



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0080903
(43) 공개일자 2025년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/68 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 47/68037 (2025.05)

(21) 출원번호 10-2025-7016318

(22) 출원일자(국제) 2023년10월18일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2025년05월19일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/125253

(87) 국제공개번호 WO 2024/083161

국제공개일자 2024년04월25일

(30) 우선권주장

PCT/CN2022/126273 2022년10월19일 중국(CN)

PCT/CN2023/118363 2023년09월12일 중국(CN)

(71) 출원인

멀티튜드 테라퓨틱스 인코퍼레이티드

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 티엔저우
로드 넘버 159 유닛 10 101 201 301 401

(72) 발명자

멍, 원

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 티엔저우
로드 159 유닛 10 101, 201, 301, 401

리우, 수-후이

미국 94065 캘리포니아 레드우드 시티 세인트 마
틴 드라이브 361

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상영

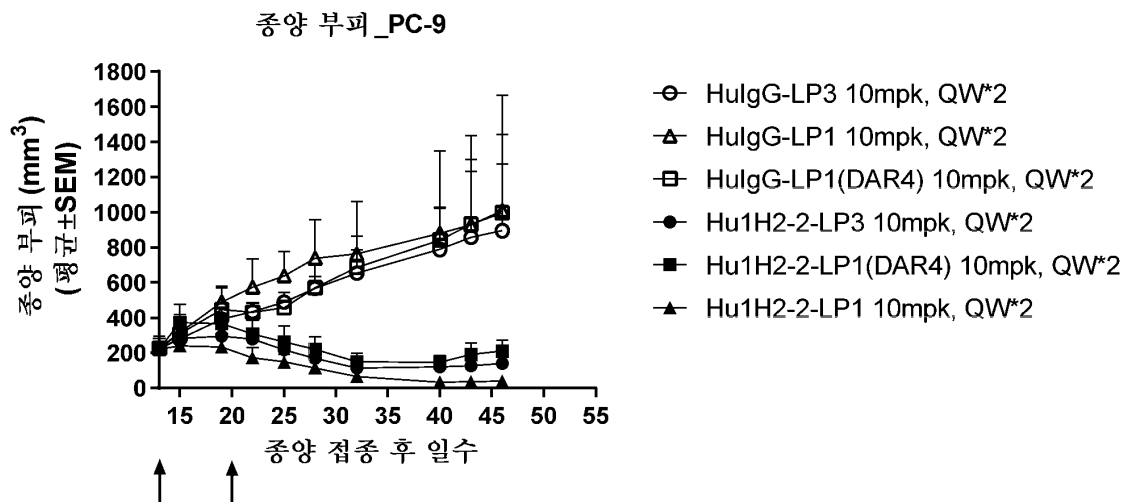
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 항체-약물 접합체, 이의 제조 방법 및 용도

(57) 요약

항체-약물 접합체, 이의 제조 방법 및 용도가 제공된다. 항체-약물 접합체는 항체, 세포독성 페이로드 및 화학식 I의 링커를 포함하며, 여기서 화학식 I의 링커의 숙신이미드기는 항체의 쇄간 디설피드 쇄의 환원에 의해 수득된 티올기와 티오에테르 결합을 형성하고, 링커의 에스테르기는 카르보닐기는 페이로드의 아미노기에 연결된다. 항체-약물 접합체는 신생물성 질환의 진단, 예방 및 치료를 위한 치료제의 제조에서의 용도를 갖는다.

대표도 - 도22



(52) CPC특허분류

A61K 47/6851 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2884 (2013.01)

C07K 16/3092 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

스, 정

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 티엔저우
로드 159 유닛 10 101, 201, 301, 401

왕, 웨이닝

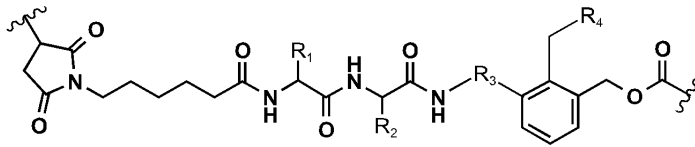
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 티엔저우
로드 159 유닛 10 101, 201, 301, 401

명세서

청구범위

청구항 1

항-MUC18 또는 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 페이로드 및 화학식 I의 링커를 포함하는, 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합:



화학식 I

여기서,

화학식 I의 링커의 숙신이미딜 기는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠간 디설피드 쇠의 환원에 의해 수득된 티올 기와 티오에테르 결합을 형성하고;

화학식 I의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기는 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

R_1 및 R_2 는 수소, 메틸 및 이소프로필 기로부터 독립적으로 선택되고;

R_3 은 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R_5 는 수소 또는 벤질이고, n^1 은 0 내지 2의 정수를 나타내고, n^2 는 0 내지 2의 정수를 나타내고;

R_4 는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

청구항 2

제1항에 있어서, R_4 가 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 이 8 내지 15의 정수를 나타내는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R_4 가 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 이 10 내지 12의 정수를 나타내는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R_3 이 $-(CR_5H_2CONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R_5 가 벤질이고, n^1 이 1 또는 2를 나타내고, n^2 가 1 또는 2를 나타내고;

R_4 가 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 이 8 내지 15의 정수를 나타내는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 5

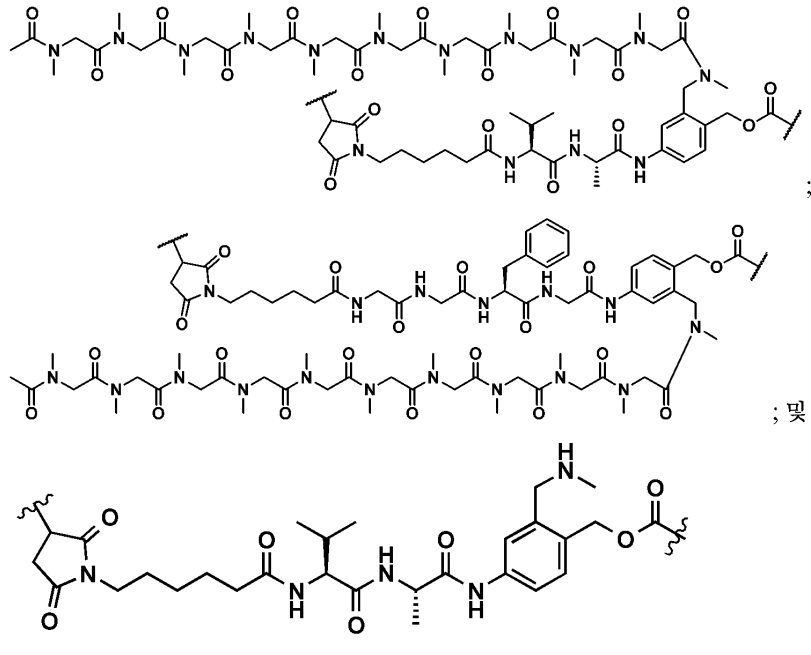
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R_3 이 단일 결합을 나타내고, R_4 가 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 이 8 내지 15의 정수를 나타내는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R_3 이 단일 결합을 나타내고, R_4 가 메틸아미노 기를 나타내는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 하기 중 임의의 하나로부터 선택되는 것인 항체-약물 접합체:



청구항 8

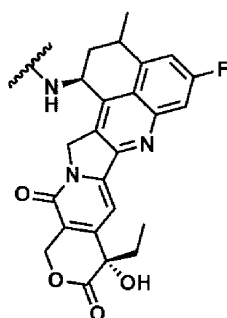
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 세포독성제, 라벨, 핵산, 방사성핵종, 호르몬, 면역조절제, 전구약물 전환 효소, 리보뉴클레아제, 효능작용 항체, 길항작용 항체 및 이의 단편, 이의 융합 단백질 또는 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나인 항체-약물 접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포독성제가 튜블린 억제제 및/또는 토포이소머라제 억제제를 포함하고, 튜블린 억제제가 아우리스타틴 또는 이의 유도체, 메이탄신 또는 이의 유도체를 포함하고; 토포이소머라제 억제제가 캄프토테신 및 이의 유도체를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 화학식 II의 엑사테칸이고, 이는 그의 시클로헥산 고리의 아미노 기의 질소 원자에 의해 링커에 연결된 것인 항체-약물 접합체.



화학식 II

43에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 WAS를 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 55에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3;

서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 32에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 및 서열식별번호: 44에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 WAS를 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 56에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3; 또는

서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 및 서열식별번호: 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 LMS를 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 57에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하기를 포함하는 것인 항체-약물 접합체:

서열식별번호: 84에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 85에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

서열식별번호: 86에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 87에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

서열식별번호: 88에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 89에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간 CD44 v7/8의 결합 펩티드에 특이적으로 결합하고, 여기서 결합 펩티드가 서열식별번호: 90에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 14

제1항 내지 제10항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간 CD44 v7/8의 서열식별번호: 91 및/또는 서열식별번호: 92에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 결합 펩티드에 결합하지 않는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 93에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 94에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열식별번호: 95에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및 서열식별번호: 96에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 RAN을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 97에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하기를 포함하는 것인 항체-약물 접합체:

서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 101에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 104에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 17

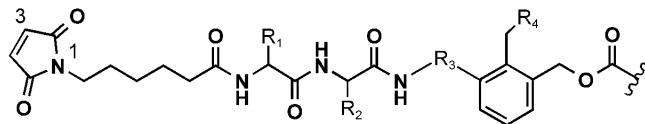
제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, DAR이 1 내지 10인 항체-약물 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, DAR이 4 내지 10인 항체-약물 접합체.

청구항 19

항-MUC18 또는 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 이의 디설피드 결합이 적어도 부분적으로 환원되도록 환원시키는 단계, 및 화학식 III의 링커의 말레이미드-N-일의 위치 3에 있는 탄소 원자와 반응시키는 단계



화학식 III

를 포함하고,

링커-페이로드에서, 화학식 III의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기는 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

R₁ 및 R₂는 수소, 메틸 및 이소프로필 기로부터 독립적으로 선택되고;

R₃은 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R₅는 수소 또는 벤질이고, n¹은 0 내지 2의 정수를 나타내고, n²는 0 내지 2의 정수를 나타내고;

R₄는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n³은 1 내지 20의 정수를 나타내는 것인,

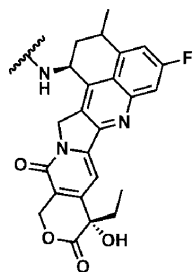
제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합, 및 제약상 허용되는 부형제의 제조 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 킬레이트제를 함유하는 버퍼 용액에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 환원제와 반응시키는 단계, 이어서 링커-페이로드의 용액을 첨가하는 단계이며, 링커는 화학식 III의 구조를 갖는 것인 단계, 및 반응 용액의 pH를 조정하는 단계를 포함하는 제조 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 페이로드가 화학식 II의 엑사테칸이고, 이는 그의 시클로헥산 고리의 아미노 기의 질소 원자에 의해 화학식 III의 에스테르 기의 카르보닐 기에 연결된 것인 제조 방법.



화학식 II

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, DAR이 1 내지 10인 제조 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 84에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 85에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

서열식별번호: 86에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 87에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

서열식별번호: 88에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 89에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체를 포함하고;

항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 101에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 104에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 24

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 또는 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 또는 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 제24항의 제약 조성물, 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합을 포함하는 키트.

청구항 26

신생물성 질환의 진단, 예방 및 치료를 위한 치료제의 제조에서의, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체, 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 제24항의 제약 조성물 또는 제25항의 키트의 용도.

청구항 27

제26항에 있어서, 신생물성 질환이 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 발현하는 양성 종양 및 악성 종양을 포함하는 것인 용도.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 신생물성 질환이 흑색종, 인두암, 삼중-음성 유방암, 식도 선암종, 식도 편평 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 요로상피암, 방광 신경내분비 종양, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 피부 편평 세포 암종, 담관암종, 전이성 췌장 암종, 폐 편평 세포 암종, 두경부 편평 세포 암종 및/또는 식도 편평 세포 암종을 포함하는 것인 용도.

청구항 29

MUC18 및/또는 CD44v7/8을 표적화하는 치료제의 제조에서의, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체, 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 제24항의 제약 조성물 또는 제25항의 키트의 용도.

