소류신-리신-히스티딘-아스파라긴), 484번 위치의 이소류신, 490번 위치의 아르기닌 및 491번 위치의 아르기닌;

바람직하게는, Her3 리간드-의존적(ligand-dependent) 및/또는 Her3 리간드-독립적인 신호전달(ligand-independent signalling)을 차단하고;

바람직하게는, Her3 리간드-의존적 및/또는 Her3 리간드-독립적인 AKT 인산화를 억제하는

항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

키메라 항체(chimeric antibody), 인간화된 항체(humanized antibody), 또는 완전한 인간 항체(full human antibody)이고;

임의로, Fab, Fab', (Fab')₂, scFv 또는 디설파이드-결합된 Fv(dsFv)와 같은 Fv 단편, 디아바디(diabody), 및 다중특이적(multi-specific) 항체 중에서 선택되는,

항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역 CH; 및/또는

(b) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역 CL

을 추가로 포함하고, 여기서 변이체가, 상기 변이체가 유래된 야생형 서열과 비교하여, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖거나, 또는 변이체가, 상기 변이체가 유래된 야생형 서열과 비교하여, 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합; 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합을 가지며;

바람직하게는, 중쇄 불변 영역이 IgG 중쇄 불변 영역, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이고; 및/또는 경쇄 불변 영역이 κ 또는 λ 경쇄 불변 영역이며;

보다 바람직하게는, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하고; 및/또는 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함하는,

항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제7항에 있어서,

중쇄 불변 영역이 서열번호 29에 제시된 CH 또는 이의 변이체를 포함하고, 상기 변이체가 서열번호 29와 비교하여 최대 20개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환을 갖거나; 또는 서열번호 29와 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가지며;

경쇄 불변 영역이 서열번호 30에 제시된 CL 또는 이의 변이체를 포함하고, 상기 변이체가 서열번호 30과 비교하여 최대 20개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환을 갖거나; 또는 서열번호

호 30과 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가지며;

바람직하게는, 서열번호 29에 제시된 중쇄 불변 영역 CH 및 서열번호 30에 제시된 경쇄 불변 영역 CL을 포함하는,

항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 하기를 포함하는 그룹 중에서 선택되는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

(a) 서열번호 23에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 24에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄; 바람직하게는 서열번호 11에 제시된 중쇄 및 서열번호 22에 제시된 경쇄;

(b) 서열번호 25에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 26에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄; 또는

(c) 서열번호 27에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

다중특이적 항체이고;

바람직하게는, 다중특이적 항체가 이중특이적 항체 또는 삼중특이적 항체 또는 사중특이적 항체인,

항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화(encoding)하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제11항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector)로서, 바람직하게는 클로닝 벡터(cloning vector) 또는 발현 벡터인, 벡터.

청구항 13

제11항의 단리된 핵산 분자 또는 제12항의 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법으로서, 제13항의 숙주 세포를 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 이의 입체이성질체, 이의 전구약물(prodrug), 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물로서, 여기서 항체가, 커넥터(connector)를 통해 커플링 모이어티(coupling moiety)에 연결되는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고;

커플링 모이어티가 검출 가능한 마커(marker), 방사성 동위원소, 형광제, 발광제, 착색제, 효소, 폴리에틸렌 글리콜, 핵종, 핵산, 소분자 독소, 결합 활성을 갖는 폴리펩티드, 단백질, 수용체, 리간드, 및 종양 세포 성장을

억제하고 중앙 세포 세포자멸사 또는 괴사를 촉진하는 기타 활성제 중에서 선택될 수 있는

항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물.

청구항 16

제15항에 있어서,

하기 식으로 표시되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

Tb-(L-D)_q,

여기서:

Tb는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고;

D는 소분자 독소 약물 모이어티이고;

L은 Tb와 D를 공유적으로 연결하는 결합 또는 링커이고;

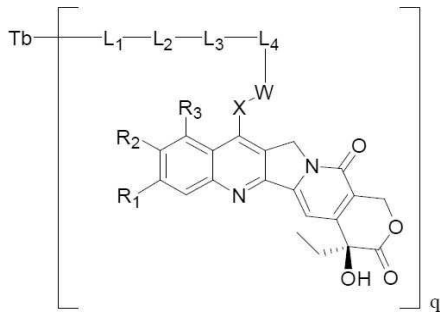
q는 1 내지 16의 정수이고, Tb에 공유결합된 L-D의 수를 나타낸다.

청구항 17

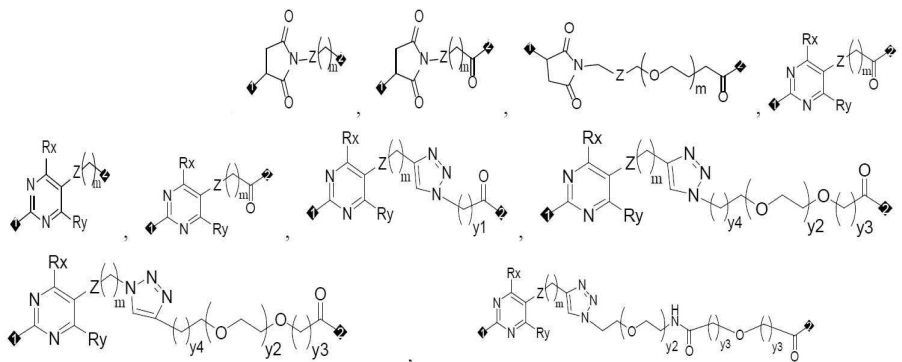
제16항에 있어서,

하기 화학식 I로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

화학식 I

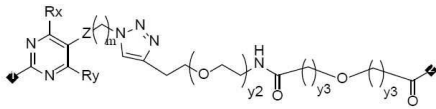


여기서,

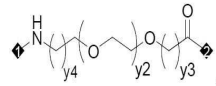


L₁은

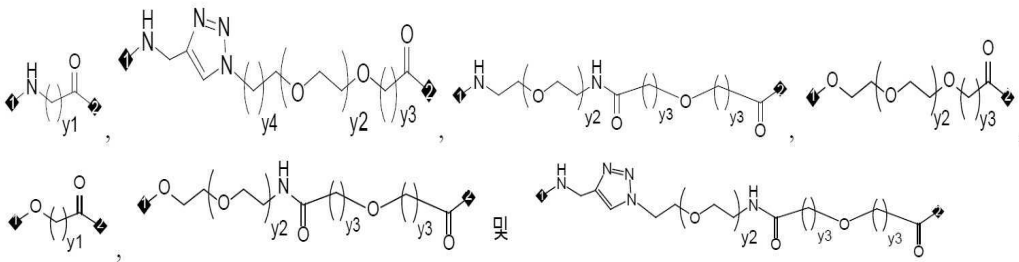
및



중에서 선택되고, 각각의 Z는 직접 결합, 탄소-탄소 삼중 결합, 탄소-탄소 이중 결합, 및 아미도 중에서 독립적으로 선택되고; Rx 및 Ry는 각각 독립적으로 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택되고; 각각의 m은 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 독립적으로 선택되고; y1은 1 내지 6의 임의의 정수 중에서 선택되고; 각각의 y2는 0 내지 15의 임의의 정수 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y3은 1, 2 및 3 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y4는 0 및 1 중에서 독립적으로 선택되고; 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L₂ 또는 L₃에 부착되며;

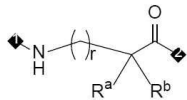


L₂는 존재하지 않거나 존재하고, L₂가 존재하는 경우 L₂는

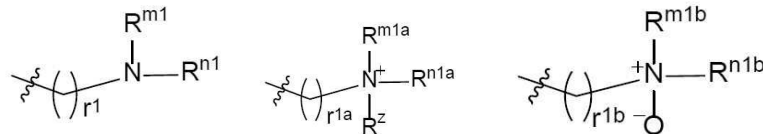


중에서 선택되고, y1은 1 내지 6의 임의의 정수 중에서 선택되고; 각각의 y2는 0 내지 10의 임의의 정수 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y3은 1 또는 2 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y4는 0 또는 1 중에서 독립적으로 선택되고, 1번 위치는 L₁에 부착되고, 2번 위치는 L₃에 부착되며;

L₃은 아미노산 잔기 또는 2-10개의 아미노산 잔기로 이루어지는 짧은 펩티드 중에서 선택되고; 아미노산 잔기는 천연 아미노산 잔기, 비-천연 아미노산 잔기 중에서 선택되거나, 또는 AA¹로 표시되는 아미노산 잔기 또는 이의



입체이성질체, AA¹ 중에서 선택되고; AA¹로 표시되는 아미노산 잔기에서, R^a 및 R^b 중 어느 하나는



H이고, 다른 하나는 H, 이거나; 또는 R^a 및 R^b는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리는 피페리딘 고리 또는 피페라진 고리이고;

r, r¹, r^{1a} 및 r^{1b}는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4 또는 5 중에서 선택되고;

R^{m1}, Rⁿ¹, R^{m1a}, R^{n1a}, R^{m1b} 및 R^{n1b}는 각각 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬 또는 -COOR^{x1} (여기서 R^{x1}은 C₁₋₆ 알킬이다)이거나;

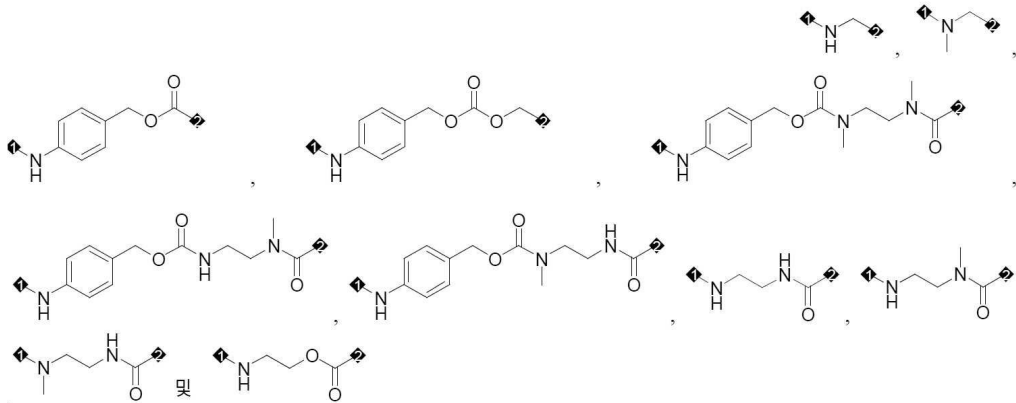
또는 R^{m1} 및 Rⁿ¹, R^{m1a} 및 R^{n1a}, 및 R^{m1b} 및 R^{n1b}는 이들이 둘 다 부착된 질소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리 중에서 헤테로원자는 1 또는 2개의 N 원자 중에서 선택되고; 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리는 하나 이상의 R^{0'}로 임의로 치환되고;

R^z는 C₁₋₆ 알킬 중에서 선택되고;

R^0 및 $R^{0'}$ 는 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬, $-NR^{m2}R^{n2}$, 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환된 5-6원 헤테로사이클릴 중에서 선택되고; 상기 5-6원 헤테로사이클릴 중에서 헤테로원자는 1 또는 2개의 N 원자 중에서 선택되고;

R^{m2} 및 R^{n2} 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬 중에서 선택되고;

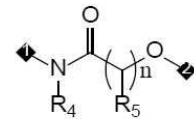
L_4 는 존재하지 않거나 존재하고, L_4 가 존재하는 경우 L_4 는



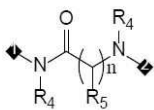
중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착되며;

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, 할로젠 및 C_{1-4} 알킬 중에서 선택되거나; 또는 R_1 및 R_2 는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 헤테로사이클릭 고리는 1, 2 또는 3개의 O, S 또는 이들의 임의의 조합을 함유하고;

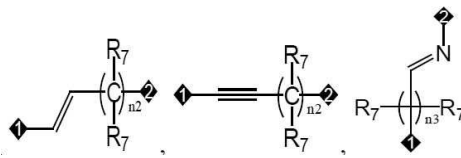
R_3 은 H 및 C_{1-4} 알킬 중에서 선택되거나; 또는 R_3 및 X는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 탄소 고리를 형성하고;



W는 존재하지 않거나 존재하며, W가 존재하는 경우, W는 $-O-$, $-S-$, $-NR_4-$, 및



중에서 선택되고, 1번 위치는 X에 부착되고 2번 위치는 L_4 또는 L_3 에 부착되며;



X는 임의로 치환된 $-(CH_2)_{n1}-$, $-(CH=CH)-$, $-(C\equiv C)-$, $-(CH=N)-$ 중에서 선택되고, 1번 위치는 모 고리 (parent ring)에 부착되고, 2번 위치는 W 또는 L_4 에 부착되고; 치환체는 1 또는 2개의 C_{1-4} 알킬 중에서 선택되고;

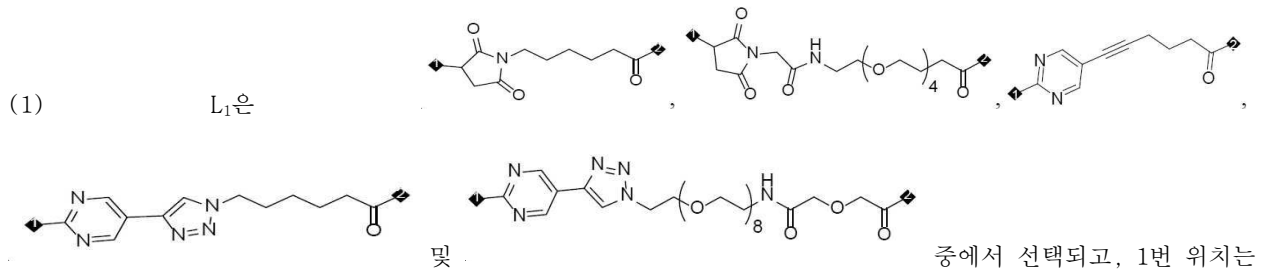
R_4 , R_5 , 및 R_7 은 각각 독립적으로 H 및 C_{1-4} 알킬 중에서 선택되고;

n , $n1$, $n2$, $n3$ 은 각각 독립적으로 0 및 6의 임의의 정수 중에서 선택된다.

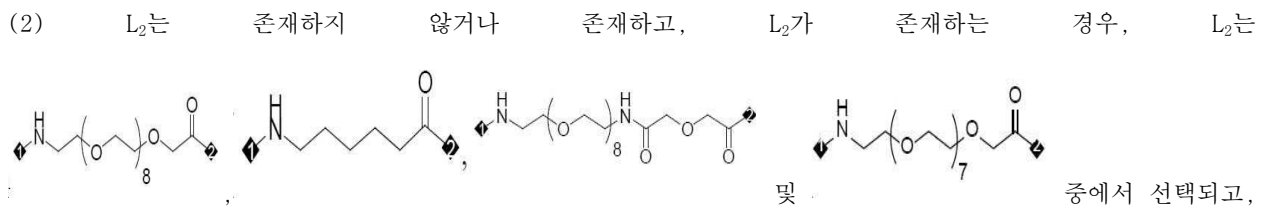
청구항 18

제17항에 있어서,

하기 조건 중 하나 이상이 충족되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

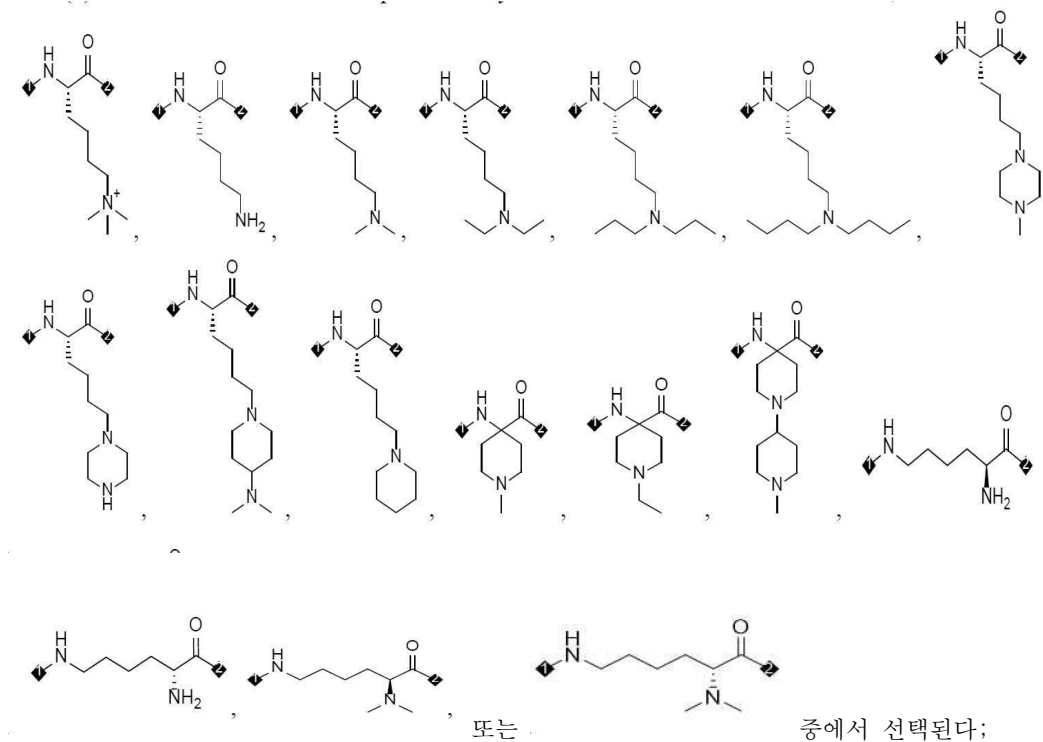
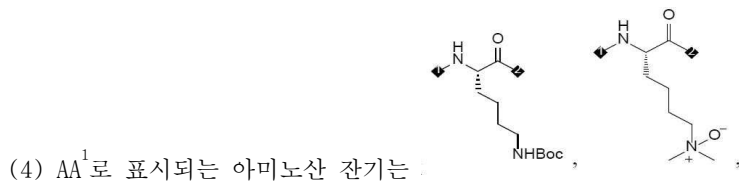


S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L_2 또는 L_3 에 부착된다;

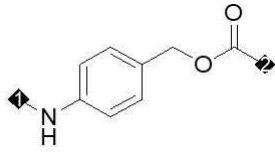


1번 위치는 L_1 에 부착되고, 2번 위치는 L_3 에 부착된다;

(3) L_3 은 AA^1 , AA^1 -Gly, Val-Cit, Val- AA^1 -Gly, AA^1 -Ala-Asn 및 Gly-Gly-Phe-Gly 중에서 선택된다;



(5) L₄는 존재하지 않거나 존재하고, L₄가 존재하는 경우, L₄는



중에서 선택되고, 1번 위치는 L₃에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다;

(6) R₁은 H 및 할로젠 중에서 선택되고, R₂는 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택되거나, 또는 R₁ 및 R₂는 이들이 부착

된 탄소 원자와 함께 또는 를 형성하고, "접선"은 헤테로사이클릭 고리가 벤젠 고리에 융합된 것을 가리킨다;

(7) R₃은 H이거나, 또는 R₃ 및 X는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 를 형성하고, "접선"은 헤테로사이클릭 고리가 벤젠 고리 및 피리딘 고리에 융합된 것을 가리킨다;

(8) 각각의 R₄는 H, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필 및 3급-부틸 중에서 독립적으로 선택되고, R₆는 H이다;

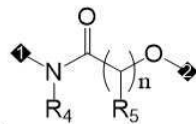
(9) 각각의 R₇은 H 및 C1-4 알킬 중에서 독립적으로 선택된다;

(10) n은 1, 2, 및 3 중에서 선택된다;

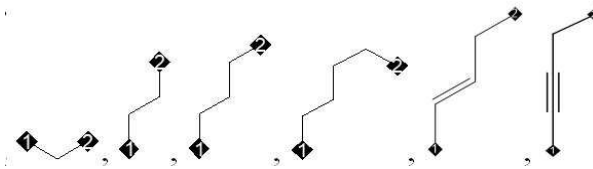
(11) n₁은 1, 2, 3 및 4 중에서 선택된다;

(12) n₂는 1이다;

(13) n₃은 0이다;



(14) W는 -O-, -NR₄- 및 중에서 선택되고, 1번 위치는 X에 부착되고, 2번 위치는 L₄ 또는 L₃에 부착된다;


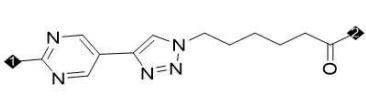


(15) X는 임의로 치환된 및 중에서 선택되고, 1번 위치는 모 고리에 부착되고, 2번 위치는 W 또는 L₄에 부착되고; 치환체는 1 또는 2개의 C1-4 알킬 그룹, 또는 2개의 C1-4 알킬 그룹 중에서 선택된다.

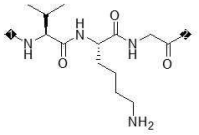
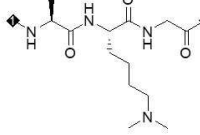
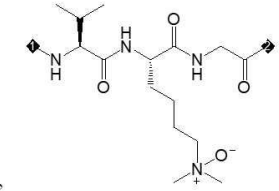
청구항 19

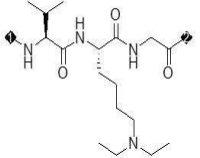
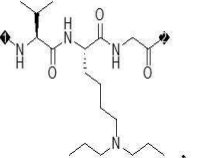
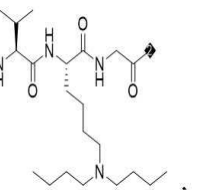
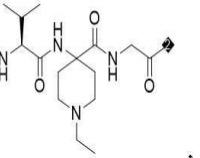
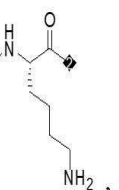
제18항에 있어서,

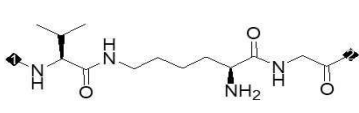
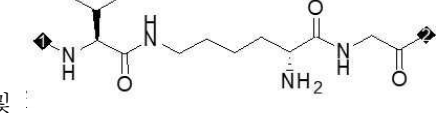
하기 조건 중 하나 이상이 충족되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

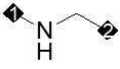
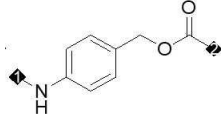
(1) L_1 은  및  중에서 선택되고, 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L_2 또는 L_3 에 부착된다;


(2) L_2 는 존재하지 않는다;

(3) L_3 은 , , ,

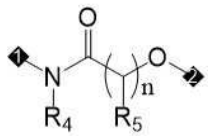
, , , , ,

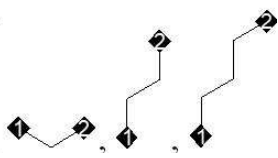
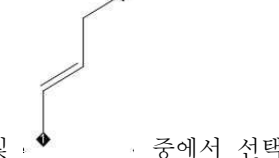
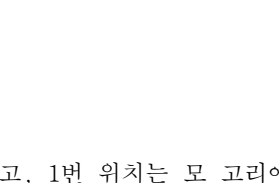
 및  중에서 선택되고, 1번 위치는 L_1 또는 L_2 에 부착되고, 2번 위치는 L_4 또는 D에 부착된다;

(4) L_4 는  및  중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다;

(5) R_1 은 H 또는 F이고, R_2 는 H 또는 메틸이거나; 또는 R_1 및 R_2 는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 를 형성한다;

(6) R_3 은 H이다;

(7) W는 $-O-$, $-NR_4-$, 및  중에서 선택되고, 1번 위치는 X에 부착되고, 2번 위치는 L_4 또는 L_3 에 부착된다;

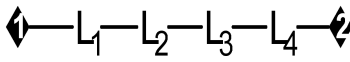
(8) X는 ,  및  중에서 선택되고, 1번 위치는 모 고리에 부착되고, 2번 위치

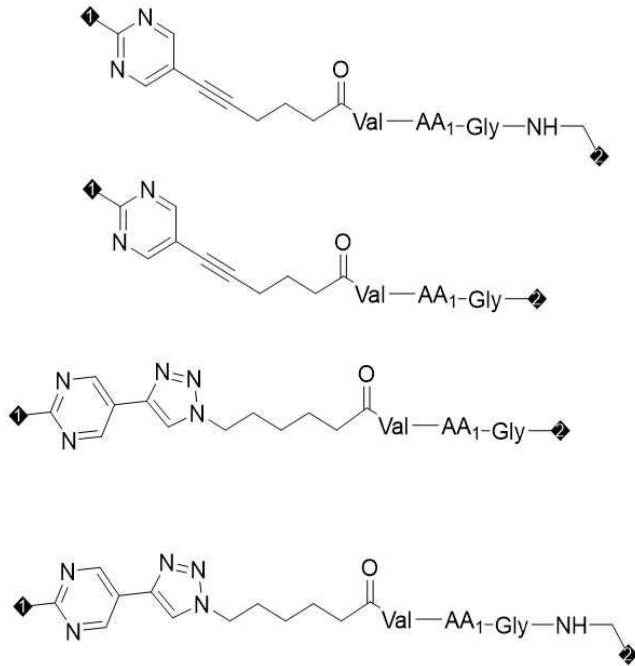
는 W에 부착된다.

청구항 20

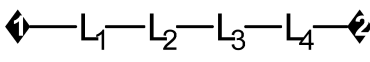
제17항 또는 제18항에 있어서,

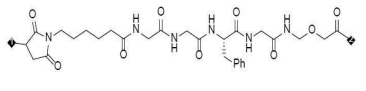
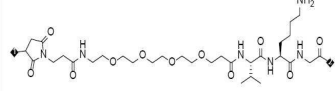
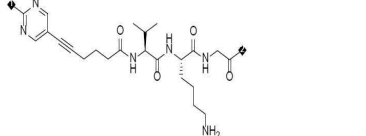
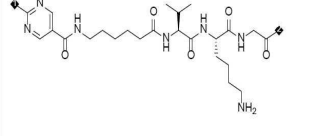
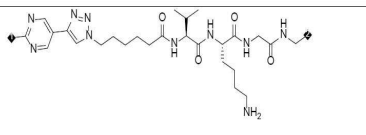
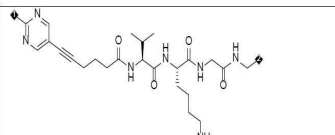
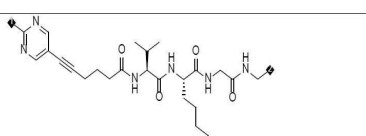
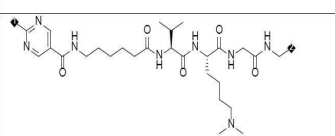
하기 조건 중 하나 이상이 충족되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

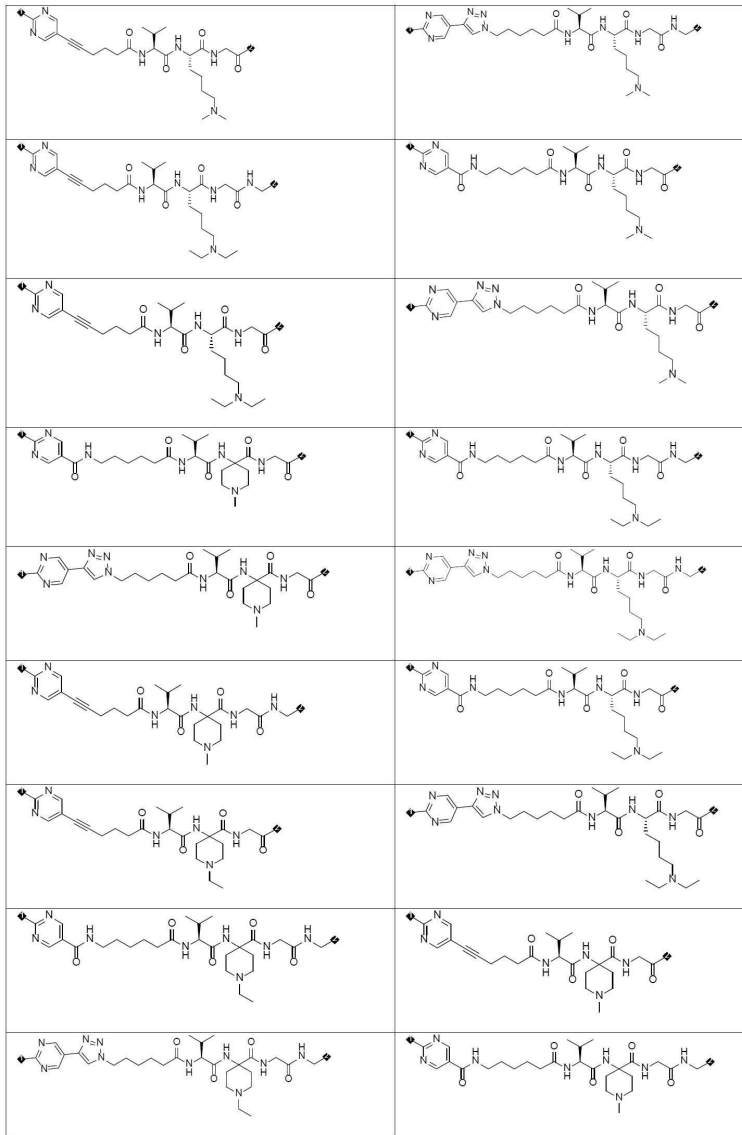
(1) 구조  는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:

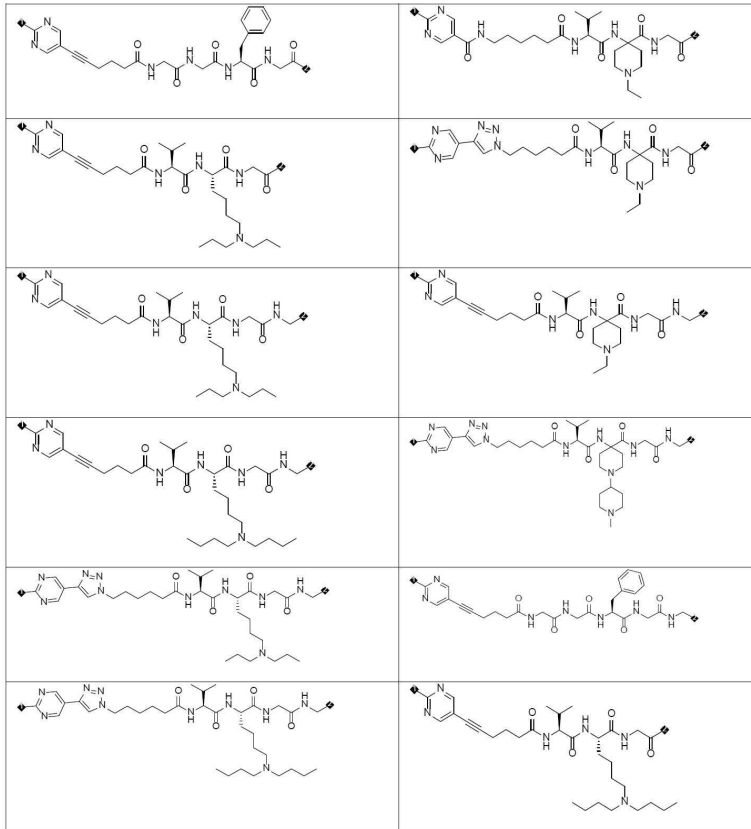


여기서, 1번 위치는 Tb에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다;

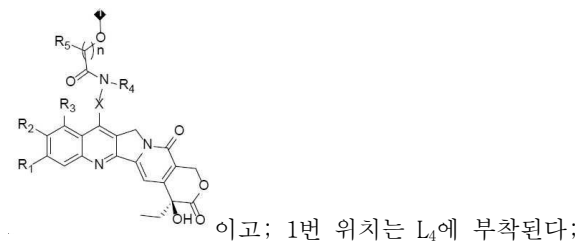
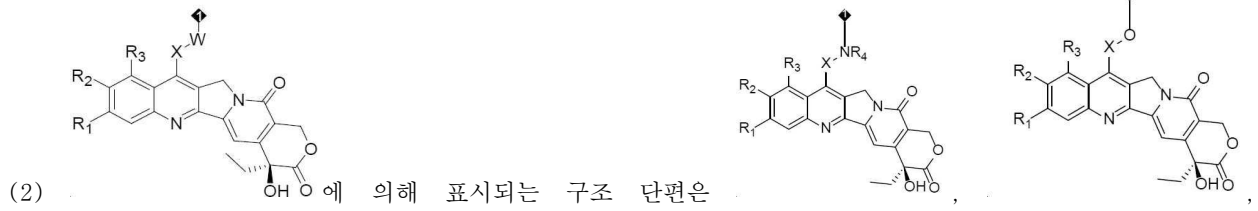
예를 들어, 구조  는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:

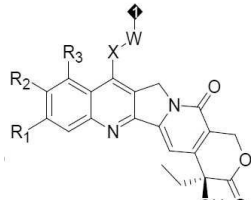
	
	
	
	



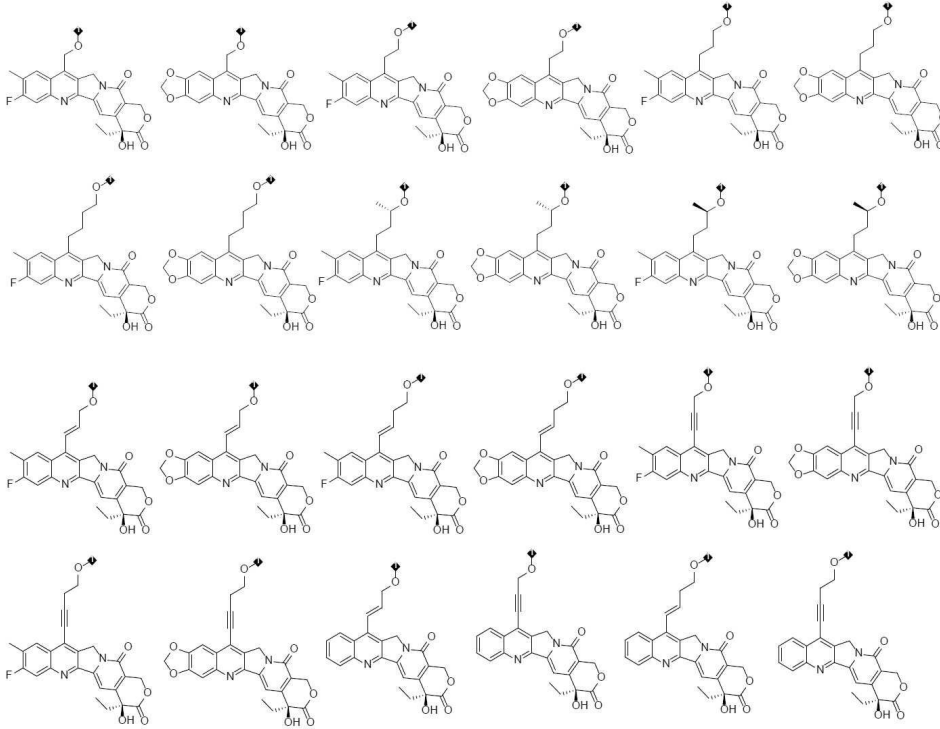


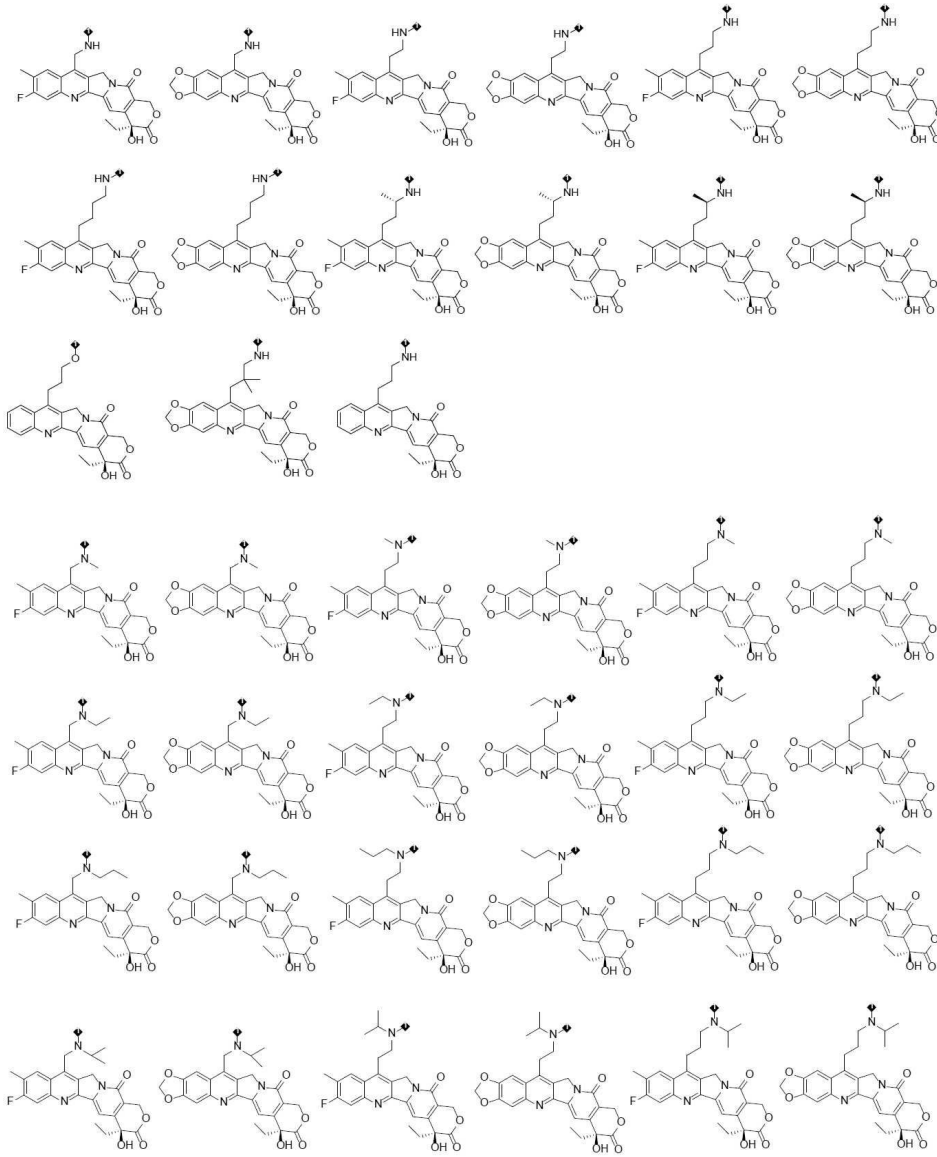
여기서, 1번 위치는 Tb에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다;

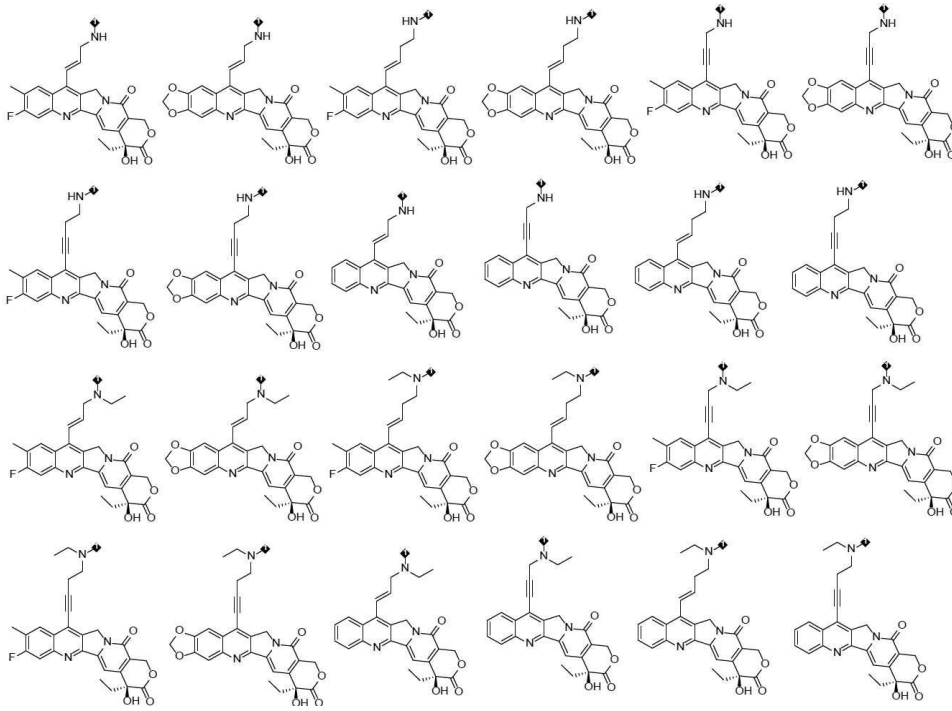




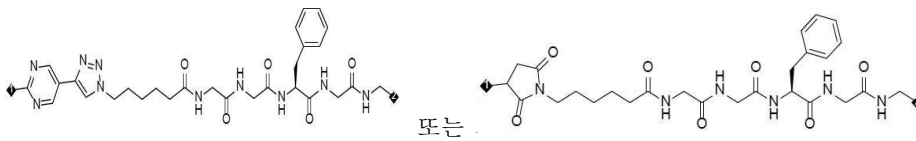
예를 들어, 구조 는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:



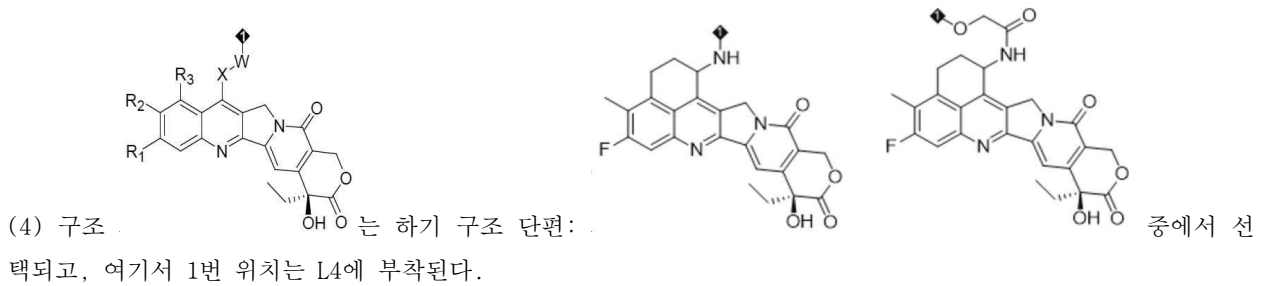




(3) 구조는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:



여기서, 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다;



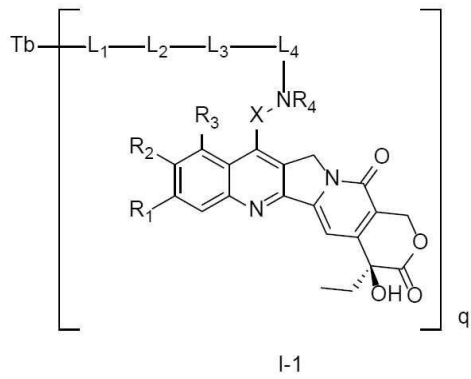
청구항 21

제17항 또는 제18항에 있어서,

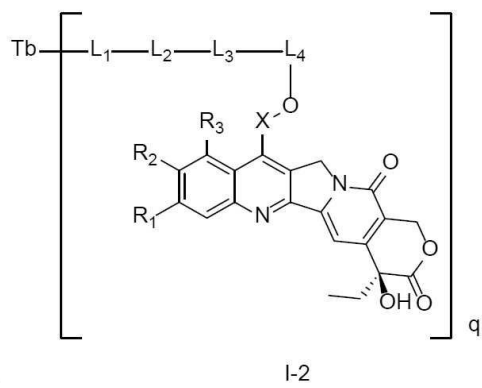
하기 조건 중 하나 이상이 충족되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

(1) 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I-1, I-2, I-3에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

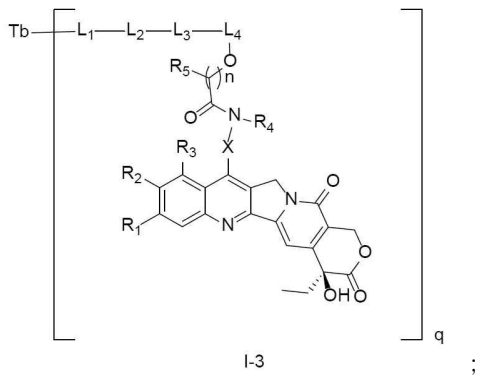
화학식 I-1



화학식 I-2

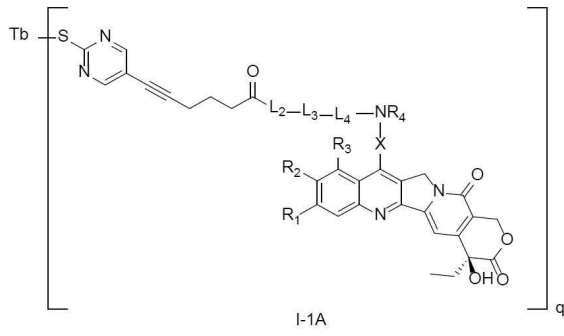


화학식 I-3

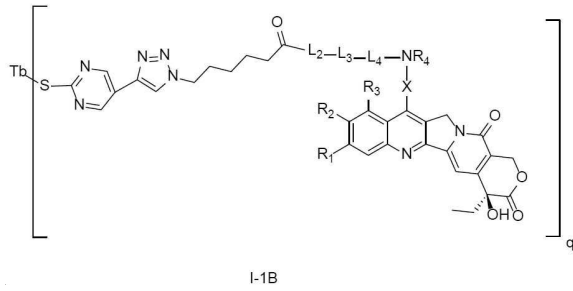


(2) 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I-1A, I-1B, I-2A, I-2B, I-3A 또는 I-3B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

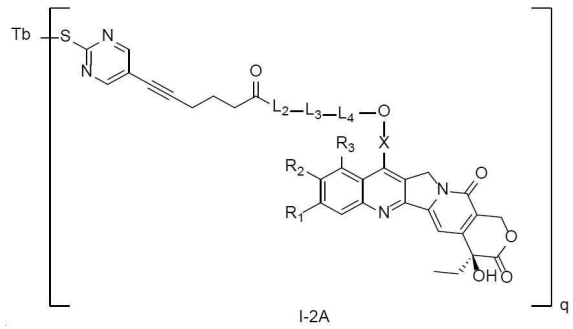
화학식 I-1A



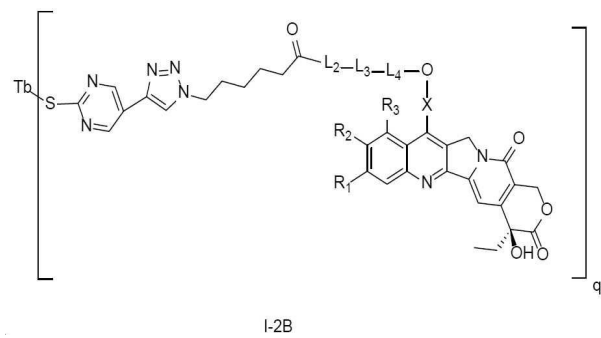
화학식 I-1B



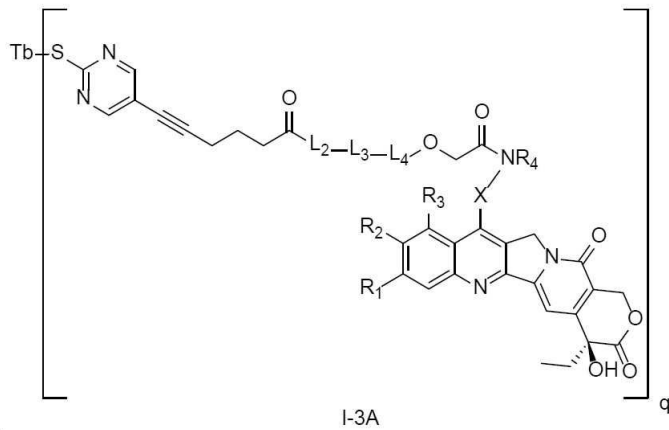
화학식 I-2A



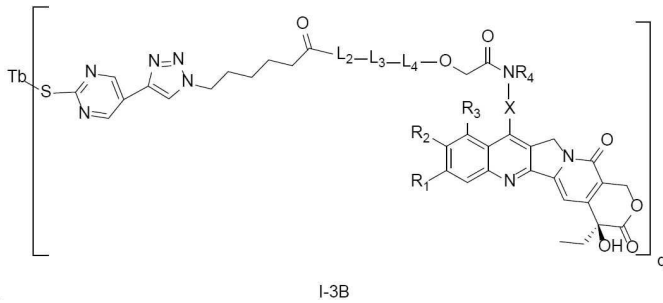
화학식 I-2B



화학식 I-3A

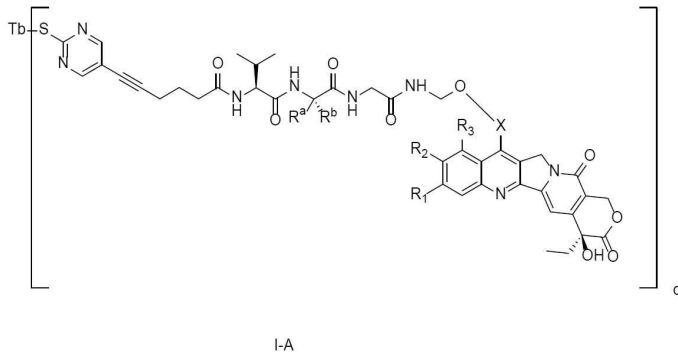


화학식 I-3B

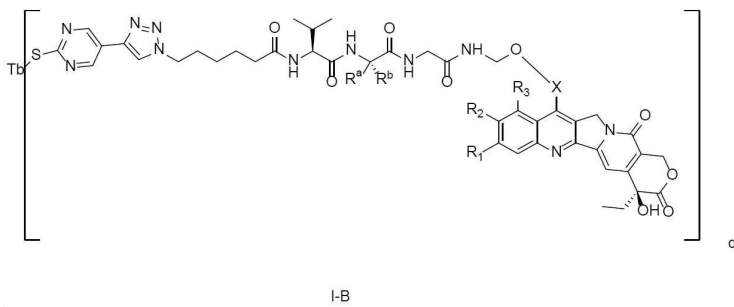


(3) 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I-A, I-B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

화학식 I-A



화학식 I-B



여기서 Tb, L₁, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃, R₄, R^a, R^b, n 및 q는 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 정의

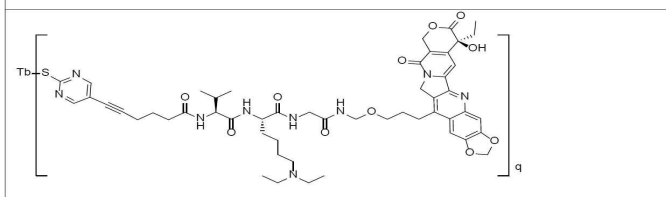
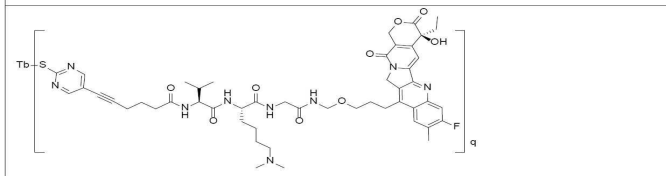
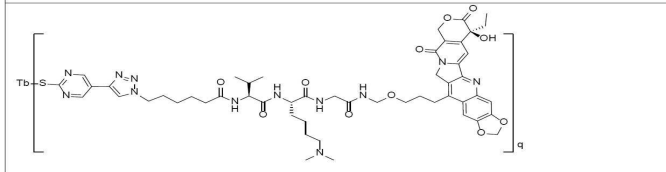
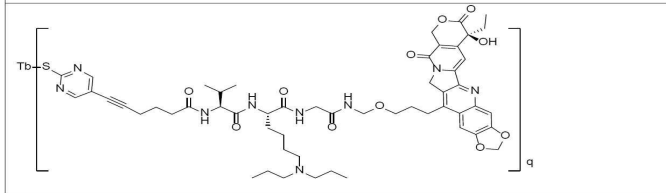
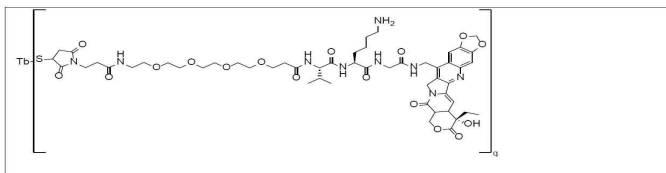
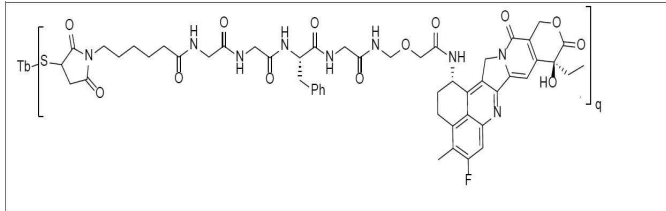
된 바와 같다.

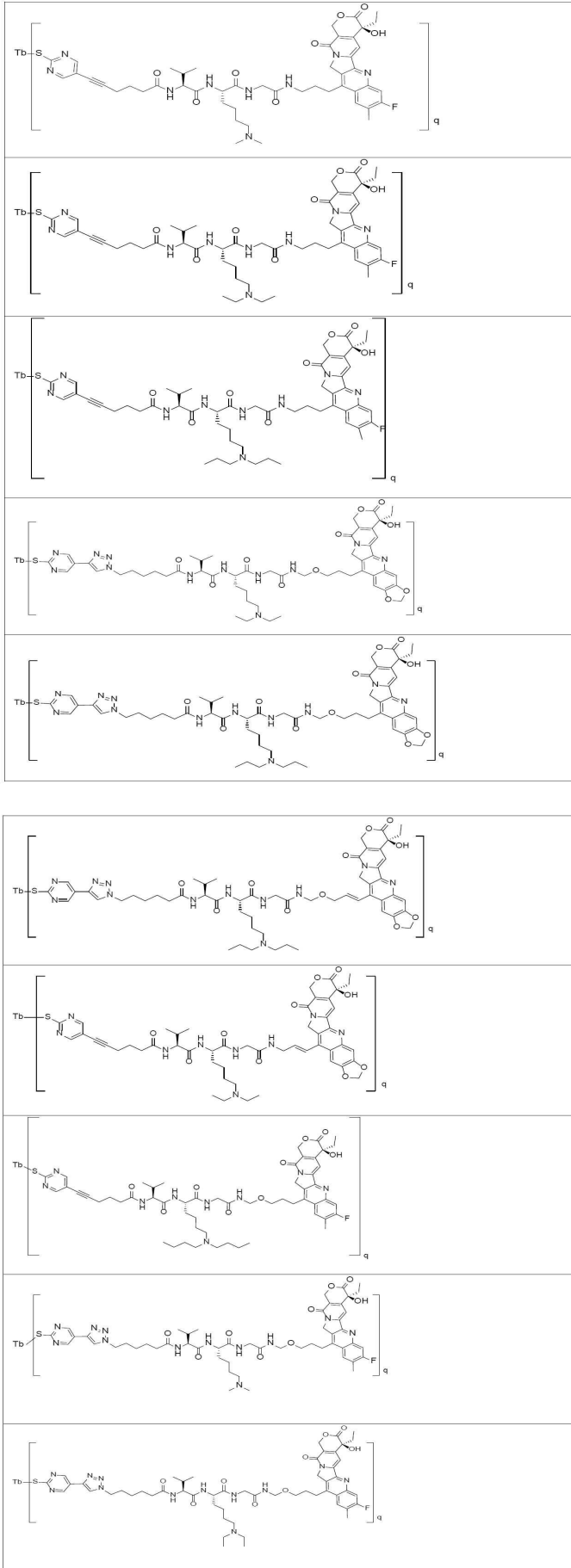
청구항 22

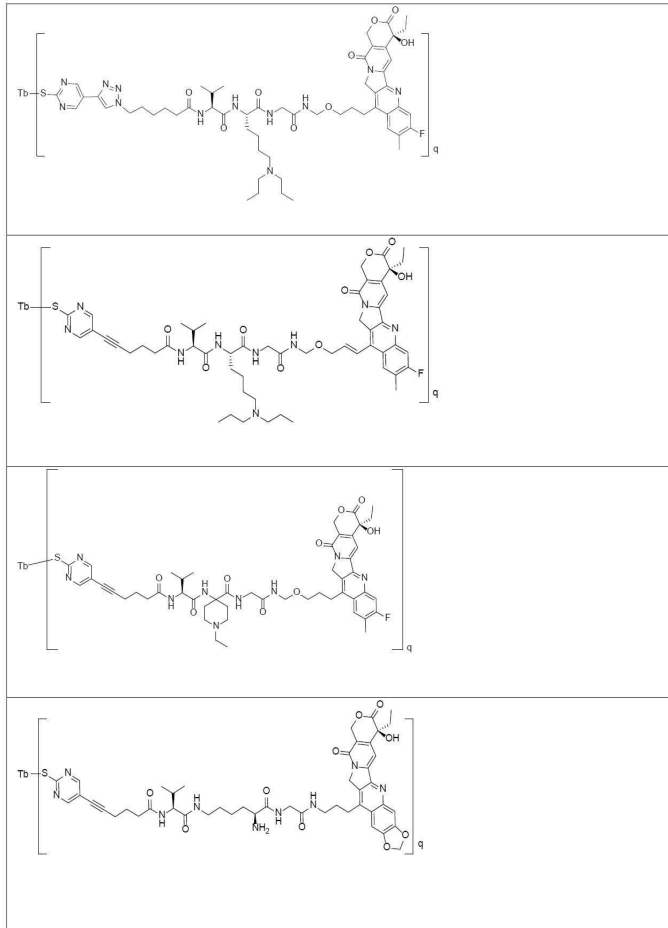
제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

하기 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:

항체-약물 접합체의 구조







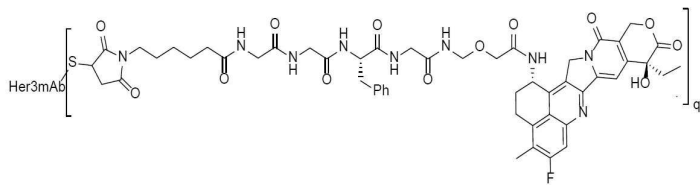
여기서,

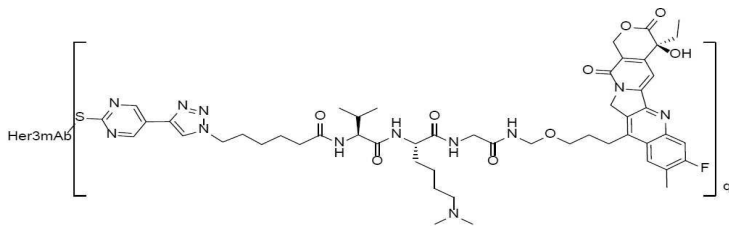
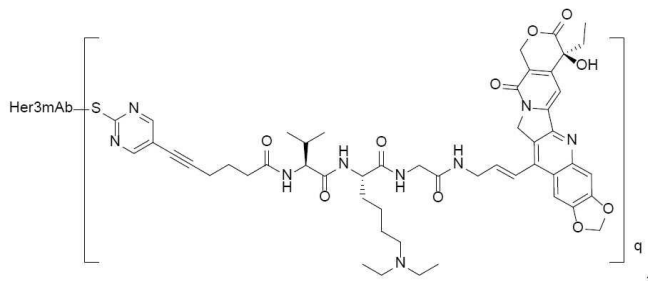
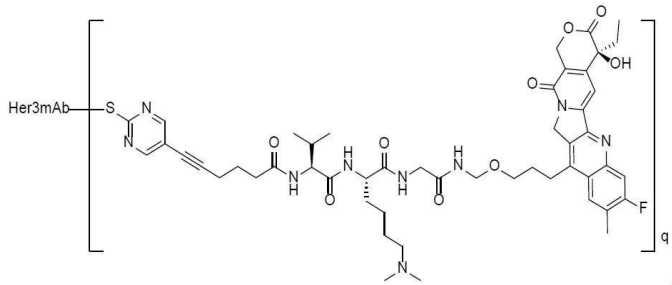
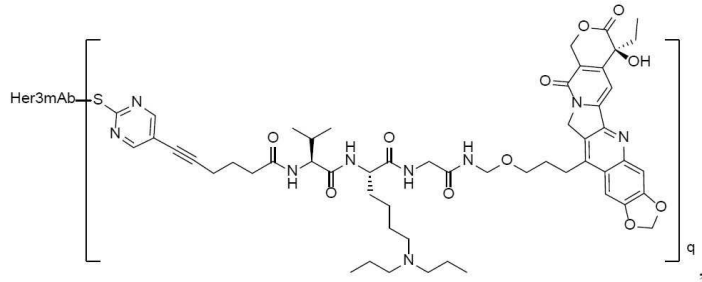
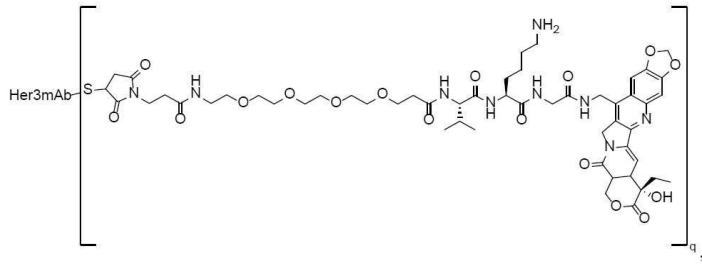
Tb는 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항-Her3 항체이고;

q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16이고;

q는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8이다;

예를 들어



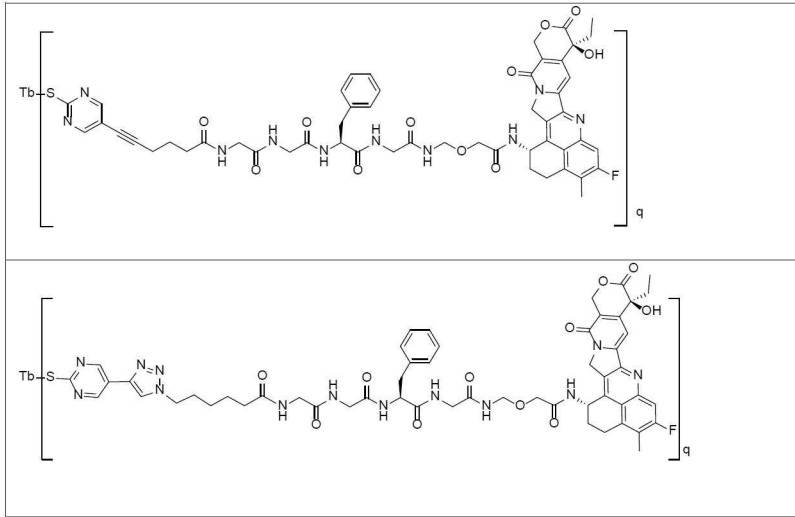


여기서, Her3mAb는 항체 202-2-1이다.

청구항 23

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

하기 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물:



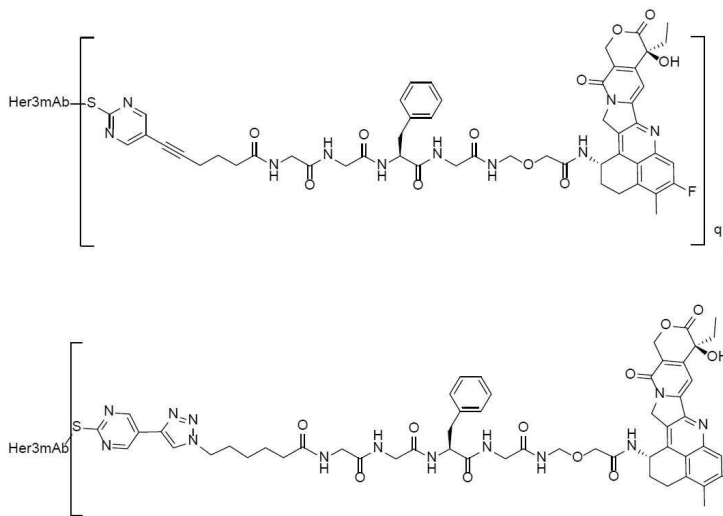
여기서,

Tb는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-Her3 항체이고;

q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16이고;

q는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8이다;

예를 들어



여기서, Her3mAb는 항체 202-2-1이다.

청구항 24

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 2개 이상의 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물을 포함하고, 항체-약물 접합체 중의 항체-약물 접합체가 1, 2 또는 그 이상의 q 값을 갖는, 항체-약물 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서,

항체-약물 접합체 중 약물 대 항체의 비(DAR)가 1과 10 사이의 정수 또는 소수 중에서 선택되고,

예를 들어, DAR이 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.7, 8.9 및 9 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는

항체-약물 접합체.

청구항 26

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제11항의 핵산 분자, 제12항의 벡터, 제13항의 숙주 세포, 제15항 내지 제23항의 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 및/또는 제24항 내지 제25항의 항체-약물 접합체뿐만 아니라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

종양(tumor) 및/또는 감염성 질환(infectious disease)의 예방 및/또는 치료를 위한 약제(medicament)의 제조에서의, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제11항의 핵산 분자, 제12항의 벡터, 제13항의 숙주 세포, 제15항 내지 제23항의 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 제24항 내지 제25항의 항체-약물 접합체, 및/또는 제26항의 약제학적 조성물의 용도로서;

임의로, 종양이 고형 종양이고;

임의로, 종양이 식도암(esophageal cancer)(예를 들어, 식도 선암증(esophageal adenocarcinoma) 및 식도 편평세포 암증(esophageal squamous cell carcinoma)), 뇌종양(brain tumor), 폐암(lung cancer)(예를 들어, 소세포 폐암(small cell lung cancer) 및 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer)), 편평세포 암증(squamous cell carcinoma), 방광암(bladder cancer), 위암(stomach cancer), 난소암(ovarian cancer), 복막암(peritoneal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 간암(liver cancer), 신장암(kidney cancer), 요로상피암(urothelial cancer), 고형 종양(solid tumor), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 중추신경계 종양(central nervous system tumor)(예를 들어, 신경교종(neuroglioma), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 신경교종(glioma) 또는 육종(sarcoma)), 전립선암(prostate cancer) 또는 갑상선암(thyroid cancer) 중에서 선택되고;

임의로, 종양이 결장직장암(예를 들어, 결장암), 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐암), 유방암, 및 전립선암 중에서 선택되는

용도.

청구항 28

종양 및/또는 감염성 질환의 예방 및/또는 치료가 필요한 대상체(subject)에게 유효량의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제11항의 핵산 분자, 제12항의 벡터, 제13항의 숙주 세포, 제15항 내지 제23항의 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 제24항 내지 제25항의 항체-약물 접합체, 및/또는 제26항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 상기 대상체에서 종양 및/또는 감염성 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법으로서, 여기서 대상체가 포유동물이고;

바람직하게는, 대상체가 인간인

방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 치료학적 생물약제학 분야에 속하며, 보다 구체적으로 본 개시내용은 Her3에 대한 항체, 접합체에 관한 것이고, 추가로 질병 치료를 위한 항체 또는 접합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Her3(ErbB3)은, EGFR, Her2, Her3 및 Her4의 4개의 구성원을 포함하는 ERBB 패밀리의 막관통 수용체 티로신 키나제 분자이다. ERBB 수용체의 활성화에는 동종 또는 이종 이량체의 형성이 필요하며, 이들의 패밀리를 구성원은

서로 이량체를 형성할 수 있다. 리간드가 결합되면 Her3은 시스테인-풍부 영역과의 상호작용에 의해 고정된 형태로 잠기게 되며; 세포내 단백질 키나제 도메인(domain)의 보존되지 않은 아미노산의 돌연변이로 인해 Her3은 약한 키나제 활성만 유지하게 되고, 이어서 신호 전달을 매개하기 위해서는 다른 EGFR 패밀리 분자와의 이중이량체 형성이 필요하다. Her3은 배아 발생에 중요한 역할을 하며, 마우스에서 Her3이 없으면 방실 판막의 심각한 저형성증을 초래하여 마우스의 배아 사망을 초래할 수 있다. 이 효과는 주로 그의 NRG1 리간드에 의해 결정된다. 또한 Her3은 신경 능선(예를 들어, 슈만 세포)의 분화 및 교감 신경계 발달에 중요한 역할을 한다. Her3은 여러 유형의 선암종(adenocarcinomas)(유방암(breast cancer), 요도암(urethral cancer), 위암(gastric cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 담도암(biliary cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁암(uterine cancer), 전립선암(prostate cancer), 폐암(lung cancer)), 및 흑색종(melanoma), 신경교종(glioma) 등과 같은 다양한 암에서 돌연변이되거나 과발현된다.

[0003] 항체-약물 접합체(ADC; antibody-drug conjugate)의 경우, 정상 세포 및 종양(tumor) 세포 표면 항원에 대한 항체의 결합 특이성 및 소분자의 높은 항-종양 생물 활성을 충분히 활용하는 동시에, 전자의 낮은 특정 효능뿐만 아니라 후자의 독성 부작용과 같은 결합을 피하기 위해, 생물학적으로 활성인 소분자 화합물을 화학적 방법에 의해 단클론 항체 또는 항체 단편에 접합시킨다. 전통적인 화학요법제나 표적 약물과 비교했을 때, 항체-약물 접합체는 종양 세포에 더 정확하게 결합하고 정상 세포에 미치는 영향을 줄일 수 있다.

[0004] 현재 Her3 항체 및 ADC 약물, 예를 들어 Daiichi Sankyo가 개발한 U3-1402, 및 MediaPharma가 개발한 MP-Her3-ADC에 대한 특허 보고서가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나 항체-약물 접합체(ADC)는 로딩된 약물의 종양 사멸 능력과 함께 표적 세포에 대한 항체의 표적 특이성과 표적화 특성의 장점을 겸비하고 있으나, ADC 약물 분자의 구조적 복잡성으로 인해 실제 적용에서는 안전상 부족 문제가 여전하다. 현행 Her3 ADC는 아직 초기 개발 단계에 있으며, 따라서 미충족 임상적 수요를 충족시키기 위해서는 보다 안전하고 효과적인 Her3 항체 또는 항체-약물 접합체가 여전히 시급히 필요하다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 개시내용에서, 경쇄 가변 영역(VL) 및/또는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 Her3 분자 결합 도메인이 최초로 개발되었으며, 상기 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 사용하여, 인간 항체가 추가로 개발되었다.

[0007] 본 개시내용에 포함된 항체는 완전한 인간 항체일 수 있으며, 이는 면역원성 반응을 유발하지 않고 인간 대상체(subject)에게 안전하게 투여될 수 있다. 이는 인간 및 비-인간 Her3 분자에 결합하는 능력이 높으며, 특히 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이) 및 포유동물(예를 들어, 래트;rat)의 Her3과 교차 반응성을 갖는 분자를 포함한다. 본 개시내용은 또한 Her3 항체를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)에 관한 것이다. 본 개시내용의 항체 또는 항체-약물 접합체(ADC)는 상당한 임상적 가치를 갖는다.

[0008] 본 개시내용의 항체

[0009] 첫 번째 양태에서, 본 개시내용은 Her3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 나타낸 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다:

[0010] 서열번호 23, 25, 또는 27에 제시된 중쇄 가변 영역(VH)에 포함된 바와 같은 HCDR1 또는 이의 서열의 변이체, HCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 HCDR3 또는 이의 서열의 변이체; 및/또는

[0011] 서열번호 24, 26, 또는 28에 제시된 경쇄 가변 영역(VL)에 포함된 바와 같은 LCDR1 또는 이의 서열의 변이체, LCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 LCDR3 또는 이의 서열의 변이체.

[0012] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 23에 제시된 VH에 포함된 HCDR1 또는 이의 서열의 변이체, HCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 HCDR3 또는 이의 서열의 변이체; 및/또는 서열번호 24에 제시된 VL에 포함된 LCDR1 또는 이의 서열의 변이체, LCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 LCDR3 또는 이의 서열의 변이체를 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25에 제시된 VH에 포함된 HCDR1 또는 이의 서열의 변이체, HCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 HCDR3 또는 이의 서열의 변이체; 및/또는 서열번호 26에 제시된 VL

에 포함된 LCDR1 또는 이의 서열의 변이체, LCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 LCDR3 또는 이의 서열의 변이체를 포함한다.

- [0014] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 27에 제시된 VH에 포함된 HCDR1 또는 이의 서열의 변이체, HCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 HCDR3 또는 이의 서열의 변이체; 및/또는 서열번호 28에 제시된 VL에 포함된 LCDR1 또는 이의 서열의 변이체, LCDR2 또는 이의 서열의 변이체, 및 LCDR3 또는 이의 서열의 변이체를 포함한다.
- [0015] 특정한 바람직한 구현예에서, 서열의 변이체는 상기 변이체가 유래된 CDR과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 CDR이다.
- [0016] 특정한 바람직한 구현예에서, 치환(들)은 보존적 치환(들)이다.
- [0017] 바람직하게, CDR은 AbM, Chothia, Kabat 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된다.
- [0018] 한 양태에서, 본 개시내용은 Her3에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0019] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 나타낸 바와 같은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의된다:
- [0020] (a) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 1의 서열 또는 서열번호 1과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR1; 서열번호 2의 서열 또는 서열번호 2와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR2; 서열번호 3의 서열 또는 서열번호 3과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0021] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 7의 서열 또는 서열번호 7과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR1; 서열번호 8의 서열 또는 서열번호 8과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR2; 서열번호 9의 서열 또는 서열번호 9와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR3;
- [0022] (b) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 12의 서열 또는 서열번호 12와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR1; 서열번호 13의 서열 또는 서열번호 13과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR2; 서열번호 14의 서열 또는 서열번호 14와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0023] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 18의 서열 또는 서열번호 18과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR1; 서열번호 19의 서열 또는 서열번호 19와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR2; 서열번호 20의 서열 또는 서열번호 20과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR3.
- [0024] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 나타낸 바와 같은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의된다:
- [0025] (a) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 1의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 2의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 3의 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0026] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 7의 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 8의 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 9의 서열로 이루어지는 LCDR3; 또는
- [0027] (b) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 12의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 13의

서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 14의 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는

- [0028] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 18의 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 19의 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 20의 서열로 이루어지는 LCDR3.
- [0029] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 나타낸 바와 같은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된다:
- [0030] (a) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 4의 서열 또는 서열번호 4와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR1; 서열번호 5의 서열 또는 서열번호 5와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR2; 서열번호 6의 서열 또는 서열번호 6과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0031] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 10의 서열 또는 서열번호 10과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR1; AAS의 서열 또는 AAS와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR2; 서열번호 9의 서열 또는 서열번호 9와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR3; 또는
- [0032] (b) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 15의 서열 또는 서열번호 15와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR1; 서열번호 16의 서열 또는 서열번호 16과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR2; 서열번호 17의 서열 또는 서열번호 17과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0033] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 21의 서열 또는 서열번호 21과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR1; AAS의 서열 또는 AAS와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR2; 서열번호 20의 서열 또는 서열번호 20과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가(예를 들어, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가)를 갖는 서열로 이루어지는 LCDR3.
- [0034] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 나타낸 바와 같은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된다:
- [0035] (a) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 4의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 5의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 6의 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0036] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 10의 서열로 이루어지는 LCDR1, AAS의 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 9의 서열로 이루어지는 LCDR3;
- [0037] (b) 하기 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호 15의 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 16의 서열로 이루어지는 HCDR2, 서열번호 17의 서열로 이루어지는 HCDR3; 및/또는
- [0038] 하기 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL): 서열번호 21의 서열로 이루어지는 LCDR1, AAS의 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 20의 서열로 이루어지는 LCDR3.
- [0039] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기에 정의된 바와 같은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 적어도 하나의 CDR은 전술한 Kabat 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된 CDR과 비교하여 돌연변이(여기서 상기 돌연변이(들)는 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)이다)를 함유하며, 여전히 Her3 결합 활성을 갖는다.

- [0040] 바람직하게, 본 개시내용에서 언급된 치환은 보존적 치환이다.
- [0041] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 Her3, 원숭이 Her3 및/또는 래트 Her3에 결합한다.
- [0042] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH는 인간 면역글로불린의 중쇄 가변 영역(VH)으로부터 유래된 프레임워크 영역(FR)을 포함하고/하거나, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VL은 인간 면역글로불린의 경쇄 가변 영역(VL)으로부터 유래된 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 완전히 인간화된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화된다.
- [0043] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0044] (a) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 프레임워크 영역(변이체는 상기 변이체가 유래된 생식계열 항체 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 비교하여, 최대 20개 아미노산의 보존적 치환(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환; 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환)을 갖는다); 및/또는
- [0045] (b) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 프레임워크 영역(변이체는 상기 변이체가 유래된 생식계열 항체 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 비교하여, 최대 20개 아미노산의 보존적 치환(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환; 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환)을 갖는다).
- [0046] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 인간화 정도는 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다.
- [0047] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0048] (a) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH):
- [0049] (i) 서열번호 23, 25, 또는 27에 제시된 서열;
- [0050] (ii) 서열번호 23, 25 또는 27에 제시된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0051] (iii) 서열번호 23, 25 또는 27에 제시된 서열과 비교하여, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 서열; 및/또는
- [0052] (b) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL):
- [0053] (iv) 서열번호 24, 26, 또는 28에 제시된 서열;
- [0054] (v) 서열번호 24, 26 또는 28에 제시된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0055] (vi) 서열번호 24, 26 또는 28에 제시된 서열과 비교하여, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열.
- [0056] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 23에 제시된 VH 및/또는 서열번호 24에 제시된 VL을 포함한다.
- [0057] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25에 제시된 VH 및/또는 서열번호 26에 제시된 VL을 포함한다.
- [0058] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 27에 제시된 VH 및/또는 서열번호 28에 제시된 VL을 포함한다.

- [0059] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0060] (a) 서열번호 23에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 24에 제시된 서열로 이루어지는 VL;
- [0061] (b) 서열번호 25에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 26에 제시된 서열로 이루어지는 VL;
- [0062] (c) 서열번호 27에 제시된 서열로 이루어지는 VH 및 서열번호 28에 제시된 서열로 이루어지는 VL;
- [0063] (d) 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)으로서, 여기서 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)이 (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 VH 및 VL과 비교하여 각각 독립적으로 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 및 VL; 또는
- [0064] (e) 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)으로서, 여기서 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)이 독립적으로 각각 (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 VH 및 VL과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 VH 및 VL.
- [0065] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 또한 결합에 대해 상기에 정의된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기와 경쟁하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 상이한 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 상기는 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편이 아니다.
- [0066] 일부 구현예에서, 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 결합에 대해 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하며, 이는 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편이 아니고 항체 202-2-1 또는 이의 항원-결합 단편과 상이한 CDR(들)을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0067] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 인간 Her3의 도메인 3, 예를 들어 도메인 3의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시내용은 HER3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 Her3의 도메인 3, 바람직하게는 서열번호 31에 제시된 인간 Her3의 328-499번 위치의 아미노산에 결합한다.
- [0068] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 HER3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기의 공간 에피토프(spatial epitope)에 결합한다: 서열번호 31에 제시된 인간 Her3의 466번 위치의 히스티딘, 470번 위치의 트립토판, 471번 위치의 트레오닌, 478번 위치의 트레오닌, 483 내지 487번 위치의 (아스파르트산-이소류신-리신-히스티딘-아스파라긴), 484번 위치의 이소류신, 490번 위치의 아르기닌 및 491번 위치의 아르기닌.
- [0069] 결합에 대해 항체 202-2-1과 경쟁하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기의 공간 에피토프에 결합한다: 서열번호 31에 제시된 Her3의 466번 위치의 히스티딘, 470번 위치의 트립토판, 471번 위치의 트레오닌, 478번 위치의 트레오닌, 483 내지 487번 위치의 (아스파르트산-이소류신-리신-히스티딘-아스파라긴), 484번 위치의 이소류신, 490번 위치의 아르기닌 및 491번 위치의 아르기닌.
- [0070] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Her3 리간드 의존적 및/또는 독립적인 신호 전달을 차단한다.
- [0071] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Her3 리간드 의존적 및/또는 독립적인 AKT 인산화를 억제한다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Her3 리간드 의존적 및/또는 독립적인 Her3/Her2 이중이량체의 형성을 억제한다.
- [0072] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 키메라 항체(chimeric antibody), 인간화된 항체(humanized antibody), 또는 완전한 인간 항체(fully human antibody)이다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', (Fab')₂, scFv 또는 디설파이드-결합된 Fv(dsFv)와 같은 Fv 단편, 이중 항체(디아바디;diabody), 및 다중특이적(multi-specific) 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 중에서 선택된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 scFv이다.
- [0073] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역(CH)을 포함하고, 변이체는 상기 변이체가 유래된 야생형 서열과 비교하여, 50개 아미노산의 보존적

치환(예를 들어, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환; 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하고, 변이체는 상기 변이체가 유래된 야생형 서열과 비교하여, 50개 아미노산의 보존적 치환(예를 들어, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환)을 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 불변 영역을, 항-Her3 항체 분자의 특성을 변형시키기 위해(예를 들어, 하기의 특성: Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기의 수, 효과기 세포 기능 또는 보체 기능 중 하나 이상을 변경시키기 위해) 변경시킨다, 예를 들어 돌연변이시킨다. 기능적 변화는 항체의 불변 영역에 있는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 잔기로 치환시켜, 예를 들어 효과기 리간드(예를 들어, FcR 또는 보체 C1q)에 대한 항체의 친화도를 변화시켜, 효과기 기능을 변화(예를 들어, 감소)시킴으로써 수행될 수 있다. 항체의 Fc 영역은 ADCC, 식세포작용(ADCP), CDC 등과 같은 몇 가지 중요한 효과기 기능을 매개한다.

[0075] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 불변 영역(CH)을 가지며, 이는 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 중쇄 불변 영역 중에서; 특히 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄 불변 영역 중에서; 더욱 특히 IgG1(예를 들어, 인간 IgG1)의 중쇄 불변 영역 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역은 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 불변 영역을 가지며, 이는 예를 들어 κ 또는 λ 경쇄 불변 영역, 바람직하게는 κ 경쇄 불변 영역(예를 들어 인간 κ 경쇄 불변 영역) 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 30에 제시된 서열을 갖는다.

[0076] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29에 제시된 CH 또는 이의 변이체를 가지며, 상기 변이체는 서열번호 29와 비교하여 최대 20개 아미노산의 보존적 치환(예를 들어 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환); 또는 서열번호 29와 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0077] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 갖는다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 κ 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 30에 제시된 경쇄 불변 영역(CL) 또는 이의 변이체를 가지며, 상기 변이체는 서열번호 30과 비교하여 최대 20개 아미노산의 보존적 치환(예를 들어 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산의 보존적 치환, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 보존적 치환); 또는 서열번호 30과 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0078] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29에 제시된 중쇄 불변 영역(CH) 및 서열번호 30에 제시된 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0080] (a) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄:

[0081] (i) 서열번호 23에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 서열;

[0082] (ii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는

[0083] (iii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열; 및

[0084] (b) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄:

- [0085] (iv) 서열번호 24에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 서열;
- [0086] (v) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0087] (vi) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열.
- [0088] 특정 구현예에서, (ii) 또는 (v)에 기재된 치환(들)은 보존적 치환(들)이다.
- [0089] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0090] (a) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄:
- [0091] (i) 서열번호 25에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 서열;
- [0092] (ii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0093] (iii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열; 및
- [0094] (b) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄:
- [0095] (iv) 서열번호 26에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 서열;
- [0096] (v) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0097] (vi) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열.
- [0098] 특정 구현예에서, (ii) 또는 (v)에 기재된 치환(들)은 보존적 치환(들)이다.
- [0099] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0100] (a) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄:
- [0101] (i) 서열번호 27에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 제시된 CH 서열을 포함하는 서열;
- [0102] (ii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0103] (iii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열; 및
- [0104] (b) 하기 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄:
- [0105] (iv) 서열번호 28에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 서열;
- [0106] (v) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의

조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는

- [0107] (vi) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열.
- [0108] 특정 구현예에서, (ii) 또는 (v)에 기재된 치환(들)은 보존적 치환(들)이다.
- [0109] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하며,
- [0110] 중쇄는 하기를 포함하고:
- [0111] (i) 서열번호 11에 제시된 서열;
- [0112] (ii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0113] (iii) (i)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열; 및
- [0114] 경쇄는 하기를 포함하며:
- [0115] (iv) 서열번호 22에 제시된 서열;
- [0116] (v) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합(예를 들어, 최대 50개, 최대 45개, 최대 40개, 최대 35개, 최대 30개, 최대 25개, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 치환, 결실 또는 부가 또는 이들의 임의의 조합)을 갖는 서열; 또는
- [0117] (vi) (iv)에 나타난 서열과 비교하여, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열;
- [0118] 바람직하게, (ii) 또는 (v)에 기재된 치환(들)은 보존적 치환(들)이다.
- [0119] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서, 항체는 하기를 포함하는 하기의 그룹 중에서 선택된다:
- [0120] (a) 서열번호 23에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 기재된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 24에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄; 바람직하게는 서열번호 11에 제시된 중쇄 및 서열번호 22에 제시된 경쇄;
- [0121] (b) 서열번호 25에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 기재된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 26에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄;
- [0122] (c) 서열번호 27에 제시된 VH 서열 및 서열번호 29에 기재된 CH 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28에 제시된 VL 서열 및 서열번호 30에 제시된 CL 서열을 포함하는 경쇄.
- [0123] 두 번째 양태에서, 본 개시내용의 항체는 Her3 및 하나 이상의 다른 항원에 결합하는 다중특이적 항체이다. 따라서, 본 개시내용은 다중특이적 항체를 제공한다.
- [0124] 바람직하게, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체 또는 삼중특이적 항체 또는 사중특이적 항체이다.
- [0125] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 다중특이적 항체는 Her3에 결합하는 본 개시내용의 항원-결합 단편, 및 다른 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 항체 모방물을 포함한다.
- [0126] 본 개시내용의 항체 유도체
- [0127] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 유도체화될 수 있으며, 예를 들어 또 다른 분자(예를 들어, 또

다른 폴리펩티드 또는 단백질)에 연결될 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유도체화(예를 들어, 표지화)는 Her3(특히 인간 Her3)에 대한 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 따라서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 그러한 유도체화된 형태를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하나 이상의 다른 분자 그룹, 예를 들어 또 다른 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체를 형성하기 위해), 검출제, 약제학적 제제 및/또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 또 다른 분자(예를 들어, 아비딘 또는 폴리히스티딘 태그)에의 결합을 매개할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드에 연결될 수 있다(예를 들어, 화학적 커플링, 유전자 융합, 비-공유 결합에 의해 또는 달리).

[0128] 한 가지 유형의 유도체화된 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)는 2개 이상의 항체(동일하거나 상이한 유형에 속함)를 가교-결합시켜 생성된다. 이중특이적 항체를 수득하는 방법은 당업계에 주지되어 있으며, 그 예로는 화학적 가교결합 방법, 세포 공학 방법(하이브리도마 방법) 또는 유전 공학 방법이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0129] 또 다른 유형의 유도체화된 항체는 표지된 항체이다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 검출가능한 마커(marker)에 부착될 수 있다. 본 개시내용에 기재된 검출가능한 마커는 형광, 분광학, 광화학적, 생화학적, 면역학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 이러한 마커는 당업계에 주지되어 있으며, 예에는 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 옥시다제 등), 방사성 핵종(예를 들어, 3H, 125I, 35S, 14C 또는 32P), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레세인, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 피코에리트린(PE), 텍사스 레드, 로다민, 양자점 또는 시아닌 염료 유도체(예를 들어, Cy7, Alexa 750)), 아크리딘 에스테르, 자성 비드(예를 들어, Dynabeads®), 콜로이드 금 또는 유색 유리 또는 플라 스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드와 같은 열량 측정 마커, 및 상기 마커(들)에 의해 변형된 아비딘 결합용 비오틴(예를 들어, 스트렙타아비딘)이 포함되나 이들로 제한되지는 않는다. 마커의 용도를 교시하는 특허로는 미국특허 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; 및 4,366,241(모두 내용 전체가 참고로 포함됨)가 있으나, 이들로 제한되지는 않는다. 상기 기재된 바와 같은 검출 가능한 마커는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 방사성 마커는 사진 필름이나 섬광 계수기를 사용하여 검출할 수 있으며, 형광 마커는 광검출기를 사용하여 검출하여 방출된 빛을 검출할 수 있다. 효소 마커는 일반적으로 효소에 기질을 공급하고 기질에 대한 효소의 작용에 의해 생성된 반응 생성물을 검출함으로써 검출되는 반면, 열량 측정 마커는 컬러 마커의 간단한 시각화로 검출된다. 특정 구현예에서, 이러한 표지화는 면역학적 검출(예를 들어, 효소 결합 면역분석, 방사성 면역분석, 형광 면역분석, 화학발광 면역분석 등)에 적합할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 검출가능한 마커는 잠재적인 인체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길이를 갖는 링커에 의해 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 부착될 수 있다.

[0130] 또한, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 메틸 또는 에틸, 또는 글리코실과 같은 화학 그룹으로 유도체화될 수 있다. 이들 그룹은 혈청 반감기 증가와 같은 항체의 생물학적 특성을 개선하는 데 사용될 수 있다.

[0131] 항체의 제조

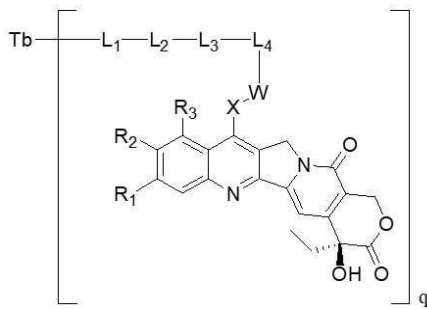
[0132] 본 개시내용의 항체는 유전공학적 재조합 기술을 사용하여 획득하는 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자를 암호화(encoding)하는 DNA 분자는 화학적 합성 또는 PCR 증폭에 의해 획득된다. 생성된 DNA 분자를 발현 벡터(vector)에 삽입한 다음 숙주 세포에 형질감염시킨다. 이어서, 형질감염된 숙주 세포를 특정 조건 하에서 배양하여 본 개시내용의 항체를 발현시킨다.

[0133] 본 개시내용의 항원-결합 단편은 온전한 항체 분자를 가수분해함으로써 수득될 수 있다(참조: Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117 (1992) 및 Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). 또한, 이들 항원-결합 단편은 또한 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수도 있다(Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000) 검토). 예를 들어, Fab' 단편을 숙주 세포로부터 직접 수득할 수 있고; Fab' 단편을 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성시킬 수 있다(Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). 또한, Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 또한 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리할 수도 있다. 이들 항원-결합 단편을 제조하기 위한 다른 기법은 당업자에게 충분히 공지되어 있다.