청구항 30

치료 유효량의 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 신생물성 질환을 진단, 예방 및 치료하는 방법으로서, 여기서 치료제는 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체, 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체 또는 제24항의 제약 조성물을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 항체를 링커에 의해 항종양 활성을 갖는 약물 또는 독소에 연결하고 종양 세포에 대해 항종양 역할을 하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이 섹션의 기술은 단지 본 개시내용과 관련된 배경 정보를 제공할 뿐이며, 반드시 선행 기술을 구성하는 것은 아니다.

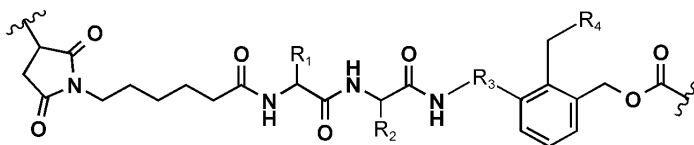
[0003] 항체-약물 접합체 (ADC)는 벡터화된 화학요법이며, 종양/암 세포에서 세포독성 약물을 선택적으로 전달한다 (항체-약물 접합체: The Last Decade, Nicolas Joubert, et al., Pharmaceuticals (Basel). 2020 Sep 14;13(9):245.). 약물 전달 기술의 발전으로, ADC 표적화된 전달 기술은 캄프토테신의 불량한 수용성 및 불충분한 조직 분포에 의해 유발되는 부작용을 효과적으로 극복할 수 있다. 시판되는 ADC 약물 엔허투 및 사시투주맙 고비테칸은 종양, 특히 악성 종양의 치료에서 우수한 효과를 갖는다. 엔허투 및 사시투주맙 고비테칸 둘 모두는 튜블린 억제제 (예를 들어, MMAE 및 MMAF)보다 더 소수성인 캄프토테신 유도체의 DNA 토포이소머라제 억제제를 세포독성 약물로서 사용한다. 사시투주맙 고비테칸은 MCC-트리아졸 스페이서-PEG7-리신-PABC를 링커로서 사용하여 세포 리소좀에서 캄프토테신 SN38을 분해하고 방출한다 (US13/948,732). 아스트라제네카/다이이치 산쿄에 의해 개발된 엔허투는 카텝신 B-활성화된 GGFG (펩티드 결합에 의해 연결된 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신으로 구성된 아미노산 서열) 테트라펩티드를 링커로서 사용하고, 자기-절단 구조를 도입하여 엑사테칸 유도체 Dxd를 방출한다 (Yusuke Ogitani et al., Clin Cancer Res (2016) 22 (20): 5097-5108). 그러나, 상기 세포독성 약물 MMAE, SN38 및 Dxd는 모두 P-당단백질 (P-gp)의 기질이며 (Front Pharmacol 2019;10:749), P-gp의 높은 발현을 갖는 일부 종양에 대해 약물 저항성을 가질 수 있다.

[0004] 따라서, 종양/암 세포 내에서 세포독성 약물을 전달하기 위한 새로운 항체-약물 접합체에 대한 필요성이 여전히 있다.

발명의 내용

[0005] 요약

[0006] 본 개시내용은 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합을 제공하며, 이는 항-MUC18 또는 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 페이로드 및 화학식 I의 링커를 포함한다.



화학식 I

[0007]

[0008] 화학식 I의 링커의 숙신이미딜 기는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠간 디설피드 쇠의 환원에 의해 수득된 티올 기와 티오에테르 결합을 형성하고;

[0009] 화학식 I의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기는 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

[0010] R₁ 및 R₂는 독립적으로 수소, 메틸 또는 이소프로필 기이고;

[0011] R₃은 -(CR₅HCONH)^{n¹}-(CH₂CONH)^{n²}- 또는 단일 결합을 나타내고, R₅는 수소 또는 벤질이고, n¹은 0 내지 2의 정수를 나타내고, n²는 0 내지 2의 정수를 나타내고;

[0012] R₄는 메틸아미노 기 또는 -(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃을 나타내고, n³은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

[0013] 일부 실시양태에서, R₄는 -(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃을 나타내고, n³은 8 내지 15의 정수를 나타낸다.

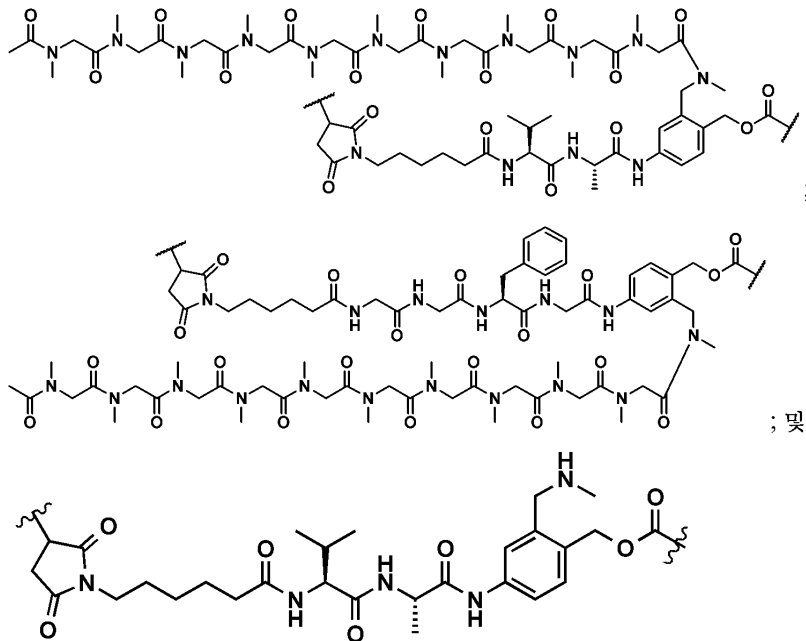
[0014] 일부 실시양태에서, R_4 는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 10 내지 12의 정수를 나타낸다.

[0015] 일부 실시양태에서, R_3 은 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R_5 는 벤질이고, n^1 은 1 또는 2를 나타내고, n^2 는 1 또는 2를 나타내고, R_4 는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 8 내지 15의 정수를 나타낸다.

[0016] 일부 실시양태에서, R_3 은 단일 결합을 나타내고, R_4 는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 8 내지 15의 정수를 나타낸다.

[0017] 일부 실시양태에서, R_3 은 단일 결합을 나타내고, R_4 는 메틸아미노 기를 나타낸다.

[0018] 일부 실시양태에서, 링커는 하기 중 임의의 하나로부터 선택된다:

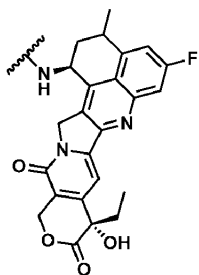


[0019] , 또는 이들의 조합.

[0020] 일부 실시양태에서, 페이로드는 세포독성제, 라벨, 핵산, 방사성핵종, 호르몬, 면역조정제, 전구약물 전환 효소, 리보뉴클레아제, 효능작용 항체, 길항작용 항체 및 이의 단편, 이의 융합 단백질 또는 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 세포독성제는 튜블린 억제제 및/또는 토포이소머라제 억제제를 포함하고, 튜블린 억제제는 아우리스타틴 또는 이의 유도체, 메이탄신 또는 이의 유도체를 포함하고, 토포이소머라제 억제제는 캄프토테신 및 이의 유도체를 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 페이로드는 화학식 II의 엑사테칸이고, 이는 그의 시클로헥산 고리의 아미노 기의 질소 원자에 의해 링커에 연결된다.



화학식 II

[0023]

[0024] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 중 임의의 하나를 포함한다:

- [illegible]

44에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 WAS를 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 56에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3; 및

[0037] 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 및 서열식별번호: 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 LMS를 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 57에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

[0038] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0039] 서열식별번호: 84에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 85에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0040] 서열식별번호: 86에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 87에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

[0041] 서열식별번호: 88에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 89에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체.

[0042] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 CD44 v7/8의 결합 펩티드에 특이적으로 결합하고, 여기서 결합 펩티드는 서열식별번호: 90에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 CD44 v7/8의 서열식별번호: 91 및/또는 서열식별번호: 92에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 결합 펩티드에 결합하지 않는다.

[0044] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 93에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 94에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 95에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 및 서열식별번호: 96에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 RAN을 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 97에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.

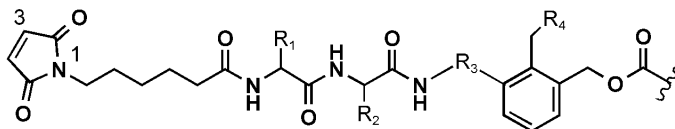
[0045] 일부 실시양태에서, 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0046] 서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 101에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

[0047] 서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 104에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체.

[0048] 일부 실시양태에서, DAR은 1 내지 10이다. 일부 실시양태에서, DAR은 4 내지 10이다.

[0049] 본 개시내용은 상기 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합의 제조 방법을 제공하며, 이는 항-MUC18 또는 항-CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 이의 쇠간 디설피드 결합이 적어도 부분적으로 환원되도록 환원시키는 단계, 및 그 후 화학식 III의 링커의 말레이미드-N-일의 위치 3에 있는 탄소 원자와 반응시키는 단계



화학식 III

[0050]

[0051] 를 포함하고,

[0052] 링커-페이로드에서, 화학식 III의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기는 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

[0053] R₁ 및 R₂는 독립적으로 수소, 메틸 또는 이소프로필 기이고;

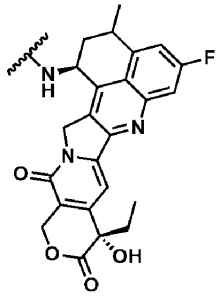
[0054] R₃은 -(CR₅HCONH)¹_n-(CH₂CONH)²_n- 또는 단일 결합을 나타내고, R₅는 수소 또는 벤질이고, n¹은 0 내지 2의 정수를

나타내고, n^2 는 0 내지 2의 정수를 나타내고;

[0055] R_4 는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)_n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

[0056] 일부 실시양태에서, 방법은 킬레이트제를 함유하는 버퍼 용액에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 환원제와 반응시키는 단계, 이어서 링커-페이로드의 용액을 첨가하는 단계이며, 링커는 화학식 III의 구조를 갖는 것인 단계, 및 반응 용액의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 페이로드는 화학식 II의 엑사테칸이고, 이는 그의 시클로헥산 고리의 아미노 기의 질소 원자에 의해 화학식 III의 에스테르 기의 카르보닐 기에 연결된다.



화학식 II

[0058] 일부 실시양태에서, DAR은 1 내지 10, 임의로 4 내지 10이다.

[0059]

[0060] 본 개시내용은 제약 조성물을 제공하며, 이는 상기 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함한다.

[0061] 본 개시내용은 키트를 제공하며, 이는 상기 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0062] 본 개시내용은 신생물성 질환의 진단, 예방 및 치료를 위한 치료제의 제조에서의, 상기 항체-약물 접합체, 상기 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 상기 항체-약물 접합체를 함유하는 제약 조성물 또는 키트의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 종양 질환은 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 발현하는 양성 종양 및 악성 종양을 포함한다.

[0063] 일부 실시양태에서, 종양 질환은 흑색종, 인두암, 삼중-음성 유방암, 식도 선암종, 식도 편평 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 요로상피암, 방광 신경내분비 종양, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 피부 편평 세포 암종, 담관암종, 전이성 췌장 암종, 폐 편평 세포 암종, 두경부 편평 세포 암종 및/또는 식도 편평 세포 암종을 포함한다.

[0064] 본 개시내용은 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 표적화하는 치료제의 제조에서의, 상기 항체-약물 접합체, 상기 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 상기 항체-약물 접합체를 함유하는 제약 조성물 또는 키트의 용도를 제공한다.

[0065] 본 개시내용은 신생물성 질환을 진단, 예방 및 치료하는 방법을 제공하며, 이는 치료 유효량의 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 치료제는 상기 항체-약물 접합체, 상기 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체 또는 상기 제약 조성물을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1a는 02-1 네이키드 항체의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 1b는 Hu1H2-2 네이키드 항체의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여준다.