- [0134] 따라서, 세 번째 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 하나 이상의 CDR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 또는 본 개시내용의 다중특이적 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 특정 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 코돈 축퇴성에 따라 치환될 수 있다. 특정 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 코돈 최적화된다.
- [0135] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 단리된 핵산 분자는 하기를 포함한다: (i) 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 각각 암호화하는 제1 핵산 및 제2 핵산, 또는 (ii) 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역뿐만 아니라 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 각각 암호화하는 제1 핵산 및 제2 핵산, 또는 (iii) 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 및 경쇄를 각각 암호화하는 제1 핵산 및 제2 핵산. 특정 구현예에서, 제1 핵산 및 제2 핵산은 상기 항목 (i)-(iii) 중 어느 하나의 제1 및 제2 핵산의 서열에 실질적으로 일치하는 축퇴 서열인 핵산을 포함하다. 특정 구현예에서, 축퇴 서열 또는 실질적으로 일치하는 서열은 항목 (i)-(iii)에 제시된 핵산 분자와 비교하여, 적어도 약 85%, 90%, 95% 이상의 서열 동일성을 갖거나, 또는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 갖거나, 또는 3, 6, 15, 30 또는 45개 이하의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 지칭한다.
- [0136] 네 번째 양태에서, 본 개시내용의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 벡터(cloning vector) 또는 발현 벡터)를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터이다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 벡터는 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 박테리오파지, 렌티바이러스 등이다. 특정 구현예에서, 벡터는 대상체(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)의 생체내에서 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현할 수 있다.
- [0137] 다섯 번째 양태에서, 본 개시내용의 단리된 핵산 분자 또는 본 개시내용의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 진핵 세포(예를 들어, 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포) 또는 원핵 세포(예를 들어, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*))일 수 있다. 적합한 진핵 세포에는 NSO 세포, Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 적합한 곤충 세포에는 Sf9 세포가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 CHO(예를 들어, CHO-K1, CHO-S, CHO DXB11, CHO DG44)와 같은 포유동물 세포이다.
- [0138] 여섯 번째 양태에서, 본 개시내용의 숙주 세포를 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 다중특이적 항체의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0139] 항체-약물 접합체
- [0140] 일곱 번째 양태에서, 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물(prodrug), 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물을 제공하며, 여기서 항체는 Her3에 결합하고 커넥터(connector)를 통해 커플링 모이어티(coupling moiety)에 연결되는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0141] 커플링 모이어티는 검출 가능한 마커, 방사성 동위원소, 형광제, 발광제, 착색제, 효소, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 핵종, 핵산, 소분자 독소, 결합 활성을 갖는 폴리펩티드, 단백질, 수용체, 리간드, 및 종양 세포 성장을 억제하고 종양 세포 세포자멸사 또는 괴사를 촉진하는 기타 활성제 중에서 선택된다.
- [0142] 특정 예에서, 항체-약물 접합체는 하기 식의 항-Her3 항체 약물 접합체(Her3-ADC)를 포함한다:
- [0143] $Tb-(L-D)_q$,
- [0144] 여기서:
- [0145] Tb는 Her3에 결합하는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고;
- [0146] D는 소분자 독소 약물 모이어티이고;
- [0147] L은 Tb와 D를 공유적으로 연결하는 결합 또는 링커이고;
- [0148] q는 1 내지 16의 정수이고, Tb에 공유결합된 L-D의 수를 나타내고;

[0149] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I로 표시되는 구조를 갖는다:

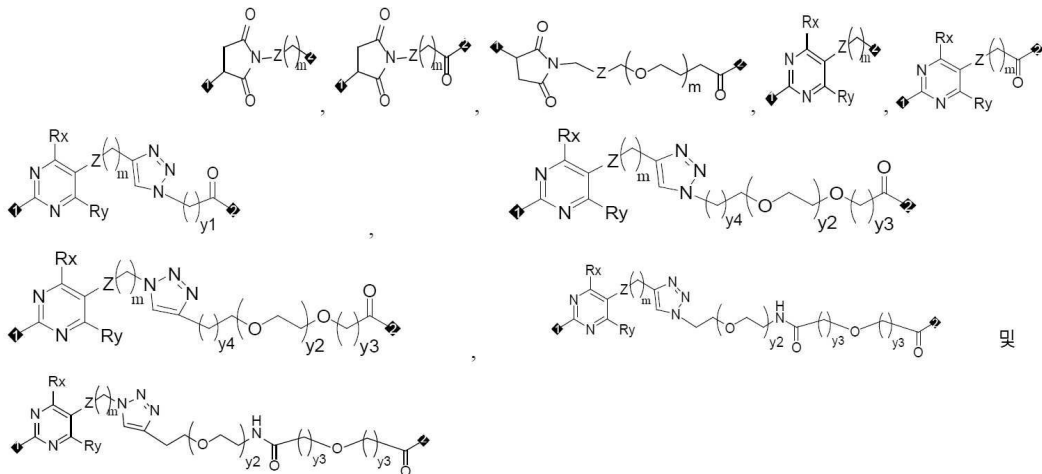
[0150] [화학식 I]



[0151]

[0152] 여기서,

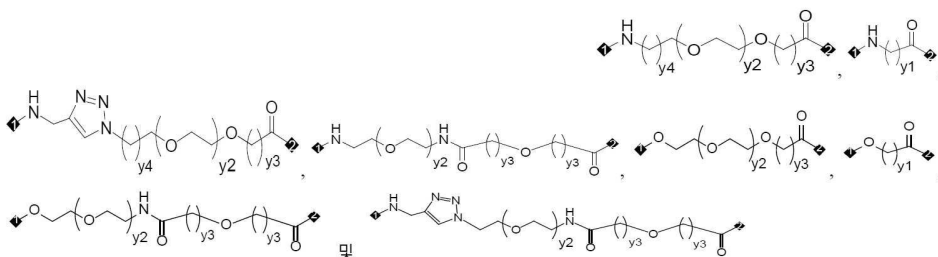
[0153] L₁은



[0154]

[0155] 중에서 선택되고, 각각의 Z는 직접 결합, 탄소-탄소 삼중 결합, 탄소-탄소 이중 결합, 및 아마이드 중에서 독립적으로 선택되고(바람직하게는 직접 결합, 탄소-탄소 삼중 결합, 및 탄소-탄소 이중 결합 중에서 선택되고); Rx 및 Ry는 각각 독립적으로 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택되고; 각각의 m은 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 독립적으로 선택되고; y₁은 1 내지 6의 임의의 정수(예를 들어, 4, 5, 6) 중에서 선택되고; 각각의 y₂는 0 내지 15의 임의의 정수(예를 들어, 6-15) 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y₃은 1, 2 및 3 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y₄는 0 및 1 중에서 독립적으로 선택되고; 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L₂ 또는 L₃에 부착되며;

[0156] L₂는 존재하지 않거나 존재하고, L₂가 존재하는 경우 L₂는

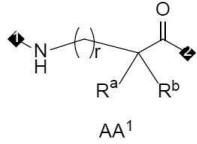


[0157]

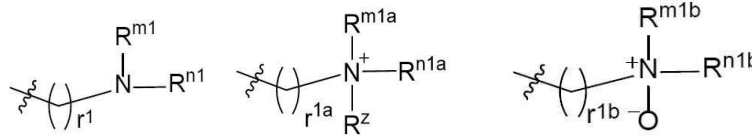
[0158] 중에서 선택되고, y₁은 1 내지 6의 임의의 정수(예를 들어, 4, 5 및 6) 중에서 선택되고; 각각의 y₂는 0 내지 10의 임의의 정수(예를 들어, 6-10) 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y₃은 1 또는 2 중에서 독립적으로 선택

택되고; 각각의 y_4 는 0 및 1 중에서 독립적으로 선택되고, 1번 위치는 L_1 에 부착되고, 2번 위치는 L_3 에 부착되며;

[0159] L_3 은 아미노산 잔기 또는 2-10개의 아미노산 잔기로 이루어지는 짧은 펩티드 중에서 선택되고; 아미노산 잔기는 천연 아미노산 잔기, 비-천연 아미노산 잔기 중에서 선택되거나, 또는 AA^1 로 표시되는 아미노산 잔기 또는 이의



입체이성질체, AA^1 중에서 선택되고; AA^1 로 표시되는 아미노산 잔기에서, R^a 및 R^b 중 어느 하나



는 H이고, 다른 하나는 H, 및 이거나; 또는 R^a 및 R^b 는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리는 피페리딘 고리 또는 피페라진 고리이다.

[0160] r , r^1 , r^{1a} 및 r^{1b} 는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

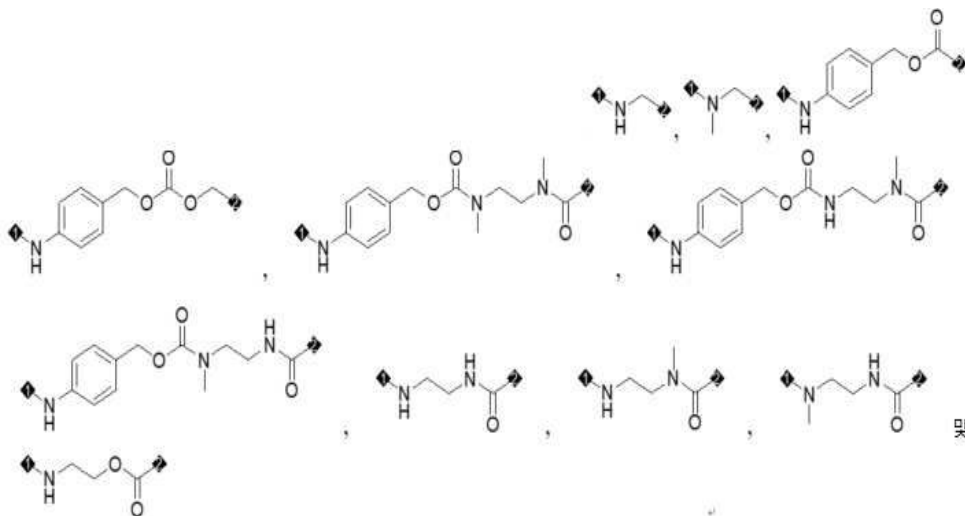
[0161] R^{m1} , R^{n1} , R^{m1a} , R^{n1a} , R^{m1b} 및 R^{n1b} 는 각각 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 또는 $-COOR^{x1}$ (여기서 R^{x1} 은 C_{1-6} 알킬이다)이거나; 또는 R^{m1} 및 R^{n1} , R^{m1a} 및 R^{n1a} , 및 R^{m1b} 및 R^{n1b} 는 이들이 둘 다 부착된 질소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리 중에서 헤테로원자는 1 또는 2개의 N 원자 중에서 선택되고; 상기 5-6원 헤테로사이클릭 고리는 하나 이상의 $R^{0'}$ 로 임의로 치환되고;

[0162] R^z 는 C_{1-6} 알킬 중에서 선택되고;

[0163] R^0 및 $R^{0'}$ 는 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬, $-NR^{m2}R^{n2}$, 또는 C_{1-6} 알킬로 임의로 치환된 5-6원 헤테로사이클릭 중에서 선택되고; 상기 5-6원 헤테로사이클릭 중에서 헤테로원자는 1 또는 2개의 N 원자 중에서 선택되고;

[0164] R^{m2} 및 R^{n2} 는 각각 독립적으로 H 및 C_{1-6} 알킬 중에서 선택되고;

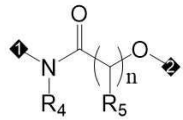
[0165] L_4 는 존재하지 않거나 존재하고, L_4 가 존재하는 경우 L_4 는

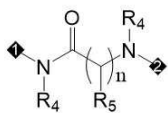


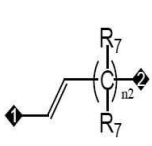
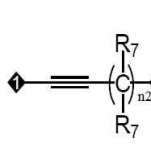
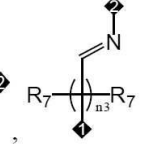
[0166] 중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착되며;

[0168] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, 할로겐 및 C₁₋₄ 알킬 중에서 선택되거나; 또는 R₁ 및 R₂는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 헤테로사이클릭 고리는 1, 2 또는 3개의 O, S 또는 N 또는 이들의 임의의 조합을 함유하고;

[0169] R₃은 H 및 C₁₋₄ 알킬 중에서 선택되거나; 또는 R₃ 및 X는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 5-6원 탄소 고리를 형성하고;

[0170] W는 존재하지 않거나 존재하며, W가 존재하는 경우, W는 -O-, -S-, -NR₄-, 및  및

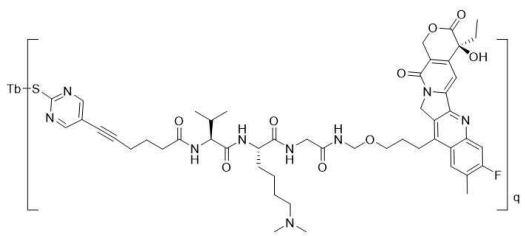
 중에서 선택되고, 1번 위치는 X에 부착되고 2번 위치는 L₄ 또는 L₃에 부착되며;

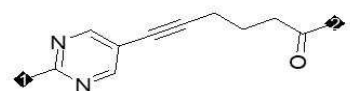
[0171] X는 임의로 치환된 -(CH₂)_{n1}-, , ,  중에서 선택되고, 1번 위치는 모 고리(parent ring)에 부착되고, 2번 위치는 W 또는 L₄에 부착되고; 치환체는 1 또는 2개의 C1-4 알킬 중에서 선택되고;

[0172] R₄, R₅, 및 R₇은 각각 독립적으로 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택되고;

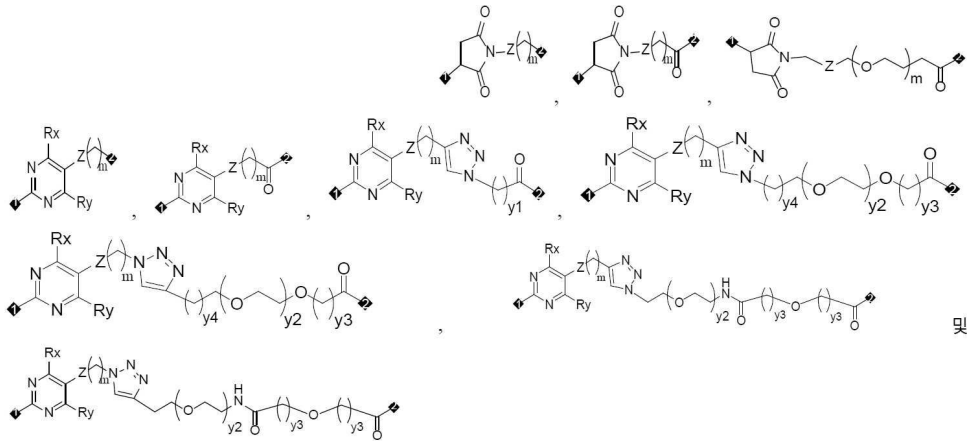
[0173] n, n1, n2, n3은 각각 독립적으로 0 및 6의 임의의 정수 중에서 선택된다.

[0174] 또한, "L₁의 1번 위치가 S 원자를 통해 Tb에 부착된다"에 대해서, 당업자는 L₁의 1번 위치가 디설파이드 결합이 개방된 후(예를 들어 환원제 TCEP에 의한 디설파이드 결합의 환원이 디설파이드 결합을 깨뜨려 설프히드릴 -SH 그룹을 생성시킬 수 있다) Tb(예를 들어, 항체)에 포함된 설프히드릴 그룹에 연결됨을 이해할 수 있음에 또한 유의해야 한다. 즉, L₁과 Tb 사이의 -S-는 추가적인 외부 황 원자가 아니다. 예를 들어,

 에서 -S-는 추가적인 외부 황 원자가 아니라,

 와 같은 L₁의 1번 위치에 디설파이드 결합 개방 후 Tb에 포함된 설프히드릴 그룹을 연결함으로써 형성된 -S-이다.

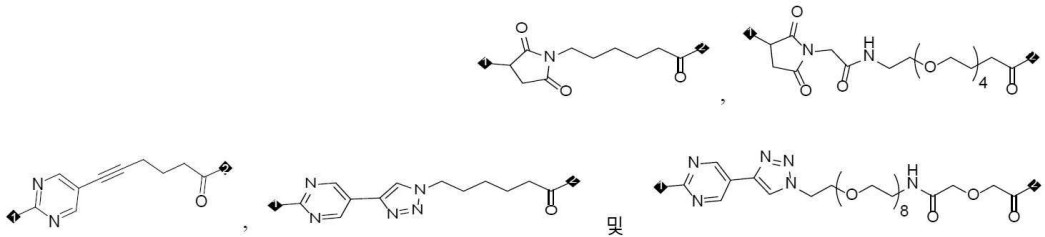
[0175] 일부 구현예에서, L₁은



[0176]

[0177] 중에서 선택되고, 각각의 Z는 직접 결합, 탄소-탄소 삼중 결합, 탄소-탄소 이중 결합, C6 아릴, 및 아마이드 중에서 독립적으로 선택되고(바람직하게는 직접 결합, 탄소-탄소 삼중 결합, 및 탄소-탄소 이중 결합 중에서 선택되고); Rx 및 Ry는 각각 독립적으로 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택되고; 각각의 m은 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 독립적으로 선택되고; y₁은 1 내지 6의 임의의 정수(예를 들어, 4, 5, 6) 중에서 선택되고; 각각의 y₂는 0 내지 15의 임의의 정수(예를 들어, 6-15) 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y₃은 1, 2 및 3 중에서 독립적으로 선택되고; 각각의 y₄는 0 및 1 중에서 독립적으로 선택되고; 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L₂ 또는 L₃에 부착된다.

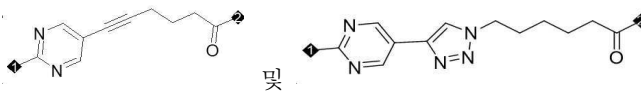
[0178] 일부 구현예에서, L₁은



[0179]

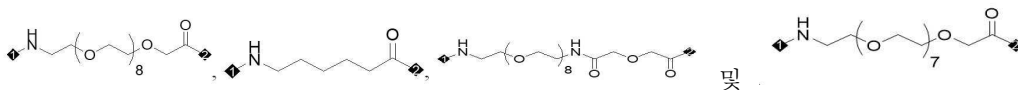
[0180] 중에서 선택되고, 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L₂ 또는 L₃에 부착된다.

[0181] 일부 구현예에서, L₁은



중에서 선택되고, 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 L₂ 또는 L₃에 부착된다.

[0182] 일부 구현예에서, L₂는 존재하지 않거나 존재하고, L₂가 존재하는 경우 L₂는



1번 위치는 L₁에 부착되고, 2번 위치는 L₃에 부착된다.

[0183] 일부 구현예에서, L₂는 존재하지 않는다.

[0184] 일부 구현예에서, L₃은 AA¹, AA¹-Gly, Val-Cit, Val-Ala, Val-AA¹, Val-AA¹-Gly, AA¹-Ala-Asn, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Asn 및 Gly-Gly-Phe-Gly 중에서 선택된다.

[0185] 일부 구현예에서, L₃은 AA¹, AA¹-Gly, Val-Cit, Val-AA¹-Gly, AA¹-Ala-Asn 및 Gly-Gly-Phe-Gly 중에서 선택된다.

[0186] 일부 구현예에서, L_3 은 Val-AA¹-Gly 중에서 선택된다.

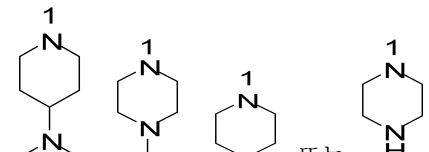
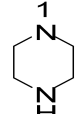
[0187] 일부 구현예에서, r , r^1 , r^{1a} 및 r^{1b} 는 각각 독립적으로 0 또는 4 중에서 선택되고; 바람직하게, r 은 0이고, r^1 , r^{1a} 및 r^{1b} 는 4이거나; 또는 r 은 4이고, r^1 , r^{1a} 및 r^{1b} 는 0이다.

[0188] 일부 구현예에서, r , r^1 , r^{1a} 및 r^{1b} 는 모두 0이 아니다.

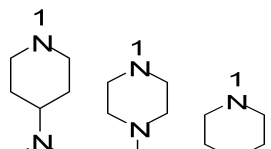
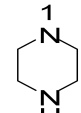
[0189] 일부 구현예에서, r 은 0이고, r^1 은 4이다.

[0190] 일부 구현예에서, R^{m1} , R^{n1} , R^{m1a} , R^{n1a} , R^{m1b} 및 R^{n1b} 는 각각 독립적으로 H, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -COOCH₂CH₂CH₃, -COOCH(CH₃)₂, -COOC(CH₃)₃ 또는 -COOCH₂CH₂CH₂CH₃이다.

[0191] 일부 구현예에서, R^{m1} , R^{n1} , R^{m1a} , R^{n1a} , R^{m1b} , 및 R^{n1b} 는 각각 독립적으로 H, 메틸, 에틸, n-프로필, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -COOCH₂CH₂CH₃, -COOCH(CH₃)₂, -COOC(CH₃)₃, 또는 -COOCH₂CH₂CH₂CH₃이다. 일부 구현예에서, R^{m1} 및 R^{n1} , R^{m1a} 및 R^{n1a} , 및 R^{m1b} 및 R^{n1b} 는 이들이 둘 다 부착된 질소 원자와 함께, 피페리딘 고리 또는 피페라진 고리; 및

추가로 바람직하게는 , 또는  를 형성하고, 1번으로 표시된 질소 원자는 R^{m1} 및 R^{n1} 이 둘 다 부착된 질소 원자이다.

[0192] 일부 구현예에서, R^{m1} 및 R^{n1} , R^{m1a} 및 R^{n1a} , 및 R^{m1b} 및 R^{n1b} 는 이들이 둘 다 부착된 질소 원자와 함께, 피페리딘 고

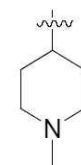

리; 및 추가로 바람직하게는 , 또는  를 형성하고, 1번으로 표시된 질소 원자는 R^{m1} 및 R^{n1} 이 둘 다 부착된 질소 원자이다.

[0193] 일부 구현예에서, r 및 r^1 에 대해서, r 이 4이고 r^1 이 0인 경우, R^{m1} 및 R^{n1} 은 각각 독립적으로 H, C1-6 알킬(예를 들어, H, 메틸) 중에서 선택되고; r 이 0이고 r^1 이 4인 경우, R^{m1} 및 R^{n1} 은 각각 독립적으로 C1-6 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필) 중에서 선택되고, 바람직하게는 C2-6 알킬(예를 들어, 에틸, n-프로필) 중에서 선택된다.

[0194] 일부 구현예에서, r 이 0이고 r^1 이 4인 경우, R^{m1} 및 R^{n1} 은 각각 독립적으로 C1-6 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, 및 n-프로필) 중에서 선택된다.

[0195] 일부 구현예에서, R^z 는 메틸이다.



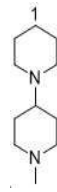
[0196] 일부 구현예에서, R^0 은 C₁₋₆ 알킬, 또는 C₁₋₆ 알킬로 치환된 피페리디닐 또는 피페라지닐이고; 바람직하게는 메틸,


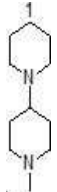
 에틸 또는 메틸로 치환된 피페리디닐; 예를 들어 메틸 또는  이다.

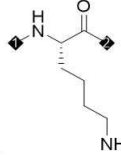
[0197] 일부 구현예에서, R^{01} 은 각각 독립적으로 C₁₋₆ 알킬 또는 -NR^{m2}Rⁿ²이고; 보다 바람직하게는 메틸 또는

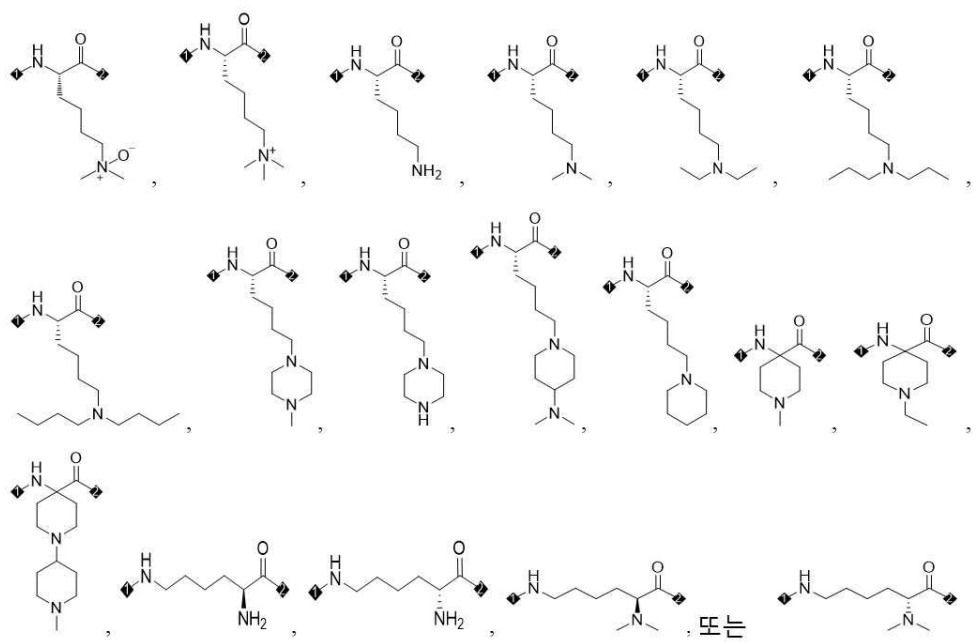
-NR^{m2}Rⁿ²이고, 여기서 R^{m2} 및 Rⁿ²는 각각 독립적으로 H 또는 C₁₋₆ 알킬이고, 보다 바람직하게는 메틸이다.

[0198] 일부 구현예에서, AA¹에 의해 표시되는 아미노산 잔기에서, R^{a1} 및 R^b는 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께

피페리딘 고리, 예를 들어 , , 또는  를 형성하고, 1번으로 표시된 탄소 원자는 R^a 및 R^b가 둘 다 부

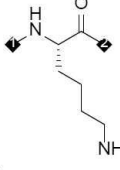
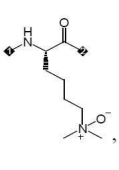
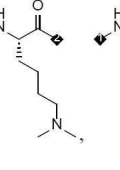
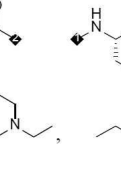
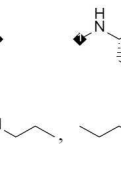
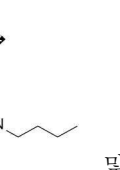
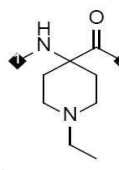
착된 탄소 원자이다; 예를 들어 , 또는 .

[0199] 일부 구현예에서, AA¹에 의해 표시되는 아미노산 잔기는  ,



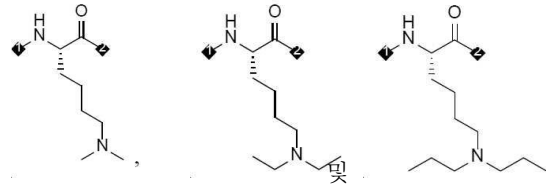
[0200]
 [0201] 중에서 선택된다.

[0202] 일부 구현예에서, AA¹에 의해 표시되는 아미노산 잔기는

, , , , ,  및  중에서 선택된다.

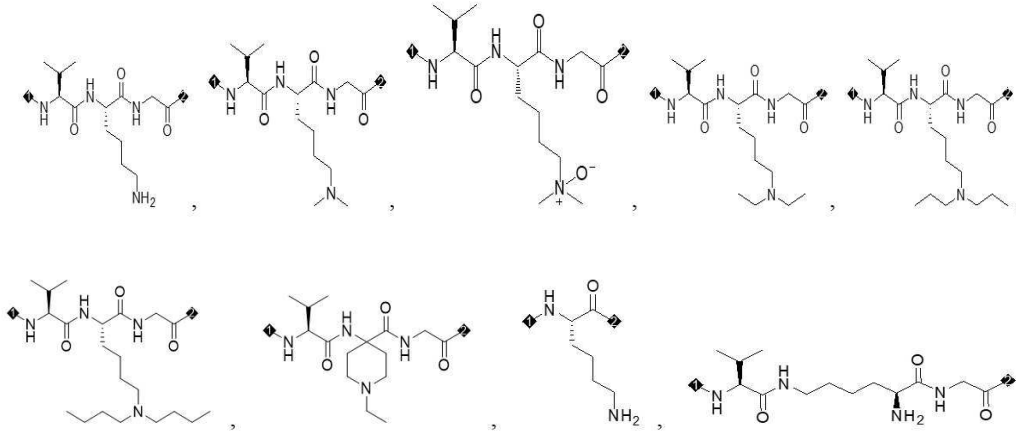
[0203]

일부 구현예에서, AA¹에 의해 표시되는 아미노산 잔기는
 서 선택된다. 일부 구현예에서, L₃은



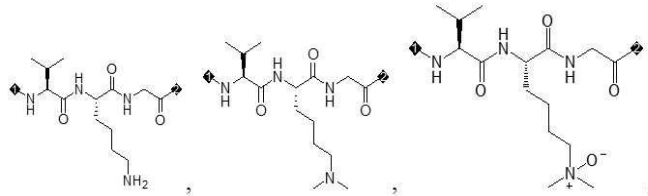
[0204]

중에서 선택되고, 1번 위치는 L₁ 또는 L₂에 부착되고, 2번 위치는 L₄ 또는 D에 부착된다.



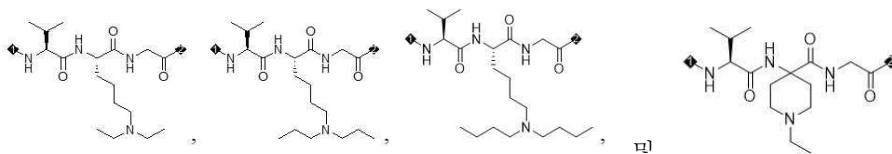
[0205]

일부 구현예에서, L₃은



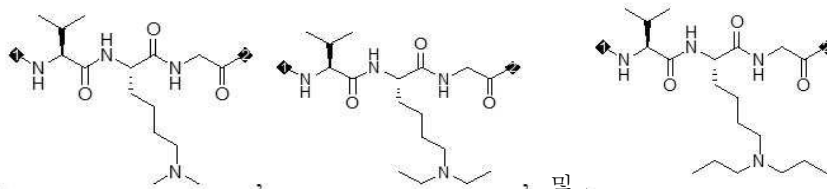
[0206]

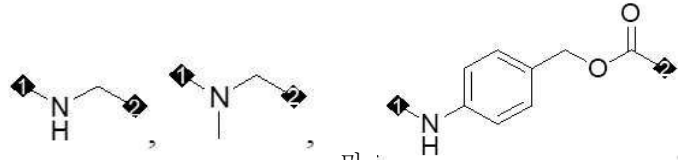
중에서 선택되고, 1번 위치는 L₁ 또는 L₂에 부착되고, 2번 위치는 L₄ 또는 D에 부착된다.



[0207]

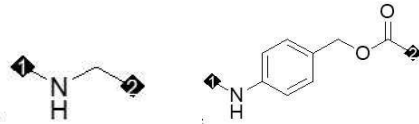
일부 구현예에서, L₃은
 되고, 1번 위치는 L₁ 또는 L₂에 부착되고, 2번 위치는 L₄ 또는 D에 부착된다. 일부 구현예에서, L₄는 존재하지



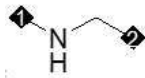


않거나 존재하고, L_4 가 존재하는 경우 L_4 는 L_1 , L_2 , 및 L_3 중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다.

[0208] 일부 구현예에서, L_4 는 존재하지 않는다.

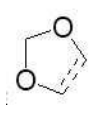


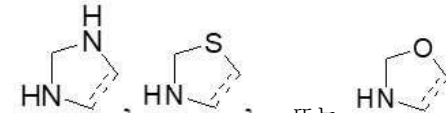

[0209] 일부 구현예에서, L_4 는 L_1 , L_2 , 및 L_3 중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다.



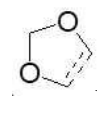
[0210] 일부 구현예에서, L_4 는 L_1 , L_2 , 및 L_3 중에서 선택되고, 1번 위치는 L_3 에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착된다.

[0211] 일부 구현예에서, R_1 은 H 및 할로젠 중에서 선택되고, R_2 는 H 및 C1-4 알킬 중에서 선택된다.

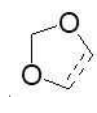
[0212] 일부 구현예에서, R_1 및 R_2 는 이들이 둘 다 부착된 탄소와 함께 를 형성한다.


[0213]  또는 을 형성하고, "점선"은 헤테로사이클릭 고리가 벤젠 고리에 융합된 것을 가리킨다.

[0214] 일부 구현예에서, R_1 은 H 또는 F이고, R_2 는 H 또는 메틸이다.

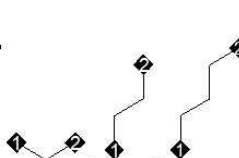
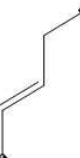
[0215] 일부 구현예에서, R_1 은 F이고, R_2 는 메틸이거나, 또는 R_1 및 R_2 는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 를 형성한다.

[0216] 일부 구현예에서, R_1 은 F이고, R_2 는 메틸이다.

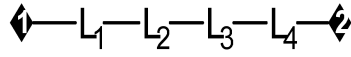
[0217] 일부 구현예에서, R_1 및 R_2 는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 을 형성한다.

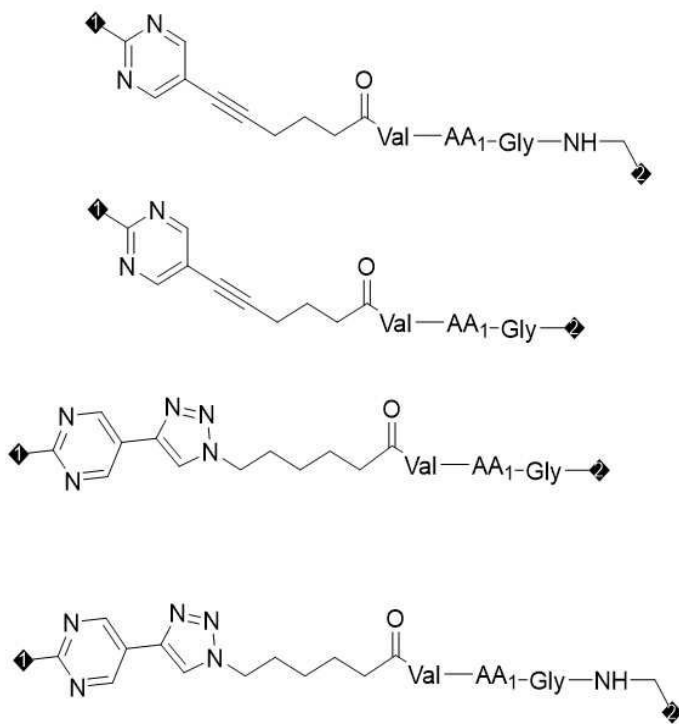
[0218] 일부 구현예에서, R_3 은 H이거나; 또는, R_3 및 X는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 를 형성하고, "점선"은 헤테로사이클릭 고리가 벤젠 고리 및 피리딘 고리에 융합된 것을 가리킨다.

[0219] 일부 구현예에서, R_3 은 H이다.

치는 L₄ 또는 L₃에 부착되고, X는  및  중에서 선택되고, 1번 위치는 모 고리에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다.

[0234] W가 존재하지 않거나 부재하고, 따라서 W가 존재하지 않는 경우 L₄의 1번 위치는 L₃에 부착되고, 2번 위치는 X에 부착되며; W가 존재하는 경우 L₄의 1번 위치는 L₃에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다. L₄에 대한 하기의 연결 관계는 상기를 참조하여 이해할 수 있다.

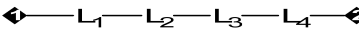
[0235] 일부 구현예에서, 구조  는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:

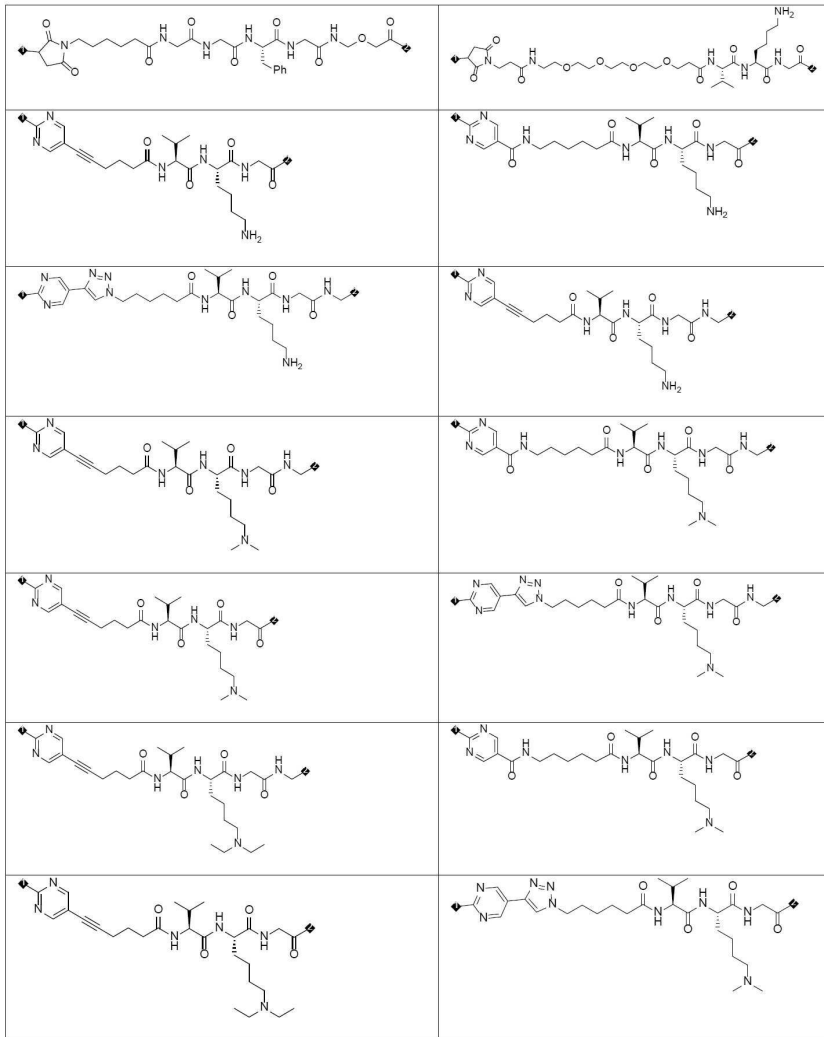


[0236]

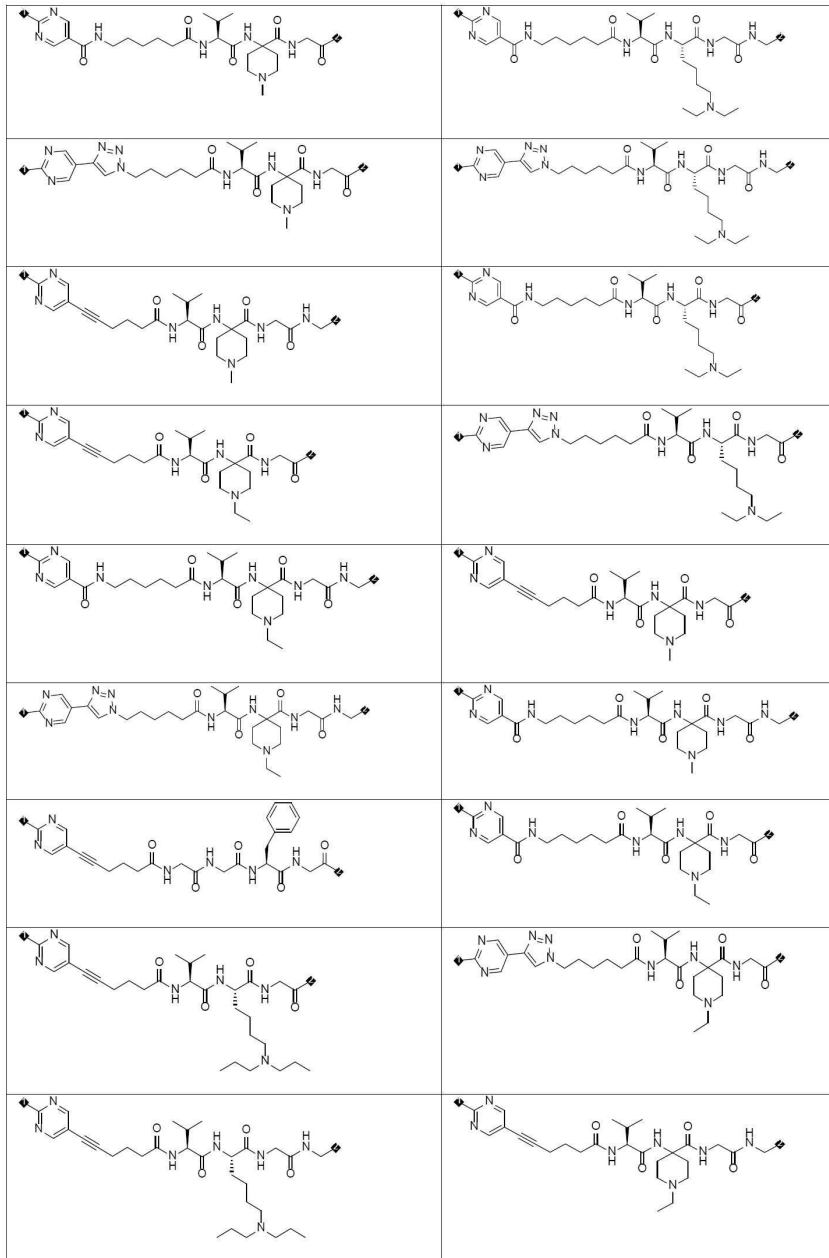
[0237] 여기서, 1번 위치는 Tb에 부착되고, 2번 위치는 D에 부착되며, AA¹은 상기에 정의된다.

[0238]

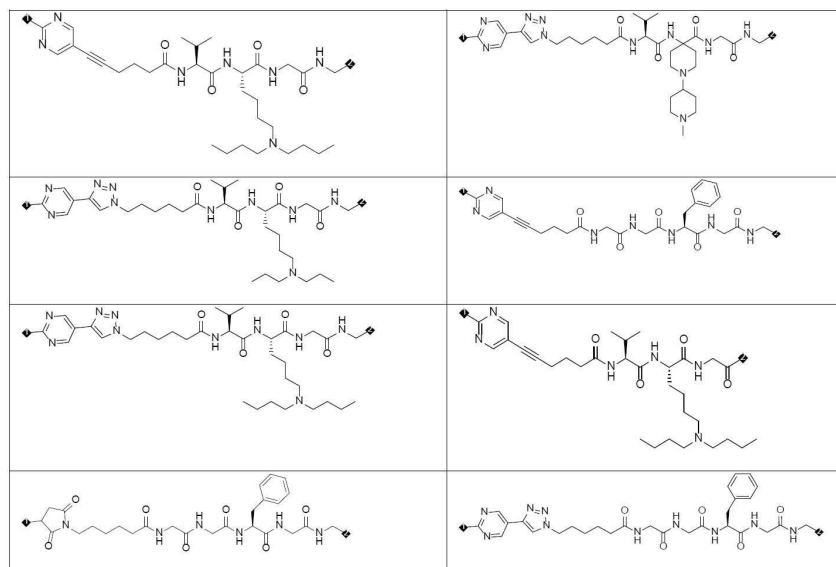
일부 구현예에서, 구조  는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:



[0239]

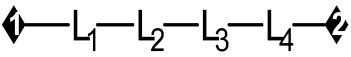


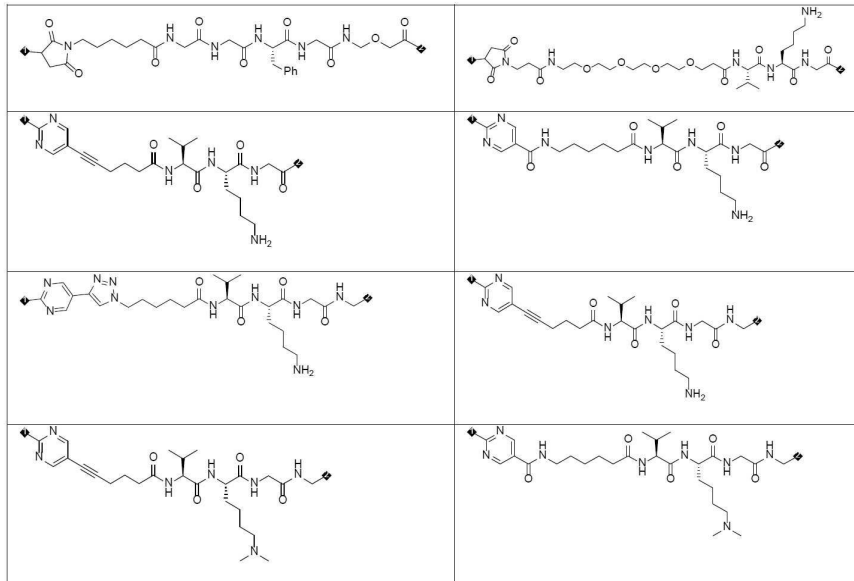
[0240]



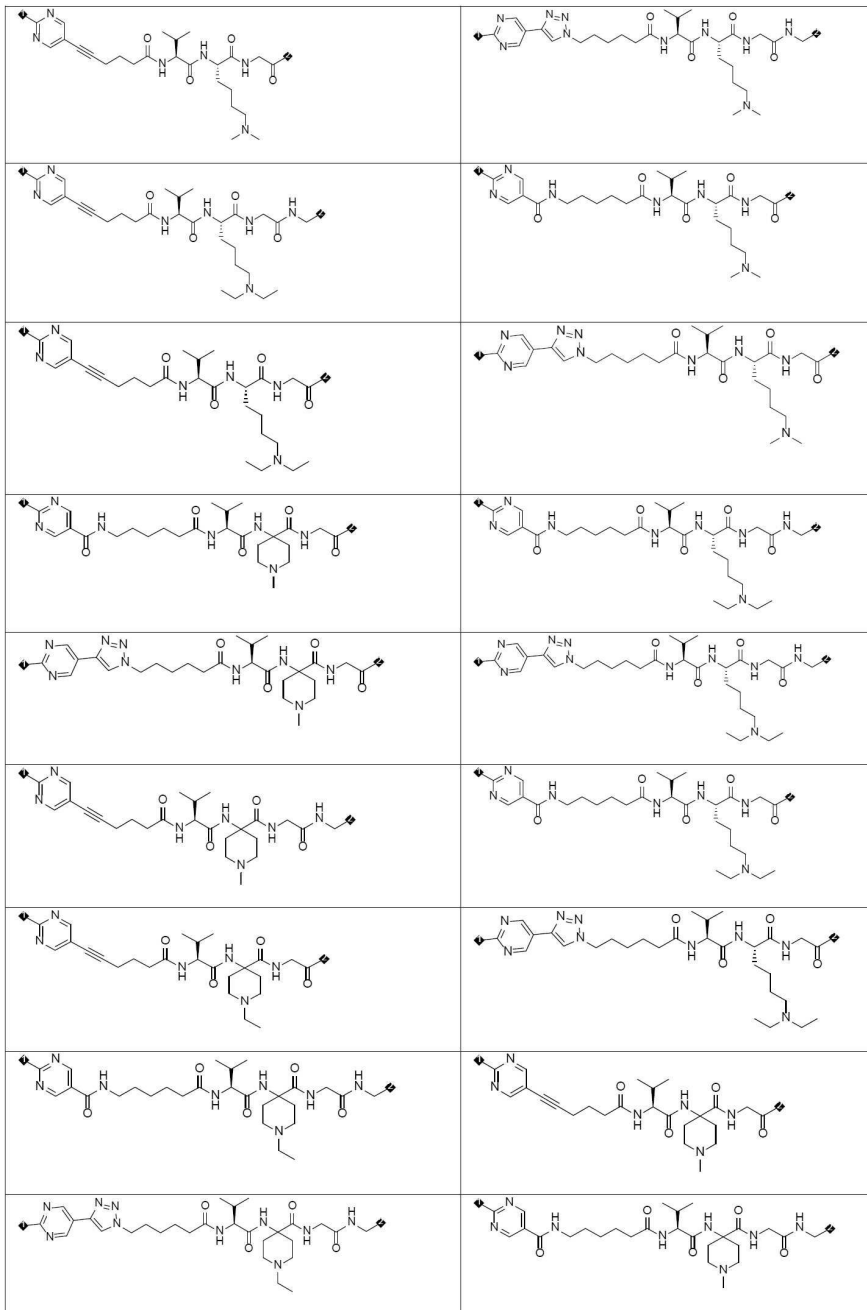
[0241]

[0242] 여기서, 1번 위치는 Tb에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다.

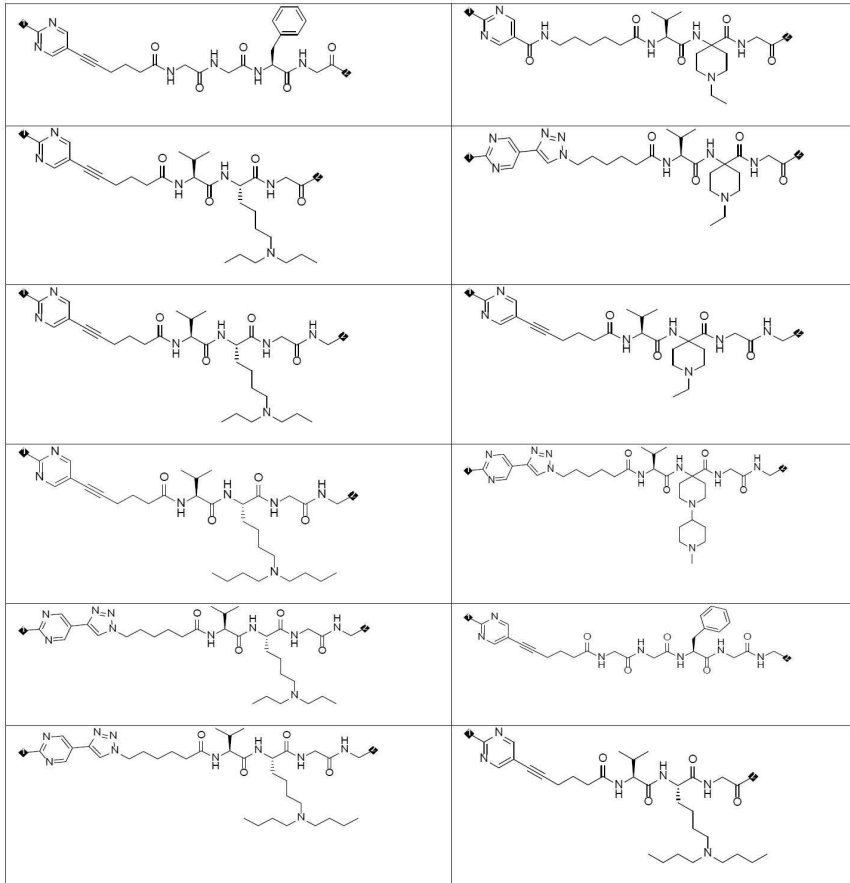
[0243] 일부 구현예에서, 구조  는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:



[0244]



[0245]



[0246]

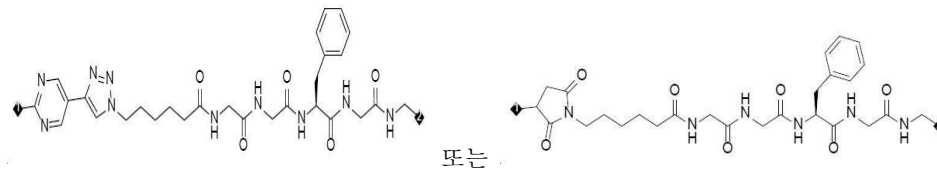
[0247]

여기서, 1번 위치는 Tb에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다.