도 2a는 02-1 네이키드 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 2b는 Hu1H2-2 네이키드 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 그래프를 보여준다.

도 3a는 실시예 5에서 제조된 항체-약물 접합체 02-1-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 3b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 4a는 실시예 6에서 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고;

도 4b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 5a는 실시예 7에서 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 5b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 6a는 실시예 8에서 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 6b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 7a는 실시예 9에서 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 7b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 8a는 비교예 1에서 제조된 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 8b는 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 9a는 비교예 2에서 제조된 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 9b는 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 10a는 비교예 3에서 제조된 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 10b는 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 11a는 비교예 4에서 제조된 항체-약물 접합체 인간 IgG-DXD의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 11b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-DXD의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 12a는 비교예 5에서 제조된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 12b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 13a는 비교예 6에서 제조된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 13b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 14a는 비교예 7에서 제조된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 14b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 15a는 비교예 8에서 제조된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 15b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 16a는 비교예 9에서 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-DXD의 크기 배제 크로마토그래피의 그래프를 보여주고; 도 16b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-DXD의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여준다.

도 17은 A375 세포, HMVII 세포, SK-MEL-2 세포 및 GAK 세포의 항체-약물 접합체 02-1-LP1로의 세포내이입의 시간-형광 강도 통계 그래프를 보여준다.

도 18ai는 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE, 02-1-vc-MMAE, 리톡시맵-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 흑색종 모델 마우스의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여주고; 도 18aii는 도 18ai의 부분도이며, 이는 02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE 및 비히클 그룹의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다.

도 18bi는 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE, 02-1-vc-MMAE, 리톡시맵-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 흑색종 모델 마우스의 종양-시간 변화 곡선을 보여주고; 도 18bii는 도 18bi의 부분도이며, 이는 02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE 및 비히클 그룹의 종양-시간 변화 곡선을 보여준다.

도 19는 두경부 편평 세포 암종 세포주 디트로이트562에 대한 항체-약물 접합체의 시험관내 사멸 곡선을 보여주고; 도 19ai는 도 19의 부분도이며, 이는 Hu1H2-2-LP2, Hu1H2-2-LP1 및 Hu1H2-2-DXD의 시험관내 사멸 곡선을 보여주고; 도 19aii는 도 19의 부분도이며, 이는 인간 IgG-LP2, 인간 IgG-LP1 및 인간 IgG-DXD의 시험관내 사멸 곡선을 보여준다.

도 20은 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2 및 인간 IgG-LP1로 치료된 두경부 편평 세포 암종 모델 마우스의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다.

도 21은 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2 및 인간 IgG-LP1로 치료된 두경부 편평 세포 암종 모델

마우스의 중량-시간 변화 곡선을 보여준다.

도 22는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1(DAR4), Hu1H2-2-LP3, 인간 IgG-LP1, 인간 IgG-LP1(DAR4) 및 인간 IgG-LP3으로 치료된 폐암 모델 마우스의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다.

도 23은 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1(DAR4), Hu1H2-2-LP3, 인간 IgG-LP1, 인간 IgG-LP1(DAR4) 및 인간 IgG-LP3으로 치료된 폐암 모델 마우스의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 24a는 항체-약물 접합체 리톡시맙-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 SCC-9 인간 두경부 편평 세포 암종 CDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 24b는 항체-약물 접합체 리톡시맙-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 SCC-9 인간 두경부 편평 세포 암종 CDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 25a는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 Huh-7 인간 간암 CDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 25b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 Huh-7 인간 간암 CDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 26a는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 LD1-0015-200617 인간 식도 편평 세포 암종 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 26b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 LD1-0015-200617 인간 식도 편평 세포 암종 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 27a는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-0016-390730 인간 식도 선암종 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 27b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-0016-390730 인간 식도 선암종 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 28a는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-2025-362797 인간 소세포 폐암 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 28b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-2025-362797 인간 소세포 폐암 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 29a는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-2009-362263 인간 삼중 음성 유방암 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 29b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-2009-362263 인간 삼중 음성 유방암 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 30a는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-0060-200770 인간 담관암종 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 30b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1로 치료된 LD1-0060-200770 인간 담관암종 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

도 31a는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 OV-10-0073 인간 난소암 PDX 모델의 종양 부피-시간 변화 곡선을 보여준다. 도 31b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 및 02-1-LP1로 치료된 OV-10-0073 인간 난소암 PDX 모델의 중량-시간 곡선을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067]

상세한 설명

[0068]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에서 함량, 농도, 비율, 질량, 부피, 시간, 온도, 두께, 기술적 효과 등을 나타내는데 사용되는 모든 숫자는 임의의 경우에 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 나타내지 않는 한, 하기 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 근사치이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게, 수치 파라미터는 본 개시내용에 의해 수득하고자 하는 원하는 특성 및 효과에 따라 달라질 수 있으며, 각 수치 파라미터는 유효 숫자의 수 및 기존 반올림 방법에 따라 해석되거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이 해석되어야 한다.

[0069]

본 개시내용의 광범위한 범주를 제시하는 수치 범위 및 파라미터는 근사치이지만, 구체적인 예에 제시된 수치 값은 가능한 한 정확하게 제공된다. 그러나, 임의의 수치 값은 각각의 테스트 측정에서 발견된 표준 편차로 인해 필연적으로 발생하는 특정 오류를 본질적으로 포함한다. 본 명세서 전반에 걸쳐 제공되는 모든 수치 범위는 더 넓은 수치 범위 내에 있는 모든 더 좁은 수치 범위를 포함할 것이며, 마치 더 좁은 수치 범위가 모두 본원에 명시적으로 기재된 것처럼 보인다.

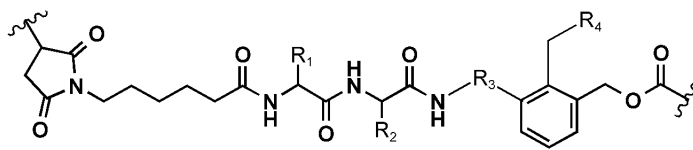
[0070]

ADC에서, 항체 및 페이로드를 연결하는 연결 구조인 링커는 ADC의 성공적인 구축을 위한 핵심 인자이다. 분자 설계 및 특성은 약동학 (PK)/약력학 (PD) 및 치료 윈도우 측면에서 ADC 효능에 대한 중요한 결정 인자이다. 최

적의 효능을 위해, 이상적인 링커는 하기 특성을 가져야 한다: (1) 링커는 ADC가 혈류를 순환하고 조기 절단 없이 종양 부위에 편재화될 수 있도록 혈장에서 충분한 안정성을 보유해야 한다. 링커의 불안정성은 독성 페이로드의 조기 방출 및 비-표적 건강한 세포에 대한 원치않는 손상을 유발하여, 전신 독성 및 유해 효과를 유발한다. (2) 링커는 ADC가 표적 종양 세포에 내재화되면 빠르게 절단되고 자유롭고 독성이 있는 페이로드를 방출할 수 있는 능력을 보유해야 한다. (3) 링커 설계에서 고려해야 할 또 다른 특성은 소수성이다. 소수성 페이로드와 커플링된 소수성 링커는 종종 ADC의 응집을 촉진한다. 이러한 분자는 치료적으로 유용한 ADC를 추구하는데 불리하며, 간독성을 유발하거나 원치않는 면역 반응을 도발할 수 있다 (Kyoji Tsuchikama et al., Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistrie, Protein Cell. 2018 Jan;9(1):33-46).

[0071] 항체-약물 접합체

[0072] 본 개시내용은 항체-약물 접합체 (ADC) 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합을 제공하며, 이는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 페이로드 및 화학식 I의 링커를 포함한다.



화학식 I

[0073]

[0074] 화학식 I의 링커의 숙신이미딜 기는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠간 디설피드 쇠의 환원에 의해 수득된 티올 기와 티오에테르 결합을 형성하고;

[0075] 화학식 I의 링커의 에스테르 기의 카르보닐은 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

[0076] R₁ 및 R₂는 독립적으로 수소, 메틸 또는 이소프로필 기이고;

[0077] R₃은 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R₅는 수소 또는 벤질이고, n¹은 0 내지 2의 정수를 나타내고, n²은 0 내지 2의 정수를 나타내고;

[0078] R₄는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n³은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

[0079] 용어 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"는 페이로드에 공유결합적으로 연결된 본원에 기재된 항-MUC18/ CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 접합체를 지칭한다. 일반적으로, 항체-약물 접합체는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 페이로드, 및 임의로 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 페이로드 사이의 링커를 포함할 수 있다. ADC는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 표적화된 MUC18 및/또는 CD44v7/8 세포, 특히 MUC18 및/또는 CD44v7/8 종양 세포에 페이로드를 전달함으로써 치료 효과를 제공할 수 있다. 항체-약물 접합체는 항체-약물 접합체를 제조하기 위해 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0080] 본원에서 사용된 바와 같은 "항체"는 항원과 결합하는 면역글로불린 (Ig) 패밀리의 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, IgG 유형의 자연 발생 "항체"는 디설피드 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 사량체이다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 CL로 약칭됨)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 초가변성 영역으로 더 세분화될 수 있으며, 이 사이에 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카르복시-말단까지 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[0081] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항원-결합 단편"은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디설피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디설피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 Fv (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부로부터 형성된 다중특

이적 항체, 카멜화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, 또는 항원에 결합하지만 완전한 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편은 부모 항체 또는 부모 항체 단편 (예를 들어, 부모 scFv)이 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다.

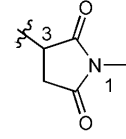
[0082] 용어 "이성질체"는 동일한 분자식을 갖지만 구조가 상이한 화합물을 지칭하며, 이는 구조 이성질체로도 불리고, 일반적으로 구조 이성질체 및 입체이성질체를 포함한다. 구조 이성질체는 분자 내 원자의 연결 순서의 차이 또는 상이한 결합 특성에 의해 발생하는 이성질체를 지칭하며, 바람직하게는 호변이성질체를 포함한다. 호변이성질체는 분자 내 2개의 위치에서 원자의 빠른 이동으로 인해 발생하는 관능기 이성질체를 지칭한다. 입체이성질체는 동일한 순서 및 결합으로 서로 연결되어 있지만 공간 배열이 상이한, 분자 내 원자 또는 원자 그룹에 의해 발생하는 이성질체를 지칭하며, 바람직하게는 광학 이성질체를 포함한다. 광학 이성질체는 분자 내 반축 대칭의 부재로 인해 상이한 광학적 특성을 갖는 입체이성질체 (예컨대 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 및 메조머)를 지칭한다.

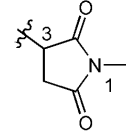
[0083] 용어 "전구약물"은 약물의 화학 구조를 변형함으로써 수득된 화합물을 지칭하며, 이는 시험관내에서 불활성이거나 덜 활성이고, 생체내에서 효소적 또는 비-효소적 형질전환을 통해 활성 약물을 방출하여 약리학적 효과를 발휘한다. 본 개시내용에서, 전구약물은 ADC 분자 또는 페이로드일 수 있다.

[0084] 용어 "페이로드"는 항체-약물 접합체로부터 방출 시 세포독성이거나 세포를 사멸시킬 수 있는 화합물, 방사성라벨, 형광단, 발색단, 영상화제 및/또는 금속 이온을 검출 라벨로서 갖거나 세포 사멸 효과를 갖는 화합물, 방사성핵종 또는 폴리펩티드, 신체의 면역 활성 (활성화 또는 억제 효과 포함)을 조정할 수 있는 화합물, 핵산, 폴리펩티드 또는 단백질, 효소, 호르몬 또는 핵산을 포함한다.