[0248]

일부 구현예에서, 구조 는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:

[0249]

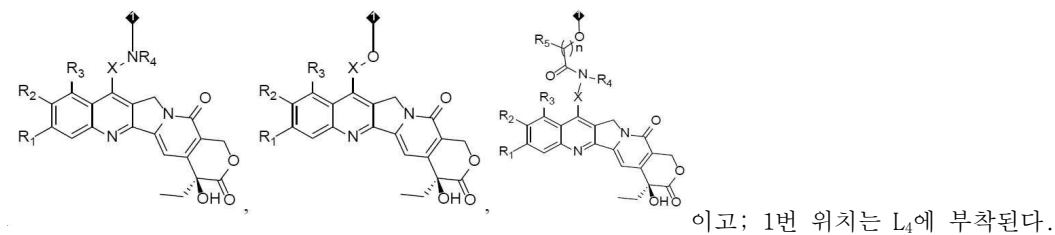


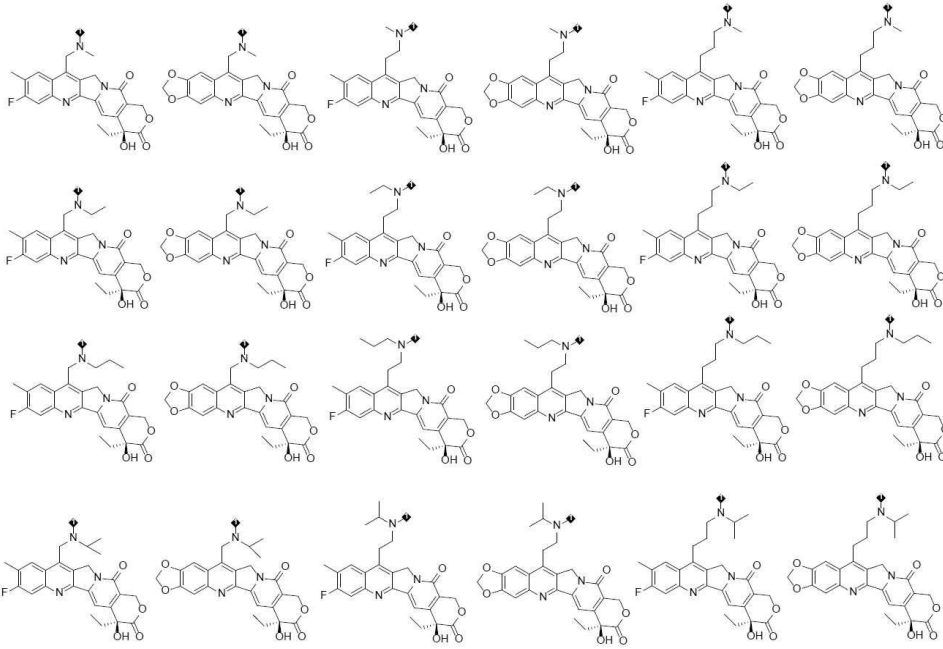
[0250]

여기서, 1번 위치는 S 원자를 통해 Tb에 부착되고, 2번 위치는 W에 부착된다.

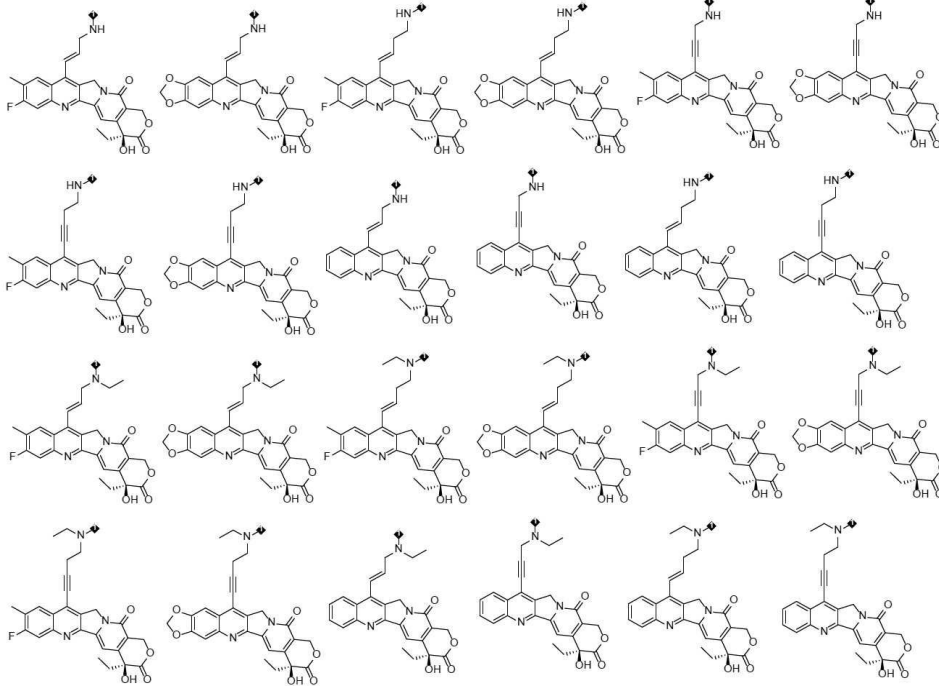
[0251]

일부 구현예에서, 에 의해 표시되는 구조 단편은

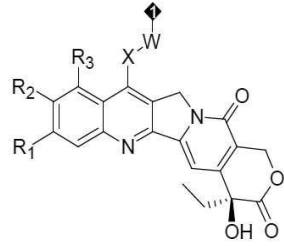




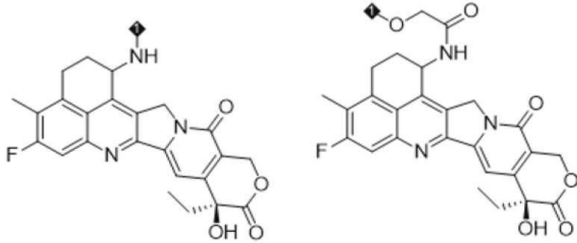
[0255]



[0256]



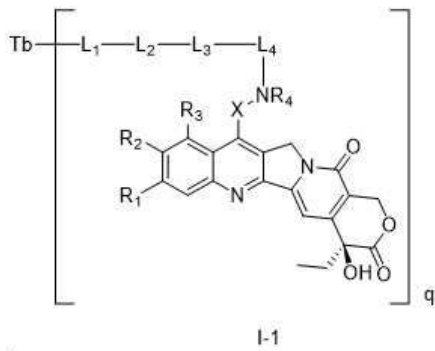
[0257] 일부 구현예에서, 구조 는 하기의 구조 단편 중에서 선택된다:



[0258]

[0259] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-1에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0260] [화학식 I-1]

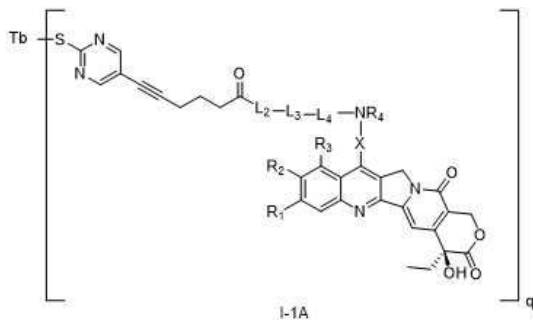


[0261]

[0262] 여기서 Tb, L₁, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃, R₄, 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

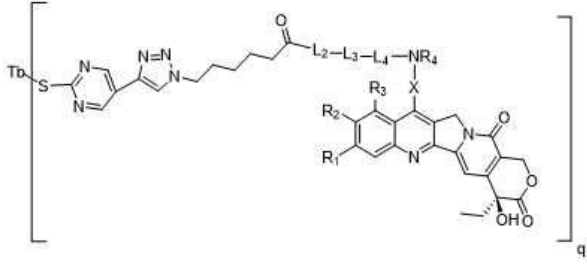
[0263] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-1A 또는 I-1B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0264] [화학식 I-1A]



[0265]

[0266] [화학식 I-1B]



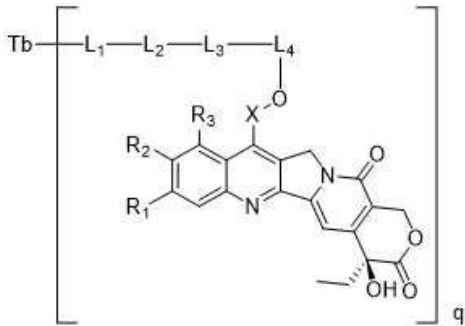
I-1B

[0267]

[0268] 여기서 Tb, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃, R₄, 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0269] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-2에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0270] [화학식 I-2]



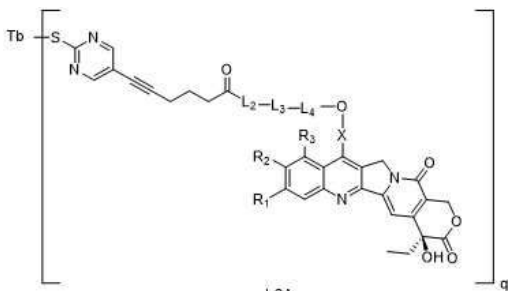
I-2

[0271]

[0272] 여기서 Tb, L₁, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃ 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0273] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-2A 또는 I-2B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

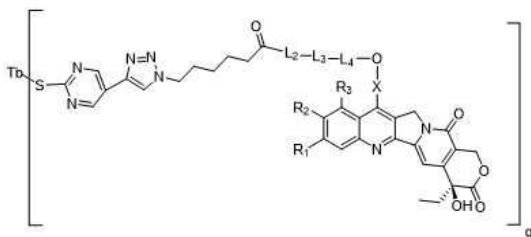
[0274] [화학식 I-2A]



I-2A

[0275]

[0276] [화학식 I-2B]



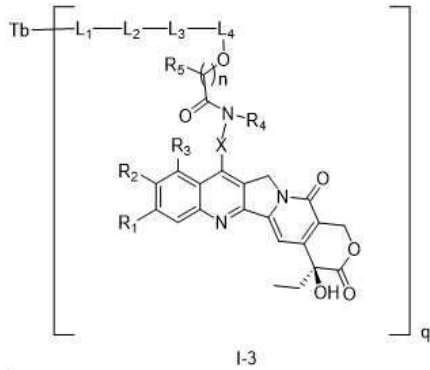
I-2B

[0277]

[0278] 여기서 Tb, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃ 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0279] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-3에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0280] [화학식 I-3]

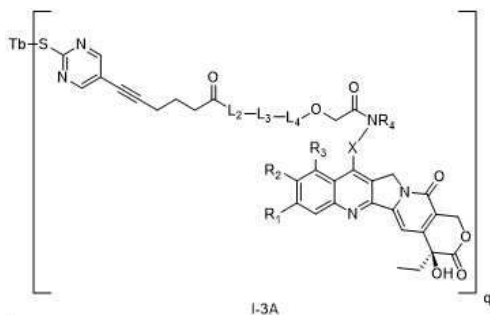


[0281]

[0282] 여기서 Tb, L₁, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, n, 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

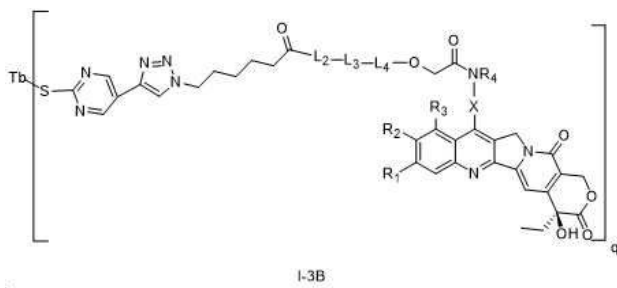
[0283] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-3A 또는 I-3B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0284] [화학식 I-3A]



[0285]

[0286] [화학식 I-3B]

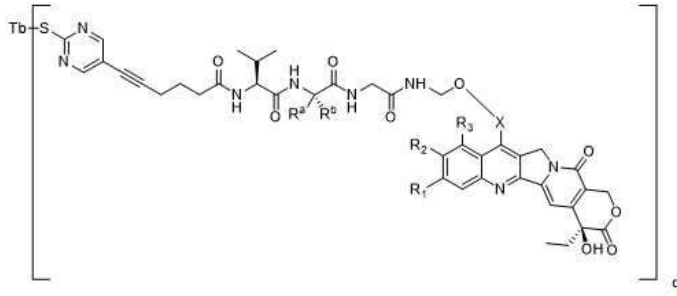


[0287]

[0288] 여기서 Tb, L₂, L₃, L₄, X, R₁, R₂, R₃, R₄ 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0289] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-A에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0290] [화학식 I-A]



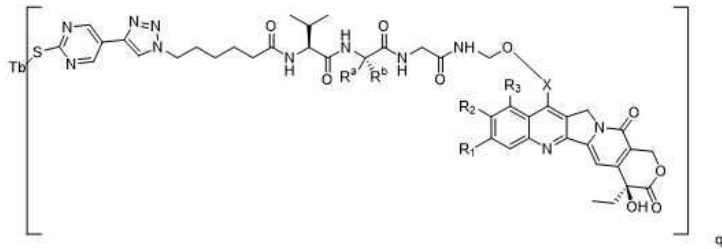
I-A

[0291]

[0292] 여기서 Tb, X, R₁, R₂, R₃, R^a, R^b 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0293] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 I-B에 의해 표시되는 구조를 갖는다:

[0294] [화학식 I-B]



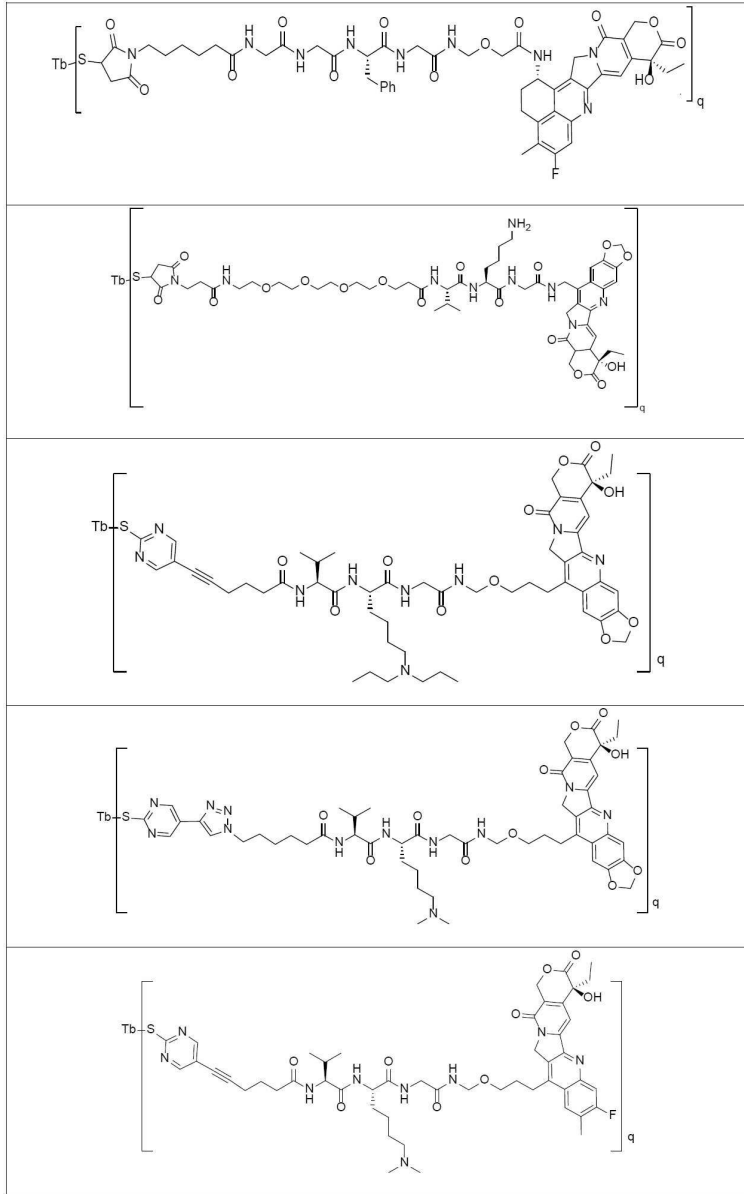
I-B

[0295]

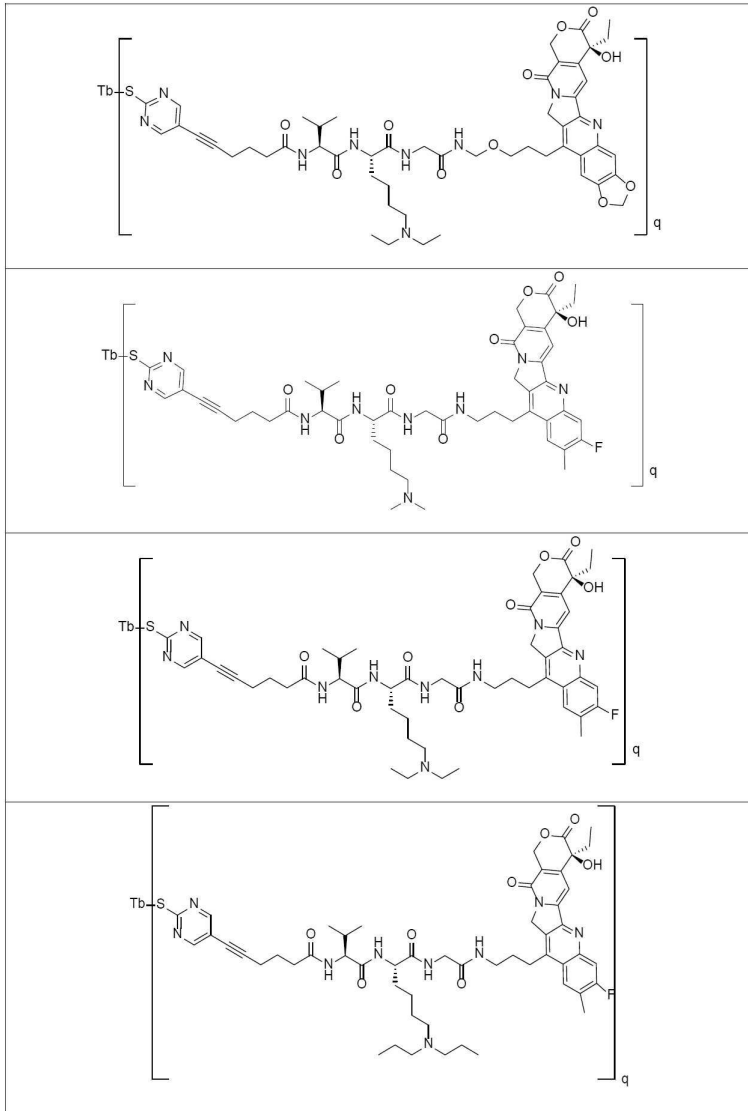
[0296] 여기서 Tb, X, R₁, R₂, R₃, R^a, R^b 및 q는 상기 및 본원에 구체적으로 기재된 임의의 구현예에서 정의된 바와 같다.

[0297] 일부 바람직한 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 중에서 선택된다:

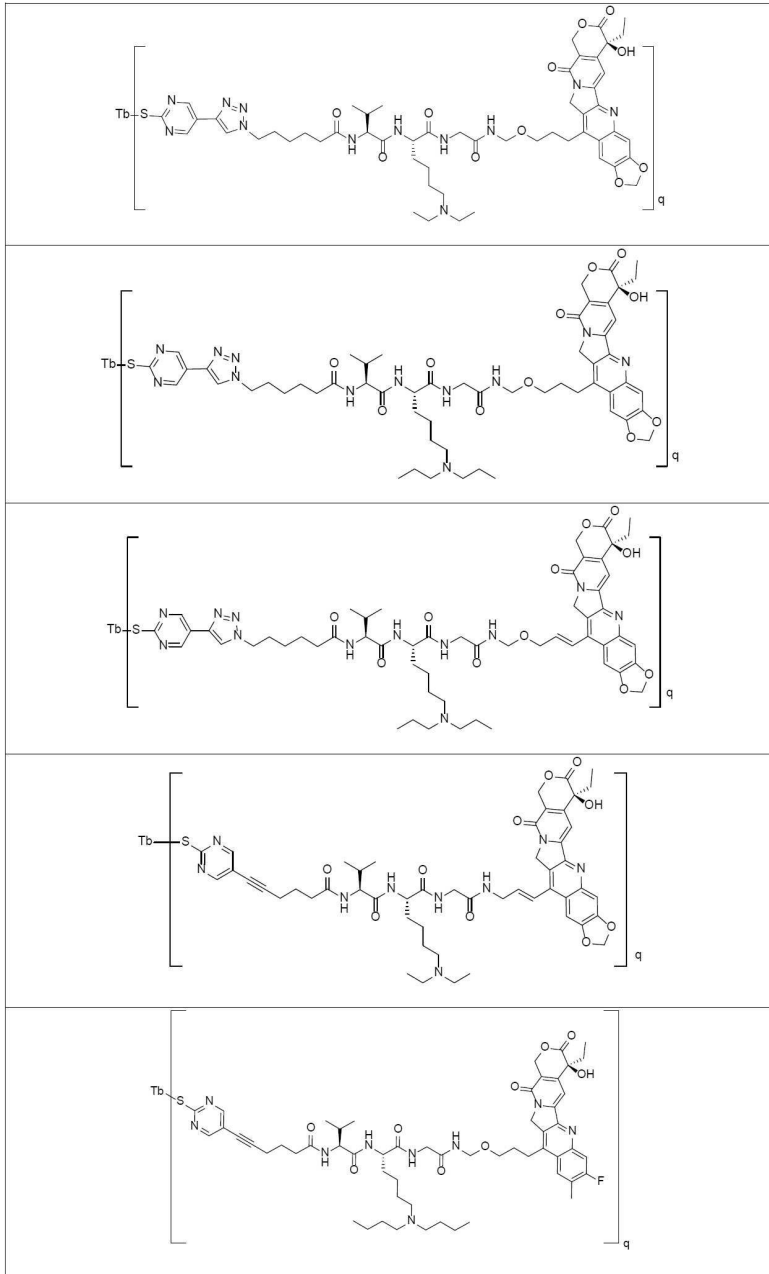
[0298] 리간드-약물 접합체의 구조



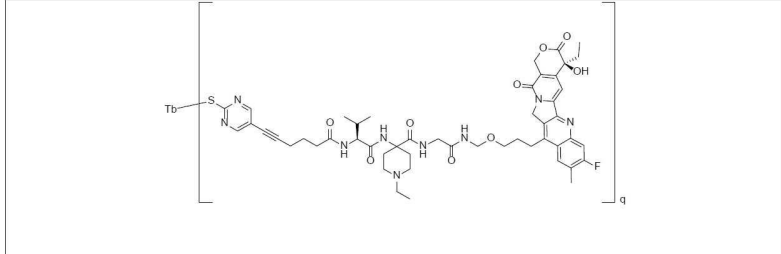
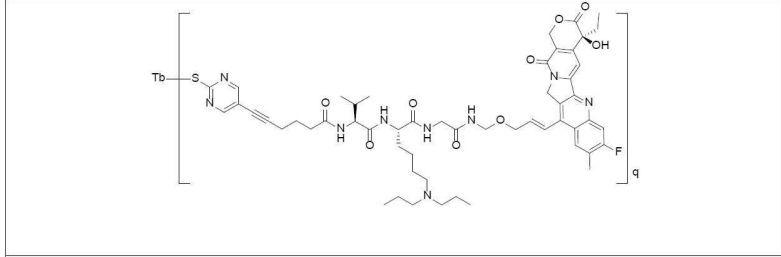
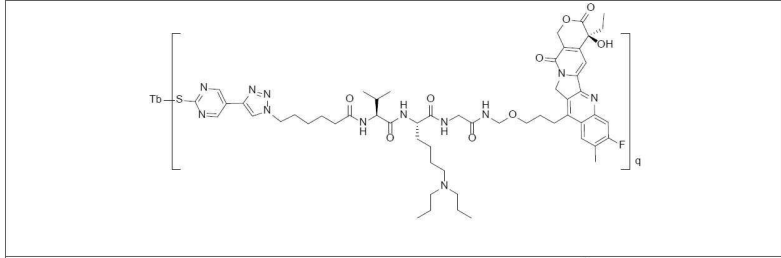
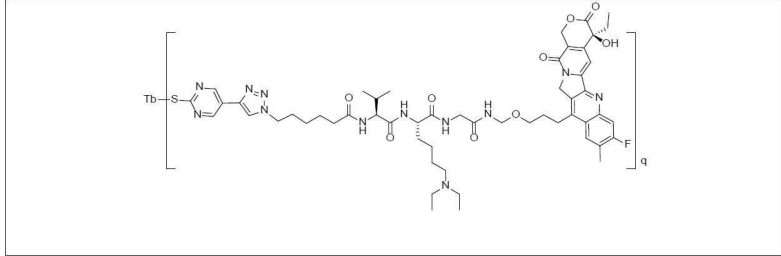
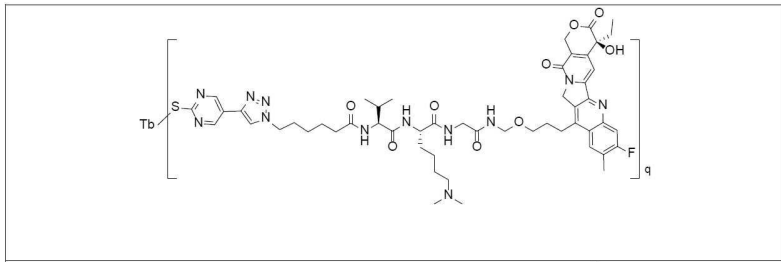
[0299]



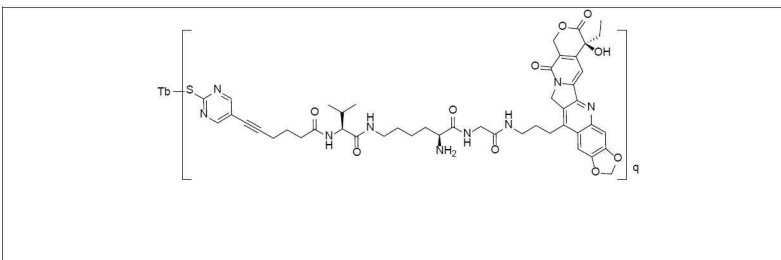
[0300]



[0301]



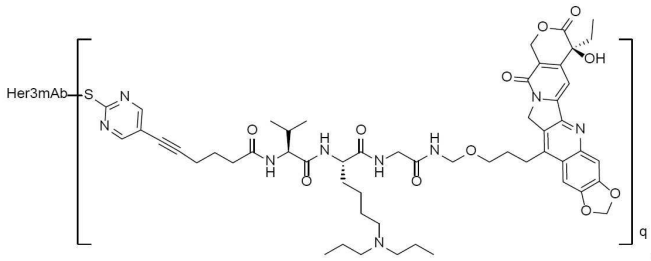
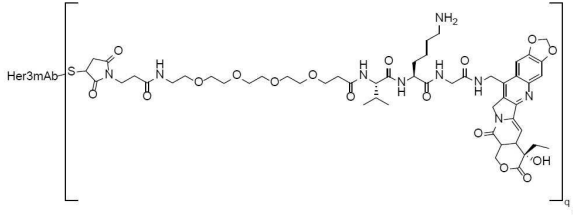
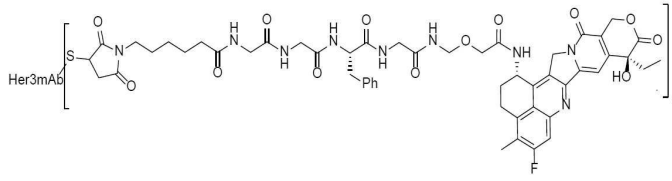
[0302]



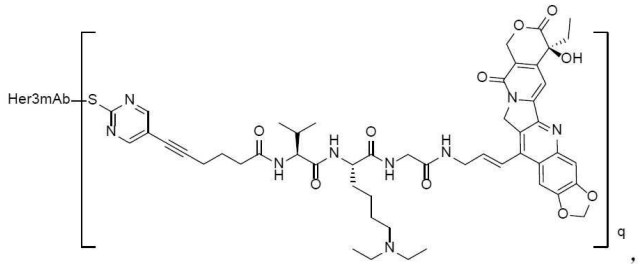
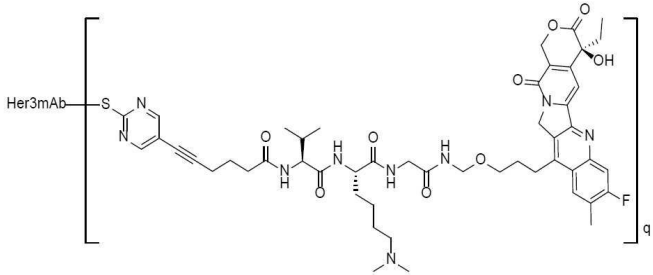
[0303]

[0304] 여기서, Tb는 상기 임의의 구현예에 기재된 바와 같은 Her3 항체이고; q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16이고; q는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8이고;

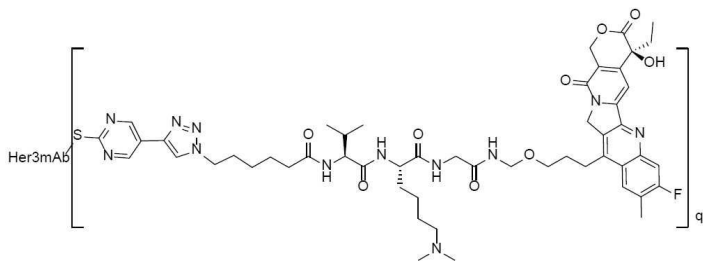
[0305] 예를 들어



[0306]

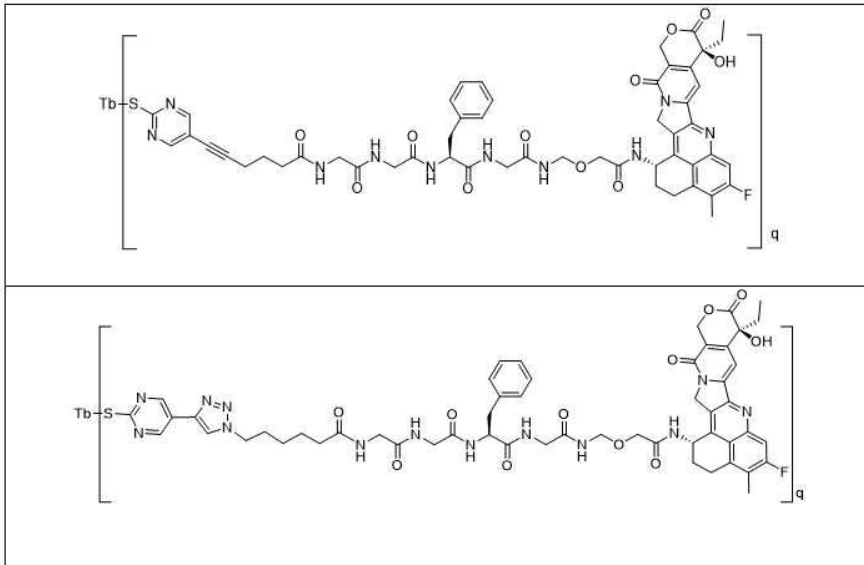


[0307]



[0308] 여기서, Her3mAb는 항체 202-2-1이다.

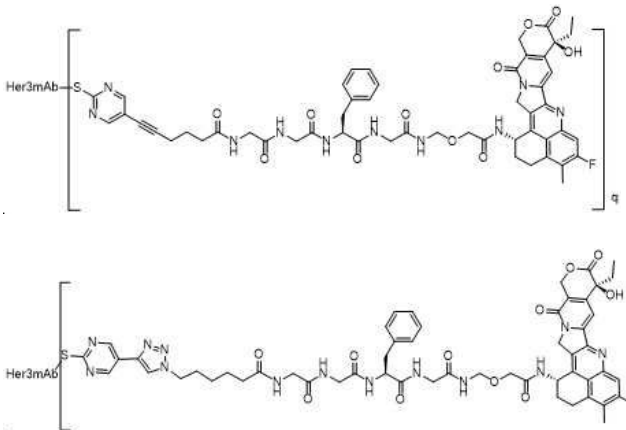
[0309] 일부 바람직한 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 하기 중에서 선택된다:



[0310]

[0311] 여기서, Tb는 상기 임의의 구현예에 기재된 바와 같은 Her3 항체이고; q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16이고; q는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8이다.

[0312] 일부 바람직한 구현예에서, 리간드-약물은 하기 중에서 선택되고:



[0313]

[0314]

[0315] 여기서, Her3mAb는 항체 202-2-1이다.

[0316] 일부 바람직한 구현예에서, 리간드-약물 접합체에서의 q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16이고; q는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다.

[0317] 본 개시내용의 여덟 번째 양태에서, 본 개시내용은 상기 언급된 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물 중 2개 이상을 포함하는 항체-약물 접합체를 제공하고, 항체-약물 접합체 내의 항체-약물 접합체는 1개, 2개 이상의 q 값을 갖는다.

[0318] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체 중 약물 대 항체의 비(DAR)는 1과 10 사이의 정수 또는 소수 중에서 선택된다.

[0319] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체 중 약물 대 항체의 비(DAR)는 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.7, 8.9 및 9 중에서 선택된다.

[0320] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체의 DAR 값은 2 ± 0.5 , 4 ± 0.5 , 6 ± 0.5 , 또는 8 ± 0.5 중에서 선택된다.

[0321] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체의 DAR 값은 2 ± 0.5 , 4 ± 0.5 , 5 ± 0.5 , 6 ± 0.5 , 7 ± 0.5 , 또는 8 ± 0.5 중에서 선택된다.

- [0322] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체의 DAR 값은 8 ± 0.5 , 8 ± 0.4 , 8 ± 0.3 , 8 ± 0.2 , 8 ± 0.1 또는 8.0이다.
- [0323] 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 2 내지 8, 예를 들어 1.5, 2, 4, 6 및 8의 DAR 분포를 갖는 ADC(즉, 1.5, 2, 4, 6 및 8개의 페이로드 중)를 포함한다. 리간드 약물 접합체가 또한 1, 3, 5 및 7의 DAR을 포함할 수 있도록 분해 산물을 생성시킬 수 있다는 점에 유의해야 한다. 더욱이, 혼합물 중 ADC는 또한 8 초과인 DAR을 가질 수 있다. 리간드 약물 접합체는 쇠간 디설파이드의 환원에 이은 커플링에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 리간드 약물 접합체는 DAR이 4 이하인 ADC(즉, 페이로드 종이 4 이하이다) 및 DAR이 6 이상인 ADC(즉, 페이로드 종이 6 이상이다)를 모두 포함한다.
- [0324] 용도, 치료 방법 및 약제학적 조성물
- [0325] 본 개시내용의 아홉 번째 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 첫 번째 양태에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 두 번째 양태에 기재된 다중특이적 항체; 세 번째 양태에 기재된 핵산 분자; 네 번째 양태에 기재된 백터; 다섯 번째 양태에 기재된 숙주 세포; 일곱 번째 양태에 기재된 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 및/또는 여덟 번째 양태에 기재된 항체-약물 접합체뿐만 아니라, 약제학적으로 허용되는 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0326] 본 개시내용의 첫 번째 양태에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 두 번째 양태에 기재된 다중특이적 항체; 세 번째 양태에 기재된 핵산 분자; 네 번째 양태에 기재된 백터; 다섯 번째 양태에 기재된 숙주 세포; 일곱 번째 양태에 기재된 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 및/또는 여덟 번째 양태에 기재된 항체-약물 접합체는 치료적 유효량(therapeutically effective amount)으로 존재할 수 있다.
- [0327] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0328] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용의 숙주 세포, 및 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하며, 여기서 숙주 세포는 이전에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 분자 또는 백터를 포함한다.
- [0329] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용의 다중특이적 항체, 및 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0330] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용의 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 및/또는 항체-약물 접합체뿐만 아니라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0331] 본 개시내용의 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 Her3의 활성을 조절(억제 또는 차단)하기 위한 약제(medicament)의 제조에서의 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산, 백터, 숙주 세포, 다중 특이적 항체, 또는 항체 약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산 분자, 백터, 숙주 세포, 다중 특이적 항체, 또는 항체-약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물은 치료적 유효량으로 존재할 수 있다.
- [0332] 일부 예에서, 본 개시내용은 Her3 활성과 관련된 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산, 백터, 숙주 세포, 다중 특이적 항체, 항체 약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0333] 일부 예에서, 본 개시내용은 Her3 활성과 관련된 종양의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산, 백터, 숙주 세포, 다중 특이적 항체, 항체 약물 접합체, 이의 입체이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물, 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0334] 일부 구현예에서, 암 질환은 식도암(esophageal cancer)(예를 들어, 식도 선암종(esophageal adenocarcinoma))

및 식도 편평세포 암종(esophageal squamous cell carcinoma), 뇌종양(brain tumor), 폐암(lung cancer)(예를 들어, 소세포 폐암(small cell lung cancer) 및 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer)), 편평세포 암종(squamous cell carcinoma), 방광암(bladder cancer), 위암(stomach cancer), 난소암(ovarian cancer), 복막암(peritoneal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 간암(liver cancer), 신장암(kidney cancer), 요로상피암(urothelial cancer), 고형 종양(solid tumor), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 중추신경계 종양(central nervous system tumor)(예를 들어, 신경교종(neuroglioma), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 신경교종(glioma) 또는 육종(sarcoma)), 전립선암(prostate cancer) 또는 갑상선암(thyroid cancer) 중에서 선택된다.

[0335]

일부 구현예에서, 암은 고형 종양이다.

[0336]

일부 구현예에서, 종양은 결장직장암(예를 들어, 결장암), 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐암), 유방암, 및 전립선암 중에서 선택된다.

[0337]

일부 구현예에서, 암은 유방암 또는 폐암(바람직하게는 비-소세포 폐암)이다.

[0338]

또 다른 양태에서, 본 개시내용은 샘플내 Her3의 존재 또는 이의 수준을 검출하기 위한 키트의 제조에 있어서 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 다중특이적 항체의 용도를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기의 작용제 중 하나 이상을 포함하는 진단 또는 치료 키트를 제공한다: 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산, 벡터, 숙주 세포, 다중특이적 항체, 항체-약물 접합체, 또는 약제학적 조성물. 임의로, 진단 또는 치료 키트는 사용 지침을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0339]

도 1A. ELISA에 의한 인간 Her3-his 단백질에 대한 항-Her3 항체의 결합에 대한 분석.

도 1B. ELISA에 의한 원숭이 Her3-his 단백질에 대한 항-Her3 항체의 결합에 대한 분석.

도 1C. ELISA에 의한 래트 Her3-his 단백질에 대한 항-Her3 항체의 결합에 대한 분석.

도 2A. 유세포 분석법에 의한 A549-인간 Her3 세포에 대한 항-Her3 항체의 결합에 대한 분석.

도 2B. 유세포 분석법에 의한 T47D 세포에 대한 항-Her3 항체 202-2-1의 결합에 대한 분석.

도 2C. 유세포 분석법에 의한 MCF-7 세포에 대한 항-Her3 항체 202-2-1의 결합에 대한 분석.

도 3. 종양 세포에서 NRG1에 의한 AKT의 인산화에 대한 항-Her3 항체의 억제.

도 4. 항-Her3 항체에 대한 종양 세포 A549-인간 Her3 세포의 세포내이입에 대한 분석.

도 5A. 인간 Her3 단백질에 대한 결합에 대해 비오틴화 대조용 항체 2와 경쟁하는 항-Her3 항체에 대한 분석.

도 5B-1. 항체 202-2-1의 Fab와 Her3의 복합체는 결합을 보이며, 복합체가 형성되었다.

도 5B-2. 항체 202-2-1의 Fab와 Her3의 복합체에 대한 인터페이스 도면 1, 여기서 점선과 숫자는 서로 상호작용하는 아미노산 측쇄 및 그 거리(Å)를 가리킨다.

도 5B-3. 항체 202-2-1의 Fab와 Her3의 복합체에 대한 인터페이스 도면 2, 여기서 점선과 숫자는 서로 상호작용하는 아미노산 측쇄 및 그 거리(Å)를 가리킨다.

도 6A. PC-9 종양 세포에 대한 항-Her3 항체 202-2-1 ADC 약물의 사멸에 대한 분석.

도 6B. NCI-H358 종양 세포에 대한 항-Her3 항체 202-2-1 ADC 약물의 사멸에 대한 분석.

도 7. NCI-H358 종양 모델에 대한 항-Her3 항체 202-2-1 ADC 약물의 약력학적 시험.

도 8. 하나의 SW480 종양 모델에 대한 항-Her3 항체 202-2-1 ADC 약물의 약력학적 시험.

도 9. 또 다른 SW480 종양 모델에 대한 항-Her3 항체 202-2-1 ADC 약물의 약력학적 시험.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0340]

정의

- [0341] 본 개시내용에서, 달리 명시하지 않는 한, 본원에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본원에 사용되는 세포배양, 생물화학, 핵산화학, 및 면역학 실험실 절차 등은 모두 해당 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 개시내용의 이해를 돕기 위해 관련 용어의 정의 및 설명을 하기에 제공한다.
- [0342] 본원에 사용된 "HER3 리간드"라는 용어는 HER3에 결합하여 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 지칭한다. HER3 리간드의 예에는 뉴레글린 1(NRG) 및 뉴레글린 2, 베타셀룰린, 헤파린 결합 표피 성장 인자(HB-EGF) 및 에피레글린이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0343] 본 개시내용은 HER3 수용체의 입체형태적 에피토프를 인식하는 단리된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이며, 여기서 입체형태적 에피토프는 HER3의 도메인 3의 아미노산 잔기를 포함하고, 항체 또는 이의 단편은 HER3 리간드-독립적인(ligand-independent) 인산화 분석에 의해 평가되는 바와 같이, HER3의 인산화를 억제한다. 한 구현예에서, HER3 리간드-독립적인 인산화 분석은 증폭된 HER2를 갖는 세포를 사용하며, 여기서 증폭된 HER2를 갖는 세포는 SK-Br-3 세포이다.
- [0344] 본원에 사용된 "리간드-의존적인(ligand-dependent) 신호전달"이라는 용어는 리간드 활성화, 예를 들어 리간드에 의한 ErbB(예를 들어, HER3)의 활성화에 의존하는 신호전달을 지칭한다. HER3의 활성화는 하류 신호전달 경로(예를 들어, PI3K)에서 올리고머화(예를 들어, 이중이량체화) 및/또는 HER3 인산화를 증가시킴으로써 입증될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 실시예에 기재된 분석을 사용하여 측정할 때 미처리(대조군) 세포에 비해 항원 결합 단백질(예를 들어 항체)에 노출된 자극된 세포에서 인산화된 HER3의 양을 통계적으로 유의하게 감소시킬 수 있다. HER3를 발현하는 세포는 자연 발생 세포주(예를 들어, MCF7)일 수 있거나, HER3 단백질을 암호화하는 핵산을 숙주 세포에 도입하여 생성된 재조합 세포일 수 있다. 세포 자극은 활성화 HER3 리간드의 외인성 첨가에 의해 또는 활성화 리간드의 내인성 발현에 의해 수행될 수 있다.
- [0345] 본원에 사용된 "리간드-독립적인 신호전달"이라는 용어는 리간드 결합과 무관한 HER3 활성화(예를 들어 인산화)와 같이 리간드 결합을 필요로 하지 않는 신호전달을 지칭한다. 예를 들어, 리간드-독립적인 HER3 활성화는 HER2의 과발현의 결과이거나 EGFR 및 HER2와 같은 HER3 이중이량체 상대의 활성화 돌연변이의 결과일 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 미처리(대조군) 세포에 비해 항원 결합 단백질(예를 들어 항체)에 노출된 세포에서 인산화된 HER3의 양을 통계적으로 유의하게 감소시킬 수 있다. HER3를 발현하는 세포는 자연 발생 세포주(예를 들어, SK Br-3)일 수도 있고, HER3 단백질을 암호화하는 핵산을 숙주 세포에 도입하여 생성된 재조합 세포일 수도 있다.
- [0346] 본원에 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 염"의 예는 약제학적으로 허용되는 음이온을 제공하는 유기산으로 형성된 유기산 부가염이며, 유기산 부가 염에는 포르메이트, 아세테이트, 프로피오네이트, 벤조에이트, 말리에이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 시트레이트, 아스코르베이트, α -케토글루타레이트, α -글리세로포스페이트, 알킬설포네이트 또는 아릴설포네이트가 포함되나, 이에 제한되지 않으며; 바람직하게, 알킬설포네이트는 메틸설포네이트 또는 에틸설포네이트이고; 아릴설포네이트는 벤젠설포네이트 또는 p-톨루엔설포네이트이다. 적합한 무기염, 예를 들어 비제한적으로 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 니트레이트, 비카보네이트 및 카보네이트, 설페이트 또는 포스페이트 등이 또한 형성될 수 있다.
- [0347] 본원에 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"라는 용어는 당업계에 공지되어 있는 (예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995]을 참조하시오), 대상체 및 활성 성분과 약리학 및/또는 생리학적으로 양립성인 담체 및/또는 부형제를 지칭하며, 비제한적으로 pH 조절제, 계면활성제, 보조제(adjuvant), 이온 강도 향상제, 희석제, 삼투압 유지제, 흡수 지연제, 보존제를 포함한다.
- [0348] 약제학적으로 허용되는 염은 당업계에 널리 공지된 표준 절차를 사용하여, 예를 들어 충분한 양의 염기성 화합물을 적합한 산과 반응시켜 약제학적으로 허용되는 음이온을 제공함으로써 획득될 수 있다.
- [0349] 본 개시내용에 있어서, 약제학적으로 허용되는 보조제란, 약제 및 제형의 제조에 사용되는 부형제 및 첨가제를 지칭하며, 활성 성분 외에 안전성이 합리적으로 평가된 약학 제제에 함유되는 물질을 지칭한다. 성형, 담체로서 작용 및 안정성 개선 외에도, 약제학적으로 허용되는 보조제는 또한 가용화, 하이드로 트로프(hydro trope), 느린 방출 및 조절 방출과 같은 중요한 기능을 가지며, 약물의 품질, 안전성 및 유효성에 영향을 미칠 수 있는 중요한 성분이다. 그 공급원에 따라, 천연, 반-합성, 및 완전 합성으로 나눌 수 있다. 기능 및 용도에 따라,

용매, 추진제, 가용화제, 공용매, 유화제, 착색제, 결합제, 봉해제, 충전제, 운할제, 습윤제, 삼투압 조절제, 안정제, 활택제, 풍미제, 보존제, 현탁제, 코팅제, 향료, 부착방지제, 산화방지제, 킬레이트제, 침투촉진제, pH 조절제, 완충제, 가소제, 계면활성제, 발포제, 소포제, 증점제, 봉입제, 보습제, 흡수제, 회석제, 응집제 및 해 교제, 필터 보조제, 방출 차단제 등으로 나눌 수 있으며; 투여 경로에 따라 경구, 주사, 점막, 경피 또는 국소 투여, 비강 또는 경구 흡입 투여 및 안구 투여로 나눌 수 있다. 동일한 약제학적으로 허용되는 보조제는 다양한 투여 경로로 약학 제형에 사용될 수 있으며, 상이한 효과와 용도를 갖는다.