[0085] 일부 이상적인 조건 하에, 항체-약물 접합체에서, 접합된 페이로드는 세포독성이 거의 없거나 그 세포독성이 너무 낮아서 치료 유효 용량의 ADC를 투여해도 접합된 페이로드로 인해 대상체에서 전신 독성이 유발되지 않을 것이다. 페이로드는 특정 질환의 치료를 위한 임상적으로 검증된 약물, 또는 임상 사용 조건 하에 허용가능한 약리학적 활성을 갖는 화합물, 방사성핵종, 핵산, 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0086] 본 개시내용에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠간 디설피드 쇠의 환원에 의해 수득된 티올 기 및 화학식



I의 말단 숙신이미딜 기가 함께 연결되어 티오에테르 결합을 형성한다. 숙신이미딜 기는  이며, 이는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠간 디설피드 쇠의 환원 후 티올 모이어티와 위치 3에서 티오에테르 결합

을 형성한다. 본 개시내용에서,  와의 결합은 다른 기에 연결된 화학적 결합을 나타낸다.

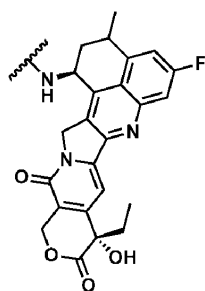
[0087] 본 개시내용에서, 쇠간 디설피드 결합 및 쇠내 디설피드 결합을 포함하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 디설피드 결합, 바람직하게는 프로세싱된, 예를 들어 티올로 활성화된 후 링커에 결합된 쇠간 디설피드 쇠이다. 링커의 숙신이미딜 기에 화학적으로 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 아미노산은 리신, 히스티딘, 티로신 및 시스테인 중 하나 또는 이들의 조합을 포함한다. 임의로, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 화학적으로 결합된 아미노산은 시스테인이다. 일부 실시양태에서, 화학식 I의 링커는 항체의 힌지, 가변 및/또는 불변 영역에 연결될 수 있다.

[0088] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 링커에서, R_4 는 $-(N(CH_3COCH_2))_n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 1 내지 20의 정수를 나타낸다. n^3 은 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20의 임의의 정수일 수 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, R_4 는 $-(N(CH_3COCH_2))_n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 8 내지 15의 정수를 나타낸다. 일부 실시양태에서, R_4 는 $-(N(CH_3COCH_2))_n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 10 내지 12의 정수를 나타낸다. 일부 실시양태에서, R_4 는 메틸아미노 기를 나타낸다.

[0090] 본 개시내용에서, 화학식 I의 링커는 폴리사르코신 기 또는 메틸아미노 기를 함유하는 친수성 아미노 기 R_4 를 함

- [0101] 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 페이로드는 면역조정제 (면역성에 영향을 미칠 수 있는 시토카인 및 케모카인 포함), 또는 생물학적 활성을 갖는 효능작용 또는 길항작용 항체이다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 페이로드는 세포독성 화합물이다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 페이로드는 항종양 활성을 갖거나 항종양 약물이다. 페이로드는 DNA 토포이소머라제 억제제 또는 튜블린 억제제로부터 선택된다. DNA 토포이소머라제 억제제는 토포이소머라제 I 억제제 또는 토포이소머라제 II 억제제일 수 있다.
- [0103] 본 출원에서, 용어 "토포이소머라제 억제제"는 일반적으로 토포이소머라제 활성을 억제하는 화합물을 지칭한다. 토포이소머라제 I 억제제로 공지된 화합물은 토포이소머라제 I에 대한 활성을 갖고, 토포이소머라제 II 억제제는 토포이소머라제 II에 대한 활성을 갖는다. 일부 화합물은 토포이소머라제 I 및 토포이소머라제 II 둘 모두에 대한 활성을 갖고, 토포이소머라제 I/II 억제제로 공지되어 있다.
- [0104] 용어 "튜블린 억제제"는 일반적으로 진행 세포의 미세소관 시스템을 억제하고, 세포 분열을 방해하고, 세포 증식을 억제하는 화합물을 지칭한다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 페이로드는 토포이소머라제 억제 효과를 갖는 캄프토테신 또는 이의 유도체이다. 용어 "유도체"는 부모 화합물의 분자에서 원자 또는 원자 그룹을 다른 원자 또는 원자 그룹으로 대체함으로써 형성된 화합물을 지칭하며, 부모 화합물의 유도체라고 한다. 용어 "캄프토테신 및 이의 유도체"는 일반적으로 캄프토테신 및 캄프토테신 유도체를 포함한다. 캄프토테신은 토포이소머라제 I을 비가역적으로 억제함으로써 약리학적 효과를 발휘한다. 캄프토테신 유도체는 엑사테칸, 이리노테칸, 토포테칸, 루르토테칸, 실라테칸, 에티리노테칸 페골, TAS 103, 9-아미노캄프토테신, 7-에틸캄프토테신, 10-히드록시캄프토테신, 9-니트로캄프토테신, 10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, 9-아미노-10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, 9-클로로-10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, (7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신, 7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-메틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신 및 7-(2-N-이소프로필아미노)에틸)-(20S)-캄프토테신, 및 이의 입체이성질체, 염 및 에스테르를 포함한다. 캄프토테신 및 이의 유사체 또는 유도체에 대한 합성 방법은 공지되어 있으며, 미국 특허 번호 5,244,903에 요약되고 제시되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 페이로드는 아우리스타틴 또는 이의 유도체, 메이탄신 또는 이의 유도체이며, 이는 튜블린 억제 효과를 갖는다. 용어 "아우리스타틴 또는 이의 유도체"는 일반적으로 아우리스타틴 F 및 아우리스타틴 F 유도체를 포함한다. 아우리스타틴 F 유도체는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 및 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)를 포함한다. 용어 "메이탄신 또는 이의 유도체"는 일반적으로 메이탄신 및 메이탄신 유도체를 포함한다. 메이탄신 유도체는 메이탄신 DM1, 메이탄신 DM2 및 메이탄신 DM4를 포함한다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 페이로드는 캄프토테신 유도체인 엑사테칸이며, 이는 토포이소머라제 억제제로서 세포 주기 전반에 걸쳐 작용할 수 있으며, 저속-성장 고형 종양에 대한 강한 침투성 및 양호한 치료 효과를 갖는다. 또한, 세포내 표적의 수는 튜블린 억제제의 표적보다 훨씬 적으므로, ADC 분자가 동일한 양의 페이로드를 세포로 운반할 때 더 나은 사멸 효과를 달성할 수 있다. 엑사테칸 분자는 P-gp의 기질이 아니며, 이는 약물 저항성 문제를 감소시키거나 경감시키는데 유익하다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 페이로드는 화학식 II의 캄프토테신이며, 이는 이의 시클로헥산 고리의 아미노 기의 질소 원자에 의해 링커에 연결된다.



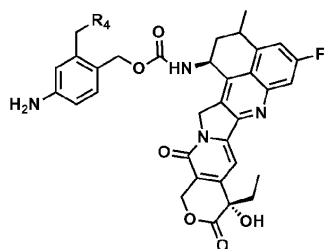
화학식 II

- [0109]
- [0110] 엑사테칸 분자는 구조가 단단하고 불량한 친수성을 가지며, 그러므로 ADC를 제조하기 위해 선행 기술에서 일반적으로 사용되는 GGFG 테트라펩티드 링커에 연결될 때 ADC 분자 사이에 중합을 유발하기 쉽고, 이는 ADC 약물의 개발 요구사항을 충족하지 못한다 (Bioorg. Med Chem. Lett. 26 (2016) 1542-1545). 따라서, 링커 및 페이로

드의 선택 및 매칭은 ADC 약물의 안전성 및 안정성에 영향을 미친다.

[0111] 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 본 개시내용에 의해 제공된 항체-약물 접합체에서, 링커에 있는 다중 친수성기로 인해, 링커-페이로드 구조의 친수성이 개선되고, 소수성 페이로드에 의해 유발되는 ADC 분자의 응집 및 침전이 특정 정도로 감소될 수 있다.

[0112] ADC 분자가 세포 내로 세포내이입된 후, 링커가 분해되었는지 여부에 따라 페이로드 또는 링커 (또는 링커의 일부)-페이로드 구조의 화합물이 방출된다. 일부 실시양태에서, 화학식 II의 엑사테칸의 시클로헥산 고리의 아미노기는 화학식 I의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기에 결합되고 카르바메이트를 포함하는 링커-페이로드 구조를 형성한다. 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 본 개시내용에 의해 제공된 링커-페이로드 구조에서, ADC 분자가 세포 내로 세포내이입된 후, 링커는 카텡신 (예를 들어, 카텡신 B)에 의해 절단되어 하기 화학식 IV의 중간체 또는 활성 대사산물을 형성한다.



화학식 IV

[0113]

[0114] 여기서, R_4 는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)_n-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n^3 은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

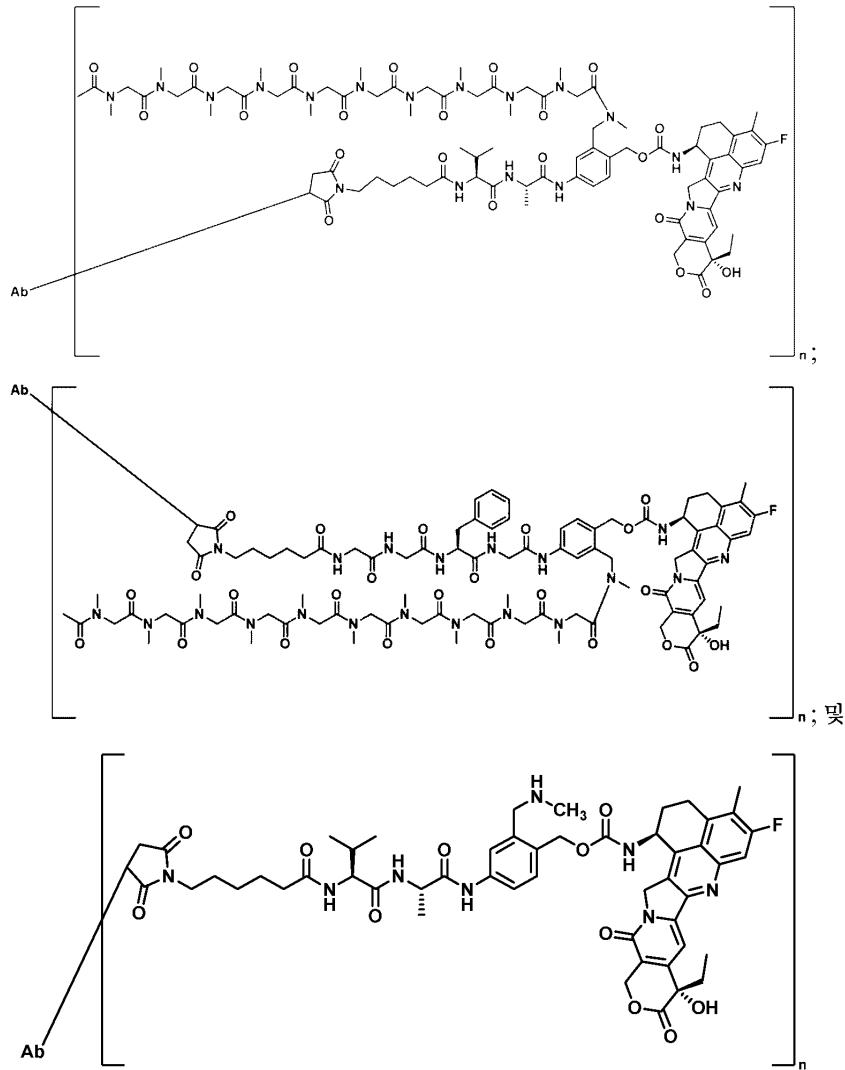
[0115] 그 후, 화학식 IV의 중간체 또는 활성 대사산물의 PABC (파라-아미노 벤질옥시카르보닐) 기는 1,6-제거를 거쳐 엑사테칸을 방출한다 (문헌 [Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 7492-7509] 참조). 따라서, 본 개시내용에 의해 제공된 ADC 분자의 링커-페이로드 구조는 양호한 생체내 안정성 및 생물학적 활성을 갖는다.

[0116] 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 링커-페이로드 구조의 절단 부위는 링커 내의 아미드 결합, 예를 들어 R_2 로 나타내어지는 치환기가 위치된 탄소 원자와 R_3 으로 나타내어지는 기 사이의 아미드 결합 또는 R_3 으로 나타내어지는 기 내의 아미드 결합일 수 있다.

[0117] 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체에서, 접합된 페이로드의 분자 수 대 항체 또는 항원-결합 단편의 각 분자의 비율, 즉 약물-대-항체 비율 또는 DAR은 1 내지 10이다. 일부 실시양태에서, DAR은 1~2, 2~4, 4~6, 2~8, 4~8, 4~10, 6~10, 7~10 또는 8~10이고, DAR의 예시적 값은 4, 6, 7.8, 9.2 또는 9.92이다.

[0118] DAR은 항체 분자당 접합된 페이로드 또는 약물 분자 수의 평균 값, 즉 접합된 약물 분자의 평균 수를 나타낸다. 항체-약물 접합체에서, DAR은 그 효능 및 안전성에 영향을 미치는 핵심 인자이다. 항체-약물 접합체의 생산은 반응 조건, 예컨대 반응에 사용되는 출발 물질 및 시약의 양을 특정하여 일정한 수의 접합된 페이로드 분자를 얻음으로써 수행된다. 항체-약물 접합체를 제조할 때 일반적으로 상이한 수의 접합된 페이로드 분자를 함유하는 혼합물이 수득된다. 달리 특정되지 않는 한, 본 개시내용에서, DAR은 평균 값, 즉 접합된 페이로드 또는 약물 분자의 평균 수로서 정의된다.

[0119] 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 하기 구조 중 임의의 하나를 포함한다:



[0120]

[0121] Ab는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 나타내고; n은 DAR과 동일하다.

[0122]

항체 또는 이의 항원-결합 단편은 환원된 반응성 티올 기에 의해 링커에 연결되고, 임의로 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 힌지 영역에 있는 디설피드 결합은 반응성 티올 기로 환원된 후 링커에 연결된다.

[0123]

일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체 내의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 MUC18로 표적화된다. CD146 또는 흑색종 세포 접착 분자 (MCAM)로도 공지된 MUC18은 주로 세포 접착에서 기능하는 막형단 당단백질이다. 혈관 평활근을 포함한 혈관 조직 내의 내피 세포에서 검출가능한 수준으로 발현된다. 특히, MUC18은 인간 악성 흑색종, 특히 전이성 병변 및 진행성 원발성 종양에서 과발현된다.

[0124]

본 개시내용에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 (H) 및 경쇄 (L)를 포함하고, 중쇄 및 경쇄의 CDR은 표 1에 제시된다.

[0125] 표 1. CDR 서열 (IMGT 체계에 의해 넘버링됨)

항체 코드	H/L	CDR1	CDR2	CDR3
CL070336	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	MHYSATP (SEQ ID NO: 11)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)
	L	KSVRTSGYNY (SEQ ID NO: 34)	LAS	QHSREFPFT (SEQ ID NO: 46)
CL070335	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	IHYSTTT (SEQ ID NO: 12)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)
	L	KSVRTSGYSY (SEQ ID NO: 35)	LAS	QHTREFPFT (SEQ ID NO: 47)
CL070333	H	GFTFTGYY (SEQ ID NO: 2)	IYPGNVNT (SEQ ID NO: 13)	ARSGYFASSYEFAY (SEQ ID NO: 24)
	L	ENIYSY (SEQ ID NO: 36)	NAK	QHHYGTPLT (SEQ ID NO: 48)
CL070319	H	GYTFTEYA (SEQ ID NO: 3)	ITAYSGDA (SEQ ID NO: 14)	ARGLGRPNYGM DY (SEQ ID NO: 25)
	L	QSLNLSRYQKNY (SEQ ID NO: 37)	FAS	QQHYGTPFT (SEQ ID NO: 49)
CL070321	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDDYYAFDY (SEQ ID NO: 26)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSSYPST (SEQ ID NO: 50)
CL070320	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDNYALDY (SEQ ID NO: 27)
	L	STVGY (SEQ ID NO: 39)	STS	HQWSSYPCT (SEQ ID NO: 51)
CL070324	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGAT (SEQ ID NO: 16)	TRSGYDDYYALDY (SEQ ID NO: 28)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSNYPST (SEQ ID NO: 52)
CL070341	H	GFTFSTYG (SEQ ID NO: 5)	INSRAS YT (SEQ ID NO: 17)	ARHRRDWD SY YAM DY (SEQ ID NO: 29)
	L	QSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 40)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070350	H	GFTFN NYG (SEQ ID NO: 6)	INRGGSYT (SEQ ID NO: 18)	ARHRRDWD SY YAM DY (SEQ ID NO: 29)
	L	RSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 41)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070349	H	GYSITSGFY (SEQ ID NO: 7)	INFGGTN (SEQ ID NO: 19)	ARGGNDGGFTY (SEQ ID NO: 30)
	L	SSVSSTY (SEQ ID NO: 42)	RTS	HQWSGYPYT (SEQ ID NO: 54)

[0126]

CL070348	H	GYSITSDYA (SEQ ID NO: 8)	ITYSGST (SEQ ID NO: 20)	ARRIRRTGDWYFDV (SEQ ID NO: 31)
	L	QNLLNSVNQKNF (SEQ ID NO: 43)	WAS	QNDYIYPYT (SEQ ID NO: 55)
CL070370	H	GYTFTDYS (SEQ ID NO: 9)	INTETGEP (SEQ ID NO: 21)	VSYDYDAVSY (SEQ ID NO: 32)
	L	QYVGAA (SEQ ID NO: 44)	WAS	QQYGN YRT (SEQ ID NO: 56)
J253	H	GYTFTSYD (SEQ ID NO: 10)	IFPGDGST (SEQ ID NO: 22)	ARYHFFDN (SEQ ID NO: 33)
	L	KSLLYKDGKTY (SEQ ID NO: 45)	LMS	QQLVEYPYT (SEQ ID NO: 57)

[0127]

[0128]

본원에서 사용된 바와 같은 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역 내의 비인접 항원 조합 부위를 의미하도록 의도된다. CDR 잔기 넘버링은 IMGT의 명명법을 따르며 (문헌 [Lefranc M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003)] 참조), 여기서 정의는 서로 비교할 때 아미노산 잔기의 중복 또는 서브셋을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 그래프트된 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 지칭하기 위해 정의 중 임의의 하나의 적용은 본원에서 정의되고 사용된 바와 같은 용어의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

- [0129] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체 코딩된 CL070336, CL070335, CL070333, CL070319, CL070321, CL070320, CL070324, CL070341, CL070350, CL070349, CL070348, CL070370 또는 J253에서 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1 (중쇄 CDR1), 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2 (중쇄 CDR2), 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3 (중쇄 CDR3); 및 서열식별번호: 38에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1 (경쇄 CDR1), 아미노산 서열 STS를 갖는 LCDR2 (경쇄 CDR2), 서열식별번호: 52에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3 (경쇄 CDR3)을 포함한다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표 2에 제시된 참조 항체 서열의 VH 중 임의의 것과 적어도 85% 또는 90% 동일한 중쇄 가변 영역 (VH), 및/또는 표 2에 제시된 참조 항체 서열의 VL 중 임의의 것과 적어도 85% 또는 90% 동일한 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.
- [0132] 동일성은 문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990]의 알고리즘 (문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993]에서와 같이 변형됨)을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)에 혼입된다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어길이=3으로 수행되어 관심 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 두 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, 문헌 [Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997]에 기재된 바와 같이 Gapped BLAST를 활용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 활용할 때, 각 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 프레임워크 영역에서는 돌연변이가 존재하지 않거나, 항원에 대한 항체 가변 영역의 결합에 영향을 미치지 않는 돌연변이가 존재한다. 항원에 대한 항체 가변 영역의 결합에 영향을 미치지 않는 돌연변이는 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 증가시키거나 이를 거의 변하지 않게 유지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-MUC18 또는 CD44v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 보존적으로 변형된 변이체를 추가로 포함한다. 보존적으로 변형된 변이체는 아미노산의 화학적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 초래하는 폴리펩티드 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가를 포함한다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 다형성 변이체, 중간 상동체 및 대립유전자에 추가되며 이를 배제하지 않는다. 하기 8개 그룹은 서로에 대한 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예를 들어, 문헌 [Creighton, Proteins (1984)] 참조). 일부 실시양태에서, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특징에 유의한 영향을 미치지거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭하는데 사용된다.

[0134] 표 2. 참조 항체 서열

항체 코드	VH	VL	항체 코드	VH	VL
CL070336	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	CL070341	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
CL070335	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	CL070350	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
CL070333	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	CL070349	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77
CL070319	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	CL070348	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
CL070321	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	CL070370	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
CL070320	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	J253	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83
CL070324	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	/	/	/

[0135]

[0136] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표 3에 제시된 VH와 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 VH; 및 표 3에 제시된 VL과 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 VL을 포함한다. 표 3에 제시된 항체는 각각 CL070324 및 J253의 인간화 서열이다.

[0137]

표 3. 인간화 항체 서열

항체 코드	VH	VL
인간화 CL070324 (02-1)	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85
인간화 hJ253-03-1	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87
인간화 hJ253-03-7	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89

[0138]

[0139] 일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 84에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 85에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0140]

일부 실시양태에서, 항-MUC18 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 CL070324, 인간화 hJ253-03-1 또는 인간화 hJ253-03-7, 또는 이의 보존적 변이체이다.

[0141]

여기서 서열식별번호: 1~89에 제시된 항-MUC18 항체의 CDR 서열 및 항체 가변 영역 서열은 미국 특허 US2022041749에 기록되었으며 (서열식별번호: 8~90, 서열식별번호: 1~6), 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0142]

일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD44v7/8로 표적화된다. HCAM (귀소 세포 접착 분자), Pgp-1 (식세포성 당단백질-1), 헤르메스 항원, 림프구 귀소 수용체, ECM-III 또는 HUTCH-1로도 공지된 CD44는 세포 접착 및 세포-세포 상호작용에서 주로 기능하는 세포-표면 당단백질이다. CD44의 여러 스플라이스 변이체가 공지되어 있으며, 이는 엑손 7 및 엑손 8을 포함하는 변이체인 CD44 v7/8을 포함한다. CD44는 히알루론산에 대한 단백질 수용체이며, 또한 오스테오펀틴, 콜라겐, 매트릭스 메탈로프로테이나제 및 다른 유사한 리간드와 결합하거나 달리 상호작용하는 것으로 밝혀졌다.

[0143]

일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 CD44 v7/8의 결합 펩티드에 특이적으로 결합하고, 여기서 결합 펩티드는 QAGRRMDMSSHSIT (서열식별번호: 90)로서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0144]

일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 CD44 v7/8에서 PISHPMGRGHQAGRR (서열식별번호: 91) 및/또는 SHSITLQPTANPNTG (서열식별번호: 92)의 아미노산 서열을 갖는 결합 펩티드에 결합하지

않는다.

[0145] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 93에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 94에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 95에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 함유하는 중쇄; 및 서열식별번호: 96에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 아미노산 서열 RAN을 갖는 LCDR2, 서열식별번호: 97에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 함유하는 경쇄를 포함한다. 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 CDR 서열은 표 4에 제시된다:

[0146] 표 4. CDR 서열 (IMGT 체계에 의해 넘버링됨)

항체		CDR1	CDR2	CDR3
HIS1H2-2	중쇄	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 93)	IYPSDSYT (SEQ ID NO: 94)	TKWGDSDY (SEQ ID NO: 95)
	경쇄	QDINRY (SEQ ID NO: 96)	RAN	LQYDEFPFT (SEQ ID NO: 97)

[0147]

[0148] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표 5에 제시된 참조 항체 서열의 VH와 적어도 85% 또는 90% 동일한 VH, 및/또는 표 5에 제시된 참조 항체의 VL과 적어도 85% 또는 90% 동일한 VL을 포함한다.

[0149] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표 5에 제시된 참조 항체의 인간화 서열인 HIS1H2-2a 또는 HIS1H2-2의 VH와 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 VH; 및 HIS1H2-2a 또는 HIS1H2-2의 VL과 적어도 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일한 VL을 포함한다.

[0150] 표 5. 항-CD44 v7/8 항체의 중쇄/경쇄 가변 영역 서열

항체 코드	VH	VL
참조 항체 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99
인간화 항체 HIS1H2-2a	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101
인간화 항체 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 104

[0151]

[0152] 일부 실시양태에서, 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 100에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 101 또는 서열식별번호: 104에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이의 보존적 변이체를 포함한다.