[0350] 약제학적 조성물을 투여 경로에 따라 다양한 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 정제, 캡슐, 과립, 경구 용액, 경구 현탁액, 경구 유화액, 분말, 팅크제, 시럽, 주사제, 좌제, 연고, 크림, 페이스트, 안과 제형, 환제, 임플란트, 에어로졸, 분말 에어로졸, 스프레이 등이 있으며, 여기서 약제학적 조성물 또는 적합한 투여형 은 0.01 mg 내지 1000 mg, 적합하게는 0.1 mg 내지 800 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 500 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 350 mg, 특히 바람직하게는 1 mg 내지 250 mg의 본 개시내용의 항체, 항체 약물 접합체, 이의 입체 이성질체, 이의 전구약물, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 용매화물을 함유 할 수 있다.

[0351] 약제학적 조성물은 주사액, 멸균 주사용 분말 및 농축된 주사용액 등의 주사제 형태로 투여될 수 있다. 그 중 유용한 비히클 및 용매로는 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한 멸균 비휘발성 오일을 또한 모노- 또는 디글리세리드와 같은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있다.

[0352] 본원에 사용된 "치료"라는 용어는 일반적으로 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 지칭하 다. 그 효과는 질병이나 그 증상의 완전하거나 부분적인 예방면에서 예방적; 및/또는 질병 및/또는 질병으로 인 한 부작용의 부분적 또는 완전한 안정화 또는 치유면에서 치료적이다. 본원에 사용된 "치료"는 (a) 질병 또는 증상에 민감하지만 아직 질병 또는 증상이 있는 것으로 진단되지 않은 환자의 질병 또는 증상의 예방; (b) 질병 증상의 억제, 즉 질병의 발병의 예방; 또는 (c) 질병의 증상을 완화시키는 것, 즉 질병 또는 증상의 퇴행을 야 기하는 것을 포함하여, 환자에서 질병의 임의의 치료를 포함한다.

[0353] 본 개시내용에서, "개체"라는 용어는 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 예시적인 인간 개체에는 질병(예를 들어, 본원에 기재된 질병)을 앓고 있는 인간 개체(환자로서 지칭됨) 또는 정상 개체가 포함된다. 본 개시내용 에서 "비-인간 동물"이라는 용어는 비-포유동물(예를 들어, 조류, 양서류, 파충류)과 같은 모든 척추동물 및 비 -인간 영장류, 가축 및/또는 사육되는 동물(예를 들어, 양, 개, 고양이, 소, 돼지 등)과 같은 포유동물을 포함 한다.

[0354] 본 개시내용에서, "유효 용량"은, 투여 후 장애의 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화시키는 화합물의 양을 지 칭한다.

[0355] 본 개시내용에서, "리간드-약물 접합체"란 용어는 생물활성 분자(약물 분자)가 표적 부위에 연결되어 있는 물질을 지칭한다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 생물활성 분자는 링커에 의해 표적화 모이어티에 연결된다. 링커 는 특정 환경(예를 들어, 종양 내 가수분해효소의 존재 및/또는 낮은 pH 환경)에서 또는 특정 작용(예를 들어, 리소솜 프로테아제의 작용) 하에서 분해되어, 생물활성 분자가 표적 모이어티로부터 분리된다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 또는 절단불가능한 단위, 예를 들어 펩티드 또는 디설파이드 결합을 포함 한다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 생물활성 분자는, 특정 환경 또는 작용 하에서 깨질 수 있고, 이에 의해 생물활성 분자를 표적 모이어티로부터 분리할 수 있는 공유 결합에 의해 표적 모이어티에 직접 연결된다. 본 개 시내용의 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 표적화 모이어티, 링커, 및 본 개시내용의 화학식 II의 화합 물 단편을 포함한다.

[0356] 본 개시내용에서, "리간드-약물 접합체"라는 용어는 생물활성 분자(약물 분자)가 항체 또는 이의 항원-결합 단 편에 결합되어 있는 물질을 지칭한다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 생물활성 분자는 링커에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결된다. 링커는 특정 환경(예를 들어, 종양 내 가수분해효소의 존재 및/또는 낮은 pH 환경)에서 또는 특정 작용(예를 들어, 리소솜 프로테아제의 작용) 하에서 분해될 수 있으며, 따라서 생물활성 분자가 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 분리된다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 또는 절단불가능한 단위, 예를 들어 펩티드 또는 디설파이드 결합을 포함한다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 생물활성 분자는, 특정 환경 또는 작용 하에서 깨질 수 있고, 이에 의해 생물활성 분자를 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 분리할 수 있는 공유 결합에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 직접 연결된다. 본 개시 내용의 일부 구현예에서, 리간드-약물 접합체는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 링커, 및 본 개시내용 의 화학식 II의 화합물 단편을 포함한다.

- [0357] 본 개시내용에서, "생물활성 물질", "생물활성 분자" 또는 "약물 분자"라는 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 접합체 내의 생물활성 물질, 생물활성 분자 또는 약물 분자는 항-종양 생물학적 활성을 갖는 분자이다. 예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 및 Lu와 같은 방사성 동위원소; 금속 백금 착체, 금속 금 착체, 옥살리플라틴 등의 금속 착체; 블레오마이신, 핑야마이신과 같은 글리코펩티드 항생제; DNA 토포이소머라제 억제제, 예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제, 캄토테신, 하이드록실캄토테신, 9-아미노캄토테신, SN-38, 이리노테칸, 토포테칸, 벨로테칸, 루비테칸, 토포이소머라제 II 억제제, 액티노마이신 D, 아드리아마이신, 독소루비신, 듀오카마이신, 다우노루비신, 미톡산트론, 포도필로톡신, 에토포시드 등; 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메르캄토포린, 펜토스타틴, 플루다라빈, 클라드리빈, 넬라라빈 등과 같은 DNA 합성을 방해하는 약물; 튜불린 억제제, 빈카 알칼로이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 카바지탁셀 등과 같은 구조 단백질에 작용하는 약물; 세틴/트레오닌 키나제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 아스파테이트 키나제 억제제 또는 히스티딘 키나제 억제제 등과 같은 종양 신호전달 경로 억제제; 또한 프로테아좀 억제제, 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제, 종양 혈관신생 억제제, 사이클린 억제제, 메이탄신 유도체, 칼리케아미신 유도체, 아우리스타틴 유도체, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 유도체, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 또는 종양 세포 성장을 억제하고, 종양 세포의 세포사멸사 및 괴사를 촉진하는 기타 활성 물질을 포함하고; 뉴클레오리신과 같은 효소 및 이의 단편; 항생제; 세균, 진균, 식물 또는 동물로부터 유래된 소분자 독소 또는 효소 활성 독소(이의 단편 및/또는 변이체 포함)와 같은 독소; 성장 억제제; 약물 모듈. "독소"라는 용어는 세포의 성장 또는 증식에 해로운 영향을 미칠 수 있는 물질을 지칭한다.
- [0358] 본 개시내용에서, "소분자"라는 용어는 생물활성 소분자 약물을 지칭한다. 소분자 독소라는 용어는 세포 손상 활성, 즉 어떤 형태로든 세포의 병리학적 변화를 일으키는 상태를 가지며, 세포 손상은 직접적인 손상에만 제한되지 않고, 세포의 구조와 기능에 대한 모든 종류의 손상, 예를 들어 DNA 절단, 염기-이량체 형성, 염색체 절단, 세포 분열 이전에 대한 손상 및 다양한 효소 활성 감소를 포함한다.
- [0359] 본 개시내용에서, "링커"라는 용어는 생물활성 분자(약물 분자)를 표적화 모이어티에 연결하는 단편을 지칭한다.
- [0360] 본 개시내용에서, "표적화 모이어티"라는 용어는 세포 표면 상의 표적(또는 표적의 일부)에 특이적으로 결합할 수 있는 접합체 내의 모이어티를 지칭한다. 표적 모이어티와 표적과의 상호작용을 통해 접합체는 특정 세포 집단에 전달될 수 있다.
- [0361] 본 개시내용에서, 접합체내 표적화 모이어티가 항체인 경우, 접합체는 "약물-항체 접합체"로 지칭될 수 있다.
- [0362] 본 개시내용에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 유도체화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어 티올기를 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 유도체화는 항체가 약물-링커 접합체와 반응하는 그룹 또는 능력을 갖도록 허용한다. 티올-SH는 디설파이드 결합을 절단시켜(예를 들어, 환원제 TCEP를 사용한 환원에 의해) 유도체화할 수 있다.
- [0363] 본 개시내용 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, "a" 및 "the"와 같은 단수형은 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 복수형 의미를 포함한다. 따라서 단수 "a"의 의미에는 "하나 이상"이 포함된다.
- [0364] 본원에 사용된 바와 같이, "암" 및 "종양"이라는 용어는 동일한 의미로 사용된다.
- [0365] 본원에 사용된 바와 같이, "유전자"라는 용어는 DNA뿐만 아니라 그 mRNA, cDNA 및 cRNA도 포함한다.
- [0366] 본원에 사용된 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 핵산과 동일한 의미로 사용되며, DNA, RNA, 탐침, 올리고뉴클레오티드 및 프라이머도 포함한다.
- [0367] 본원에 사용된 "Tb"라는 용어는 "표적 결합(target bond)"의 약어로서 항체 또는 표적에 결합하는 모든 분자를 포함하며, "Ab"라는 용어는 "항체"의 약어로서 "항체"와 상호교환적으로 사용된다.
- [0368] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 상호교환적으로 사용된다.
- [0369] 본원에 사용된 "세포"라는 용어는 개별 동물내의 세포 및 배양된 세포를 또한 포함한다.
- [0370] 본 개시내용에서 사용된 "Her3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편"은 Her3, 예를 들어 인간 Her3에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭한다.
- [0371] 본원에 사용된 "Her3"은 "ErbB3"으로도 공지되어 있으며 ERBB 패밀리의 막관통 수용체 티로신 키나제 분자이다.

HER3 유전자는 12번 염색체의 긴 아암(12q13.2)에 위치하며 180 kDa 단백질을 암호화한다. HER3의 세포외 도메인은 4개의 하위 도메인(도메인 1-4)으로 나뉜다: 도메인 1 및 도메인 3은 리간드 결합을 담당하는 류신-풍부 베타 나선 영역이고; 도메인 2 및 도메인 4는 시스테인-풍부 영역이다. 또한 도메인 2에는 다른 수용체와의 상호작용에 필요한 이량체 아암도 포함되어 있다. 막관통 도메인 다음에는 가요성 막 인접 영역, 키나제 구조 및 C-말단 꼬리를 포함하는 세포내 도메인이 있다. 리간드 부재 하에서, 도메인 2와 도메인 4 사이의 결합은 HER3을 불활성으로 만든다. 일단 리간드에 결합되면, 이종이량체의 키나제 구조의 나머지 절반은 HER3의 C-말단 꼬리에 있는 티로신 잔기를 인산화한다.

[0372] 본 개시내용과 관련된 Her3은 당업계에서 통상적인 Her3(예를 들어, 인간 Her3), 예를 들어 가용성 Her3, 막 형태의 Her3 등일 수 있으며, 또한 Her3 변이체 1 및/또는 Her3 변이체 2를 나타낸다. 일부 구현예에서, 인간 Her3은 수납 번호 Uniport ID: P21860-1 또는 NCBI:NP_001973.2로 표시된다. 일부 구현예에서, 인간 Her3은 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0373] 서열번호 31에 제시된 Her3(1-643)은 Uniport ID: P21860-1로부터 기원하였으며, 여기서 서열번호 31은 하기와 같다:

```
MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTYLYRCEVVMGNLEI
VLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSLPLPLNLRVVRGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTSSHAL
RQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGP
GSEDCQLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECAGGCSGPQDITDCFACRFHNSGACVPRCPQL
VYNKLIQLEPNPHTKYQYGGVVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCP
KACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGY
LNIQSWPPMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYH
HSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRRRDCVAEGKVCPLCSSGGCWGPGGQCLSCRNYSRGGVCV
THCNFLNGEPREFAHEAEFCFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGA
KGPIYKYPDVQNECRPCHECTQCGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLT.
```

[0374]

[0375] KD는 Kd(특정한 결합 분자-표적 단백질 상호작용의 해리속도) 대 Ka(특정한 결합 분자-표적 단백질 상호작용의 결합속도)의 비(또는 Kd/Ka, 몰농도(M)로 표시)로부터 획득된 해리상수를 지칭한다. KD 값은 해당 분야에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 결합 분자의 KD를 결정하는 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어 Biacore™(GE Healthcare Life Sciences) 시스템과 같은 바이오센서 시스템의 사용에 의한다.

[0376] 본원에 사용된 "항원-결합 단편"이라는 용어는 항원-결합 활성을 갖는 항체의 부분 단편을 지칭하며, 여기서 단편은 항체의 전체 또는 부분 기능성을 갖고, 비제한적으로 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 예를 들어 단쇄 Fv(scFv), 디설파이드-연결된 Fv(sdFv) 또는 디-scFv 등을 포함한다. 이 용어는 또한 환원 조건 하에서 F(ab')₂를 처리하여 획득된 항체의 가변 영역의 1가 단편인 Fab'를 포함한다. 그러나, 단편이 항원에 대한 결합 친화성을 갖고 있는 한, 이 용어는 이들 분자에만 제한되지 않는다. 또한, 이러한 기능성 단편에는 항체 단백질의 전장 분자를 적절한 효소로 처리하여 획득된 단편뿐만 아니라 유전자 변형 항체 유전자를 사용하여 적절한 숙주 세포에서 생성된 단백질도 포함된다.

[0377] 본원에 사용된 "항체 분자" 또는 "항체"는 가장 넓은 해석에서 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있게 하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. 따라서, 항체라는 용어는 전체 항체 분자뿐만 아니라, 상기 항체의 단편뿐만 아니라 상기 항체의 변이체(유도체 포함) 및 항체 단편도 광범위하게 포함한다. "항체 분자" 또는 "항체"가 항원-결합 단편과 동일한 맥락에서 사용되는 경우, "항체 분자" 또는 "항체"는 온전한 항체 분자 또는 전장 항체를 지칭한다.

[0378] "단쇄 Fv" 또는 "scFv"라는 용어는 항체의 VH 도메인에 연결된 항체의 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, Her3에 면역특이적으로 결합하는 항체는 다른 항원과 교차반응할 수 있고, 바람직하게는 다른 항원과 교차반응할 수 없다. Her3에 면역특이적으로 결합하는 항체는 예를 들어 면역분석 또는 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 확인될 수 있다. "온전한" 항체 또는 "전장" 항체는 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 단백질을 지칭하며, 단백질은 하기를 포함한다: (1) 중쇄의 경우, 3개의 도메인 CH1, CH2, CH3을 포함하는 중쇄의 가변 영역(본원에서는 "VH"로 약칭함) 및 불변 영역; 및 (2) 경쇄의 경우, 경쇄의 가변 영역(본원에서는 "VL"로 약칭됨) 및 도메인 CL을 포함하는 경쇄의 불변 영역. 본 개시내용의 항체에는 단클론성, 다중특이적, 인간 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 항-이디오

타입(항-Id) 항체(예를 들어, 본 개시내용의 항체의 항-Id 항체 포함), 및 상기 언급된 항체 중 임의의 항체의 에피토프-결합 단편. 본 개시내용의 면역글로불린 분자는 면역글로불린의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 임의의 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 임의의 하위부류일 수 있다. 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 표 1에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체 중 어느 하나를 갖는 VH 도메인, VH CDR, VL 도메인, 또는 VL CDR을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0379] 본원에 사용되는 "Fab"라는 용어는 상기 기재된 바와 같은 환원 조건 하에서 F(ab')₂를 처리하여 획득된 항체 가변 영역의 1가 단편을 지칭한다. 다만, 본 개시내용의 Fab'에는 유전자 변형 항체 유전자를 사용하여 생성된 Fab'도 포함된다.

[0380] 본원에 사용된 "scFv"라는 용어는 VL 및 VH 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄를 지칭하며, 여기서 VL 및 VH는 링커에 의해 또는 직접적으로 연결된다(예를 들어 하기 문헌을 참조하십시오: Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); 및 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Eds. Roseburg and Moore, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)). 이러한 scFv 분자는 일반적인 구조: NH₂-VL-링커-VH-COOH 또는 NH₂-VH-링커-VL-COOH를 가질 수 있다. 선행 기술의 적합한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 이루어진다. 예를 들어, 아미노산 서열(GGGGS)₄를 갖는 링커가 사용될 수 있으며, 이의 변이체도 사용될 수 있다(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). 본 개시내용에 사용될 수 있는 다른 링커는 하기의 문헌에 기재되었다: Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu et al (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov et al (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 and Roovers et al (2001), Cancer Immunol. 일부 경우에, scFv의 VH와 VL 사이에 디설파이드 결합이 또한 존재할 수도 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "디-scFv"라는 용어는 2개의 scFv가 연결되어 형성된 항체 단편을 지칭한다.

[0381] "Her3 변이체"라는 용어는 HER3 폴리펩티드, HER3 단편, 항-HER3 항체 또는 이의 항체 단편과 유사하거나 동일한 기능을 갖지만, 유사하거나 동일한 HER3 폴리펩티드, HER3 단편, 항-HER3 항체 또는 이의 단편의 아미노산 서열, 또는 유사하거나 동일한 HER3 폴리펩티드, HER3 단편, 항-Her3 항체 또는 이의 단편의 구조를 반드시 포함할 필요는 없는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0382] 본원에 사용된 바와 같이, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 변이체 및 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 존재한다 하더라도, 상기는 여전히 Her3에 결합하는 활성을 갖는다.

[0383] 본원에 사용된 바와 같이, 2개의 아미노산 서열 사이의 상동성 백분율은 2개의 서열 사이의 동일성의 백분율과 동일하다. 두 서열 사이의 서열 동일성 백분율은 간격 수와 길이를 고려하여 서열이 공유하는 일치하는 위치 수의 함수이다(즉, 상동성% = 일치하는 위치 수/위치 총 수 X 100). 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 각 간격의 서열 비교 및 서열 간의 동일성 백분율 결정은 당업계에 일반적으로 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이러한 서열 비교 및 동일성 백분율 결정은 수학적 알고리즘에 의해 실현될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Meyers and Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17]의 알고리즘(ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합됨)은 아미노산 서열 사이 및/또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율을 결정하는 데 사용될 수 있다. 또한 Accelrys에서 온라인으로 획득한 GCG 패키지의 GAP 프로그램(디폴트 매개변수 사용)을 사용하여 아미노산 서열 간 또는 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 백분율을 결정할 수 있다. 한 구현예에서, 두 서열은 동일한 길이를 갖는다.

[0384] "에피토프"라는 용어는 동물, 바람직하게는 포유동물에서 항원성 또는 면역원성 활성을 갖는 Her3의 일부를 지칭한다. 면역원성 활성을 갖는 에피토프는 동물에서 항체 반응을 촉발하는 Her3의 일부이다. 항원성 활성을 갖는 에피토프는 항체가 면역특이적으로 결합하는 Her3의 일부이며, 이는 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 항원성 에피토프가 반드시 면역원성일 필요는 없다.

[0385] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 에피토프는 합성 펩티드 방법, 면역 정보학 예측, 폴리펩티드 활성 결정, 에피토프 펩티드 스퀀링 방법, 파지 디스플레이 기술, X-선 회절 및 핵자기공명 분석, 상동성 항체 모델링 단백질 도킹 예측 방법과 같은 기존 기술에 의해 결정될 수 있다. 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Her3 도메인 3에 결합하는 에피토프를 갖는다.

[0386] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 본원에 사용된 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"라는 문구는 공통 에피토프에 결합하는 상이한 항체를 지칭한다. 제2

항체가, 제1 항체가 결합하는 펩티드의 일부 또는 3차 구조의 일부에 결합하는 경우, 제1 항체와 제2 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 판단될 수 있다.

- [0387] "에피토프 202-2-1" 또는 "202-2-1 에피토프"는 항체 202-2-1에 결합하는 HER3의 세포외 도메인내 영역이다. 이 에피토프는 HER3의 막관통 도메인에 가깝고 HER3의 도메인 3 내에 있다. "에피토프 202-2-1"은 서열번호 31에 제시된 Her3의 466번 위치의 히스티딘, 470번 위치의 트립토판, 471번 위치의 트레오닌, 478번 위치의 트레오닌, 483 내지 487번 위치의 (아스파르트산-이소류신-리신-히스티딘-아스파라긴), 484번 위치의 이소류신, 490번 위치의 아르기닌 및 491번 위치의 아르기닌으로 구성된다.
- [0388] 본원에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 포함된 CDR은 당업계에 공지된 다양한 넘버링 시스템에 의해 식별될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 포함된 CDR은 바람직하게는 Kabat, Chothia, AbM 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 결정된다.
- [0389] 본원에 사용된 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기라는 용어는 상기 정의된 CDR 잔기를 제외하고 항체의 가변 영역 내의 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0390] 본원에 사용된 "생식계열 항체 유전자"라는 용어는 비-립프구에서 발견되는 면역글로불린을 암호화하는 유전자로서, 발견되는 특정 면역글로불린의 유전적 재배열 및 성숙을 초래하는 성숙 과정을 거치지 않은 유전자이다. 본 개시내용의 다양한 구현예에 의해 제공되는 한 가지 이점은 생식계열 항체 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열이 성숙한 항체 유전자에 의해 암호화되는 것보다 동물종 개체의 더 특징적이고 중요한 아미노산 서열 구조를 유지한다는 인식에 있다. 따라서, 이는 종에 치료적으로 적용될 때 상기 종에 의해 이물질로 인식될 가능성이 적다.
- [0391] 아미노산 치환에 관해서, 본 명세서에서는 보존적 아미노산 치환이 바람직하다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 측쇄와 연관된 아미노산 세트 내에서 발생하는 치환을 지칭한다. 바람직한 아미노산 세트는 하기와 같다: 산성 세트(아스파르트산 및 글루탐산); 염기성 세트(리신, 아르기닌 및 히스티딘); 비극성 세트(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판); 및 하전되지 않은 극성 페밀리(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌 및 티로신). 보다 바람직한 아미노산 세트는 하기와 같다: 지방족 하이드록실(세린 및 트레오닌); 아미드-함유 세트(아스파라긴 및 글루타민); 지방족 세트(알라닌, 발린, 류신 및 이소류신); 및 방향족 세트(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신). 이러한 아미노산 치환은 원래의 아미노산 서열을 갖는 물질의 성질을 손상시키지 않는 범위 내에서 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0392] 또한, 배양된 포유동물 세포에서 생성된 항체의 중쇄 카르복실 단부에서 리신 잔기가 결실되어 있는 것으로 공지되어 있으며(*Journal of Chromatography A*, 705: 129-134 (1995)), 또한 배양된 포유동물 세포에서 생성된 항체의 중쇄 카르복실 단부에서 2개의 아미노산 잔기(글리신 및 리신)가 결실되고, 카르복실 말단에서 새로운 프롤린 잔기가 아미드화되는 것으로 공지되어 있다(*Analytical Biochemistry*, 360:75- 83(2007)). 그러나 이러한 중쇄 서열의 결실 및 변형은 항체의 항원 결합 친화도 및 효과기 기능(보체 활성화, 항체 의존성 세포 세포 독성 등)에 영향을 미치지 않는다.
- [0393] 본 개시내용의 IgG 아이소타입 대조용 항체는 당업자에게 충분히 공지되어 있으며 구입 또는 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간 항-Hen Egg 리소자임 IgG(항-HEL, 예를 들어 인간 IgG1, hIgG1로 약칭됨)의 서열은 Acierno et al.(Acierno et al. *J Mol Biol.* 2007; 374(1): 130-46)에 의해 공개된 "친화도 성숙이 항-단백질 항체의 Fv 도메인의 안정성과 가소성을 증가시킨다"에서 Fab F10.6.6 서열의 가변 영역으로부터 유래된다. Hen Egg 리소자임에 대한 통상적인 hIgG1 항체인 항-hel-hIgG1은 Baiyin Biological(카탈로그 번호: B117901)에서 구입할 수 있다. 이는 혼자서 제조할 수도 있다. 제조 방법은 하기와 같다: 인간 IgG 항체의 아미노산 코돈 최적화 및 중쇄 및 경쇄(전체 서열 또는 가변 영역) 유전자의 유전자 합성이 문헌["*Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd Edition)*"]에 도입된 표준 기술에 따라, Nanjing GenScript Biotech Corp.에서 수행된다. 중쇄 및 경쇄 유전자를 각각, PCR, 효소 절단, DNA 겔 회수, 절찰 형질전환, 콜로니 PCR 또는 효소 절단 식별과 같은 표준 분자 클로닝 기법에 의해 포유동물 발현 시스템의 항체 중쇄 발현 벡터 및 항체 경쇄 발현 벡터에 서브클로닝하고, 재조합 발현 벡터의 중쇄 및 경쇄 유전자를 추가로 서열분석하였다. 서열분석에 의해 서열이 정확하게 검증된 후, 다수의 무-엔도톡신 등급의 발현 플라스미드를 제조한 다음, 재조합 항체 발현을 위해 중량 및 경쇄 발현 플라스미드를 HEK293 세포에 일시적으로 공동형질감염시켰다. 7일 배양 후, 세포 배양물을 수집하고 rProtein A 친화성 컬럼(GE)으로 정제하였다. 수확된 항체 샘플의 품질은 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC 표준 분석 기법에 의해 결정되었다.

[0394] 본원에 언급된 20개의 통상적인 아미노산은 통상적인 사용법에 따라 기록되었다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 문헌[Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))]을 참조하시오. 본원에서 사용된 "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용된다. 그리고 본 개시내용에서 아미노산은 일반적으로 당업계에 주지된 1글자 및 3글자 약어로 표현된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있고; 아르기닌은 R 또는 Arg로 표시될 수 있으며; 글리신은 G 또는 Gly로 표시될 수 있고; 글루타민은 Q 또는 Gln으로 표시될 수 있다.

[0395] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"라는 용어는 대상체 및 활성 성분과 약리학 및/또는 생리학적으로 양립성인 담체 및/또는 부형제를 지칭하며, 이는 당업계에 공지되어 있고(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995] 참조), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 향상제, 희석제, 삼투압 유지제, 흡수 지연제, 보존제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0396] 본원에 사용된 바와 같이, "예방"이라는 용어는 대상체에서 질병, 장애 또는 증상(예를 들어, 종양 및 감염성 질환(infectious disease))의 발생을 예방하거나 지연시키기 위해 수행되는 방법을 지칭한다. 본원에 사용되는 "치료"라는 용어는 유익하거나 원하는 임상 결과를 얻기 위해 수행되는 방법을 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 유익하거나 원하는 임상 결과에는 증상의 완화, 질병의 정도의 감소, 질병 상태의 안정화(즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 둔화, 질병 상태의 개선 또는 경감, 및 검출가능 여부에 관계없이 증상의 완화(부분적이든 전체적이든)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, "치료"는 예상 생존 기간(치료를 받지 않는 경우)과 비교하여 생존 기간을 연장하는 것을 의미할 수도 있다.

[0397] 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"라는 용어는 포유동물, 예를 들어 비-인간 영장류 포유동물 또는 인간과 같은 영장류 포유동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 대상체(예를 들어, 인간)는 종양 및 감염성 질환을 앓고 있거나 그러한 질환을 앓을 위험이 있다.

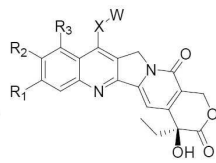
[0398] 본원에 사용된 바와 같이, "유효량"이라는 용어는 원하는 효과를 달성하거나 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 질병(예를 들어, 종양 및 감염성 질병)을 예방하는 유효량은 질병(예를 들어, 종양 및 감염성 질병)의 발생을 예방, 정지 또는 지연시키는 데 충분한 양이다. 질병 치료 유효량은 이미 질병을 앓고 있는 환자의 질병 및 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양이다. 이러한 유효량의 결정은 전적으로 당업자의 능력 내에 있다. 예를 들어, 치료 유효량은 치료할 질병의 중증도, 환자 자신의 면역계의 일반적인 상태, 연령, 체중, 성별과 같은 환자의 일반적인 조건, 약물을 투여하는 방식, 및 동시에 투여되는 다른 치료에 따라 달라질 것이다.

[0399] 본원에 사용된 바와 같이, "효과기 기능"이라는 용어는 항체 아이소타입에 따라 달라지는 항체의 Fc 영역(고유 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열의 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다.

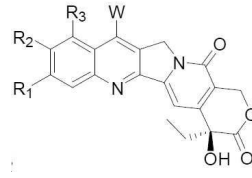
[0400] "약제학적으로 허용되는"이라는 용어는 분자 자체, 분자 단편 또는 조성물이 동물 또는 인간에게 적절하게 투여되었을 때 유해하거나 알레르기 또는 기타 부작용을 일으키지 않는다는 것을 의미한다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 이의 성분이 될 수 있는 일부 물질의 구체적인 예에는 당(예를 들어, 락토오스), 전분, 셀룰로오스 및 이의 유도체, 식물성 오일, 젤라틴, 폴리올(예를 들어, 프로필렌 글리콜), 알긴산 등이 포함된다.

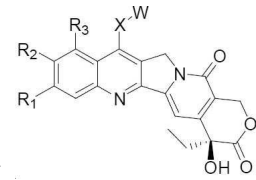
[0401] 암에 대한 항체 및 항체-약물 접합체의 생체내 치료 효과를, 실험 동물을 사용하여, 예를 들어 Her3-발현 종양 세포주가 이식된 누드 마우스에 항체를 투여하고 암세포의 임의의 변화를 측정하여 결정할 수 있다.

[0402] 암 유형의 예는 폐암, 결장직장암 등이 있다.

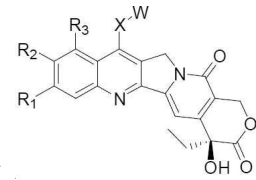
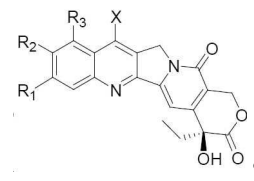


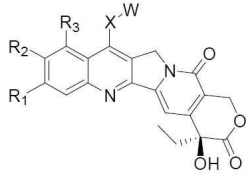
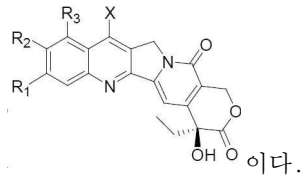
[0403] 본원에서, "직접 결합"이라는 용어는 화학식 II 로 표시되는 화합물에서와 같이, 양쪽 그룹



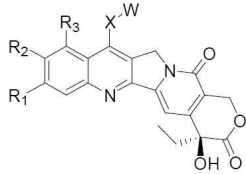
이 직접 연결됨을 의미하며, X가 직접 결합인 경우 구조식은 이다. 다른 직접 결합은 전술한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.

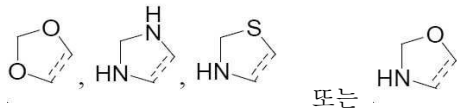
[0404]


본원에 사용된 바와 같이, "존재하지 않는"이라는 용어는 화학식 II 에서와 같이 그룹이 존재하지 않음을 의미하며, W가 존재하지 않는 경우 이의 구조식은 이다.

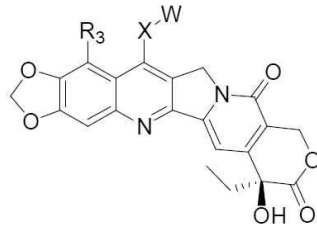


[0405]

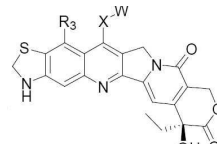
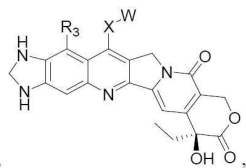
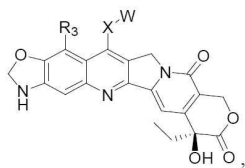
화학식 II 로 표시되는 화합물에서, R₁ 및 R₂는 이들 둘 다가 부착된 탄소 원자와 함께




또는 을 형성하고, "점선"은 헤테로사이클릭 고리가 벤젠 고리에 융합되어,



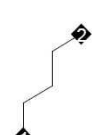
예를 들어

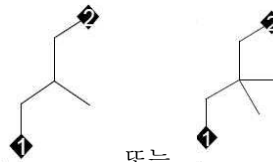


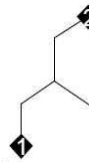
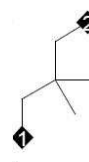
[0406]

또는 을 형성함을 가리킨다.

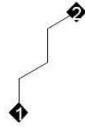
[0407]

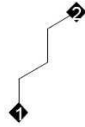
본원에서, X가 예를 들어 "X는 임의로 치환된  중에서 선택되고 치환체는 1 또는 2개의 C1-4 알킬 그룹

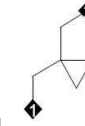


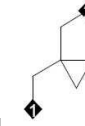
(예를 들어, 메틸) 중에서 선택된다"로서 정의되면, X는 예를 들어  또는  일 수 있다. X의 다

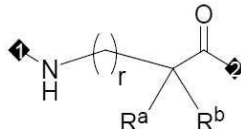
른 유사한 정의는 전술한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.



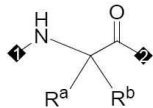
[0408] 본원에서, X가 예를 들어 "X는 임의로 치환된  중에서 선택되고 치환체는 2개의 C1-4 알킬 그룹(예를 들어, 메틸) 중에서 선택되며 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 C3-6 사이클로알킬(예를 들어, 사이클로프로



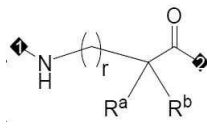
필)을 형성한다"로서 정의되면, X는 예를 들어  일 수 있다. X의 다른 유사한 정의는 전술한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.

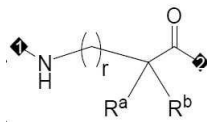


[0409] AA¹로 표시되는 아미노산 잔기의 구조  에 있어서, r이 0인 경우, AA¹로 표시되는 아미노산

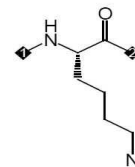


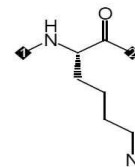
잔기의 구조는  가 될 것임을 당업자는 이해할 것이다.

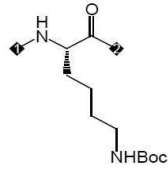


[0410] AA¹로 표시되는 아미노산 잔기의 구조  에 있어서, R^a 및 R^b가 이들이 둘 다 부착된 탄소 원자와 함께 4-10원 헤테로사이클을 형성하고, 4-10원 헤테로사이클이 하나 이상의 R⁰로 임의로 치환되는 경우, 여기서 "4-10원 헤테로사이클이 하나 이상의 R⁰로 임의로 치환된다"라는 용어는 4-10원 헤테로사이클이 비치환되거나 하나 이상의 R⁰로 치환될 수 있음을 의미하며, 더 많은 R⁰의 경우에, 각 R⁰의 정의는 동일하거나 상이할 수 있다. 다른 유사한 정의는 전술한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.

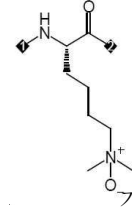
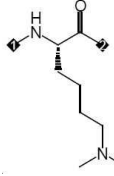
[0411] 본원에서, 예를 들어 L₃이 Lys, Val-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Ala-Asp, Gly-Gly-Phe-Gly, Val-Lys-Gly, Val-Ala, Lys-Ala-Asn 중에서 선택되는 경우, "리신(Lys)의 원위 아미노 그룹은 3급-부톡시카르보닐, C1-6 알킬(바람직하게는 메틸), 0 중에서 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체로 임의로 치환된다"는 L₃의 각 옵션에서 Lys의 원위 아미노 그룹이 3급-부톡시카르보닐, C1-6 알킬(바람직하게는 메틸), 0 중에서 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체로 임



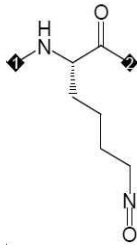
의로 치환된다는 것을 의미한다. 본원에서 "Lys의 원위 아미노 그룹"은 리신 잔기  의 네이키드 아미노 그룹 -NH₂를 지칭한다. "리신(Lys)의 원위 아미노 그룹은 3급-부톡시카르보닐, C1-6 알킬(바람직하게는 메틸), 0 중에서 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체로 임의로 치환된다"는 리신(Lys)의 원위 아미노 그룹이 치환되지 않을 수도 있거나, 또는 3급-부톡시카르보닐, C1-6 알킬(바람직하게는 메틸), 0 중에서 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체로 치환될 수 있다는 것을 가리킨다. 예를 들어, 상기는 1개의 3급-부톡시카르보닐 그룹에 의해 치환될



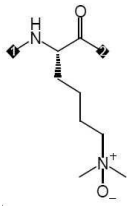
수 있다, 즉 상기는 C(CCN(C)C)C(=O)N 가 되거나, 또는 2개의 메틸에 의해 치환될 수 있다, 즉 상기는



C(CCN(C)C)C(=O)N 가 되거나, 또는 2개의 메틸 및 하나의 O에 의해 치환될 수 있다, 즉 상기는 C(CCN(C)C)C(=O)N 가 된다. "리신(Lys)의 원위 아미노 그룹이 O로 치환된다"는 것은 리신(Lys)의 원위 아미노 그룹이 옥소로 치환된다는



것, 즉 상기가 C(CCN(C)C)C(=O)N 가 되고, 원위 아미노 그룹이 2개의 메틸 그룹으로 추가로 치환되는 경우, 상기가



C(CCN(C)C)C(=O)N 가 된다는 것을 의미하는 데 유의한다.

- [0412] 본 명세서의 다양한 부분에서, 본 개시내용의 화합물의 치환체는 그룹 유형 또는 범위에 따라 개시된다. 구체적으로, 본 개시내용은 이들 그룹 유형 또는 범위의 각 구성원의 각각의 개별 하위 조합을 포함한다. 예를 들어, "C1-6 알킬"이라는 용어는 특히, 독립적으로 개시된 바와 같이 메틸, 에틸, C3 알킬, C4 알킬, C5 알킬 및 C6 알킬을 지칭한다.
- [0413] 본원에 사용된 바와 같이, "C1-6 알킬"이라는 용어는 예를 들어 "C1-3 알킬" 또는 "C1-4 알킬", 메틸, 에틸을 포함하여 1-6개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 알킬 그룹을 지칭하고, 구체적인 예에는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, 펜틸, 헥실이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0414] 본원에 사용된 바와 같이, "C₁₋₄ 알킬"이라는 용어는 예를 들어 "C₁₋₃ 알킬", 메틸, 에틸 등을 포함하여 1-4개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 알킬 그룹을 지칭한다. 구체적인 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸이 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0415] 본원에 사용된 바와 같이, "C₂₋₆ 알케닐"이라는 용어는 예를 들어 "C₂₋₄ 알케닐" 등을 포함하여, 적어도 하나의 이중 결합 및 2-6개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄, 분지쇄 또는 환상 알케닐 그룹을 지칭한다. 예에는 비닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 1,3-부타디에닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-펜테닐, 1,3-펜타디에닐, 1,4-펜타디에닐, 1-헥세닐, 2-헥세닐, 3-헥세닐, 1,4-헥사디에닐, 사이클로펜테닐, 1,3-사이클로펜타디에닐, 사이클로헥세닐, 1,4-사이클로헥사디에닐 등이 포함되지만 이들로 제한되지는 않는다.
- [0416] 본원에 사용된 바와 같이, "C₂₋₆ 알키닐"이라는 용어는 예를 들어 "C₂₋₄ 알키닐" 등을 포함하여 적어도 하나의 삼중 결합 및 2-6개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지된 알키닐 그룹을 지칭한다. 예에는 에티닐, 프로피닐, 2-부티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 4-메틸-2-펜티닐, 2-헥시닐, 3-헥시닐, 5-메틸-2-헥시닐 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0417] 본원에 사용된 바와 같이, "할로젠"이라는 용어는 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 포함한다.

- [0418] 본원에 사용된 바와 같이, "3-6원 사이클로알킬" 또는 " C_{3-6} 사이클로알킬"이라는 용어는 사이클로프로판닐(즉, 사이클로프로필), 사이클로부타닐(즉, 사이클로부틸), 사이클로펜타닐(즉 사이클로펜틸), 사이클로헥실을 포함하여 3-6개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 사이클릭 알킬을 지칭한다.
- [0419] 본원에 사용된 바와 같이, "3-7원 카르보사이클로알킬" 또는 " C_{3-7} 사이클로알킬"이라는 용어는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸을 포함하여 3-7개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 사이클릭 알킬을 지칭한다.
- [0420] 본원에 사용된 바와 같이, " C_{1-6} 알콕시"라는 용어는 산소 원자에 의해 모 분자 모이어티에 부착된 상기 정의된 알킬 그룹을 지칭한다. 구체적인 예에는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, 3급-부톡시, 펜톡시, 헥실옥시 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0421] 본원에 사용된 바와 같이, " C_{1-4} 알콕시"라는 용어는 산소 원자에 의해 모 분자 모이어티에 부착된 상기 정의된 알킬 그룹을 지칭한다. 구체적인 예에는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, 3급-부톡시 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0422] 본원에 사용된 바와 같이, "4-10원 헤테로사이클릭 그룹"이라는 용어는 4 내지 10개의 고리 원자(여기서, 적어도 하나의 고리 원자는 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소 또는 황 원자이다)를 함유하는 사이클릭 그룹을 지칭한다. "4-6원 헤테로사이클릭 그룹"이라는 용어는 4-6개의 고리 원자(여기서 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소 또는 황 원자와 같은 헤테로원자이다)를 함유하는 사이클릭 그룹을 지칭한다. 임의로, 고리 구조 내의 고리 원자(예를 들어, 탄소, 질소 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. "4-8원 헤테로사이클릭 그룹"은 예를 들어 "4-8원 질소 함유 헤테로사이클릭 그룹", "4-8원 산소 함유 헤테로사이클릭 그룹", "4-7원 헤테로사이클릭 그룹", "4-7원 산소 함유 헤테로사이클릭 그룹", "4-7원 헤테로사이클릭 그룹", "4-6원 헤테로사이클릭 그룹", "5-7원 헤테로사이클릭 그룹", "5-6원 헤테로사이클릭 그룹", "5-6원 질소 함유 헤테로사이클릭 그룹", 예를 들어 비제한적으로 옥소사이클로부타닐, 피롤리디닐, 테트라하이드로푸릴, 피페리디닐, 피페라지닐, 테트라하이드로피라닐, 호모피페라지닐 등을 포함한다.
- [0423] 본원에 사용된 바와 같이, "4-10-원 헤테로사이클"이라는 용어는 4-10개의 고리 원자를 함유하는 고리를 지칭한다(여기서, 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소 또는 황 원자와 같은 헤테로원자이다). "5-6원 헤테로사이클"이라는 용어는 5-6개의 고리 원자(여기서 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소 또는 황 원자와 같은 헤테로원자이다)를 함유하는 고리, 예를 들어 비제한적으로 피롤리딘, 테트라히드로푸란, 피페리딘, 피페라진, 테트라하이드로피란 등을 지칭한다.
- [0424] 본원에 사용된 바와 같이, "아릴"이라는 용어는 방향족성을 갖는 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 그룹, 예를 들어 6-10원 아릴, 5-8원 아릴 등을 지칭한다. 구체적인 예에는 페닐, 나프틸, 안트라세닐, 펜안트릴 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. "6-10원 아릴"은 6-10개의 고리 원자를 갖는 아릴을 지칭한다. "C₆-10 아릴"은 6-10개의 탄소 원자를 함유하는 아릴 그룹을 지칭한다.
- [0425] 본원에 사용된 바와 같이, "헤테로아릴"이라는 용어는 방향족성을 갖는 사이클릭 그룹을 지칭하며, 여기서 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소 또는 황 원자이다. 임의로, 고리 구조 중의 고리 원자(예를 들어, 탄소, 질소 또는 황원자)는 산소로 치환될 수 있다. 구체적인 예로는 5-10원 헤테로아릴, 5-6원 헤테로아릴, 5-10원 질소 함유 헤테로아릴, 6-10원 산소 함유 헤테로아릴, 6-8원 질소 함유 헤테로아릴, 5-8원 산소 함유 헤테로아릴 등, 예를 들어 푸릴, 티에닐, 피롤릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 1,2,3-트리아졸릴, 1,2,4-트리아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 피리디닐, 2-피리도닐, 4-피리도닐, 피리미디닐, 1,4-디옥시닐, 2H-1,2-옥사지닐, 4H-1,2-옥사지닐, 6H-1,2-옥사지닐, 4H-1,3-옥사지닐, 6H-1,3-옥사지닐, 4H-1,4-옥사지닐, 피리다지닐, 피라지닐, 1,2,3-트리아지닐, 1,3,5-트리아지닐, 1,2,4,5-테트라지닐, 아자사이클로헵타트리에닐, 1,3-디아자사이클로헵타트리에닐, 아자사이클로옥타테트라에닐 등이 포함되지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0426] 본원에서 물결선 "~"으로 표현된 구조식의 결합은 그 구조가 시스 또는 트랜스 이성질체, 또는 임의의 비의 시스 및 트랜스 이성질체의 혼합물을 나타냄을 가리키기 위한 것이다.
- [0427] 본원에서 '내지'는 구간, 예를 들어, 1 내지 16의 끝 값(1 또는 16을 지칭할 수 있다)을 포함한다.
- [0428] "약물 대 항체의 비" 또는 "DAR"이라는 용어는 약물의 양, 예를 들어 ADC의 항체에 부착된 소분자 독소 대 항체

의 평균 비를 지칭한다. ADC의 DAR 범위는 1 내지 16일 수 있지만, 항체의 부착 부위 수에 따라 상이하하며, 따라서 더 높은 로드(예를 들어, 20)도 가능하다. DAR이라는 용어는 단일 항체에 로딩된 약물의 양을 언급할 때 사용될 수 있고, 대안적으로 ADC 그룹의 평균 DAR을 언급할 때 사용될 수 있다. DAR은 또한 생성물 내 분자 집단의 평균 DAR로서 계산될 수 있는데, 이는 검출 방법(예를 들어 질량 분석법, ELISA, 전기 영동 및/또는 HPLC와 같은 통상적인 방법)에 의해 측정된 Ab 부분에 대한 생성물 내 Ab 부분에 커플링된 약물 부분(D)의 전체 비(몰비)이다.

[0429] 해당 분야의 통상적인 지식에 기초하여, 상기 바람직한 조건을 임의로 조합하여 본 개시내용의 바람직한 실시예를 얻을 수 있다. 본 개시내용에 사용된 시약 및 원료는 시판되고 있다.

[0430] 본 발명의 이로운 효과는 하기와 같다.

[0431] 선행 기술과 비교하여, 본 발명에 포함된 항체는 완전한 인간 항체이며, 이는 면역원성 반응을 유발하지 않고 인간 대상체에게 안전하게 투여될 수 있다. 본 발명에 포함된 항체는 매우 높은 친화도와 특이성을 가지며, 이는 항-종양 효과를 발휘하는데 유리할 수 있다. 뜻밖에도, 본 개시내용의 항체-약물 접합체는 상당한 생체내 항-종양 활성을 갖는다.

[0432] 약어

CDR	면역글로불린 가변 영역의 상보성 결정 영역	HRP	양고추냉이 퍼옥시다제
WFR	항체 프레임워크 영역; 항체의 가변 영역 중 CDR 잔기 이외의 아미노산 잔기	hFc	인간 IgG 항체의 Fc 단편
VH	항체의 중쇄 가변 영역	KD	평형 해리 상수
VL	항체의 경쇄 가변 영역	HCDR1	면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 1
AbM	AbM CDR의 정의는 Martin의 관련 연구(Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modeling antibody hypervariable loops: A Combined Algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9268-9272)에서 유래되며, 이 정의 방법은 Kabat 및 Chothia의 정의의 일부를 통합한다.	HCDR2	면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 2
Kabat	Elvin A. Kabat의 면역글로불린 정렬 및 넘버링 시스템(예를 들어, 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991] 참조).	HCDR3	면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 3
Chothia	구조 고리 영역의 위치에 기반하여 CDR 영역 경계를 식별하기 위한 고전적인 규칙인 Chothia 등이 제안한 면역글로불린 넘버링 시스템(예를 들어, 문헌[Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:878-883] 참조).	LCDR1	면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 1
IMGT	Lefranc 등이 후원하는 International ImMuGeneTics 정보 시스템®(IMGT)의 넘버링 시스템에 기반함, 문헌[Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003] 참조.	LCDR2	면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 2
mAb	단클론 항체	LCDR3	면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역 3

[0433]

EC50	50%의 효능 또는 결합이 생성되는 농도	SEC-HPLC	크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피
ELISA	효소 결합된 면역흡수 분석	HC	면역글로불린의 중쇄
PCR	폴리머라제 체 반응	LC	면역글로불린의 경쇄
OMs	메탄설포네이트	FA	포름산
OTs	p-톨루엔설포네이트	ACN	아세트나트륨염
OTf	트리플루오로메탄설포네이트	OCCB reagent	2-(2-메톡시-4-니트로페닐)-3-(4-니트로페닐)-5-(2,4-디설포페닐)-2H-테트라졸륨 일나트륨 염
TBS	3급-부틸디메틸실릴	FBS	소 태아 혈청
MMT	p-메톡시페닐디레닐메틸	IMSO	디메틸 설풍사이드
PE/PBS	포스페이트 완충제	HBTU	O-벤조트리아졸릴-테트라메틸유로늄 핵사플루오로포스페이트
HOBT	1-하이드록시벤조트리아졸	HATU	2-(7-아자-벤조트리아졸릴)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 핵사플루오로포스페이트
NBS	N-브로모소속신이미드	TFA	트리플루오로아세트산
PPTS	피리디늄 p-톨루엔설포네이트	DMF	디메틸로포만
THF	테트라하이드로퓨란	DMF	N,N-디메틸포름아미드
EDC	1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸 카보디이미드 하이드롤로라이드	IgG	면역글로불린

[0434]

[0435]

구현예

[0436]

하기 특정 실시예의 설명에 의해 본 개시내용을 추가로 예시하지만, 이는 본 개시내용을 제한하려는 의도는 아니다. 본 개시내용의 교시에 기초하여, 당업자는 본 개시내용의 진의 및 범위로부터 이탈됨 없이 다양한 변형 또는 개선을 이룰 수 있다. 제조사의 표시 없이 사용되는 시약 또는 장비는 상업적으로 입수할 수 있는 통상적인 제품이다

[0437]

실시예 1. Her3 단백질 및 대조용 항체의 제조

[0438]

인간 Her3의 1-643번 위치의 아미노산에 대한 핵산 서열(NCBI: NP_001973.2)을 선택하고, 여기서 6xHis 검출 태그를 C-말단에 부가하고 인간 Her3-his로서 명명하였으며; 래트 Her3의 20-641번 위치의 아미노산 서열(Uniport ID: Q61526-1)을 선택하고, 여기서 6xHis 정제 태그를 C-말단에 부가하고 래트 Her3-his로서 명명하였다. 대조용 항체 1은 MediaPharma의 특허 CN 103189392 B(중쇄 서열번호 10, 경쇄 서열번호 14)로부터 취득하였고; 대조용 항체 2는 Daiichi Sankyo Company로부터 취득하였다(IMGT 데이터베이스, IMGT/mAb DB ID: 964, INN No.: 11093 참조). 상기 인간 Her3 항원의 유전자를 합성하고, 2개의 대조용 항체의 유전자를 코돈 최적화에 의해 합성하였으며(GenScript (Nanjing) Co., Ltd.), 이어서 이들 유전자를 PTT5 발현 벡터로 구성하고, 다수의 플라스미드를 추출하였다. 추출 및 제조된 발현 벡터를 PEIMAX에 의해 HEK293F에 일시적으로 형질감염시키고 7일간 발현시키고, 발현 상등액을 Ni 컬럼 또는 ProA를 사용하여 정제 및 제조하였다. 원숭이 Her3의 1-643번 위치의 아미노산 서열(NCBI: XP_001113953.2)을 선택하고, 여기서 C-말단에 6xHis 정제 태그를 첨가하고 원숭이 Her3-his로서 명명하였다.

[0439]

실시예 2. 파지 라이브러리로부터 항-Her3 항체의 스크리닝

[0440]

정맥혈을 건강한 개체로부터 채취하고, PBMC 세포를 Ficol로 추출한 후, 역전사를 위해 mRNA를 추출하였다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을, 특정 프라이머를 설계하여 증폭시켰다. 상동성 재조합을 통해 파지 벡터 상에 ScFv를 구성하고 보조 벡터와 함께 TG1에 전기-형질전환시켜 라이브러리 용량이 1.5×10^{10} 인 완전한 인간 ScFv 파지 라이브러리를 획득하였다. 인간 Her3-His의 초기 농축에 이어서, 원숭이 Her3-His(Sino Biological Inc.에서 구입)를 2차 농축시킨 후, 96개의 파지를 선택하고, 최적의 클론 202-2-1 및 202-3-1을 ELISA 및 T47D 종양 세포 유세포 분석법에 의해 취득하였다. 202-3-1의 물리화학적 특성을 개선시키기 위해, FR에서 부위-지정 돌연변이 유발을 수행하여 202-3-2로서 명명되는 클론을 생성시켰다

[0441]

실시예 3 항-Her3 항체의 발현

[0442]

클론 202-2-1, 클론 202-3-1 및 클론 202-3-2의 중쇄 가변 영역을 각각 IgG1 불변 영역(서열번호 29)에 연결한 반면, 클론 202-2-1, 클론 202-3-1, 및 클론 202-3-2의 경쇄 가변 영역을 각각 카파 불변 영역(서열번호 30)에 연결하고, 이어서 각각 코돈 최적화 및 유전자 합성(General Biosystems(Anhui) Co., Ltd.)을 통해 PTT5 벡터로 구성하였다. 항-Her3 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 플라스미드를 PEI max 시약에 의해 HEK293F 세포에 공동-형질감염시키고 5% CO₂ 진탕기에서 37°C에서 7일 동안 발현시켰다. 상등액을 수집하고 단백질 A 자기 비드로 정

제하여, 각각 항체 202-2-1, 항체 202-3-1 및 항체 202-3-2로 명명된 항-Her3 항체를 획득하였다. 항체 202-2-1, 항체 202-3-1 및 항체 202-3-2의 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및 상응하는 CDR을 표 1에 나타내었다.

[0443] [표 1]

[0444] 항-인간 Her3 항체의 아미노산 서열

서열번호	명칭	아미노산 서열
1	202-2-1 Kabat HCDR1	TYGMH
2	202-2-1 Kabat HCDR2	VIWYDVSHKYYADSVKG
3	202-2-1 Kabat HCDR3	DWGDPAFDI
4	202-2-1 IMGT HCDR1	GFTFSTYG
5	202-2-1 IMGT HCDR2	IWYDVSHK
6	202-2-1 IMGT HCDR3	ARDWGDPAFDI
7	202-2-1 Kabat LCDR1	RASQGISSYLA
8	202-2-1 Kabat LCDR2	AASTLQS
9	202-2-1 Kabat/IMGT LCDR3	QQLNSYPLT
10	202-2-1 IMGT LCDR1	QGISSY
\	202-2-1 IMGT LCDR2	AAS
12	202-3-1/202-3-2 Kabat HCDR1	GYFWS
13	202-3-1/202-3-2 Kabat HCDR2	YIHYSGRNTYNPSLKS
14	202-3-1/202-3-2 Kabat HCDR3	ETGGSGHWYFDL
15	202-3-1/202-3-2 IMGT HCDR1	GGSIGYF
16	202-3-1/202-3-2 IMGT HCDR2	IHYSGR
17	202-3-1/202-3-2 IMGT HCDR3	ARETGGSGHWYFDL
18	202-3-1/202-3-2 Kabat LCDR1	RASQSISSYLI
19	202-3-1/202-3-2 Kabat LCDR2	AASSLQS
20	202-3-1/202-3-2 Kabat/IMGT LCDR3	HQSYSTPWT
21	202-3-1/202-3-2 IMGT LCDR1	QSISSY
\	202-3-1/202-3-2 IMGT LCDR2	AAS

[0445]

23	202-2-1 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG MHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDVSHKYYADSV KGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPAFDIWGQGMVTVSS
24	202-2-1 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAW YQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTK VEIK
25	202-3-1 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGYFW SWIRQSPGKGLEWIGYIHYSGRNYPNPSLKSRT ISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARETGGG GHWYFDLWGRGNLTVSS
26	202-3-1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLW YQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCHQSYSTPWTFGQGTK VEIK
27	202-3-2 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGYFW SWIRQSPGQGLEWIGYIHYSGRNYPNPSLKSRT ISVDTSKNQFSLQLSVTAADTAVYYCARETGGG GHWYFDLWGRGNLTVSS
28	202-3-2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLW YQKPKGQAPRLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCHQSYSTPWTFGQGTK VEIK
29	IgG1 CH 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
30	Kappa CL 경쇄 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
11	202-2-1 HC	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG MHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDVSHKYYADSV KGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT

[0446]

		QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQ KLSLSLSPGK
22	202-2-1 LC	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAW YQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

[0447]

[0448]

실시예 4 Her3 단백질에 대한 항-Her3 항체의 친화도 분석

[0449]

Her3 단백질에 대한 항-Her3 항체의 친화도를 ELISA로 시험하였다. 구체적인 실험 절차: 인간 Her3-his, 원숭이 Her3-his 단백질 및 래트 Her3-his를 pH 9.6의 카보네이트 완충액으로 최종 농도 1 µg/ml로 희석하고 96-웰 마이크로플레이트에 100 µl/L로 첨가하고, 4°C에서 밤새 코팅하고; 코팅 용액을 버리고, 플레이트를 PBST로 1회

세척하고, 이어서 PBS(2% BSA 함유) 100 μl 를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 차단하고; 이어서 PBS(2% BSA 함유)로 희석한 항-Her3 항체 100 μl (1 μg 에서 시작하여, 이중 웰에서 3배 연속 희석)를 각 웰에 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 배양하고; 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제-표지된 항-인간 Fc 항체(PBST로 1:10000으로 희석)를 100 μl /웰로 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 플레이트를 PBST로 5회 세척하였다. TMB 발색 용액을 100 μl /웰로 첨가하고 발색을 위해 37°C에서 7분간 배양한 후 정지 용액을 50 μl /웰로 첨가하여 반응을 종결시켰다. 흡광도를 450 nm에서 측정하고 EC₅₀ 값을 Graph-prism 으로 불러온 원본 데이터로부터 계산하였다. 결과를 도 1A-1C에 나타내고, 상세한 결과는 표 2에 나열하였다. 202-2-1은 인간 Her3 단백질 및 원숭이 Her3 단백질에 대해 높은 친화도를 가졌으며, 대조용 항체 1에 필적하였으나, 래트 Her3 단백질에 대한 친화도는 없었고; 202-3-1 및 202-3-2는 인간 Her3 단백질 및 원숭이 Her3 단백질에 높은 친화도를 가졌으나, 대조용 항체 1의 경우보다는 낮았고, 이들 둘 다 래트 Her3 단백질에 결합하였다.

[0450] [표 2]

[0451] Her3 단백질에 대한 항-Her3 항체의 친화도 분석 결과.

항체	인간 Her3-his EC50 (pM)	원숭이 Her3-his EC50 (pM)	래트 Her3-his EC50 (pM)
202-2-1	20.97	15.91	결합 안 됨
202-3-1	60.59	39.57	153.7
202-3-2	78.17	43.85	225.2
대조용 항체 1	27.72	9.275	결합 안 됨

[0452]

[0453] 실시예 5 항-Her3 항체의 동적 친화도 분석

[0454] Her3 단백질에 대한 항-Her3 항체의 동적 친화도를 통상적으로 사용되는 동적 친화도 분석 장치인 Fortibio에 의해 검출하였다. 방법을 하기과 같이 간략하게 기재하였다: PBST를 사용하여 인간 Her3-His의 연속 희석을 수행하여 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM, 3.125 nM, 1.5625 nM 및 0 nM을 획득하였다. ProteinA 바이오센서(Pall Life Sciences)를 사용 전에 PBST 완충액으로 미리-가습하였다. 항-Her3 항체를 PBST를 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고 ProA 센서에 고정화시켰다. 이어서 항체가 고정화된 센서를 PBST 완충액에서 60초 동안 평형화 하여 기준선을 획득한 다음 결합을 위해 60초 동안 항원 희석제로 옮긴 다음 PBST에서 180초 동안 해리시켰다. 1회 분석 주기 후에, 센서를 10 mM Gly(pH 1.5)로 재생시켰다. 결합(Ka) 및 해리(Kd) 속도 상수를 1:1 모델을 사용한 날짜 분석을 사용하여 결정하고 해리 평형 상수(KD)를 계산하는데 사용하였다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 인간 Her3에 대한 202-2-1, 202-3-1 및 202-3-2의 동적 친화도는 대조용 항체 1에 필적할 정도로 더 높았다.

[0455] [표 3]

[0456] 인간 Her3 단백질에 대한 항-Her3 항체의 동적 친화도 분석

항체	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
202-2-1	1.31E-08	1.67E+05	2.18E-03
202-3-1	7.79E-09	1.82E+05	1.42E-03
202-3-2	6.81E-09	1.82E+05	1.24E-03
대조용 항체 1	5.30E-09	5.62E+05	2.97E-03

[0457]

[0458] 실시예 6 세포에 대한 항-Her3 항체의 친화도 분석

[0459] Her3 단백질은 다양한 고형 종양 세포에서 고도로 발현되었다. 종양 세포에 대한 Her3 항체의 친화도를 FACS 분석에 의해 검출하였다. 구체적인 실험 절차: 대수기로 증식한 MCF-7(유방암 세포, ATCC, 품목 번호 HTB-22), A549-인간 Her3(인간 비-소세포 폐암, ATCC, 품목 번호 CRM-CCL-185) 및 T47D(인간 유방 도관암, ATCC) 암세포를 트립신으로 절단하고, 2% BSA를 함유한 PBS 완충액에 5×10^5 세포/ml로 재현탁시켰다. 100 μl 세포 현탁액을

96-웰 플레이트에 첨가하였다. 대조용 항체 1 또는 대조용 항체 2, 202-2-1, 202-3-1 및 202-3-2를 2% BSA를 함유하는 PBS 완충액에서 희석하고, 150 µg/ml 또는 50 µg/ml의 시작 농도에서 3배 연속 희석하여 약 10개의 농도를 획득하였다. 이어서 100 µl 항체 현탁액을 96-웰 플레이트에 첨가하고 혼합하며; 플레이트를 4°C에서 1시간 동안 배양하고 미리 냉각된 PBS로 매회 300µl/웰로 2회 세척한 다음 500 g에서 5분 동안 원심분리시키고; 1:50 형광 2차 항체 APC 항-인간 IgG(Biolegend에서 구입)를 100 µl/웰로 첨가하고 혼합하였다. 플레이트를 4°C에서 0.5시간 동안 배양하고 미리 냉각된 PBS로 매회 300 µl/웰로 2회 세척하고 500 g에서 5분 동안 원심분리한 다음 500 µl PBS로 재현탁하였다. 평균 형광 신호 값을 Beckman 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 결과를 도 2A-2C 및 표 4에 나타내었다. 세포에 대한 202-2-1의 친화도는 대조용 항체 1의 경우에 필적하고 대조용 항체 2의 경우보다 우수하였지만, 최대 MFI는 대조용 항체 1의 경우보다 높았다. 202-3-1 및 202-3-2의 세포 친화도는 대조용 항체 1의 경우보다 약간 더 약했다.

[0460] [표 4]

[0461] 항-Her3 항체의 세포 친화도 분석 결과

항체	A549-인간 Her3 종양 세포		T47D 종양 세포		MCF-7 종양 세포	
	EC50(nM)	최대 MFI	EC50 (nM)	최대 MFI	EC50 (nM)	최대 MFI
202-2-1	1.148	63823	0.080	2066	N/A	485095
202-3-1	2.036	55683	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨
202-3-2	2.593	54823	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨
대조용 항체 1	1.148	55461	0.043	1743	검출 안 됨	검출 안 됨
대조용 항체 2	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨	N/A	121782

[0462]

[0463] 표 4의 N/A는 피팅된 EC50 결과를 얻기에는 친화도가 너무 약하다는 것을 가리킨다.

[0463]

[0464] 실시예 7 NRG1-유도된 AKT 인산화에 대한 항-Her3 항체의 억제에 대한 분석

[0464]

[0465] NRG1은 높은 친화도로 Her3/Her2 이종이량체에 결합한 후 하류 신호 전달 경로에서 AKT의 인산화를 유도하고 종양 세포의 증식을 자극하였다. NRG1-유도된 AKT 인산화 경로에 대한 항-Her3 항체의 억제를, 세포 블롯팅을 사용하여 검출하였다. 구체적인 실험 절차: 하루 전에 MCF-7 종양 세포(인간 유방암 세포)를 50000/웰로 96-웰 플레이트에 도말하고 밤새 방치한 후 무혈청 RPMI1640 배지에서 약 24시간 동안 기아 상태로 두었다. 항체 202-2-1 및 202-3-1을 시작 농도 100 nM로 3배 연속 희석하고, 이어서 세포에 첨가한 다음, 37°C에서 30분간 배양하였으며, 이어서 여기에 NRG1(Sino Biological, 품목 번호: 11609 HNCH)을 최종 농도 10 ng/ml로 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 30분 동안 배양한 후, 반응을 종료하고 상등액을 버렸다. 플레이트를 PBS로 1회 세척한 후 포름알데히드를 100 µl/웰로 첨가하여 실온에서 30분간 고정화시켰다. 플레이트를 PBS로 2회 세척한 후 미리 냉각된 메탄올을 100 µl/웰로 30분간 첨가하여 막 침투를 유도한 다음 PBS로 3회 세척하였다. PBS(2% BSA 함유)를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 2시간 동안 차단하였다. 1:500 항-포스포 Akt(Ser473) 항체(CST, 품목 번호 9271-S) 100 µl를 첨가하고 플레이트를 4°C에서 밤새 배양하였다. 그 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 1:1000 HRP 알파카 항-토끼 IgG 항체(NB-biolab, Sichuan)를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBST로 5회 세척하였다. ECL 전개제(Vazyme, Article No. E412-01) 100 µl를 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(MD, Model: i3x)를 사용하여 발광 값을 판독하였다. IC50 값을 도 3에 도시된 바와 같이 Graph-prism을 사용하여 계산하였다. 항-Her3 항체 202-2-1 및 202-3-1은 모두 NRG1 유발 AKT 인산화를 유의하게 억제하였지만 항체 202-2-1은 항체 202-3-1보다 유의하게 더 강하였으며, 이때 IC50 값은 각각 0.2434 nM 및 1.037 nM였다.

[0465]

[0466] 실시예 8: 항-Her3 항체의 특이성에 대한 분석

[0466]

[0467] Her3 단백질에 결합하는 Her3 항체의 특이성을, 이의 상동성 단백질인 EGFR, Her2 및 Her4에의 결합 없이 ELISA 방법에 의해 결정하였다. 구체적인 실험 절차: 인간 EGFR-His, 인간 Her2-His, 인간 Her4-His(Sino Biological Inc.에서 구입) 및 인간 Her3-his 단백질을 각각 pH 9.6의 카보네이트 완충액으로 최종 농도 1 µg/ml로 희석하

[0467]

고, 100 μl /웰로 96-웰 마이크로플레이트에 첨가하고, 4°C에서 밤새 코팅하고; 코팅 용액을 버리고 플레이트를 PBST로 1회 세척한 후 100 μl PBS(2% BSA 함유)를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 차단하고; 이어서 PBS(2% BSA 함유)로 희석한 Her3 항체 100 μl 를 각 웰에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 ng/ml 및 40 ng/ml 로 첨가하고 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 배양하고; 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제-표지된 항-인간 Fc 항체(PBS로 1:10000 희석)를 100 μl /웰로 첨가한 후, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양하고; 플레이트를 PBST로 5회 세척하였다. 발색용 TMB 발색 용액을 100 μl /웰로 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 7분간 배양한 후, 정지액을 50 μl /웰로 첨가하여 반응을 종결시키고, 플레이트를 450 nm에서 마이크로플레이트 판독기에서 판독하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다. 202-2-1, 202-3-1 및 202-3-2는 인간 Her3 단백질에 특이적으로 결합하였으나, 인간 EGFR, 인간 Her2 및 인간 Her4 단백질에는 결합하지 않았다.

[표 5]

Her3 패밀리 단백질에 대한 항-Her3 항체의 결합 분석

항원 명칭	EGFR-his			Her2-his			Her3-his			Her4-his		
항체 농도 ng/mL	100	200	40	100	200	40	100	200	40	100	200	40
대조용 항체 1 OD450 nM	0.051	0.049	0.049	0.052	0.049	0.047	0.850	0.854	0.763	0.051	0.050	0.049
202-2-1 OD450 nM	0.051	0.051	0.051	0.049	0.050	0.049	0.610	0.695	0.573	0.051	0.051	0.050
202-3-1 OD450 nM	0.050	0.050	0.055	0.048	0.049	0.052	0.333	0.344	0.281	0.050	0.051	0.049
202-3-2 OD450nM	0.051	0.050	0.051	0.050	0.051	0.050	0.427	0.407	0.306	0.050	0.051	0.051

실시예 9 항-Her3 항체의 세포내이입 분석

A549-인간 Her3(인간 비-소세포 폐암 세포)에 의한 항-Her3 항체의 세포내이입을 FACS에 의해 검출하였다. 대수 증식기까지 성장한 A549-인간 Her3 세포를 트립신으로 절단한 후 원심분리하여 세포를 수집하고 미리 냉각된 PBS로 3회 세척하고; 세포를 PBS(1% BSA 함유)에 재현탁시키고 여기에 시험할 항-Her3 항체를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가한 후 4°C에서 1시간 동안 배양하고; 세포를 원심분리에 의해 수집하고, PBS로 3회 세척하고, DMEM+10% FBS에 재현탁시키고, 4개 부분으로 나누고, 37°C에서 각각 0, 1, 2 및 4시간 동안 배양하고; 배양 단계가 완료된 후 세포를 원심분리에 의해 수집하고 미리 냉각된 PBS로 3회 세척한 다음 50 μl 의 1% BSA(PBS 중)에 재현탁시키고, 이어서 1 μl 의 형광 2차 항체 APC 항-인간 IgG(Biolegend)를 각 웰에 첨가하고, 혼합물을 잘 혼합하고, 플레이트를 4°C에서 0.5시간 동안 배양하고; 세포를 원심분리에 의해 수집하고 미리 냉각된 PBS로 3회 세척하고 200 μl 의 PBS에 재현탁하고 검출을 위해 유세포 분석기(Beckman, 모델: CytoFlex)에 로딩하였다. 식: 세포내이입 속도(%) = [1-(이 시점의 시험 샘플의 평균 형광 값 - 이 시점의 음성 대조용 샘플의 평균 형광 값)/(0시간째의 시험 샘플의 평균 형광 값 - 0시간째의 음성 대조용 샘플의 평균 형광 값)] * 100. 결과를 도 4에 나타내었다. 항-Her3 항체 202-2-1은 A549-인간 Her3 종양 세포에 대해 강한 세포내이입 활성을 나타내어, 4시간째에 약 26.9%에 도달하였으며, 이는 16.6%의 대조용 항체 2의 경우보다 더 강하고 대조용 항체 1의 경우에 필적하였다. 그러나, 항-Her3 항체 202-2-1은 대조용 항체 전에 최대 세포내이입 속도에 도달하였으며, 대조용 항체보다

더 빠른 세포내이입 속도를 나타내었다. 항체 202-3-2의 세포내이입 활성은 대조용 항체 1 및 대조용 항체 2의 경우보다 더 강하였다.

[0473] 실시예 10. 항원 에피토프 분석

[0474] 10.1 항-Her3 항체 에피토프 경쟁 분석

[0475] 경쟁적 ELISA를 사용하여, 항-Her3 항체 202-2-1이 에피토프 결합에 대해 대조용 항체 1 및 2와 경쟁하는지 여부를 결정하였다. 구체적인 단계는 하기와 같았다: 인간 Her3-his 항원을 100 ng/웰의 CBS 코팅 용액으로 코팅한 후 플레이트를 4°C에서 밤새 배양하고; 코팅 용액을 제거하고 300 μ l의 PBS로 웰을 1회 세척한 후 각 웰을 PBS(2% BSA 함유) 용액 100 μ l/웰로 차단한 다음 37 °C에서 2시간 동안 배양하고; 차단 용액을 버리고 항체 202-2-1, 대조용 항체 1, 대조용 항체 2를 15 μ g/ml로부터 시작하여 총 11개의 희석점으로 3배 희석으로 희석하였지만, 12번째 점은 희석제로 대체되었고; 항체를 웰에 50 μ l/웰로 중복해서 첨가하고; 10 ng/ml로 희석된 비오틴-표지된 대조용 항체 1 및 88 ng/ml로 희석된 대조용 항체 2를 각 웰에 50 μ l/웰로 첨가하고, 이어서 플레이트를 25°C에서 2시간 동안 배양하고; 300 μ l의 PBST로 웰을 세척하고, 3회 반복하고, 이어서 PBS(2% BSA 함유)로 희석한 HRP 항-비오틴 2차 항체를 1:5000 비로 100 μ l/웰로 첨가한 다음, 25°C에서 1시간 동안 배양하고; 웰을 300 μ l의 PBST로 세척하고 5회 반복하고; 각 웰에 TMB 발색 용액(Huzhou InnoReagents, Anhui) 100 μ l를 첨가하고 실온에서 5분간 발색시킨 후 각 웰에 H₂SO₄ 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시키고, 플레이트를 OD450 nm에서 마이크로플레이트 판독기 상에서 즉시 판독하였다. EC50 값을 계산하기 위해 원본 데이터를 Graph-prism으로 불러오고 그 결과를 도 5A에 나타내었다. 결과는 항-Her3 항체 202-2-1이 에피토프 결합에 대해 대조용 항체 2와 경쟁하지 않음을 보여주었다.

[0476] 10.2 항-Her3 항체의 항원성 에피토프 결정

[0477] Her3 항체 및 이에 의해 인식된 에피토프의 구체적인 작용 방식을 추가로 연구하기 위해, 202-2-1 Fab 단편과 Her3 단백질의 복합체를 제조하고, 이어서 항체 항원 복합체의 구조를 저온-전자 현미경검사에 의해 분석하였다.

[0478] (1) 항원 제조: uniprot 데이터베이스로부터 획득한 HER3 세포외 도메인(20-643)의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA를 서열 최적화 후 합성하고(숙주로서 293F), 6*His 태그를 단백질의 C-말단에 부가하였다. 상기 유전자를 pLVX(MIAO LING BIO, Article No. P0249) 발현 벡터로 구성하고 293F 세포(ATCC; PTA-5077)에 형질감염시킨 후 스크리닝하여 안정적인 세포 풀을 획득하였다. 세포를 발효 및 배양하여 항원을 함유하는 배양 상등액을 수득하였다. 항원을 Ni 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 포획하고 분자체에 의해 추가로 정제하였다. 최종 항원을 pH 7.5의 Tris-NaCl 용액(0.7 mg/ml)에 용해시켰다. 항원 품질 특성화: 1. SDS-PAGE 실험은 비-환원 조건과 환원 조건 모두에서 밴드가 예리함을 보였다. 2. SEC-HPLC로 측정된 순도는 95.6%였다. 3. 역상 크로마토그래피 HPLC로 측정된 순도는 97.44%였다. 4. ELISA로 시험한 항원 및 항체의 친화도는, 상기 항원 및 항체 202-2-1 배치의 친화도가 0.1 nM 미만임을 보였으며, 다음 단계의 실험을 수행할 수 있다.

[0479] (2) Fab-항원 복합체 제조: 항체 202-2-1을 20 mM 아세트산 + 150 mM 염화나트륨에 20.7 mg/ml 농도로 용해시켰다. 펩신 및 항체를 37°C에서 240분 동안 배양하고, 절단 생성물을 SDS-PAGE로 분석하고 SEC(Superdex 200 Increment 10/300 GL 컬럼) 컬럼으로 분리하여 주요 피크를 수집하였다. 상기 생성물을 파파인과 함께 37°C에서 120분 동안 배양하고, 절단 생성물을 SDS-PAGE로 분석하고 SEC SEC(Superdex 200 증가 10/300 GL 컬럼) 컬럼으로 분리하고, 주요 피크를 수집하여 항체 202-2-1의 Fab를 획득하였다. (1) 단계에서 제조된 항원을 Fab와 혼합한 후 4°C에서 밤새 배양하였다. 배양된 생성물을 원심분리에 의해 농축시키고 SDS-PAGE에 의해 분석한 다음, SEC(Superdex 200 증분 10/300 GL 컬럼) 컬럼을 사용하여 분리하고, 주요 피크를 수집하여 Fab-항원 복합체를 수득하였다. 저온전자 현미경검사용 샘플의 제조 전에, 음성 염색 방법(Vitrobot™ MarkIV, easiGlow™ Glow Discharge, 200kV TF20, CCD 카메라 895)에 의해 복합체의 품질을 검사하였다. 음성 염색 결과는 대부분의 복합체가 일관된 형태를 가지고 있음을 보여주었다. 80장의 사진을 음성 염색의 재구성을 위해 선택하고, PDB 모델(4LEO)을 밀도 지도의 시뮬레이션에 사용하였다. 시뮬레이션 결과는 복합체가 PDB 모델(Fab 결합 도메인 포함)의 대부분과 중첩될 수 있음을 보여주었으며, 이는 복합체의 품질이 저온전자 현미경 관찰 요건을 충족하였음을 나타낸다.

[0480] (3) 저온-현미경검사를 위한 샘플 제조/저온-현미경 Glacios에서 스크리닝/데이터 수집: (2)에서 제조된 복합체를 25 mM Tris-HCl(pH 7.5) 및 150 mM NaCl을 사용하여 0.2 mg/ml로 희석하고, 12000 g에서 15분 동안 원심분리하고; 모든 관련 장비 및 시약을 제조하고, 300 mesh R 1.2/1.3 홀리 카본 필름(Quantifoil) 그리드에 3 μ l

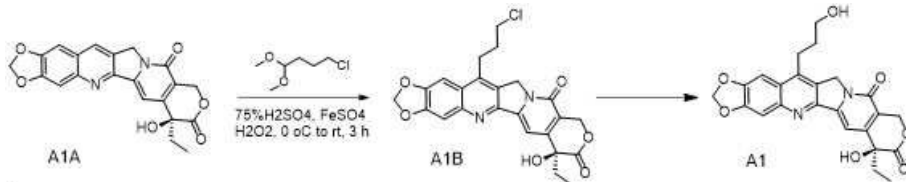
의 샘플을 적가하고 200 KV Glacios 전자현미경을 사용하여 복합체의 사진을 관찰하고 스크리닝하였다. 고해상도 저온-전자 현미경사진을 300 kV Titan Krios 전자현미경(K3 직접 전자 검출기 장착, Gatan 브랜드)에 의해 수집하고, 총 3272장의 사진을 추가 분석을 위해 수집하였다. 매개변수 설정: 배율 105 K, 물리적 픽셀 0.819 Å, 총 56.3 e-/Å² 선량의 전자를 40 프레임으로 나누고 언더포커스 범위는 -1.0 μM 내지 -2.4 μM로 설정하였다.

[0481] (4) 사진 처리/원자모델 확립 및 에피토프 분석: 모두 3272장의 사진 데이터를, 콘트라스트 전달 기능의 평가 및 보정, 2D 분류, 이중 정제 및 균질 정제를 포함하여 CryoSPARC v3.3.1을 사용하여 처리하였다. Her3-Fab 복합체의 구조 모델을 구축하기 위해, Her3 구조(PDB 1M6B) 및 항체 202-2-1과 상동성이 높은 Fab 구조(경쇄: PDB 7CDJ, 중쇄: PDB 6D01)를 저온-EM 지도에 UCSF Chimera 소프트웨어를 사용하여 피팅하였다. 이 모델은 저온-EM 지도의 안내와, CCP-EM을 사용하는 실제 공간 개선과 조합하여 Coot(Emsley P et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Apr;66(Pt 4):486-501)에서 수동으로 구축되었다. 결과를 도 5B-1, 5B-2 및 5B-3에 나타내었다.

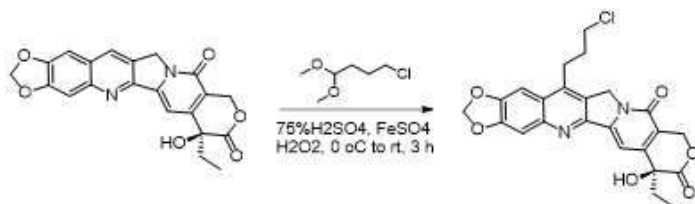
[0482] 구조 분석 결과는 하기와 같았다: 202-2-1 항체 Fab가 결합된 항원 에피토프는 서열번호 31의 아미노산 328-499 내, 인간 Her3의 도메인 3에 위치하고(단, Her3 항원은 서열번호 31의 아미노산 서열에 따라 넘버링되었다), 구체적으로 466번 위치의 히스티딘, 470-471번 위치의 (트립토판-트레오닌), 478번 위치의 트레오닌, 483-487번 위치의 (아스파르트산-이소류신-리신-히스티딘-아스파라긴), 484번 위치의 이소류신, 및 490-491번 위치의 (아르기닌-아르기닌)에 위치하고; 서열번호 23의 아미노산 번호를 기준으로, Fab 중쇄의 30번 위치의 (세린), 53-54번 위치의 (티로신-아스파르트산), 56-57번 위치의 (세린-히스티딘), 59번 위치의 티로신, 및 100번 위치의 트립토판은 항원 결합에 관여하고; 서열번호 24의 아미노산 서열에 따라 넘버링된 Fab 경쇄의 92번 위치의 아스파라긴은 항원 결합에 관여하였다.

[0483] 실시예 11 "약물-링커 화합물" 합성에 사용되는 생물활성 분자 및 중간체의 합성

[0484] 실시예 11.1: (S)-7-에틸-7-하이드록시-14-(3-하이드록시프로필)-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1)의 합성



[0485] 단계 1: (S)-14-(3-클로로프로필)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1B)의 합성

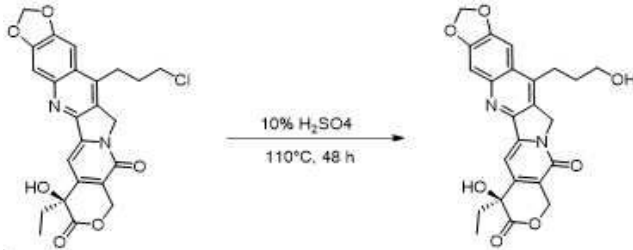


[0487] 병용에서, 75% 황산 용액(5 ml) 중의 화합물 (S) 7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인테노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A1.5-A, 500 mg)의 용액에 황산 제1철 침수화물(570 mg의 황산 제1철 침수화물을 1 ml의 물에 용해시켰다) 및 4-디메톡시클로로부탄(3.89 g)을 첨가하고, 반응 용액을 3분간 교반한 후 과산화수소(29%, 2.5 ml)를 적가하였다. 반응 용액을 0°C에서 5분간 교반하고, 실온으로 가온하고, 이어서 3시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응 용액을 물(50 ml)로 희석하고, 에틸 아세테이트(80 ml × 2)로 추출하였다. 유기상을 포화 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 C18 컬럼(아세토니트릴/수 중 0.05% 포름산: 5%-60%)으로 추가 정제하여 표적 화합물 A1B(황색 고체, 400 mg, 수율: 67%)를 수득하였다.

LCMS (ESI) [M+H]⁺: 468.9;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

단계 2: (S)-7-에틸-7-하이드록실-14-(3-하이드록실프로필)-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1)의 합성

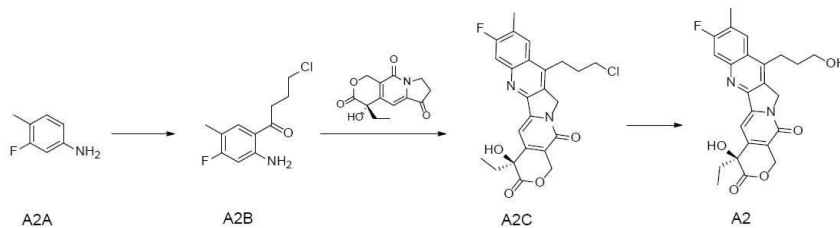


화합물 (S)-7-에틸-7-하이드록실-14-(3-클로로프로필)-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(100 mg, 0.213 mmol)을 10% 황산(5 ml) 용액에 용해시키고 110°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응 용액에 포화된 중탄산 나트륨(30 ml) 용액을 첨가하고, 이어서 생성 용액을 디클로로메탄(10 ml × 5)으로 추출하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 흡입에 의해 여과하고, 감압 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용(preparative) HPLC(아세트니트릴/0.05% 포름산을 함유하는 수)로 정제시켜 (S)-7-에틸-7-하이드록실-14-(3-하이드록실프로필)-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A1, 1.78 mg)을 수득하였다.

LCMS (ESI) [M+H]⁺: 451.0;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 0.90 – 0.84 (m, 3H).

실시예 11.2: (S)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록실-11-(3-하이드록실프로필)-9-메틸-1,12-디하이드로-14H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14(4H)-디온 (A2)의 합성



단계 1:

0°C에서, 1,2-디클로로에탄(200 ml) 중의 화합물 A2A(10 g)의 용액에 1 mol/L의 삼염화붕소(96 ml) 및 4-클로로부티로니트릴(9.9 g)을 연속적으로 적가하였다. 반응물을 80°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 실온으로 냉각시키고, 이어서 2 mol/L 염산(90 ml)을 첨가하고, 혼합물을 환류 하에 80°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 실온으로 냉각시키고, 소량의 물로 희석하고, 디클로로메탄(200 ml × 3)으로 추출하였다. 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=10/1)로 분리 및 정제시켜 목적 화합물 A2B(4 g)를 수득하였다.

LCMS(ESI) [M+H]⁺: 230.0.

[0499] 단계 2:

[0500] 화합물 A2B(50 mg)에 (S)-4-에틸-4-하이드록시-7,8-디하이드로-1H-피라노[3,4-f]인돌리진-3,6,10(4H)-트리온 (35 mg) 및 p-톨루엔설폰산 일수화물(41.4 mg)을 연속적으로 첨가하고, 이어서 혼합물을 디클로로메탄(30 ml)에 용해시켰다. 용액을 등명하게 혼합하고, 감압 농축시키고, 오일 펌프로 진공으로 펌핑하고, 진공 하에 120℃에서 3시간 동안 반응을 수행하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 이어서 물(20 ml)을 첨가하였다. 생성 혼합물을 디클로로메탄(20 ml × 3)으로 추출하였다. 조합한 유기상을 무수 황산나트륨으로 연속적으로 건조시키고, 여과하고, 여액을 감압 하에 농축시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 분리 및 정제시켜 백색 고체로서 표적 화합물 A2C(80 mg)를 수득하였다.

[0501] LCMS(ESI) [M+H]⁺: 457.0.

[0502] 단계 3

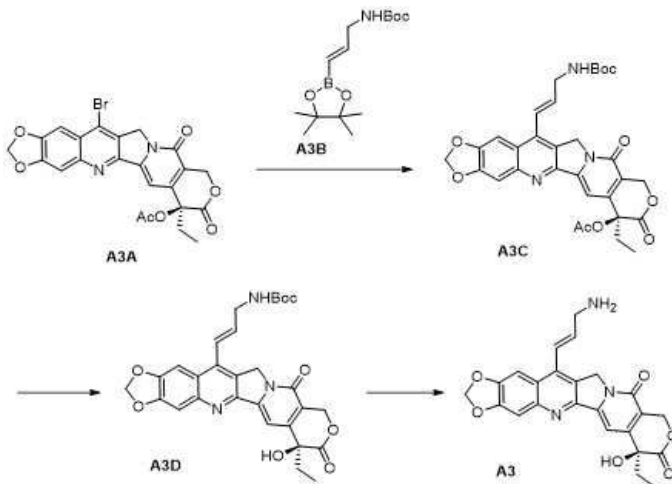
[0503] 화합물 A2C(75 mg)를 헥사메틸포스포릭 트리아미드에 용해시키고, 여기에 순수(0.8 ml)를 첨가하고 이어서 반응 용액을 100℃에서 72시간 동안 교반하였다. LCMS 시험은 반응이 완료되었음을 보여주었다. 표적 화합물 A2(10 mg)를 분취용 크로마토그래피(수 중 0.01% TFA, MeCN)로 정제시켰다.

LCMS (ESI) [M+H]⁺: 439.2;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.67 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 3.28 – 3.20 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.93 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0504]

[0505] 실시예 11.3: (S,E)-14-(3-아미노-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-7-하이드록실-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A3)의 합성



[0506]

[0507] 단계 1:

[0508] 화합물 A3A(200 mg, 0.39 mmol), 화합물 A3B(112 mg, 0.39 mmol), 불화 세슘(152 mg, 0.975 mmol) 및 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(45 mg, 0.039 mmol)을 1,4-디옥산(8 ml)에 첨가하였다. 마이크로파 반응을 질소 분위기 하에 120℃에서 0.5시간 동안 수행하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타낸다. 반응물에 디클로로메탄(20 ml) 및 메탄올(10 ml)의 혼합 용매를 첨가하고, 이어서 생성 용액을 여과하였다. 여액을 농축시키고, 조 생성물을 분취용 TLC(디클로로메탄:메탄올 = 30:1)로 정제하여 표적 화합물 (S,E)-14-(3-((3-급-부톡시카보닐)아미노)-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-7-일 아세테이트(A3C, 60 mg, 수율: 26%)를 갈색 고체로서 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 590.3$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.34 – 5.24 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.21 (br s, 3H), 2.03 – 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

[0509]

[0510]

단계 2:

[0511]

메탄올(15 ml) 중의 화합물 (S,E)-14-(3-((3급-부톡시카보닐)아미노)-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-7-일 아세테이트(A3C, 50 mg, 0.085 mmol)의 용액에 나트륨 메톡사이드(9.2 mg, 0.17 mmol)를 첨가하고, 이어서 반응물을 50 °C에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 농축시켜 조 표적 화합물 (S,E)-14-(3-((3급-부톡시카보닐)아미노)-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A3D, 50 mg)을 갈색 고체로서 수득하였다. LCMS(ESI) $[M+H]^+ = 548$;

[0512]

단계 3:

[0513]

디클로로메탄(2 ml) 중의 화합물 (S,E)-14-(3-((3급-부톡시카보닐)아미노)-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A3D, 50 mg, 0.091 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(1 ml)을 첨가하고, 이어서 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 용액을 농축시키고, 조 생성물을 분취용 HPLC(아세트오닐트릴/수 중 0.05% 포름산)로 정제하여 표적 화합물 (S,E)-14-(3-아미노-1-프로필렌-1-일)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A3)(8.1mg, 수율 21%)을 갈색 고체로서 수득하였다.

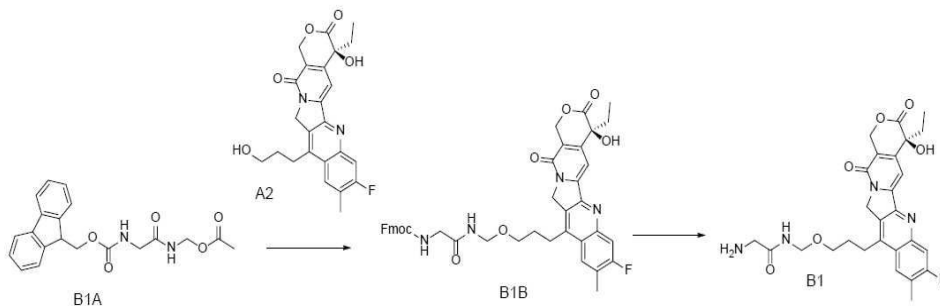
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 448.3$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.20 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 – 6.46 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.86 (br s, 2H), 1.90 – 1.83 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

[0514]

[0515]

실시예 11.4: (S)-2-아미노-N-((4-(4-에틸-8-플루오로-4-하이드록실-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)프로폭시)메틸)아세트아미드 (B1)의 합성



[0516]

[0517]

단계 1:

[0518]

화합물 A2(160 mg, 0.365 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드(3 ml)에 용해시키고 여기에 (2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)메틸 아세테이트((B1A, 672 mg, 1.83 mmol)를 첨가하고, 이어서 에틸 아세테이트 중 염산(0.073 ml, 3M)을 반응 용액에 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS 검출에 따르면 반응이 완료된 것으로 나타났다. 반응 용액을 직접 역상 크로마토그래피(아세트오닐트릴/수 중 0.05% FA: 5% 내지 50%)로 정제하여 표적 화합물 B1B(80 mg, 수율 29.0%)를 백색 고체로서 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 747.4$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.74 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 1H), 7.99 – 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.63 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.32 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.26 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 4H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

[0519]

[0520]

단계 2: B1B(240 mg)를 DMF(5 ml)에 용해시키고, 여기에 피페리딘(1 ml)을 첨가하고, 이어서 화합물을 20분 동안 교반하였다. 용액을 감압 증발시켜 저-비등 성분을 제거하고, 잔사를 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0521]

ESI-MS(m/z): 525.2 $[M+H]^+$.

[0522]

소량의 조 생성물을 역상 크로마토그래피(아세토니트릴/수 중 0.05% FA: 5% 내지 50%)로 정제하여 표적 화합물을 제공하였다.