[0153] 서열식별번호: 90~101에 제시된 항-CD44 v7/8 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 펩티드 서열, 비결합된 펩티드 서열, CDR 서열 및 가변 영역 서열은 PCT 특허 출원 W02020159754에 기록되었으며 (서열식별번호: 2~14), 이는 그 전문이 참조로 포함된다.

[0154] 본원에 제공된 항체-약물 접합체는 종양 세포에 대해 우수한 사멸 활성을 나타내고, MUC18 또는 CD44v7/8의 높은 발현을 갖는 종양 세포에 대해 극히 높은 사멸 활성을 나타낸다.

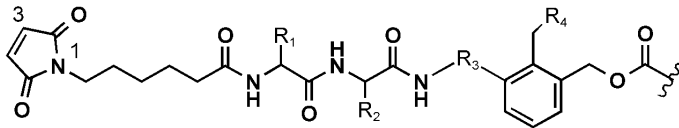
[0155] 본 개시내용에 의해 제공된 항체-약물 접합체는 우수한 항종양 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 MUC18의 상이한 발현 수준 (낮음, 보통 및 높음)을 갖는 신생물성 질환을 앓고 있는 대상체에 대해 우수한 항종양 활성을 나타낸다. MUC18의 발현 수준은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 H-점수 접근법에 의해 측정될 수 있다. 점수는 0 내지 300의 범위이며, 점수가 높을수록 발현이 높다. 예를 들어, 낮음 (H-점수 = 10~99), 보통 (H-점수 = 100~199), 높음 (H-점수 = 200~300). 또한, 항체-약물 접합체는 생체내에서 명백한 유해 효과를 나타내지 않는다.

[0156] 본 개시내용의 항체-약물 접합체는 대기 중에 방치되거나 재결정화되어 물을 흡수하거나, 흡착된 물을 유지하거나, 수화물이 될 수 있으며, 이러한 물-함유 화합물 및 이의 염이 또한 본 개시내용에 포함된다는 점을 주목해야 한다. 또한, 다양한 방사성 또는 비-방사성 동위원소로 라벨링된 동위원소 변이체의 화합물이 또한 본 개시내용에 포함된다. 본 개시내용의 항체-약물 접합체를 구성하는 원자 중 하나 초과가 또한 비자연적인 비율로 원자 동위원소를 함유할 수 있다. 원자 동위원소로서, 예를 들어 중수소 (2H), 삼중수소 (3H), 아이오딘-125 (125I) 및 탄소-14 (14C) 등이 예시될 수 있다. 또한, 본 개시내용의 화합물은 방사성동위원소, 예컨대 삼중수

소 (3H), 아이오딘-125 (125I) 또는 탄소-14 (14C)로 방사성라벨링될 수 있다. 방사성라벨링된 화합물은 치료제 또는 예방제, 연구 시약, 예컨대 테스트 시약, 및 진단제, 예를 들어 생체내 영상화 진단제로서 사용될 수 있다. 본 개시내용의 항체-약물 접합체의 모든 동위원소 변이체 (방사성이거나 방사성이 아님)는 본 개시내용의 범위 내에 포함된다.

[0157] 제조 방법

[0158] 본 개시내용은 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합, 및 제약상 허용되는 부형제의 제조 방법을 제공하며, 이는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 이의 쇠간 디설피드 결합이 적어도 부분적으로 환원되도록 환원시키는 단계, 및 링커-페이로드에서 화학식 III의 링커의 말레이미드-N-일의 위치 3에 있는 탄소 원자와 반응시키는 단계



화학식 III

[0159]

를 포함하고,

[0160]

항체-약물 접합체에서 화학식 III의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기는 페이로드의 아미노 기에 연결되고;

[0161]

R₁ 및 R₂는 수소, 메틸 및 이소프로필 기로부터 독립적으로 선택되고;

[0162]

R₃은 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 또는 단일 결합을 나타내고, R₅는 수소 또는 벤질이고, n¹은 0 내지 2의 정수를 나타내고, n²은 0 내지 2의 정수를 나타내고;

[0163]

R₄는 메틸아미노 기 또는 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ 을 나타내고, n³은 1 내지 20의 정수를 나타낸다.

[0164]

항체-약물 접합체에서, 쇠간 디설피드 결합은 티올 기로 환원된 후, 링커-페이로드에서 화학식 III으로 나타내어지는 링커의 반응성 기와 반응한다. 많은 실제적인 경우에, 페이로드를 갖는 화학식 III의 링커는 반응성 티올 기를 갖는 동일한 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 환원제, 예컨대 디티오프라이트톨 (DTT), 2-머캅토에탄올, 또는 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 히드로클로라이드 (TCEP)와 반응하여, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 디설피드 결합을 유발하여 반응성 티올 기를 형성한다. 환원제의 양은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몰 당량의 0.3-10배, 예를 들어 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몰 당량의 1-10, 3-10, 5-10, 7-10배일 수 있다.

[0165]

일부 실시양태에서, 방법은 하기를 추가로 포함한다: 킬레이트제를 함유하는 버퍼 용액에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 환원제와 반응시킨 후, 링커-페이로드 용액을 첨가하여 반응을 수행한다. 링커-페이로드를 특히 화학식 III의 링커 및 페이로드의 결합에 의해 형성된 화합물이며, 여기서 페이로드의 아미노 기 (일차 아미노 기)는 화학식 III의 링커의 에스테르 기의 카르보닐 기에 연결된다. 링커-페이로드에서, 페이로드는 [항체-약물 접합체] 섹션에 기재된 페이로드로부터 선택된다. 용어 "킬레이트제"는 금속 원자 또는 이온과 배위 결합에 의해 시클릭 구조를 갖는 복합체를 형성할 수 있는 복합체를 지칭한다.

[0166]

일부 실시양태에서, 환원제는 킬레이트제를 함유하는 완충 용액에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 반응하여, 부분적으로 또는 완전히 환원된 쇠간 디설피드 결합을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 초래한다. 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 킬레이트제는 1 mM-20 mM, 예를 들어 2 mM-20 mM, 5 mM-20 mM, 8 mM-20 mM, 1 mM-15 mM, 또는 1 mM-10 mM의 농도로 사용된다. 버퍼 용액의 구성성분은 관련 기술분야에서 일반적으로 사용되는 버퍼 염, 예컨대 인산나트륨, 붕산나트륨, 아세트산나트륨 또는 유사한 버퍼 염일 수 있다.

[0167]

항체 또는 이의 항원-결합 단편과 환원제의 반응은 조정된 pH 값 하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 pH 5~9, 임의로 6~8, 6~7, 6.5~7.5 또는 7~8 하에 환원제와 반응한다. 예를 들어, 반응은 약 pH 7 하에 수행된다. 반응 용액의 pH는 산성 또는 염기성 화학물질을 사용하여 조정될 수 있으며, 예시적 산성 또는 염기성 화학물질은 아세트산, 염산, 인산, 황산, 중탄산나트륨, 탄산나트륨, 수산화나트륨 및

[0168]

트리에틸아민을 포함한다.

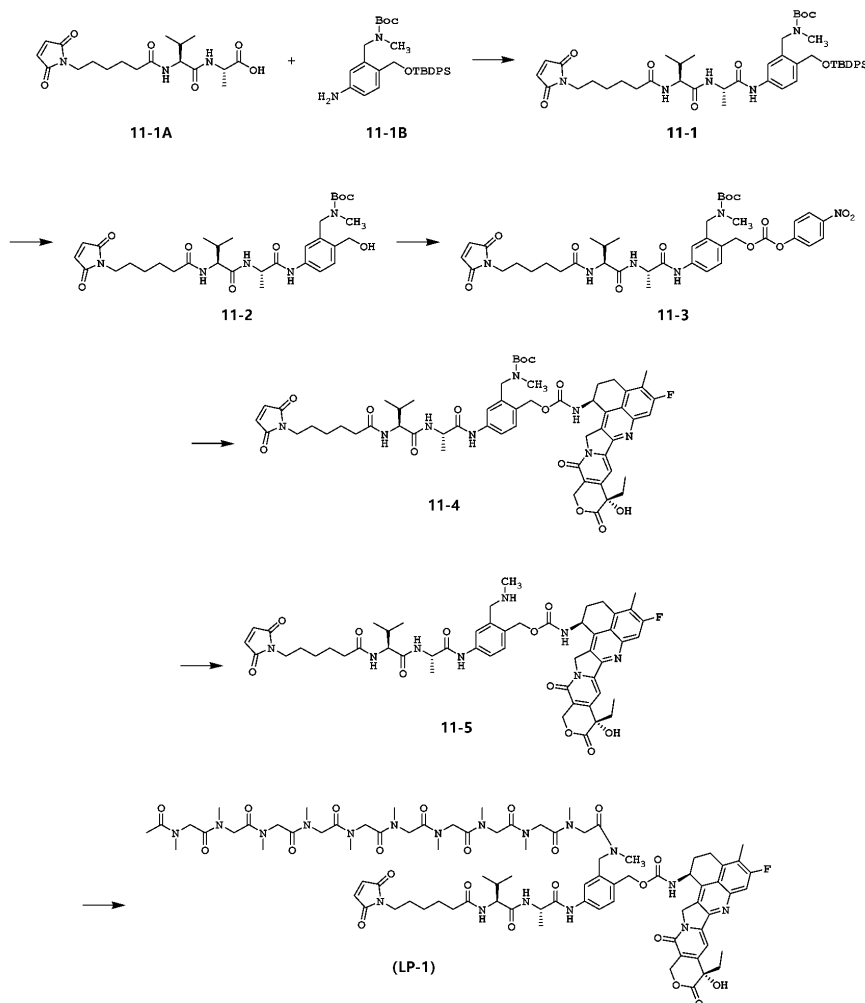
- [0169] 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 환원제의 반응은 조절된 온도 하에 수행되고, 예시적 반응 온도는 $-10\sim 40^{\circ}\text{C}$, $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$, $5\sim 40^{\circ}\text{C}$, $10\sim 40^{\circ}\text{C}$, $25\sim 40^{\circ}\text{C}$, $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 또는 $35\sim 38^{\circ}\text{C}$, 예를 들어 약 37°C 이다.
- [0170] 링커-페이로드는 디메틸 술폭시드 (DMSO), 디메틸포름아미드 (DMF), 디메틸아세트아미드 (DMA) 및 N-메틸-2-피롤리돈 (NMP) 중 임의의 하나 또는 이들의 조합으로부터 선택된 유기 용매에 용해될 수 있다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 링커-페이로드의 용액은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 버퍼 용액의 부피를 기준으로 1% 내지 20%의 부피 비율의 양으로 환원되거나 반응성 티올 기를 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 버퍼 용액에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 링커-페이로드의 첨가된 용액의 부피 비율은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 버퍼 용액의 부피를 기준으로 1~20%, 2~20%, 5~20%, 10~20%, 15~20%, 1~18%, 1~15%, 1~13%, 1~10%, 또는 5~15%이다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 링커-페이로드 대 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몰 비율은 4~20, 임의로 8~20이다. 일부 실시양태에서, 링커-페이로드 대 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몰 비율은 10~20, 14~20, 16~20, 또는 18~20이다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 링커-페이로드와 반응하는 온도는 $-10\sim 40^{\circ}\text{C}$ 또는 $0\sim 37^{\circ}\text{C}$ 이다. 일부 실시양태에서, 반응 온도는 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$, $5\sim 40^{\circ}\text{C}$, $5\sim 37^{\circ}\text{C}$, $10\sim 37^{\circ}\text{C}$, $10\sim 25^{\circ}\text{C}$ 또는 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 이다.
- [0174] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 링커-페이로드와 반응하는데 걸리는 시간은 0.5~2시간이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 링커-페이로드와 반응하는데 걸리는 시간은 0.5~1.75시간, 0.5~1.5시간, 0.5~1.25시간, 0.75~2시간 또는 1~2시간이다.
- [0175] 반응은 티올-함유 시약을 사용하여 비반응된 링커-페이로드를 불활성화시킴으로써 종결될 수 있다. 티올-함유 시약은 시스테인 또는 N-아세틸-(L)-시스테인 (NAC)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 보다 구체적으로, 링커-페이로드의 1-2배의 몰 당량을 갖는 티올-함유 시약을 반응 용액에 첨가하고, 실온 ($10\sim 30^{\circ}\text{C}$)에서 10~30분 동안 인큐베이션하여 반응을 종결시킬 수 있다.
- [0176] 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 티올 기를 갖는 경우, 항체-약물 접합체는 또한 공지된 방법 (예를 들어, 특허 공개 US2016/297890에 기재된 방법에 의해 이용가능함 (예를 들어, 단락 [0336] 내지 [0374]에 기재된 방법에 의해 이용가능함)을 사용하여 화합물의 반응에 의해 수득될 수 있다. 티올 기를 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법 (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996))에 의해 수득될 수 있다.
- [0177] 본 개시내용에 의해 제공된 항체-약물 접합체는 상기 제조 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제조된 항체-약물 접합체는 겔 여과, 예를 들어 겔 컬럼을 사용한 정제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 정제 프로세스에 적용된다.
- [0178] 키트
- [0179] 본 개시내용은 상기 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구 약물, 용매화물 또는 이들의 조합을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 본 개시내용의 방법에서, 예컨대 신생물성 질환을 치료하는 방법에서 본원에 기재된 항체-약물 접합체의 사용 지침서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0180] 키트는 용기를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 주사기 (예컨대 단일 또는 이중 챔버 주사기) 및 테스트 튜브를 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 제형을 담는다. 제형을 담는 용기는 단일-사용 바이알 또는 다중-사용 바이알일 수 있으며, 이는 재구성된 제형의 반복 투여를 허용한다.
- [0181] 키트는 용기에 있거나 용기와 연관되어 제형의 재구성 및/또는 사용에 대한 지침을 나타낼 수 있는 라벨 또는 패키지 인서트를 추가로 포함할 수 있다. 라벨 또는 패키지 인서트는 제형이 대상체에서 신생물성 질환 (예를 들어, 암)을 치료하기 위한 피하, 정맥내 (예를 들어, 정맥내 주입) 또는 다른 투여 방식에 유용하거나 의도되었음을 추가로 나타낼 수 있다. 키트는 상업적, 치료적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침서를 갖는 패키지 인서트를 포함한다.
- [0182] 제약 조성물