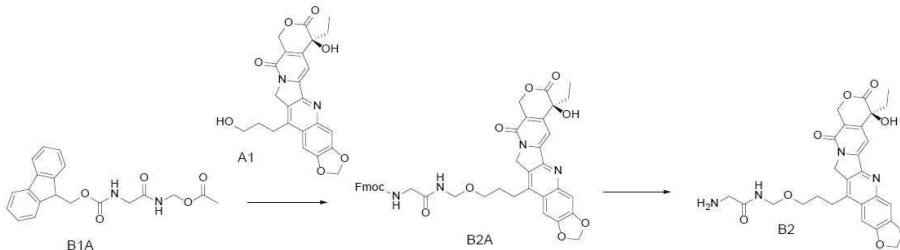
ESI-MS (m/z): 525.1 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.13 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.02 (brs, 2H), 7.89 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.98-1.84 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

[0523]

[0524]

실시예 11.5: (S)-2-아미노-N-((3-(7-에틸-7-하이드록실-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노 [1,2-b]퀴놀린-14-일)프로폭시)메틸)아세트아미드 (B2)의 합성



[0525]

[0526]

단계 1: 화합물(B1A)(368 mg), 화합물(A1)(440 mg) 및 피리디늄 p-톨루엔설포산(PPTS)(25 mg)을 디클로로메탄(20 ml)에서 20시간 동안 환류시키고, 이어서 반응 용액을 중탄산나트륨 수용액 및 염산 수용액으로 각각 세척하였다. 유기 용매를 감압 제거하여 조 생성물을 수득하고, 이를 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올 = 10/1)로 분리 및 정제시켜 표적 화합물 B2A(240 mg)를 수득하였다.

[0527]

LCMS(ESI) $[M+H]^+ : 759$.

[0528]

단계 2: B2A(240 mg)를 DMF(5 ml)에 용해시키고, 여기에 피페리딘(1 ml)을 첨가하고, 이어서 화합물을 20분간 교반하였다. 저 비점 성분을 감압 하에서 제거하고, 잔사를 다음 합성 단계에 바로 사용하였다. 소량의 조 생성물을 역상 크로마토그래피(아세토니트릴/수 중 0.05 % FA: 5% 내지 50%)로 정제하여 표적 화합물 B2 를 수득하였다.

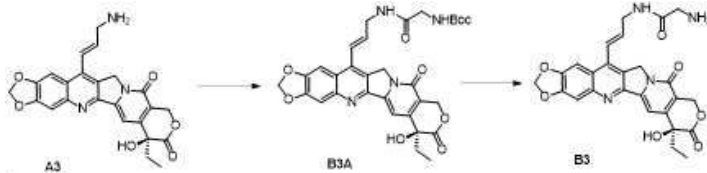
ESI-MS (m/z): 537 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.13 (t, 1H), 8.04 (br, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.65 (d, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 0.88 (t, 3H).

[0529]

[0530]

실시예 11.6: (S,E)-2-아미노-N-(3-(7-에틸-7-하이드록실-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-14-일)알릴)아세트아미드 (B3)



[0531]

[0532] 단계 1:

[0533] 실온에서, N,N-디메틸포름아미드(5 ml) 중의 화합물 A3(200 mg, 0.447 mmol)의 용액에 트리에틸아민(135 mg, 1.341 mmol) 및 N-하이드록시-2,5-디옥소피롤리딘-1-일(3급-부톡시카르보닐)글리시네이트(183 mg, 0.671 mmol)를 첨가하고, 이어서 혼합물을 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 용액에 물(20 ml)을 첨가하고 생성 혼합물을 에틸 아세테이트(20 ml×3)로 추출하였다. 유기층을 포화 염수로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조 및 농축시켜 표적 화합물 B3A(130 mg, 수율: 48%)를 갈색 고체로서 수득하였다.

[0534] LCMS(ESI) $[M+H]^+ = 605.6$.

[0535] 단계 2:

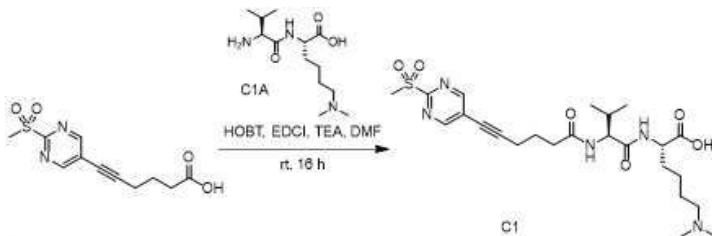
[0536] 실온에서, 화합물 B3A(130 mg, 0.215 mmol)를 1,4-디옥산(5 ml) 중의 HCl 용액에 용해시키고, 이어서 실온에서 30분간 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 용액을 역상 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표적 화합물 B3(60 mg, 수율: 52%)을 갈색 고체로서 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 505.2$.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.21 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.86 – 1.82 (m, 4H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

[0537]

[0538] 실시예 11.7: N⁶,N⁶-디메틸-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신 (C1)



[0539]

[0540] 6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노산(268 mg), 화합물 C1A(328 mg) 및 트리에틸아민(322 mg)을 N,N-디메틸포름아미드(5 ml)에 용해시켰다. 이어서, 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBT, 162 mg) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDCI, 229 mg)를 첨가하고 반응 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 역상 C18 컬럼(아세토니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템) 상에서 직접 정제시켜 표적 화합물 N⁶,N⁶-디메틸-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신(C1, 백색 고체, 327 mg)을 수득하였다.

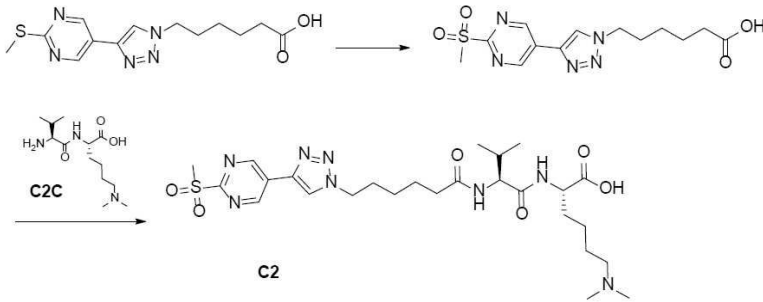
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 524.4$.

1H NMR (400 MHz) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.21 (dd, $J = 8.8, 6.9$ Hz, 1H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, $J = 12.8, 6.8$ Hz, 6H).

[0541]

[0542] 실시예 11.8: N⁶,N⁶-디메틸-N²-((6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노일)-L-발

리닐)-L-리신 (C2)



[0543]

[0544]

단계 1:

[0545]

화합물 6-(4-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노산(C2A, 1.0 g, 3.3 mmol)을 테트라하이드로푸란 및 수의 혼합 용매(40 ml, 3:1)에 용해시키고, 여기에 칼륨 퍼옥시모노설포네이트(10.0 g, 16.3mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하고, LCMS 검출에 의해 나타난 바와 같이 완료하였다. 반응 용액을 여과하였다. 케이크를 DMSO로 세척하고, 여액을 합하여 역상 정제(C18, 아세토니트릴: 0.1% 포름산 = 5%-55%)시켜 백색 고체로서 6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노산(C2B, 750 mg, 수율 67.9%)을 제공하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 340.1;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.48 (s, 2H), 8.95 (s, 1H), 4.49 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H).

[0546]

[0547]

단계 2:

[0548]

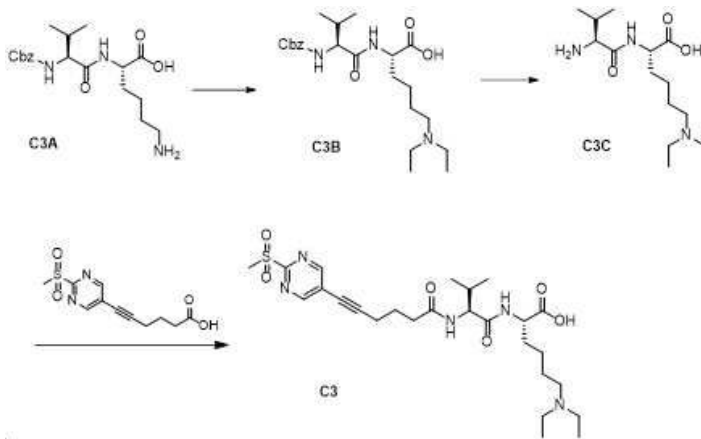
화합물 6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노산(C2B, 300 mg, 0.88 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(6 ml)에 용해시키고, 여기에 HATU(337 mg, 0.88 mmol) 및 DIPEA(286 mg, 2.21 mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이어서, 디펩티드 C1.16-D(243 mg, 0.88 mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응의 완료를 가리켰으며, 반응 용액을 C18 컬럼(아세토니트릴/0.01% FA 수용액: 5%-50%) 상에서 분리 및 정제시켜 표적 화합물 N⁶,N⁶-디메틸-N²-((6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노일)-L-발리닐)-L-리신(C2, 300 mg, 수율 57%)을 백색 고체로서 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 595.5, t_R = 2.024 min.

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.84 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.48 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.17 – 4.15 (m, 1H), 4.02 (br s, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.42 (br s, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.88 (dd, J = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.67 (br s, 1H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.43 (br s, 2H), 1.28 – 1.26 (m, 5H), 0.83 – 0.89 (m, 6H).

[0549]

[0550] 실시예 11.9: N⁶,N⁶-디에틸-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신 (C3)



[0551]

[0552] 단계 1:

[0553] 화합물 C3A(5.0 g, 12.05 mmol)를 디클로로메탄(100 ml)에 용해시키고, 여기에 아세트알데히드(3.2 g, 72.3 mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 10분 동안 교반시켰다. 이어서, 반응 용액에 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드(12.8 g, 60.25 mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응의 완료를 보여주었다. 반응 용액에 포화 염화암모늄 수용액을 첨가하고 이어서 1시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 회전 하에 증발 건조시켰다. 조 생성물을 역상 C18 컬럼(아세토니트릴 대 0.05% 포름산 수용액: 5% 내지 55%)으로 분리 및 정제시켜 백색 고체로서 표적 화합물 C3B(4.57 g, 수율 82.0%)를 수득하였다.

LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 436.4;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.70 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, J = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 2.74 (dd, J = 14.0, 6.9 Hz, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, 6H).

[0554]

[0555] 단계 2:

[0556] 실온에서, 화합물 C3B(1.6 g, 3.68 mmol)를 메탄올(80 ml)에 용해시키고, 이어서 여기에 Pd/C(0.16 g)를 첨가하고, 반응물을 수소 분위기 하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 여과하고 여액을 감압 농축시켜 표적 화합물 C3C(900 mg, 수율 82%)를 회색 고체로서 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.30 – 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

[0557]

[0558] 단계 3:

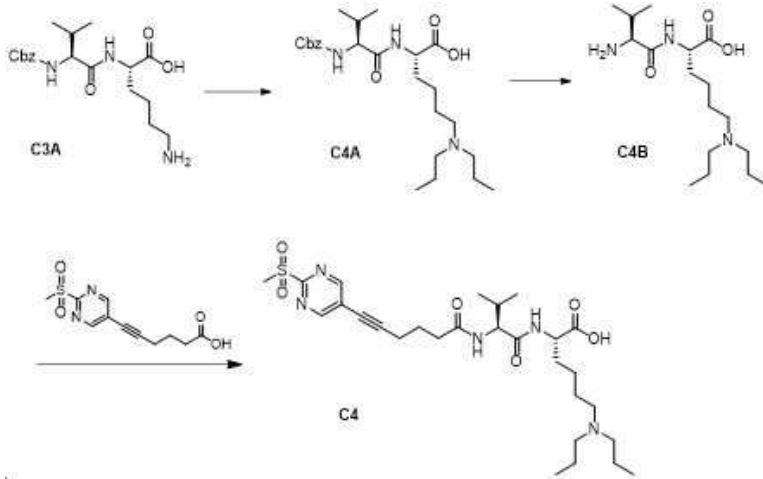
[0559] 화합물 6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노산(268 mg, 1 mmol)을 DMF(8 ml)에 용해시키고, 여기에 HATU(380 mg, 1 mmol) 및 트리에틸아민(322 mg, 2.5 mmol)을 연속적으로 첨가하고 이어서 실온에서 20분간 교반한 다음, 화합물 C3C(301 mg, 1 mmol)를 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 30분 동안 추가로 교반하였다. LCMS 검출에 의한 반응의 완료 후, 반응 용액을 역상 C18 컬럼(아세토니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템) 상에서 직접 정제시켜 백색 고체로서 표적 화합물 C3(280 mg, 수율 51%)을 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 552.3$; ,

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 12.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 – 2.69 (m, 4H), 2.62 – 2.52 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.87 – 0.82 (m, 6H). ,

[0560]

[0561] 실시예 11.10: N⁶,N⁶-디프로필-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신 (C4)



[0562]

[0563] 단계 1:

[0564] 화합물 C3A(5.0 g, 12 mmol)를 디클로로메탄(100 mL)에 용해시키고, 여기에 n-프로피온알데히드(4.2 g, 72.3 mmol)를 첨가하고, 이어서 반응물을 실온에서 10분 동안 교반한 다음, 나트륨 트리야세톡시보로하이드라이드(12.8 g, 60.25 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 용액에 염화암모늄 포화 수용액을 첨가하고, 이어서 용액을 1시간 동안 교반하고 회전 하에서 증발 건조시켰다. 여과 후, 여액을 역상 C18 컬럼(아세토니트릴 대 0.05% 포름산 수용액: 5% 내지 55%) 상에서 분리 및 정제시켜 백색 고체로서 표적 화합물 C4A(4.57 g, 수율 82.0%)를 수득하였다.

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 464.0$; ,

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.81 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.82 (m, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.53 (m, 1H), 1.52 – 1.40 (m, 6H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 12H). ,

[0565]

[0566] 단계 2:

[0567] 실온에서, 화합물 C4A(2.0 g, 4.32 mmol)를 메탄올(80 mL)에 용해시키고, 이어서 여기에 Pd/C(0.16g)를 첨가하고, 반응물을 수소 분위기 하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 여과하고 여액을 감압 농축시켜 백색 고체로서 표적 화합물 C4B(1.2 g, 수율 85.5%)를 수득하였다.

[0568]

단계 3:

[0569] 화합물 6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노산(100 mg, 0.373 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(1 mL)에 용해시키고, 이어서 여기에 HATU(142 mg, 0.373 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(120 mg, 0.93 mmol)을 첨가하고, 반응물을 30 분 동안 교반하였다. 이어서, 화합물 C4B(122 mg, 0.371 mmol)를 첨가하고, 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS가 반응이 완료된 것으로 가리킨 후에, 반응 용액을 역상 C18 컬럼(아세토니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템) 상에서 직접 정제시켜 담황색 고체로서 표적 화합물 N⁶,N⁶-디프로필-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신(C4, 50 mg, 수율 28 %)을 수득하였다.

LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 580.0;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 – 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.42 (m, 6H), 1.37 – 1.24 (m, 2H), 0.93 – 0.78 (m, 12H).

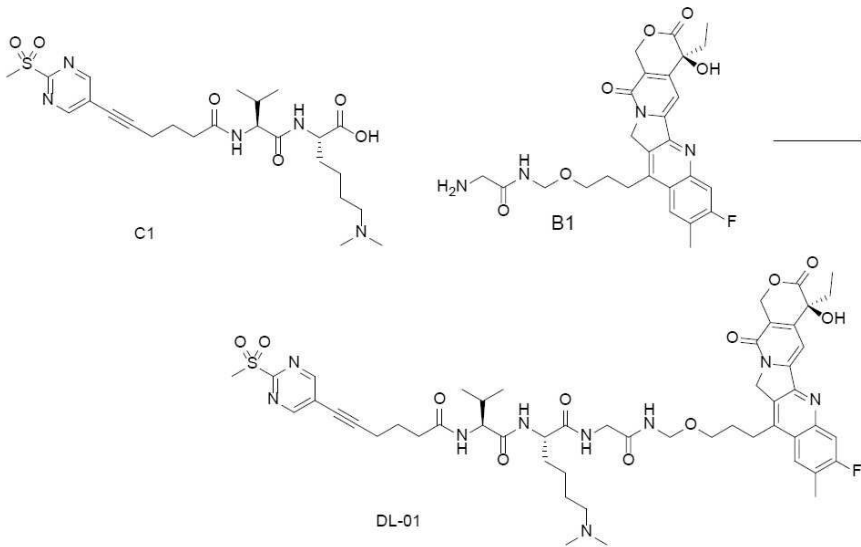
[0570]

[0571]

실시예 12 약물-링커 화합물의 합성

[0572]

실시예 12.1: N-((11S, 14S)-11-(4-(디메틸아미노)butyl)-1-((S)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록실-9-메틸-3, 14-디옥소-3, 4, 12, 14-테트라하이드로-1H-피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-b]퀴놀린-11-일)-15-메틸-7, 10, 13-트리옥소-4-옥사-6, 9, 12-트리아자헥사데칸-14-일)-6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-인아미드 (DL-01)



[0573]

[0574]

화합물 N⁶, N⁶-디메틸-N²-((6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-이노닐)-L-발리닐)-L-리신(126 mg)(C1), B1(150 mg), 1-하이드록시벤조트리아졸(49 mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(69 mg) 및 디소프로필에틸아민(156 mg, 1.21 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(10 ml)에 용해시키고, 이어서 반응물을 40℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 여과하고 분취용 HPLC(아세토니트릴/0.05% 포름산을 함유하는 수)로 정제시켜 황색 고체로서 화합물 N-((11S, 14S)-11-(4-(디메틸아미노)부틸)-1-((S)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-9-메틸-3, 14-디옥소-3, 4, 12, 14-테트라하이드로-1H-피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-b]퀴놀린-11-일)-15-메틸-7, 10, 13-트리옥소-4-옥사-6, 9, 12-트리아자헥사데칸-14-일)-6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미드(DL-01)(12 mg, 수율 6.0%)를 수득하였다.

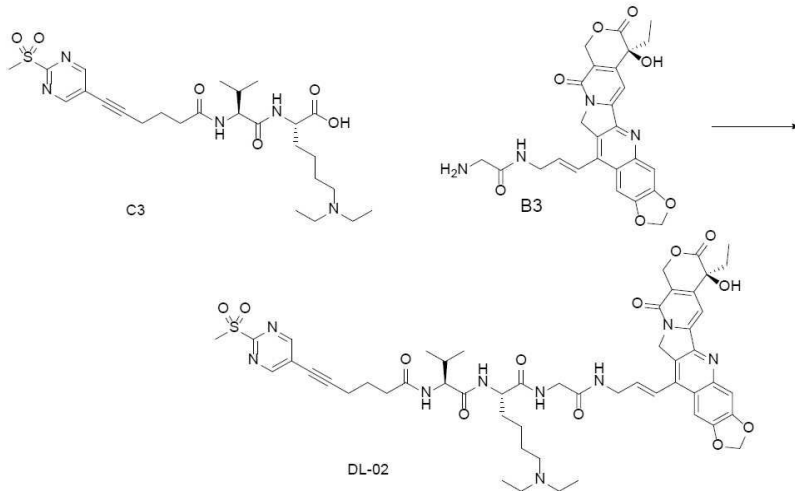
LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1030.6;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.10 (s, 2H), 8.62 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 8.23 – 8.13 (m, 2H), 8.07 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.95 – 7.83 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.64 – 4.53 (m, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.23 – 3.19 (m, 2H), 2.67 – 2.62 (m, 2H), 2.57 – 2.54 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.42 – 2.26 (m, 3H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.68 – 1.66 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.25 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.82 (t, J = 6.3 Hz, 6H).

[0575]

[0576]

실시예 12.2: N-((S)-1-(((S)-6-(디에틸아미노)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-에틸-7-하이드록실-8, 11-디옥소-7, 8, 11, 13-테트라하이드로-10H-[1, 3]디옥솔로[4, 5-g]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-b]퀴놀린-14-일)알릴)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥산-5-인아미드(DL-02)



[0577]

[0578]

N,N-디메틸포름아미드(4 ml) 중의 화합물 B3(40 mg, 0.074 mmol) 및 화합물 C3(40 mg, 0.072 mmol)의 용액에 HBTU(30 mg, 0.079 mmol) 및 DIPEA(26 mg, 0.2 mmol)를 순차적으로 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 분취용 HPLC(아세트니트릴/수 중 0.05% 트리플루오로아세트산)로 정제시켜 화합물 N-((S)-1-(((S)-6-(디에틸아미노)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-14-일)알릴)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미드(DL-02, 11.1 mg, 수율 14%)를 제공하였다.

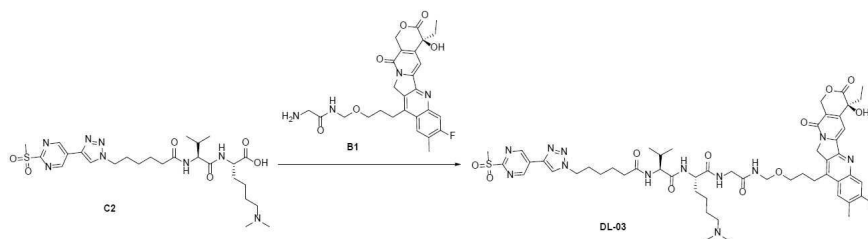
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1038.6;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.10 (s, 2H), 9.02 (s, 1H, TFA), 8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.52 – 6.50 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.28 – 5.24 (m, 2H), 4.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.81 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.11 – 3.07 (m, 6H), 2.97 (br s, 2H), 2.53 – 2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.24 (m, 4H), 1.85 – 1.79 (m, 8H), 1.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H).

[0579]

[0580]

실시에 12.3: (S)-6-(디메틸아미노)-N-(2-(((3-((S)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록실-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)프로필옥시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)-2-((S)-3-메틸-2-(6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥산아미도)부탄아미도)헥산아미드(DL-03)



[0581]

[0582]

화합물 C2(113 mg, 0.19 mmol) 및 화합물 B1(100 mg, 0.19 mmol)을 DMF(1 ml)에 용해시키고, 이어서 여기에 HBTU(72 mg, 0.19 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(61 mg, 0.48 mmol)을 첨가하였다. 첨가 후, 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 용액을 분취용 크로마토그래피(수 중 0.01% TFA, MeCN)로 정제시켜 백색 고체로서 표적 화합물 (S)-6-(디메틸아미노)-N-(2-(((3-((S)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)프로필옥시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)-2-((S)-3-메틸-2-(6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥산아미도)부탄아미도)헥산아미드(DL-03, 16 mg, 수율 8%)를 제공하였다.

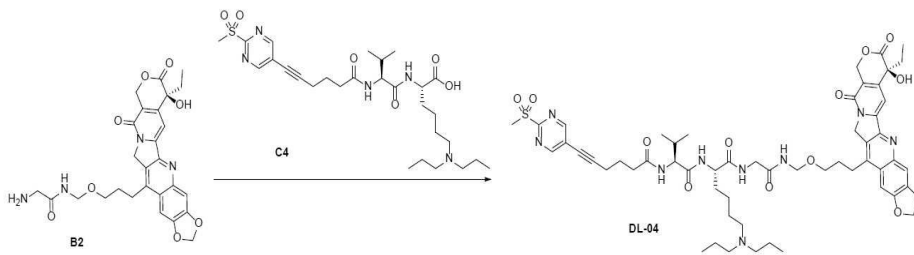
LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1101.6; -

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.20 – 8.28 (m, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.54 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.29 – 4.19 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.24 – 3.14 (m, 2H), 3.01 – 2.91 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 2.23 – 2.07 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 6H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.45 (m, 6H), 1.34 – 1.22 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H). -

[0583]

[0584]

실시예 12.4: N-((11S, 14S)-11-(4-(*n*-프로필아미노)butyl)-1-((S)-7-에틸-7-하이드록실-8, 11-디옥소-7, 8, 11, 13-테트라하이드로-10H-[1, 3]디옥솔로[4, 5-*g*]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-*b*]퀴놀린-14-일)-15-메틸-7, 10, 13-트리옥소-4-옥사-6, 9, 12-트리아자헥사테칸-14-일)-6-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)핵산-5-인아미드 (DL-04)



[0585]

[0586]

화합물 C4(43 mg, 0.074 mmol) 및 화합물 B2(40 mg, 0.075 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드(1 ml)에 용해시키고, 이어서 여기에 HBTU(28 mg, 0.075 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(24 mg, 0.187 mmol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS 검출은 반응의 완료를 나타내었다. 반응 용액을 분취용 크로마토 그래피(수 중 0.01% 트리플루오로아세트산, 아세토니트릴)에 의해 직접 정제시켜 황색 고체로서 표적 화합물 (DL-04, 8.5 mg, 수율 10%)을 제공하였다.

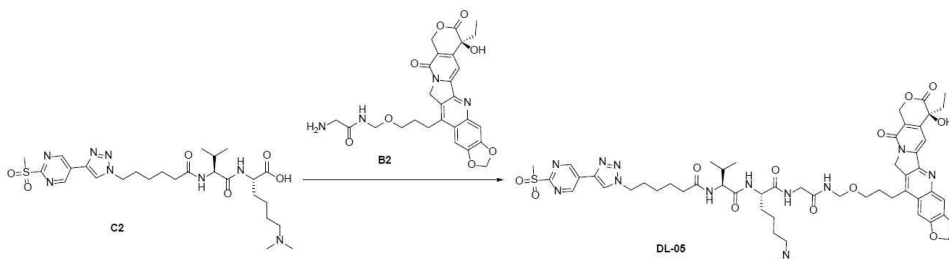
LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1098.6; -

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.49 – 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 6H), 1.31 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 15H). -

[0587]

[0588]

실시예 12.5: (S)-6-(디메틸아미노)-N-(2-(((S)-7-에틸-7-하이드록실-8, 11-디옥소-7, 8, 11, 13-테트라하이드로-10H-[1, 3]디옥솔로[4, 5-*g*]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-*b*]퀴놀린-14-일)프로필옥시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)-2-((S)-3-메틸-2-(6-(4-(2-(메탄설포닐)피리미딘-5-일)-1H-1, 2, 3-트리아졸-1-일)핵산아미도)부탄아미도)핵산아미드 (DL-05)



[0589]

[0590] 화합물 C2(40 mg, 0.06 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드(1.5 ml)에 용해시키고, 여기에 HBTU(26 mg, 0.06 mmol), B2(36 mg, 0.06 mmol) 및 DIPEA(66 mg, 0.17 mmol)를 연속적으로 첨가하고, 이어서 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS 검출은 반응의 완료를 나타내었다. 반응 용액을 분취용 크로마토그래피(아세트니트릴/수중 0.05% 트리플루오로아세트산)로 분리 및 정제시켜 옥수수-황색 고체로서 표적 화합물 DL-05(13.88 mg, TFA 염, 수율 16%)를 제공하였다.

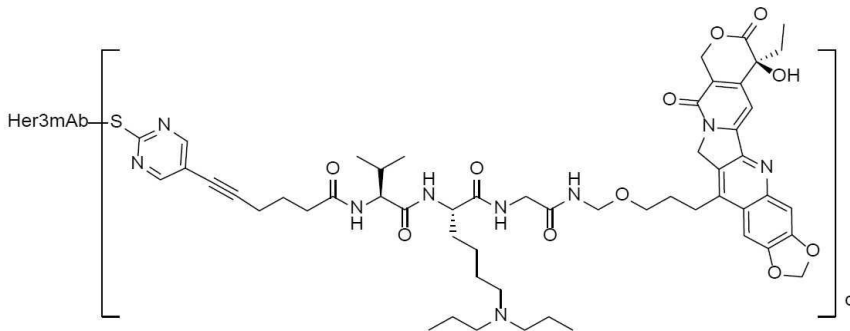
LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1113.7; -

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.46 (s, 2H), 9.29 (s, 1H, TFA 염), 8.92 (s, 1H), 8.63 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.18 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 4H), 3.53 – 3.48 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.10 – 3.08 (m, 2H), 2.97 – 2.95 (m, 2H), 2.75 (d, J = 4.9 Hz, 6H), 2.20 – 2.09 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 5H), 1.68 – 1.65 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 5H), 0.90 – 0.74 (m, 9H).

[0591]

[0592] 실시예 13 항-Her3 항체-약물 접합체의 제조

[0593] 실시예 13.1: Her3-ADC-07의 제조



[0594]

[0595] q는 DAR의 결정에서 제공된 데이터에서 추론할 수 있다.

[0596] 13.1.1 Her3-ADC-07(DAR8) 샘플의 제조

[0597] 항-Her3 항체 202-2-1 30 mg을 희석제(20 mM PB + 105 mM NaCl, pH 7.7)로 희석하고, 여기에 에테트산 나트륨 용액을 최종 농도 5 mM이 되도록 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고, 20 mmol/L의 TCEP 용액을 항체의 4.5배 몰 당량으로 첨가한 후, 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 30분 동안 정치시키고; 상기 용액에 10 mmol/L의 디메틸 설폭사이드 중의 DL-04를 10배 몰 당량(항체 대비)으로 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 2시간 동안 정치시켜 접합된 샘플을 수득하였다. 반응이 완료된 후 30 KDa 한외여과 튜브를 사용하여 샘플을 pH 5.5의 10 mM 히스티딘 완충액으로 옮겨 저 분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축시켜 항체 202-2-1 ADC 조성물 Her3-ADC-07(DAR8)을 함유하는 용액을 수득하였다. 평균 DAR 값은 실시예 14의 질량 분석법에 의해 8.0인 것으로 측정되었다.

[0598] Her3-ADC-07(DAR8)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 0%, 100%였다), 중쇄는 0-3개의 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 0%, 0%, 0%, 100%였다). q 값은 8인 것으로 추론될 수 있다.

[0599] 13.1.2 Her3-ADC-07(DAR4) 샘플의 제조

[0600] 항-Her3 항체 202-2-1 30 mg을 희석제(20 mM PB + 105 mM NaCl, pH 7.7)로 희석하고, 여기에 에테트산 나트륨 용액을 최종 농도 5 mM이 되도록 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고, 20 mmol/L의 TCEP 용액을 항체의 4.5배 몰 당량으로 첨가한 후, 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 30분 동안 정치시키고; 상기 용액에 10 mmol/L의 디메틸 설폭사이드 중의 DL-04를 4.8배 몰 당량(항체 대비)으로 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 2시간 동안 정치시켜 접합된 샘플을 수득하였다. 반응이 완료된 후 30 KDa 한외여과 튜브를 사용하여 샘플을 pH 5.5의 10 mM 히스티딘 완충액으로 옮겨 저 분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축시켜 항체 202-2-1 ADC 조성물 Her3-ADC-07(DAR4)을 함유하는 용액을 수득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법에

의해 4.5인 것으로 측정되었다.

[0601] Her3-ADC-07(DAR4)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 93.67%, 6.33%였다), 중쇄는 0-3개의 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 19.23%, 7.01%, 10.66%, 63.1%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 수 있는 것으로 추론될 수 있다.

[0602] 13.1.3 Her3-ADC-07(DAR6) 샘플의 제조

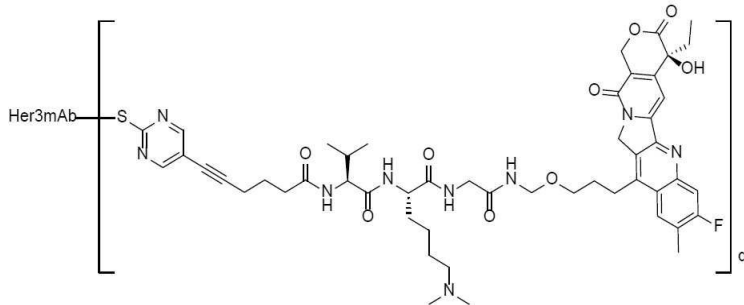
[0603] 항-Her3 항체 202-2-1 30 mg을 희석제(20 mM PB + 105 mM NaCl, pH 7.7)로 희석하고, 여기에 에테트산 나트륨 용액을 최종 농도 5 mM이 되도록 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고, 20 mmol/L의 TCEP 용액을 항체의 4.5배 몰 당량으로 첨가한 후, 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 30분 동안 정치시키고; 상기 용액에 10 mmol/L의 디메틸 설폭사이드 중의 DL-04를 7.2배 몰 당량(항체 대비)으로 첨가하고, 이어서 용액을 균질하게 혼합하고 실온에서 2시간 동안 정치시켜 접합된 샘플을 수득하였다. 반응이 완료된 후 30 KDa 한외여과 튜브를 사용하여 샘플을 pH 5.5의 10 mM 히스티딘 완충액으로 옮겨 저 분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축시켜 항체 202-2-1 ADC 조성물 Her3-ADC-07(DAR6)을 함유하는 용액을 수득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법에 의해 5.8인 것으로 측정되었다.

[0604] Her3-ADC-07(DAR6)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 81.31%, 18.69%였다), 중쇄는 0-3개의 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 7.17%, 2.36%, 4.44%, 86.03%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 수 있는 것으로 추론될 수 있다.

[0605] 13.2 Her3-ADC-05(DAR4)의 제조

[0606] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 화합물 DL-01로 대체하여 DL-01과 항체 202-2-1과의 커플링 생성물인 Her3-ADC-05(DAR4)를 수득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.0이었다.

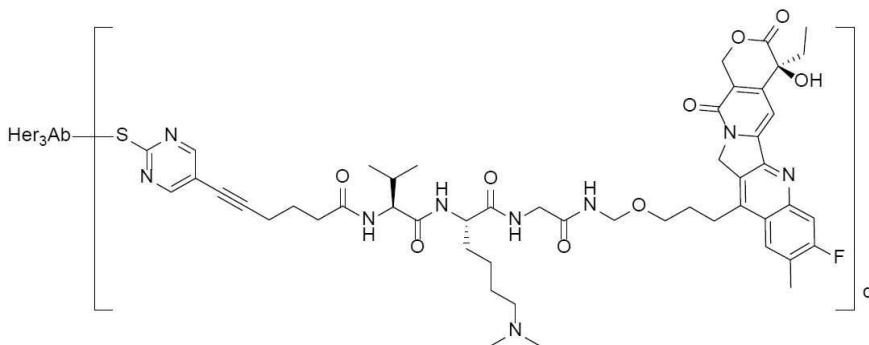
[0607] Her3-ADC-05(DAR4)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 90.89%, 9.11%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 25.1%, 7.17%, 18.19%, 49.53%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.



[0608]

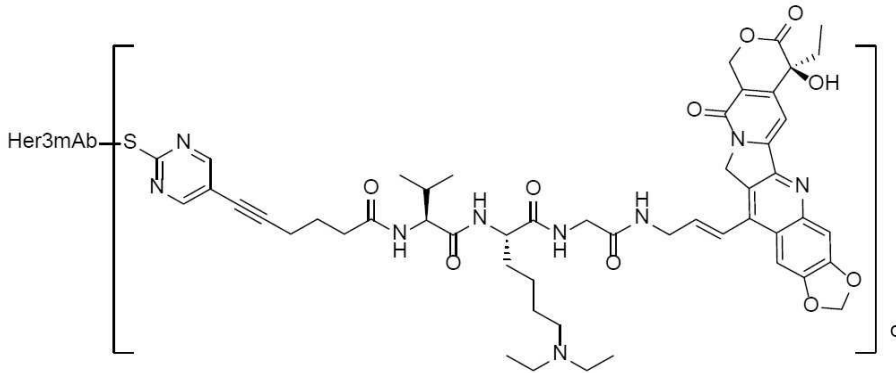
[0609] 실시예 13.3: Her3-C3-ADC-05(DAR4)(DAR4) 샘플의 제조

[0610] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 화합물 DL-01로 대체하고, 실시예 13.1.2의 항-Her3 항체 202-2-1을 대조용 항체 2로 대체하여, DL-01과 대조용 항체 2와의 커플링 생성물 Her3-C3-ADC-05(DAR4)를 수득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.7이었다.



[0611]

[0612] 실시예 13.4 : Her3-ADC-15의 제조



[0613] .
 [0614] q는 DAR의 결정에서 제공된 데이터로부터 추론될 수 있다.

[0615] 13.4.1 Her3-ADC-15(DAR8) 샘플의 제조

[0616] 실시예 13.1.1의 화합물 DL-04를 화합물 DL-02로 대체하여 DL-02와 항체 202-2-1과의 커플링 생성물인 Her3-ADC-15(DAR8)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 7.9였다.

[0617] Her3-ADC-15(DAR8)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 0%, 100%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 0%, 0%, 6.31%, 93.69%였다). q 값은 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.

[0618] 13.4.2 Her3-ADC-15(DAR2) 샘플의 제조

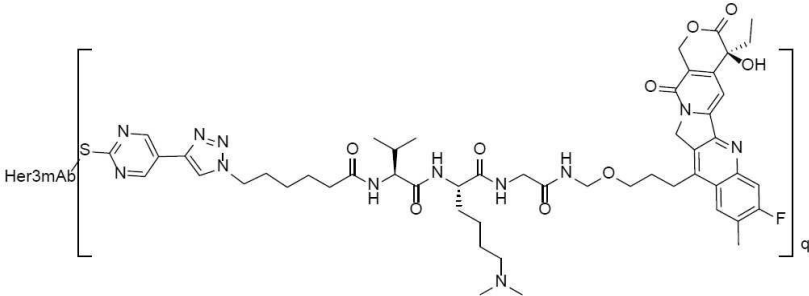
[0619] 실시예 13.1.1의 화합물 DL-04를 2몰 당량의 화합물 DL-02로 대체하여 DL-02와 항체 202-2-1과의 커플링 생성물인 Her3-ADC-15(DAR2)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 2.0이었다.

[0620] Her3-ADC-15(DAR2)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 93.82%, 6.18%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 61.16%, 5.77%, 11.02%, 22.05%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.

[0621] 실시예 13.5: Her3-ADC-23(DAR4)의 제조

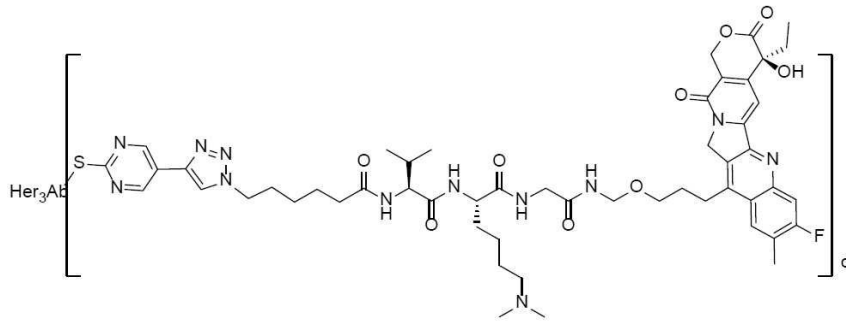
[0622] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 화합물 DL-03으로 대체하여 DL-03과 항체 202-2-1과의 커플링 생성물인 Her3-ADC-23(DAR4)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.2였다.

[0623] Her3-ADC-23(DAR4)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 91.28%, 8.72%이다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 19.24%, 8.67%, 21.97%, 50.13%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.



[0624] .
 [0625] 실시예 13.6: Her3-C3-ADC-23(DAR4)의 제조

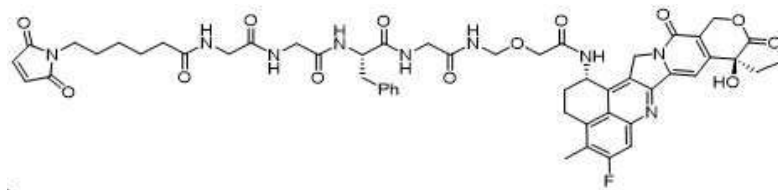
[0626] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 화합물 DL-03으로 대체하고, 13.1.2의 Her3 항체 202-2-1을 대조용 항체 2로 대체하여, DL-03과 대조용 항체 2와의 커플링 생성물인 Her3-C3-ADC-23(DAR4)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.9였다.



[0627]

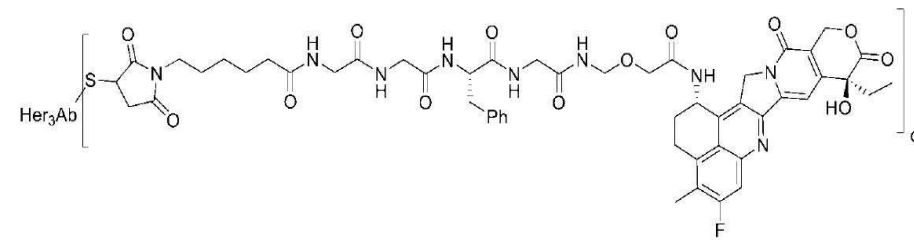
[0628] 실시예 13.7: Her3-C3-ADC-21(DAR4) 샘플의 제조

[0629] CN104755494B를 참조하여, 하기 약물-링커 화합물을 제조하였다,



[0630]

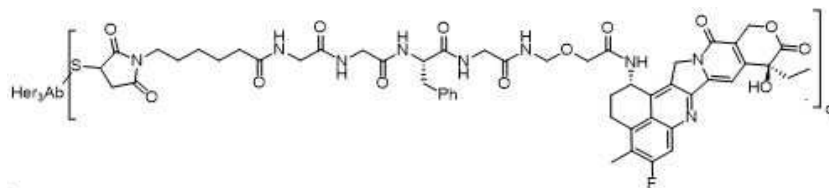
[0631] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 상기 약물-링커 화합물로 대체하고, 실시예 13.1.2의 항-Her3 항체 202-2-1을 대조용 항체 2로 대체하여, Her3-C3-ADC-21(DAR4)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.4였다.



[0632]

[0633] 실시예 13.8: Her3-C3-ADC-21(DAR8) 샘플의 제조

[0634] 실시예 13.1.1의 화합물 DL-04를 실시예 13.7의 약물-링커 화합물로 대체하고, 실시예 13.1.1의 항-Her3 항체 202-2-1을 대조용 항체 2로 대체하여, Her3-C3-ADC-21(DAR8)을 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 9.5였다.

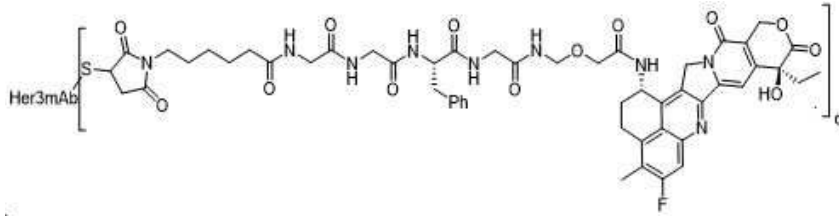


[0635]

[0636] 실시예 13.9: Her3-ADC-21(DAR4) 샘플의 제조

[0637] 실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 실시예 13.7의 약물-링커 화합물로 대체하여 상기 약물-링커 화합물과 항체 202-2-1 항체와의 커플링 생성물인 Her3-ADC-21(DAR4)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.1이었다.

[0638] Her3-ADC-21(DAR4)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 100%, 0%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 20.57%, 8.01%, 17.3%, 54.12%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.



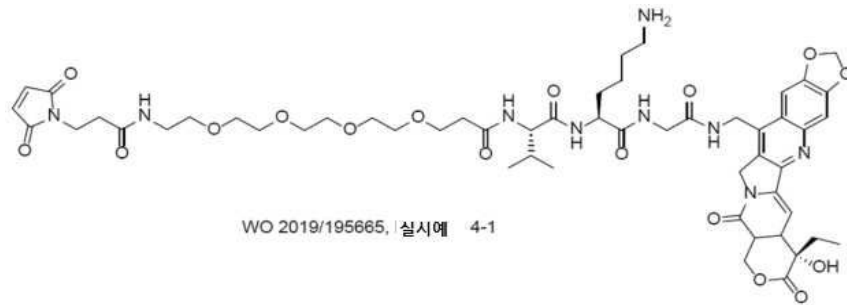
[0639]

[0640]

실시예 13.10: Her3-ADC-33의 제조

[0641]

WO2019195665의 실시예 4-1을 참조하여 하기 약물-링커 화합물을 제조하였다,



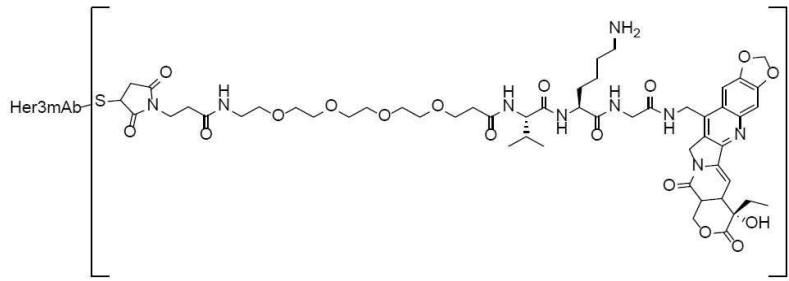
[0642]

[0643]

실시예 13.1.2의 화합물 DL-04를 상기 약물-링커 화합물로 대체하여, 상기 약물-링커 화합물과 항체 202-2-1 항체와의 커플링 생성물인 Her3-ADC-33(DAR4)를 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 5.6이었다.

[0644]

Her3-ADC-33(DAR4)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1의 백분율은 각각 49%, 51%이다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 18.01%, 3.25%, 9.13%, 69.62%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있는 것으로 추론할 수 있다.



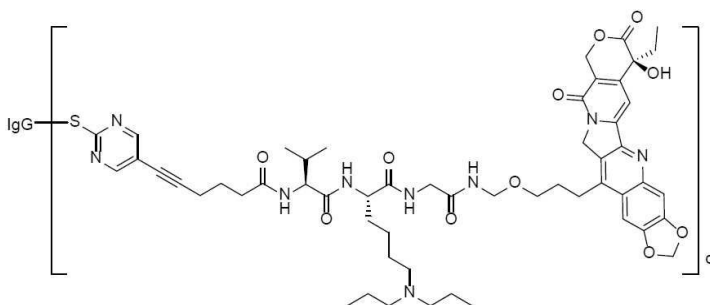
[0645]

[0646]

실시예 13.11: IgG-ADC-07(DAR8)의 제조

[0647]

실시예 13.1.1의 항체 202-2-1을 IgG1 아이소타입 항체(MediLink Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd.의 항-Hen Egg 리소자임 항체)로 대체하여, DL-04와 항체 IgG1과의 커플링 생성물인 IgG1-ADC-07을 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 8.0이었다.

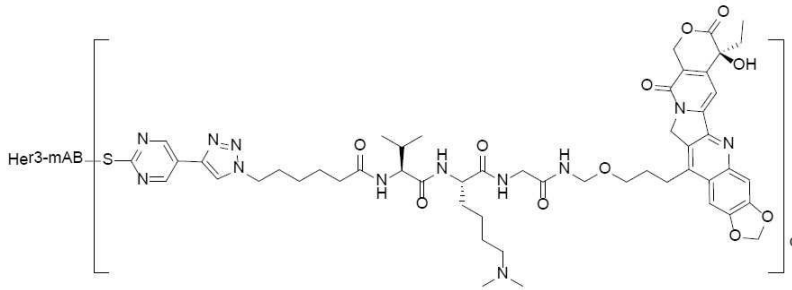


[0648]

[0649]

참고: Her3mAb 및 Her3Ab는 모두 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭하며, 특히 상기 실시예에서 Her3mAb는 항체 202-2-1이고 Her3Ab는 대조용 항체 2이다.

[0650] 실시예 13.12: Her3-ADC-08의 제조



[0651]
 [0652] q는 DAR의 결정에서 제공된 데이터로부터 추론할 수 있다.