- [0183] 본 개시내용은 제약 조성물을 제공하며, 이는 상기 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 동위원소 변이체, 제약상 허용되는 염, 전구약물, 용매화물 또는 이들의 조합, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함한다.
- [0184] 본 개시내용의 항체-약물 접합체 또는 제약 조성물은 제약상 허용되는 부형제의 특정 적용가능한 형태, 물리화학적 특징 등에 따라 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 동결-건조 제형 또는 액체 제형의 형태로 제형화될 수 있으며, 이는 관련 기술분야에서 적절한 제형 첨가제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 상기 언급된 제약 조성물은 전형적으로 하나 초과와 제약 담체, 예를 들어 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일 (석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 오일 (예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일 및 참기름 등) 포함)을 함유한다. 상기 제약 조성물의 정맥내 투여의 경우, 물이 더 대표적인 담체이다. 또한, 식염수 용액, 수성 글루코스 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서 특히 주사가 가능한 용액의 경우 사용될 수 있다. 적합한 제약 부형제는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 상기 제약 조성물은 또한 필요에 따라 미량의 습윤제, 유화제 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 제약 조성물의 투여 방식은 일반적으로 비경구 투여이며, 이는 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 또는 피하 주사일 수 있지만 이에 제한되지는 않으며, 예를 들어 제약 조성물은 주입 또는 볼루스 주사에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000)]을 참조하며, 이는 그 전문이 참조로 포함된다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)], 이는 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0185] 본 개시내용의 제약 조성물은 본 출원의 항체-약물 접합체만을 함유하는 제약 조성물, 또는 항체-약물 접합체 및 적어도 하나의 다른 치료제 (예를 들어, 암 치료제)를 함유하는 제약 조성물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체-약물 접합체는 또한 항암 효과를 향상시키기 위해 다른 암 치료제와 함께 투여될 수 있다. 이 목적을 위해 사용되는 다른 항암제는 항체-약물 접합체와 공동으로, 별도로 또는 순차적으로 개체에게 투여될 수 있거나, 다양한 간격으로 투여될 수 있다. 예시적 다른 암 치료제는 예를 들어 파클리탁셀, 시스플라틴, 빈블라스틴 등일 수 있지만 이에 제한되지는 않으며, 항종양 활성을 갖는 한 그러하다.
- [0186] 본 개시내용과 관련하여, 활성제 또는 이를 포함하는 제약 조성물은 임의의 적합한 투여 경로를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 활성제는 비경구, 비강, 경구, 폐, 국소, 질, 또는 직장 투여를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 투여 경로에 대한 하기 논의는 다양한 실시양태를 예시하기 위해 제공된 것일 뿐이며 어떤 식으로든 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체-약물 접합체는 대상체에게 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 지칭한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 고양이, 개, 돼지, 원숭이, 침팬지, 고릴라 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0188] 사용 방법
- [0189] 본 개시내용은 신생물성 질환의 진단, 예방 및 치료를 위한 치료제의 제조에서의, 항체-약물 접합체, 상기 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 조성물, 또는 본원에 제공된 키트의 용도를 제공한다.
- [0190] 신생물성 질환은 양성 종양 및 악성 종양 (예를 들어, 암)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양성 종양 및 악성 종양은 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 발현한다.
- [0191] 항체-약물 접합체가 적용되는 신생물성 질환의 유형은 항체-약물 접합체 내의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 인식가능한 단백질을 발현하는 암 세포인 한, 상기 언급된 암 세포에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 신생물성 질환은 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 발현하는 고형 종양이다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 신생물성 질환은 흑색종, 인두암, 삼중-음성 유방암, 식도 선암종, 식도 편평 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 요로상피암, 방광 신경내분비 종양, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 피부 편평 세포 암종, 담관암종, 전이성 체장 암종, 폐 편평 세포 암종, 두경부 편평 세포 암종 및/또는 식도 편평 세포 암종을 포함한다.
- [0193] 본 개시내용은 MUC18 및/또는 CD44v7/8을 표적화하는 치료제의 제조에서의, 항체-약물 접합체, 상기 방법에 의해 제조된 항체-약물 접합체, 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 조성물 또는 키트의 용도를 제공한다.
- [0194] 본 개시내용은 치료 유효량의 상기 기재된 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 신생물성 질환을

진단, 예방 및 치료하는 방법을 제공한다.

- [0195] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료 유효량"은 본원에서 정의된 바와 같은 질환 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 의도된 효과를 유도하기에 충분한 활성 성분, 즉 본원에 기재된 ADC의 양을 지칭한다. 항체-약물 접합체의 치료 용량은 치료되는 특정 병태, 병태의 중증도, 개별 환자의 파라미터 (연령, 신체 상태, 체격, 성별 및 체중 포함), 치료 지속시간, 수반 요법의 성질 (있는 경우), 특정 투여 경로 및 의료진의 지식에 따라 달라진다. 일부 실시양태에서, 상기 언급된 항체-약물 접합체의 투여량은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 투여를 제공받은 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 허용가능한 치료 용량은 0.1~30 mg/kg, 0.5~30 mg/kg, 1~30 mg/kg, 1~25 mg/kg, 0.1~25 mg/kg, 0.1~20 mg/kg, 1~20 mg/kg, 또는 0.5~20 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 투약 빈도는 12시간마다 1회, 매일 1회, 매주 1회, 2주마다 1회, 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 7주마다 1회, 8주마다 1회, 9주마다 1회 또는 10주마다 1회이거나; 또는 매달 1회, 2개월마다 1회 또는 3개월마다 1회 또는 그 초과이다. 치료 용량 및 투여 빈도는 치료 요법에 따라 달라질 수 있다.
- [0196] 본 개시내용의 다양한 실시양태 및 선호도는 서로 본질적으로 불일치하지 않는 한 서로 조합될 수 있으며, 조합에 의해 형성된 다양한 실시양태는 본 출원의 개시내용의 일부로 간주된다.
- [0197] 본 개시내용의 기술적 솔루션은 예시를 통해 실시예를 참조하여 아래에서 보다 명확하고 구체적으로 설명될 것이다. 이러한 실시양태는 단지 예시적 목적을 위한 것이며 본 개시내용의 보호 범주를 제한하려는 의도가 전혀 없다는 것을 이해해야 한다. 본 개시내용의 보호 범주는 청구범위에 의해서만 제한된다.
- [0198] 실시예
- [0199] 본 개시내용은 하기 실시예에 의해 구체적으로 설명되지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 이러한 실시예는 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 또한, 본 명세서에서, 구체적으로 기재되지 않은 시약, 용매 및 출발 물질은 상업적으로 이용가능한 공급원으로부터 쉽게 획득될 수 있다.

[0200] 실시예 1: 화합물 LP-1의 제조



[0201]

[0202]

단계 1: 중간체 11-1의 합성

[0203]

DCM (디클로로메탄): MeOH (메탄올) (v:v=2:1, 90 mL) 및 EEDQ (2-에톡시-1-에톡스카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린) (1.86 g, 7.55 mmol)를 실온에서 화합물 11-1A (Mc-Val-Ala-OH, 메드캠익스프레스 상하이(MedChemExpress Shanghai)로부터 구입, 2.4 g, 6.29 mmol) 및 화합물 11-1B (3.18 g, 6.29 mmol)의 혼합된 용액에 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하고, 그 안의 용매를 진공에서 제거하였다. 그 후, 조질 잔류물을 플래시 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하여 화합물 11-1 (3.9g, 71%)을 수득하였다. LC-MS (ESI, m/z): 868.49 (M+H).

[0204]

단계 2: 중간체 11-2의 합성

[0205]

화합물 11-1 (2 g, 2.3 mmol)을 무수 THF (테트라히드로푸란) (50 mL)에 용해시키고, 0℃에서 아르곤 분위기 하에 플루오린화 수소-피리딘 (4.6 g, 46 mmol)을 여기에 첨가하였다. 그 후, 반응 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 퀸칭시켰다. 생성된 혼합물을 DCM으로 추출하고, 그 안의 유기상을 건조하고 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 11-2 (1.1g, 76%)를 수득하였다. LC-MS (ESI, m/z): 630.31 (M+H).

[0206]

단계 3: 중간체 11-3의 합성

[0207]

화합물 11-2 (700 mg, 1.11 mmol)를 무수 DMF (N,N-디메틸포름아미드) (4 mL)에 용해시키고, DIPEA (N,N-디이소프로필에틸아민) (0.39 ml, 2.23 mmol) 및 4,4'-디니트로디페닐 카르보네이트 (406 mg, 1.33 mmol)를 아르곤 분위기 하에 실온에서 여기에 첨가하였다. 그 후, 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물 중 용매를 농축에 의해 제거하고, 이렇게 수득된 생성물을 MTBE (tert-부틸 에테르)를 사용하여 침전시켰다. 노란색 고체를 여과에 의해 수집하고, 디에틸 에테르로 세척하고 건조하여 화합물 11-3을 수득하였다. LC-MS (ESI,

m/z): 795.41 (M+H).

[0208] 단계 4: 중간체 11-4의 합성

[0209] 화합물 11-3 (300 mg, 0.44 mmol)을 무수 DMF (4 mL)에 용해시키고, 건조된 피리딘 (1 mL)을 여기에 첨가한 후, 엑사테칸 메실레이트 (메드캄익스프레스 상하이로부터 구입, 234 mg, 0.44 mmol) 및 HOBt (1-히드록시벤조트리아졸) (60 mg, 0.44 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 아르곤 하에 밤새 교반하였다. 이렇게 수득된 생성물을 pre-HPLC에 의해 정제하여 중간체 11-4 (230 mg, 48%)를 수득하였다. LC-MS (ESI, m/z): 1091.53 (M+H).