[0653] (1) Her3-ADC-08(DAR6) 샘플의 제조

[0654] 실시예 13.1.3 "Her3-ADC-07(DAR6) 샘플의 제조"에서 화합물 DL-04를 DL-05로 대체하여 DL-05와 항체 202-2-1과의 커플링 생성물 Her3-ADC-08(DAR6)을 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 4.9였다. Her3-ADC-08(DAR6)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1 백분율은 각각 66.58%, 33.42%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 16.51%, 11.72%, 16.63%, 55.59%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있는 것으로 추론될 수 있다.

[0655] (2) Her3-ADC-08(DAR2) 샘플의 제조

[0656] 실시예 13.1.1의 화합물 DL-04를 2 몰 당량의 DL-05로 대체하여 DL-05와 항체 202-2-1과의 커플링 생성물 Her3-ADC-08(DAR2)을 획득하였다. 평균 DAR 값은 질량 분석법으로 측정된 결과 1.9였다. Her3-ADC-08(DAR2)의 질량 분석 결과에 따르면, 항체 경쇄는 0-1 독소 분자와 접합되었고(LC, DAR1 백분율은 각각 96.61%, 3.39%였다), 중쇄는 0-3 독소 분자와 접합되었다(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 58.72%, 9.05%, 15.41%, 16.83%였다). q 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있는 것으로 추론될 수 있다.

[0657] 실시예 14 질량 분석법에 의한 접합된 샘플의 DAR 값의 결정

[0658] 검출: Her3-ADC-07(DAR8)의 분자량 및 DAR 값의 분석을 하기 조건을 사용하여 LC-MS에 의해 수행하였다.

[0659] 크로마토그래피 조건:

[0660] 컬럼: PLRP-S, 2.1*50 mm, 5 μm;

[0661] 이동상 A: 0.1% FA/H₂O; 이동상 B: 0.1% FA/ACN

[0662] 컬럼 온도: 30°C; 샘플 챔버 온도: 8°C; 유량: 0.6 ml/분; 주입 부피: 2 μl

시간(분)	1	5	5.1	7	10
이동상 A	90	40	10	90	90
이동상 B	10	60	90	10	10

[0663]
 [0664] 샘플 처리: 샘플 50 μg에 1 M DTT(2 μl)를 첨가하고, 여기에 초순수를 50 μl 첨가하여 용액을 약 1.0 mg/ml 농도로 희석하고, 이어서 균질하게 혼합한 다음, 실온에서 30분 동안 환원시켰다.

[0665] LC/MS 모델: Agilent 1290-6545XT Q-TOF

[0666] MS 조건: 기체 온도: 320°C, 건조 기체: 분무기: 35 psi; 차단 기체(sheath gas) 온도: 350°C; 차단 기체 흐름: 11 l/분; m/z 500-3000.

[0667] 결과를 하기에 나타내었다:

[0668] [표 6]

[0669] 이론 및 실험 분자량.

펩티드 쇠		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	이론값	23243.8	24261.2	25278.6	26296
	실험값	검출 안 됨	24258	검출 안 됨	검출 안 됨
HC	이론값	50598.6	51616	52633.4	53650.8
	실험값	검출 안 됨	검출 안 됨	검출 안 됨	53646

[0670]

[0671] 표 6에서, mAb는 접합되지 않은 항체를 나타내고; LC는 항체의 경쇄를 나타내고; HC는 항체의 중쇄를 나타내고; DAR1은 하나의 독소 분자와 접합된 경쇄 또는 중쇄를 함유하는 접합체를 나타내고; DAR2는 2개의 독소 분자와 접합된 경쇄 또는 중쇄를 포함하는 접합체를 나타내고; DAR3은 3개의 독소 분자와 접합된 경쇄 또는 중쇄를 포함하는 접합체를 나타내고; 여기서 단클론 항체의 이론적 분자량은 GOF 당형(glycoform)으로서 계산된다. 이하, mAb, LC, HC, DAR1, DAR2, DAR3을 상기와 같이 정의한다.

[0672] 검출 결과는, Her3-ADC-07(DAR8) 항체의 경쇄가 0~1개의 독소 분자와 접합된 반면(LC 및 DAR1의 백분율은 각각 0% 및 100%였다), 중쇄는 0~3개의 독소 분자와 접합되었음(mAb, DAR1, DAR2, DAR3의 백분율은 각각 0%, 0%, 0%, 100%였다)을 나타내었으며, 따라서 Her3-ADC-07(DAR8)의 항체-약물 커플링 비(DAR 값)는 8.0인 것으로 계산되었다.

[0673] 실시예 15 종양 세포주에 대한 항-Her3 ADC 약물의 시험관내 사멸 활성 분석

[0674] A. PC-9 및 NCI-H358 종양에 대한 Her3 ADC의 억제 활성의 결정

[0675] PC-9 종양 세포(인간 폐 선암종, Nanjing COBIOER Bioscience Co., Ltd.) 및 NCI-H358 종양 세포(인간 비-소세포 폐암, ATCC, CRL-5807)를 선택하여, 인간 Her3의 내인성 발현을 갖는 종양 세포주 상의 Her3-ADC-07의 사멸 활성을 검출하였다. 구체적인 실험 단계는 하기와 같았다: PC-9 세포 및 NCI-H358 세포를 절단하고, 원심분리에 의해 수집하고, 1640 + 4% FBS 배양 배지에 50000 세포/ml로 재현탁시키고, 이어서 96 웰 플레이트에 100 µl/웰로 도말하고; ADC 분자를, 총 11개의 희석 점으로 최종 농도 150 µM로부터 시작하여 3배 희석으로 1640 기본 배양 배지로 점진적으로 희석하고, 이를 상응하는 웰에 100µl/웰로 첨가하였으며, 최종 혈청 농도는 2%였고; 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 120시간 동안 배양하고; CCK8(Rhinogen)을 각 웰에 20 µl/웰로 첨가하고, 이어서 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 0.5~2.5시간 동안 배양하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기(MD, 모델 ABS Plus)에서 450 nm에서 30분마다 판독하고, 이어서 데이터를 곡선 피팅을 위해 Graphpad Prism으로 불러왔다.

[0676] 실험 결과를 도 6A 및 6B에 나타내었다. Her3-ADC-07은 PC-9 종양 세포(EC50 값이 49.26 nM이다)뿐만 아니라 NCI-H358 종양 세포(EC50 값이 183.3 nM이다)에 대해서도 사멸 활성을 가졌다.

[0677] B. KYSE520 종양에 대한 Her3 ADC의 억제 활성 결정

[0678] KYSE520(인간 식도 편평 세포 암종 종양 세포, ATCC)을 트립신을 사용하여 통상적인 방법으로 절단하고, 세포를 수집하여 튜브 내의 세포 수를 계수하고, 이어서 상응하는 분석 매질(2% FBS 함유)에 재현탁하고, 이를 96-웰 플레이트에 2000-5000 세포/웰로 첨가하였다. 2% FBS가 포함된 배지(표 7 참조)로 희석된 ADC 100 µl를 96웰 플레이트에 첨가하였으며, 초기 농도는 50 µg/ml이었고, 이어서 3배 희석하였다(11개의 농도 구배). 플레이트를 5% CO₂ 하에 37°C에서 5일 동안 배양하였다. 이어서 각 웰에 20 µl의 CCK8 시약을 첨가하고, 1-4시간 동안 반응을 수행하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기(검출 파장은 450 nm였다)에서 판독하였다. 실험에 사용된 세포 및 실험 결과를 표 7에 나타내었다.

[0679] [표 7]

ADC 샘플	KYSE520 (EC50, ng/mL)
Her3-ADC-05(DAR4)	19.01
Her3-C3-ADC-05(DAR4)	32.94

[0680]

[0681] 실험 결과는 Her3-ADC-05 및 Her3-C3-ADC-05가 모두 종양 세포에 대해 강한 사멸 효과가 있음을 가리켰다.

[0682] C. NCI-H358 종양에 대한 Her3 ADC의 억제 활성의 결정

[0683] 시험관내 세포 활성의 분석 방법: NCI-H358 종양 세포를 트립신을 사용하여 통상적인 방법으로 절단하고, 세포를 수집하고, 튜브 내 세포 수를 계수한 후, 상응하는 분석 배지(2% FBS 함유)에 재현탁시키고, 이를 2000-5000 개 세포/웰로 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 2% FBS가 포함된 배지로 희석된 ADC 100 μ l를 96-웰 플레이트에 첨가하였으며, 초기 농도는 150 μ g/ml이었고, 이어서 3배 희석하였다(11개의 농도 구배). 플레이트를 5% CO₂ 하에 37°C에서 7일 동안 배양하였다. 이어서 각 웰에 20 μ l의 CCK8 시약을 첨가하고 2~6시간 동안 반응을 수행하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기(검출 파장은 450 nm였다)에서 판독하였다. 각 샘플 그룹 및 실험 결과를 표 8에 나타내었다.

[0684] [표 8]

시험 그룹 번호	ADC 샘플	NCI-H358 (EC50, ng/mL)
1	Her3-ADC-05(DAR4)	47742
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	65109
	Her3-C3-ADC-21(DAR4)	76365
2	Her3-ADC-23(DAR4)	49330
	Her3-C3-ADC-23(DAR4)	weak
3	Her3-ADC-15(DAR2)	5572
	Her3-ADC-15(DAR8)	2562
	Her3-ADC-33(DAR4)	50774

[0685]

[0686] 본 실시예의 실험 결과는 본 개시내용에서 다양한 DAR 값을 갖는 ADC가 모두 종양 세포에 대한 사멸 효과를 가짐을 가리킨다.

[0687] 실시예 16 항-Her3 항체 약물 접합체 및 IgG-ADC의 생체내 활성 분석

[0688] 16.1 NCI-H358 이종이식 종양에 대한 항-Her3 항체 약물 접합체의 효능 분석

[0689] 생체내 효능을, Balb/c 누드 마우스의 인간 비-소세포 폐암 세포주 NCI-H358 세포(ATCC에서 입수 가능, Her3 발현 양성을 약 10%)의 피하 이식 종양 모델에서 항-Her3 항체 ADC 약물의 항종양 효과를 평가함으로써 입증하였다.

[0690] 구체적인 단계는 하기와 같다: 5-6주령의 암컷 Balb/c nu 누드 마우스를 Vital River Laboratory Animal Co., Ltd.에서 구입하였다. NCI-H358 세포를 1640 배지(10% FBS 함유)가 있는 15 cm 직경의 페트리 디쉬에서 배양하고, 용합율이 약 80-90%에 도달했을 때 트립신-EDTA로 절단하고, PBS로 2회 세척하고, 이어서 원심분리하고, 예냉된 PBS에 재현탁시켰다. 세포 계수기로 세포 수를 세고, 이어서 세포를 PBS로 5×10^7 세포/ml의 세포 농도로 희석하였다. 7일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후, Balb/c nu 마우스의 오른쪽 갈비뼈에 NCI-H358 세포를 5×10^6 세포/마우스의 접종량 및 0.2 ml의 접종 부피(50% Matrigel 함유)로 피하 접종하였다. 종양이 약 300 mm³까지 성장했을 때, 마우스를 종양 크기에 따라, 각 그룹당 5마리씩 무작위로 분류하였으며, 상기 그룹은 각각 하기와 같았다: 항-Hen Egg 리소자임 인간 IgG1 아이소타입 항체(음성 대조군, MediLink Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd.) 그룹, IgG1-ADC-07(DAR8), Her3-C3-ADC-21(DAR4), Her3-ADC-21(DAR4) 및 Her3-ADC-07(DAR8) 투여 그룹. 모든 샘플을 총 3주 동안 일주일에 한 번씩 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 투여 후 주기적으로 측정하였다. 상대 종양 증식률, T/C(%)는 특정 시점에서 대조군의 상대 종양 부피 또는 종양 중량에 대한 치료 그룹의 상대 종양 부피 또는 종양 중량의 백분율이다. 상대 종양 억제율, TGI(%)는 하기 식으로 계산되었다: $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$ (T 및 C는 각각 특정 시점에서 치료 및 대조용 그룹의 상대 종

양 부피(RTV) 또는 종양 중량(TW)이다).

[0691] 결과를 표 9 및 도 7에 나타내었다.

[0692] [표 9]

[0693] 누드 마우스에서 인간 비-소세포 폐암 NCI-H358의 피하 이종이식에 대한 Her3-ADC-07의 효과.

그룹	평균 종양 부피 (mm ³)	평균 종양 부피 (mm ³)	T/C (%)	종양 억제율 TGI(%)	P 값 (D29)
	D1	D29	D29	D29	
IgG1 5mg/kg	309.0±72.0	1425.0±241.2	-	-	-
IgG1-ADC-07(DAR8) 5mg/kg	309.4±53.4	725.2±415.1	50.83	49.17	0.203
Her3-C3-ADC-21(DAR4) 1 mg/kg	308.8±67.7	1080.8±741.8	75.89	24.11	0.996
Her3-ADC-21(DAR4) 5 mg/kg	309.6±60.6	346.4±123.8**	24.26	75.74	0.002
Her3-ADC-21(DAR4) 1 mg/kg	309.6±58.6	1000.6±184.1	70.08	29.92	0.214
Her3-ADC-07(DAR8) 5mg/kg	309.4±43.4	205.4±56.7**	14.40	85.60	0.003
Her3-ADC-07(DAR8) 1mg/kg	309.6±47.1	339.0±95.8**	23.74	76.26	0.003

[0694]

[0695] 실험 결과에 기초하여, IgG1 그룹과 비교하여, Her3-ADC-07(DAR8) 5 mg/kg 및 1 mg/kg 모두 NCI-H358 인간 비-소세포 폐암 이종이식 모델의 종양 성장을 유의하게 억제하였으며, 용량 구배 추세를 나타내었다. Her3-ADC-07 1 mg/kg 그룹의 TGI 값은 76.26%로, Her3-ADC-21 5 mg/kg 그룹의 TGI 값 75.74%보다 약간 더 높았다. Her3-ADC-21 1 mg/kg 그룹의 TGI 값은 29.92%로, Her3-C3-ADC-21 1 mg/kg 그룹의 TGI 값 24.11%보다 약간 더 높았다.

[0696] 또한, 동물 체중 결과에서는 각 시험 그룹의 동물들이 투여기간 및 회복기간 동안 잘 견디는 것으로 나타났다.

[0697] 16.2. SW480 이종이식 종양에 대한 항-Her3 항체 약물 접합체의 효능 분석 I

[0698] 본 개시내용은 Balb 누드 마우스의 인간 결장암 세포주 SW480 세포(ATCC로부터 입수 가능, Her3 발현 양성률 약 30%)의 피하 이식 종양 모델에서 항-Her3 항체 ADC 약물의 항종양 효과를 평가함으로써 생체내 효능을 입증하였다. 구체적인 단계는 하기와 같다: 5-6주령의 암컷 Balb/c nu 누드 마우스 36마리를 Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.에서 구입하였다. SW480 세포를 1640 배지(10% FBS 함유)가 있는 15 cm 직경의 페트리 디쉬에서 배양하고, 용합율이 약 80-90%에 도달했을 때 트립신-EDTA로 절단하고, PBS로 2회 세척하고, 이어서 원심분리하고, 예냉된 PBS에 재현탁시켰다. 세포 계수기로 세포 수를 세고, 이어서 세포를 PBS로 5×10^7 세포/ml의 세포 농도로 희석하였다. 7일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후, Balb/c nu 마우스의 오른쪽 갈비뼈에 SW480 세포를 5×10^6 세포/마우스의 접종량 및 0.2 ml의 접종 부피(50% Matrigel 함유)로 피하 접종하였다. 종양이 약 250 mm³까지 성장했을 때, 마우스를 종양 크기에 따라, 각 그룹당 5마리씩 무작위로 분류하였으며, 상기 그룹은 각각 하기와 같았다: 항-Hen Egg 리소자임 인간 IgG1 아이소타입 대조용 항체(음성 대조군, MediLink Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd.) 그룹, IgG1-ADC-07 및 Her3-ADC-07 투여 그룹. 모든 샘플을 총 3주 동안 일

주일에 한 번씩 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 투여 후 주기적으로 측정하였다.

[0699] 1) 상대 종양 증식률, T/C(%)는 특정 시점에서 대조군의 상대 종양 부피 또는 종양 중량에 대한 치료 그룹의 상대 종양 부피 또는 종양 중량의 백분율이다.

[0700] 2) 상대 종양 억제율, TGI(%)는 하기 식으로 계산되었다: $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$ (T 및 C는 각각 특정 시점에서 치료 및 대조용 그룹의 상대 종양 부피(RTV) 또는 종양 중량(TW)이다).

[0701] 결과를 표 10 및 도 8에 나타내었다. 실험 결과에 따르면, Her3-ADC-07의 10 mg/kg 및 3 mg/kg 용량 모두 SW480 인간 결장직장암 이종이식 모델의 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과를 가졌으며, 용량 구배 추세를 나타내었다.

[0702] [표 10]

[0703] SW480 + Balb/c 누드 마우스 모델의 효능 결과.

그룹	평균 종양 부피 (mm ³)	평균 종양 부피 (mm ³)	T/C (%)	종양 억제율 TGI (%)	P 값 D18
	D1	D18	D18	D18	
IgG1 10 mg/kg	269.80±32.42	2437.80±378.82	-	-	-
IgG1-ADC-07(DAR8) 10 mg/kg	270.60±33.13	1129.40±856.17**	46.2	53.8	0.007
Her3-ADC-07(DAR8) 10 mg/kg	269.20±31.17	164.80±39.81***	6.8	93.2	0.000
Her3-ADC-07(DAR8) 3 mg/kg	270.20±31.40	939.00±744.80**	38.5	61.5	0.002
Her3-ADC-07 (DAR8) 1 mg/kg	271.60±38.35	2708.80±535.14	110.4	-10.4	0.876

[0704]

[0705] 16.3. SW480 이종이식 종양에 대한 항-Her3 항체 약물 접합체의 효능 분석 II

[0706] 인간 결장암 세포주 SW480(ATCC로부터 입수 가능, Her3 발현 양성률 약 30%)의 이식 종양 모델에서 IgG1, IgG1-ADC-07(DAR8), Her3-ADC-07(DAR8) 및 Her3-C3-ADC-21(DAR8)의 항종양 효과를 실시예 16.2와 동일한 모델 및 방법을 참조하여 결정하였다.

[0707] 구체적인 결과를 표 11 및 도 9에 나타낸다.

[0708] [표 11]

투여 후 일수 각 그룹의 종양 부피 (mm ³)	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29	P 값 (vs IgG1) D15	T/C(%) D15	TGI(%) D15
IgG1 10mg/kg	291	483	1084	1874	2407	/	/	/	/	/	/	/
IgG1- ADC- 07(DAR8) 10mg/kg	290	315	459	931	1497	1691	1939	/	/	0.035	62.36	37.64
Her3- ADC- 07(DAR8) 10mg/kg	291	242	200	169	133	196	168	120	237	0.000	5.53	94.47
Her3- ADC- 07(DAR8) 3mg/kg	291	254	361	589	716	967	1190	1315	/	0.000	29.71	70.29
Her3-C3- ADC- 21(DAR8) 10mg/kg	292	258	129	125	178	228	360	390	890	0.000	7.36	92.64
Her3-C3- ADC- 21(DAR8) 3mg/kg	292	246	525	968	1352	1894	2360	/	/	0.012	55.97	44.03

[0709]

[0710] 실험 결과에 따르면, Her3-ADC-07의 10 mg/kg 및 3 mg/kg 용량 모두 SW480 인간 결장직장암 이종이식 모델의 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과가 있었고 용량 구배 추세를 나타내었다.

[0711] 뜻밖에도, Her3-ADC-07(DAR8) 3 mg/kg 그룹의 종양 억제 효과는 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg 그룹의 경우에 비해 유의하게 더 강하고, Her3-ADC-07(DAR8) 10 mg/kg 그룹의 종양-억제 효과는 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10 mg/kg 그룹의 경우에 비해 유의하게 더 강하였다.

[0712] 또한, 동물 체중 결과에서는 각 시험 그룹의 동물들이 투여기간 및 회복기간 동안 잘 견디는 것으로 나타났다.

[0713] 실시예 17. Her3-항체 약물 접합체 혈장 안정성 실험

[0714] 혈장 내 Her3-ADC-07(DAR8)의 안정성을, Her3-ADC-07(DAR8)을 배양한 인간 혈장 내 생물활성 분자 A1의 방출을 측정하여 평가하였다.

[0715] Her3-ADC-07(DAR8)을 각각 마우스, 래트, 개, 원숭이 및 인간의 여과 및 멸균된 혈장과 함께 3회 배양하였다. 배양을 5% CO₂ 하에 37°C에서 수행하였으며 Her3-ADC-07(DAR8)의 최종 농도는 50 µg/ml이고 총 배양 시간은 504 시간이었다. 배양 과정 중 0시간, 24시간, 72시간, 168시간, 336시간 및 504시간 시점에서 샘플을 채취하고 내부 표준물질(0.5 µM 톨부타미드) 및 0.1% 포름산을 함유한 메탄올 용액을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 시험 샘플을 하기 조건에서 UPLC-MS/MS를 사용하여 분석하였다.

분석물	A1			
검출 방법	LC-MS/MS-6500-001			
내부 표준물질	톨부타미드			
MS 조건	양이온, ESI			
이동상	A: H2O 중 0.1%FA			
	B: ACN 중 0.1%FA			
컬럼	Waters, BEH C18, 1.7 μm, 2.1*50 mm			
유량	0.5 mL/분			
액체 크로마토그래피 조건	시간(분)	펌프 B (%)		
	0.4	5		
	1.8	95		
	2.2	95		
	2.21	5		
	2.5	종료		
검출	화합물	m/z	디-클러스터링 전압 (v)	충돌 에너지 (v)
	톨부타미드	271.0-172.0	50	30
	A1.9	451.1-407.2	50	25

[0716]

[0717] 그리고 생물활성 분자 A1의 농도와 방출 백분율을 하기 식에 따라 계산하였다:

[0718] 방출 백분율 = 측정된 시간의 A1 농도/이론적 최대 방출 농도;

[0719] 이론적 최대 방출 농도 = ADC 배양 농도/ADC 약물 분자량 × DAR × 생물학적 활성 분자 A1의 분자량.

[0720] 시험 농도 50 μg/ml에서, 마우스, 래트, 개, 원숭이 및 인간 혈장에서의 Her3-ADC-07(DAR8)의 안정성 결과를 표 12에 나타낸다.

[0721] [표 12]

[0722] 마우스, 래트, 개, 원숭이 및 인간의 혈장에서 Her3-ADC-07(DAR8)의 A1 방출.

종	생물활성 분자 A1의 방출 백분율 (평균 ± SD %)					
	0 h	24 h	72 h	168 h	336 h	504 h
마우스	0.0272 ± 0.00635	0.0805 ± 0.00540	0.178 ± 0.00528	0.286 ± 0.0124	0.576 ± 0.00526	0.726 ± 0.0301
래트	0.0240 ± 0.00336	0.0774 ± 0.00668	0.148 ± 0.0155	0.236 ± 0.00507	0.424 ± 0.00974	0.497 ± 0.00956
개	0.0210 ± 0.00191	0.0330 ± 0.00144	0.0751 ± 0.00587	0.191 ± 0.0104	0.419 ± 0.0384	0.521 ± 0.0480
원숭이	0.0324 ± 0.000840	0.0914 ± 0.00349	0.193 ± 0.0119	0.330 ± 0.0187	0.399 ± 0.0122	0.474 ± 0.0117
인간	<0.0260*	0.0460 ± 0.00411	0.0991 ± 0.00132	0.170 ± 0.00997	0.332 ± 0.0238	0.372 ± 0.0201

[0723]

[0724] * : 병행 시험 중 하나의 농도가 정량분석 하한보다 낮은 경우 방출 백분율은 "<최대 값"으로 보고된다.

[0725] 실험 결과에 따르면, 50 µg/ml의 시험 농도에서 Her3-ADC-07(DAR8)을 마우스, 래트, 개, 원숭이 및 인간의 혈장에서 504시간 동안 배양하였으며 생물활성 물질 A1의 방출 백분율이 각각 0.726%, 0.497%, 0.521%, 0.474% 및 0.372%였다. 마우스, 래트, 개, 원숭이 및 인간의 혈장에서 Her3-ADC-07(DAR8)의 안정성은 양호하였다. 시험관 내에서 504시간(21일) 동안 배양한 후, A1의 방출은 이론적인 최대 방출 농도의 1% 미만이었다.

[0726] **실시에 18. Her3 항체-약물 접합체의 안전성 평가**

[0727] 치료창을 독성 시험에서 최고의 비-심각 독성 용량(HNSTD) 및 약리학 시험에서 최소 유효 용량(MED)에 따라 평가하였다. Her3-ADC-07(DAR8)의 치료창을 HNSTD 및 MED 용량에서의 생체내 노출 비에 따라 계산하였다.

[0728] **18.1 GLP 독성학 실험**

[0729] Her3-ADC-07(DAR8)의 6주 연속 GLP 독성 실험에 이은 4주간의 회복에서, 각 투여 그룹은 수컷 반, 암컷 반씩 총 10마리였으며, Her3-ADC-07(DAR8)을 시노몰구스 원숭이에게 0, 3, 10 및 20 mg/kg의 용량으로 3주에 한 번씩 연속 3회 정맥 주입을 통해 반복해서 투여하였다. 이어서 투여 후 4주 동안 동물을 회복시켰다. Her3-ADC-07(DAR8)의 독성을 시노몰구스 원숭이에서 평가하였으며, 혈청 샘플의 ADC 농도를 독성동태학(TK) 연구에서 검출하였다.

[0730] GLP 독성 실험 결과, 최고의 비-심각 독성 용량은 10 mg/kg으로 나타났으며, 이 용량에서 동물의 임상관찰, 체중, 혈액생화학, 응고 등에 유의한 이상이 발견되지 않았다.

[0731] Her3-ADC-07(DAR8)의 유사한 ADC 생성물과 비교시, 파트리투맙 데룩스테칸은 Daiichi Sankyo의 HER3 표적화 ADC이며, 시노몰구스 원숭이에서의 독성 실험 용량은 0 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 및 30 mg/kg이었고, 이를 3주에 1회씩 5회 연속 투여하였다. 결과는 ≥3 mg/kg의 용량에서 망상적혈구, 림프구 및 혈소판이 감소하고; ≥10 mg/kg의 용량에서, 트랜스퍼라제가 증가하며; 모든 용량에서 체중에 유의미한 이상은 없음이 관찰됨을 보여 주었고; 독성 표적 기관은 흉선, 골수 및 피부였다(Hashimoto Y, et al. Clin Cancer Res. 2019 Dec 1;25(23):7151-7161).

[0732] 파트리투맙 데룩스테칸이 ≥3 mg/kg의 용량에서 혈소판 감소증(thrombocytopenia)을 나타내었고, 이의 임상 연구에서 혈소판 감소증이 용량 증량 연구에서 용량-제한 독성 중 하나이며(Janne PA, et al. Cancer Discov. 2022 Jan; 12(1): 74-89), 다기관 임상 연구에서 가장 흔한(30%) 치료 응급 부작용(TEAE) 중 하나임(Yu-H, et al., Abstract # MA21.06, WCLC 2019)을 유의해야 한다. 이에 비해 Her3-ADC-07(DAR8)은 최고 용량인 20 mg/kg에서 유의한 혈소판 수 이상을 나타내지 않았으며, 20 mg/kg의 최고 용량에서 간, 신장, 폐 등 중요 장기에서 독성 반응이 관찰되지 않은 것으로 밝혀졌다.

[0733] **18.2 누드 마우스 PK/PD 실험**

[0734] NCI-H358 종양-함유 nude 마우스에게 단일 꼬리 정맥 주사를 통해 0.3 mg/kg 또는 3 mg/kg의 Her3-ADC-07(DAR8)을 투여하고 혈청과 종양을 0h, 3h, 6h, 24h, 48h, 96h, 168h 및 336h(각 시점에 5마리의 동물)째에 수집하였다. 종양 부피와 중량을 분석하고, 혈청 내 ADC 농도를 측정하였다.

[0735] NCI-H358 종양이 있는 마우스에게 Her3-ADC-07(DAR8) 0.3 mg/kg 또는 3 mg/kg을 1회 정맥 주사한 후, ≥ 0.3 mg/kg의 용량에서 종양 성장이 억제되었다. 본 실험에서 Her3-ADC-07(DAR8)의 최저 유효 용량은 0.3 mg/kg인 것으로 나타났다.

[0736] 시노물구스 원숭이의 최고 비-심각 독성 용량 하의 AUC_{0-336h} 또는 C_{max} 대 CDX 마우스의 최저 유효 용량 하의 AUC_{0-336h} 또는 C_{max} 의 비를 치료 지수(TI)로서 정의하였으며, 각 매개변수의 치료 지수는 하기와 같았다:

	치료 지수
AUC_{0-336h} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	83.2
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	194.4

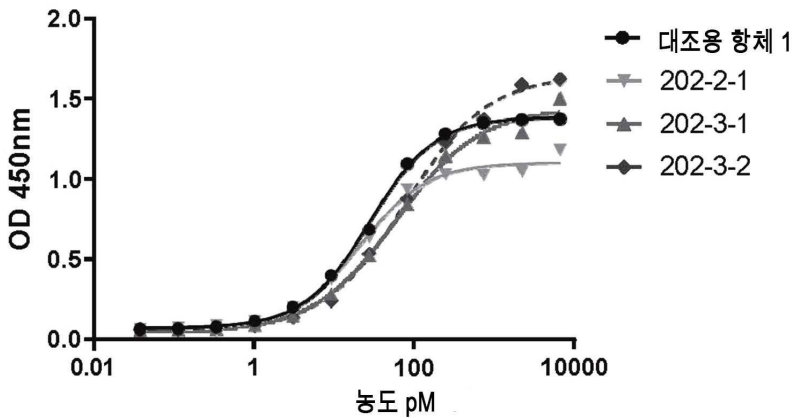
[0737]

[0738] 요약하자면, Her3-ADC-07(DAR8)은 시노물구스 원숭이에서 10 mg/kg(HNSTD)의 용량에서 잘 허용되었고 치료 지수는 100배에 가까웠다. 또한, 이 용량에서 혈소관 감소가 발생하지 않았으며, 폐, 간, 신장 등 중요 장기에 대한 독성도 관찰되지 않았다. 상기 결과는 Her3-ADC-07(DAR8)이 장기간 사용 시 안전성이 높다는 것을 가리켰다.

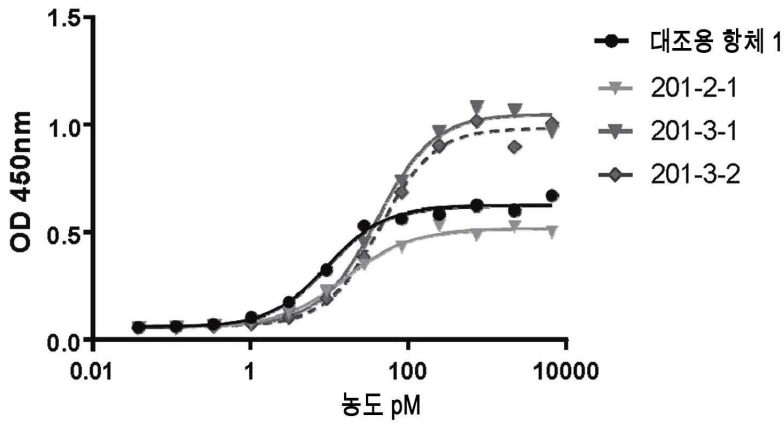
[0739] 본 개시내용의 특정 구현예를 상세히 기재하였지만, 당업자는 공개된 모든 교시에 비추어 세부 사항의 다양한 수정 및 변경이 이루어질 수 있고 그것들 모두가 본 개시내용의 범위 내에 있을 것임을 이해할 것이다. 본 개시내용의 청구된 범위는 첨부된 청구항 및 그 등가물에 의해 제공되었다.

도면

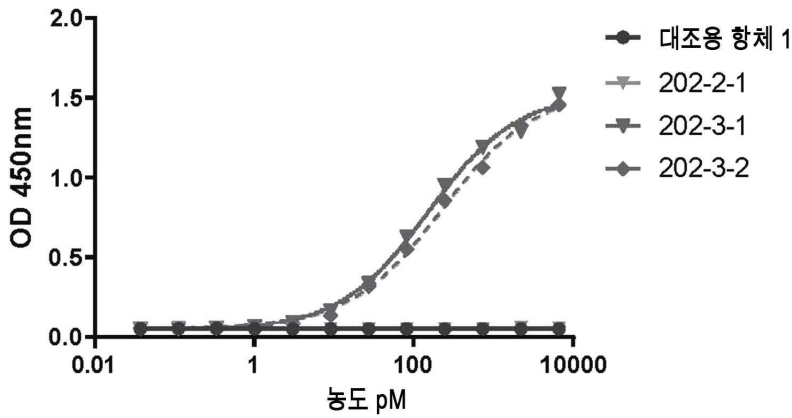
도면1a



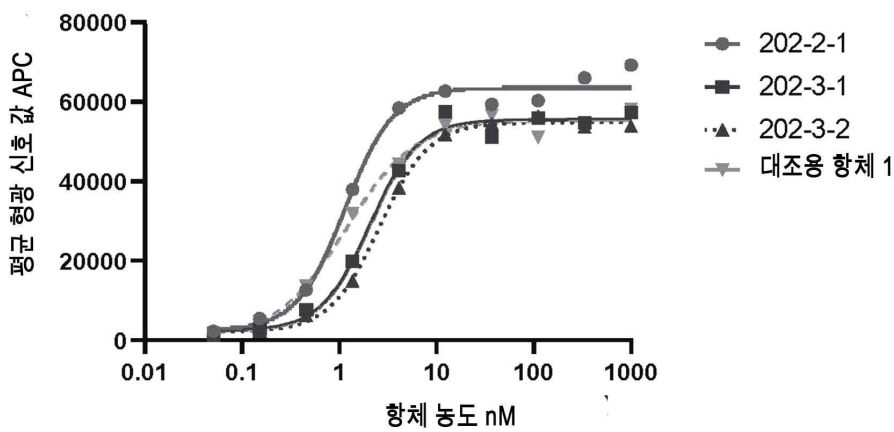
도면1b



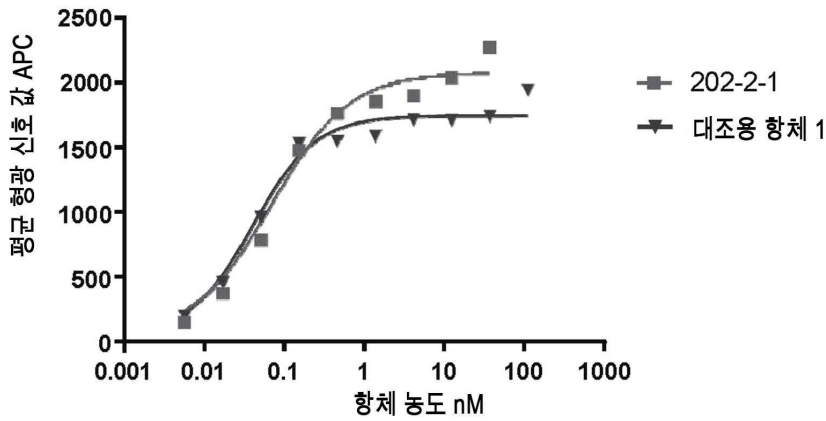
도면1c



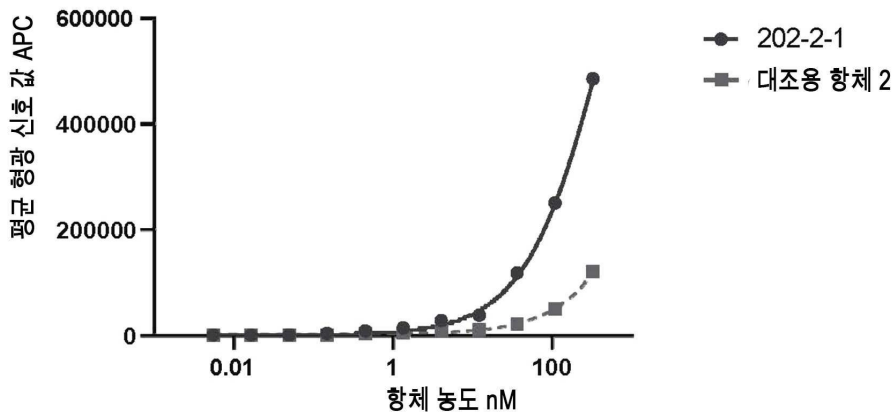
도면2a



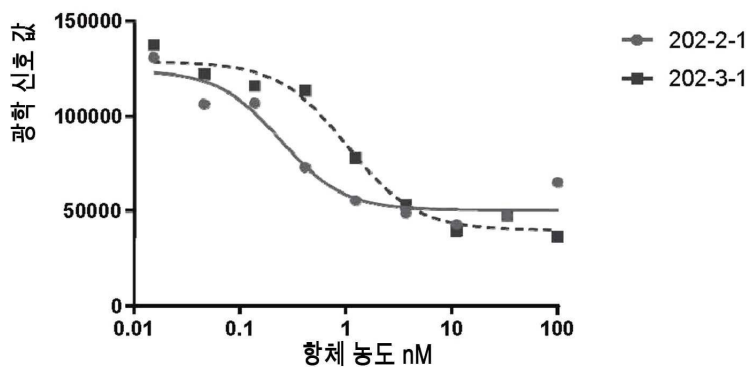
도면2b



도면2c

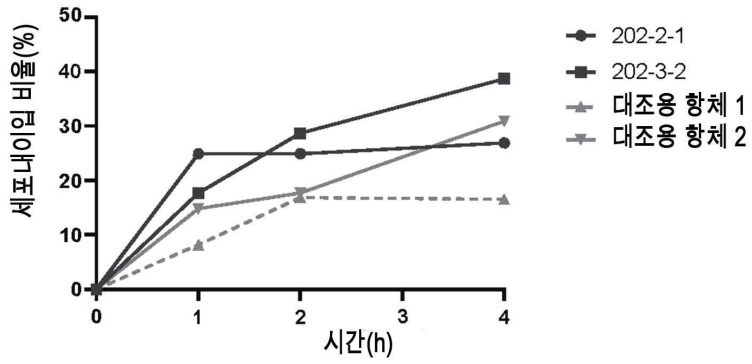


도면3

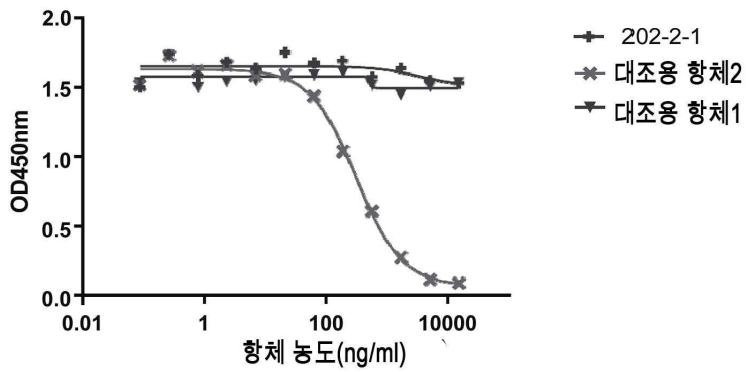


	202-2-1	202-3-1
IC50	0.2434	1.037

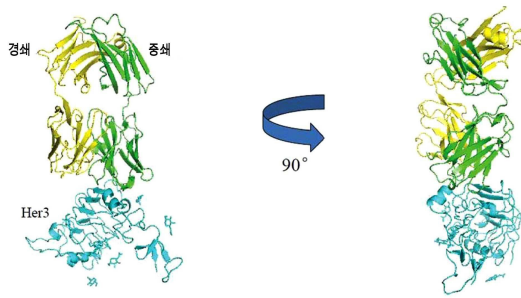
도면4



도면5a

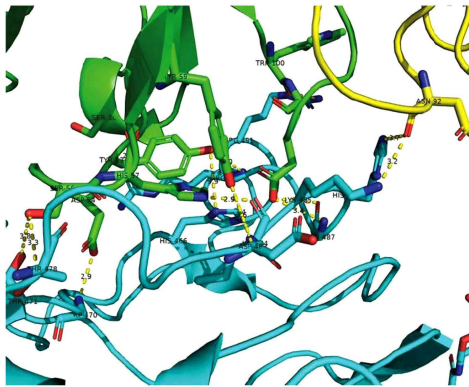


도면5b

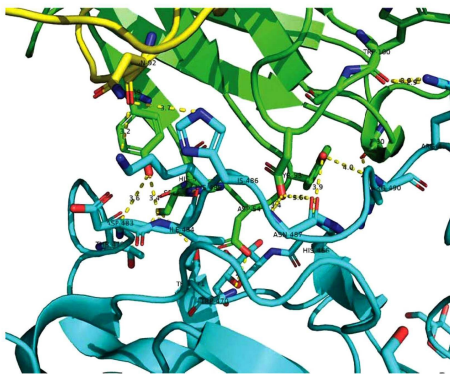


Her3 (정록(Cyan)색), 중쇄(녹색), 경쇄(황색)

도 5b-1

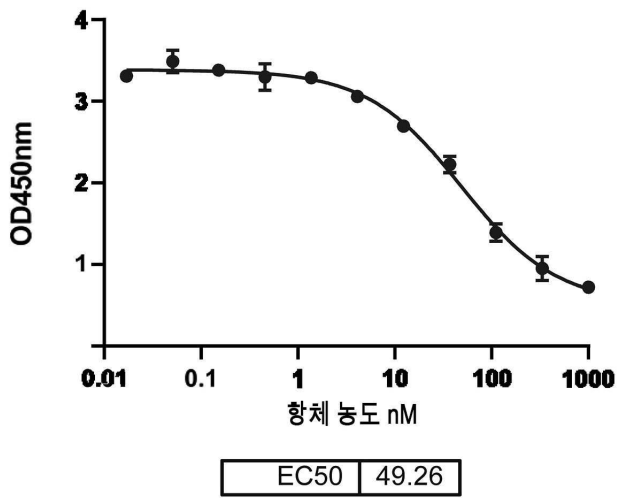


도 5b-2

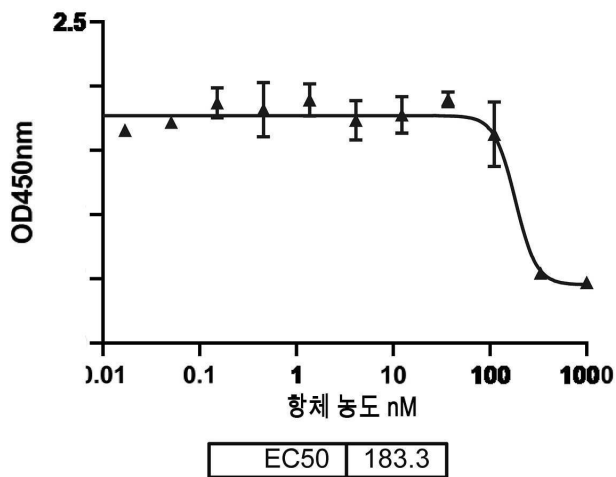


도 5b-3

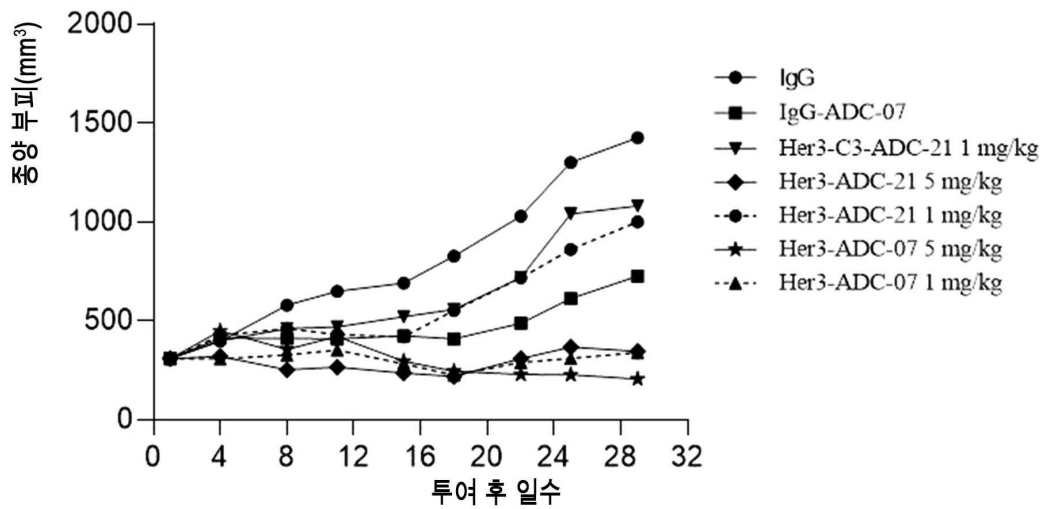
도면6a



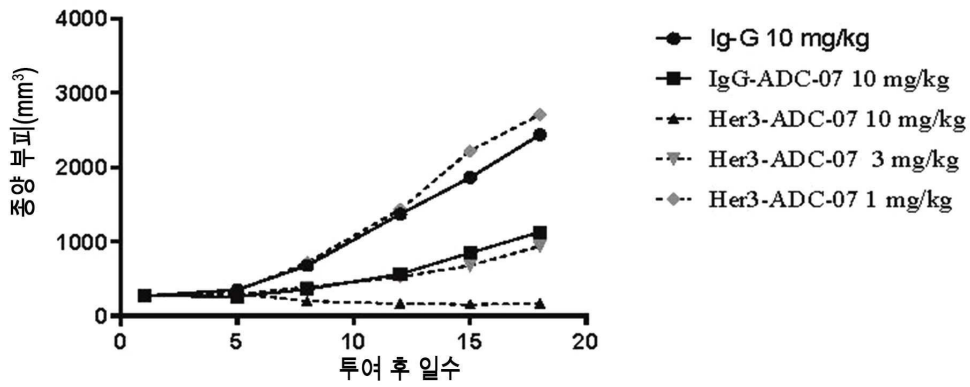
도면6b



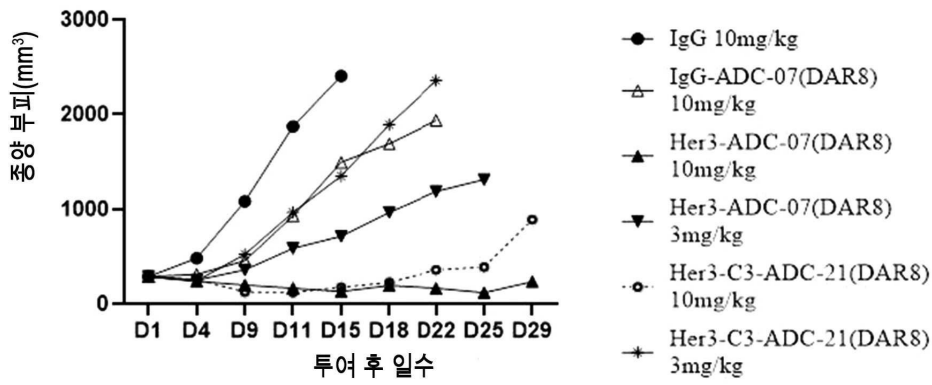
도면7



도면8



도면9



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.