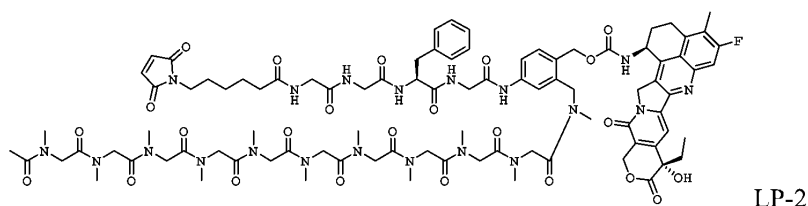
[0210] 단계 5: 중간체 11-5의 합성

[0211] 화합물 11-4 (200 mg, 0.183 mmol)를 1 mL 무수 DCM에 용해시키고, 300 μ L TFA (트리플루오로아세트산)를 0°C에서 여기에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하고, 그 안의 용매를 농축에 의해 제거하여 중간체 11-5의 TFA 염을 수득하였으며, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용할 수 있다. LC-MS (ESI, m/z): 991.47 (M+H).

[0212] 단계 6: 화합물 LP-1의 합성

[0213] 화합물 11-5 (120 mg, 0.109 mmol)를 1 mL 무수 DMF에 용해시키고, Ac-Sar10-COOH (N-아세틸 데카사르코신, 84 mg, 0.109 mmol)를 여기에 첨가한 후, HATU (2-(7-아자벤조트리아졸)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, 50 mg, 0.130 mmol) 및 DIPEA (38 μ L, 0.22 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 그 안의 용매를 농축에 의해 제거하였다. 조질 생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피 (pre-HPLC)에 의해 정제하여 화합물 LP-1 (74 mg, 38%)을 수득하였다. LC-MS (ESI, m/z): 1743.85 (M+H).

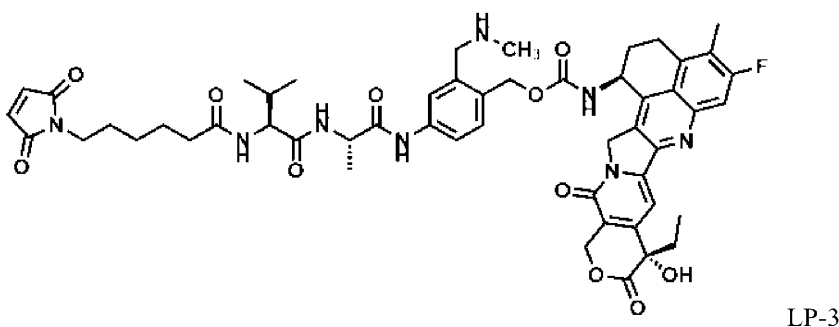
[0214] 실시예 2: 화합물 LP-2의 제조



[0215]

[0216] 화합물 LP-2의 합성은 화합물 LP-1의 합성 단계에 따라 수행하였다. 출발 물질 11-1A를 Mc-GGFG-OH (메드캄익스프레스 상하이로부터 구입, 여기서 GGFG는 펩티드 결합에 의해 연결된 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신으로 구성된 아미노산 서열을 나타냄)에 의해 대체하여 베이지색 무정형 고체인 화합물 LP-2를 수득하였다. LC-MS (ESI, m/z): 1891.90 (M+H).

[0217] 실시예 3: 화합물 LP-3의 제조



[0218]

[0219] 화합물 LP-3은 LP-1의 중간체였다. 단계 6을 제거하면, 중간체 11-5는 LP-3이 된다.

[0220] 실시예 4: 항체-약물 접합체의 검출 방법

[0221] 하기 방법에 따라, 항체-약물 접합체를 농축, 배지-교환 및 정제하고, 항체의 농도를 측정하고, 각 항체가 운반하는 약물 분자의 평균 수를 계산하여 항체-약물 접합체를 식별하였다.

[0222] 작업 A: 항체 또는 항체-약물 접합체의 농축

- [0223] 한외여과 튜브 (아미콘 울트라(Amicon Ultra), 50000 MWC0, 밀리포어 코포레이션(Millipore Corporation))를 꺼내고, 농축할 항체 또는 항체-약물 접합체 용액을 여기에 첨가하였다. 그 안의 항체 또는 항체-약물 접합체 용액이 필요한 부피에 도달할 때까지 한외여과 튜브를 원심분리한 후 꺼냈다.
- [0224] 작업 B: 항체 농도의 측정
- [0225] 제조업체에 의해 정의된 방법에 따라 마이크로플레이트 판독기 (멀티스캔(Multiskan) GO, 써모피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 항체의 흡광도를 측정하였다. 항체의 농도는 검출 파장에서 항체의 흡수 계수에 대한 흡수 값의 비율이다.
- [0226] 작업 C: 항체의 배지 교환
- [0227] 제조업체 (써모피셔 사이언티픽)에 의해 제공된 지침서에 따라, Zeba 스핀 탈염 컬럼 (5 mL, 40K MWC0)을 염화 나트륨 (50 mM) 및 EDTA (2 mM)를 함유하는 포스페이트 완충된 식염수 ("PBS7.0/EDTA"로 지칭됨, 50 mM, pH 7.0)로 이전에 평형화하였다. 2 mL의 샘플을 각 Zeba 스핀 탈염 컬럼에 로딩하고 원심분리하였다 (1000g, 4 min). 그 후, 플로우-쓰루 분획을 수집하고, 작업 A에 의해 농축하고, 항체 농도를 작업 B에 의해 결정하고, 항체 농도를 PBS7.0/EDTA로 조정하였다.
- [0228] 작업 D: 항체-약물 접합체의 정제
- [0229] 제조업체 (써모피셔 사이언티픽)에 의해 제공된 지침서에 따라, Zeba 스핀 탈염 컬럼 (5 mL, 40K MWC0)을 저장 버퍼로 이전에 평형화하였다. 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘-아세트이트 버퍼 (20 mM 히스티딘, pH 5.5) 또는 50 mM NaCl을 함유하는 포스페이트 버퍼 (50 mM, pH 7.0)를 저장 버퍼로서 사용하였다. 항체-약물 접합체를 함유하는 반응 용액 (대략, 2 mL)을 Zeba 스핀 탈염 컬럼에 적용하고 원심분리하였다 (1000g, 4 min). 그 후, 플로우-쓰루 분획 (대략, 2 mL)을 수집하고, 용출 프로세스를 2회 반복하여 비결합된 링커-페이로드 및 환원제를 포함하는 저분자량 화합물을 제거하였다.
- [0230] 작업 E: 항체-약물 접합체 내 항체의 농도 측정 및 각 항체에 연결된 약물 분자의 평균 수 (DAR 값) - (1)
- [0231] 항체-약물 접합체에 접합된 약물의 농도는 항체-약물 접합체 수용액의 UV 흡수 값을 280 nm 및 370 nm에서 측정하고 하기 공식에 의해 계산함으로써 취득될 수 있다.
- [0232] 임의의 주어진 파장에서, 시스템의 총 흡광도는 시스템에 존재하는 모든 광-흡수 화학물질의 흡광도의 합과 같다 (흡광도의 가산성). 따라서, 항체 및 약물의 몰 흡수 계수가 항체 및 약물의 접합 전 및 후에 변하지 않는다고 가정할 때, 항체-약물 접합체에서 항체의 농도 및 약물의 농도는 하기 공식으로 표현될 수 있다.
- [0233] $A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A$ 방정식 (1)
- [0234] $A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A$ 방정식 (2)
- [0235] A_{280} 은 280 nm에서 항체-약물 접합체 수용액의 총 흡수 값을 나타내고, A_{370} 은 370 nm에서 항체-약물 접합체 수용액의 총 흡수 값을 나타낸다. $A_{A,280}$ 은 280 nm에서 항체의 흡수 값을 나타내고, $A_{A,370}$ 은 370 nm에서 항체의 흡수 값을 나타내고, $A_{D,280}$ 은 280 nm에서 접합체 전구체 (약물)의 흡수 값을 나타내고, $A_{D,370}$ 은 370 nm에서 접합체 전구체의 흡수 값을 나타내고, $\epsilon_{A,280}$ 은 280 nm에서 항체의 몰 소광 계수를 나타내고, $\epsilon_{A,370}$ 은 370 nm에서 항체의 몰 소광 계수를 나타내고, $\epsilon_{D,280}$ 은 280 nm에서 접합체 전구체의 몰 소광 계수를 나타내고, $\epsilon_{D,370}$ 은 370 nm에서 접합체 전구체의 몰 소광 계수를 나타내고, C_A 는 항체-약물 접합체 내 항체의 농도를 나타내고, C_D 는 항체-약물 접합체 내 약물 분자의 농도를 나타낸다.
- [0236] 이 경우에, $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$ 및 $\epsilon_{D,370}$ 은 모두 공지된 값 (항체의 서열로부터 계산되거나 화합물의 UV 흡수에 의해 측정됨)이다. 예를 들어, $\epsilon_{A,280}$ 은 공지된 방법 (Protein Science, 1995, Vol. 4, pp. 2411-2423)을 사용하여 항체의 아미노산 서열로부터 계산될 수 있다. 항체는 일반적으로 370 nm에서 흡광도를 갖지 않으므로, $\epsilon_{A,370}$ 은 일반적으로 0이다. $\epsilon_{D,280}$ 및 $\epsilon_{D,370}$ 의 값은 각각 280 nm 및 370 nm에서 농도에 따른 접합체 전구체의 흡광도 변화를 측정하고 람베르트-비어 법칙 (흡광도 = 몰 농도 $\times$ 몰 소광 계수 $\times$ 광학 경로)을 사용하여 계산될 수 있다. C_A 및 C_D 는 항체-약물 접합체의 흡광도 값 A_{280} 및 A_{370} 을 280 nm 및 370 nm에서 측정한 후, 동시 (1) 및 (2)를 풀어 취득될 수 있다. 또한, 각 항체에 연결된 약물 분자의 평균 수 (DAR 값)는 C_D 를

C_A로 나누어 수득될 수 있다.

- [0237] 작업 F: 각 항체에 연결된 약물 분자의 평균 수 (DAR 값) - (2)
- [0238] 항체-약물 접합체에서 각 항체 분자에 접합된 약물 분자의 평균 수는 앞서 언급된 "작업 E" 외에도 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 분석 방법에 의해 결정될 수 있으며, 이는 하기와 같이 설명된다.
- [0239] 고성능 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 분석을 위한 샘플의 준비 (항체-약물 접합체의 환원)
- [0240] 3 μ L 100 mM의 환원제, 디티오프레이톨 (DTT) 및 21 μ L의 탈이온수를 항체-약물 접합체 (약 5 mg/mL, 6 μ L)에 첨가하였다. 반응 용액을 37°C의 수조에서 30분 동안 인큐베이션하고, 항체-약물 접합체에서 경쇄와 중쇄 사이 및 중쇄 사이의 디설피드 결합이 완전히 절단되었고, 생성된 샘플은 LC-MS 검출 및 분석을 위해 사용될 수 있었다.
- [0241] 고성능 액체 크로마토그래피 파라미터
- [0242] 컬럼 유형: 애질런트(Agilent) PLRP-S, 1000 Å, 50 $\times$ 2.1 mm, 8 μ m.
- [0243] 검출 파장: 280 nm
- [0244] 밴드 폭: 4 nm
- [0245] 컬럼 온도: 80°C
- [0246] 오토샘플러 항온기: 5°C
- [0247] 유속: 0.5 mL/min
- [0248] 주사 부피: 5 μ L
- [0249] 이동상 A: 0.05% TFA, H₂O
- [0250] 이동상 B: 0.05% TFA, ACN
- [0251] 용출 프로그램: (B %: 25%-34% (0 -0.7분), 34%-45% (0.7 -5분), 45%-90% (5 -6분), 90% (6 -7분), 90%-25% (7 -7.10분), 25% (7.10 -10분))
- [0252] MS 파라미터
- [0253] 원자화 가스 온도: 350°C
- [0254] 원자화 가스 유속: 13L/min
- [0255] 원자화기: 45 psig
- [0256] 모세관 전압: 5000 V
- [0257] 단편화 전압: 350 V
- [0258] 질량-대-전하 비율 범위: 500-8000 m/z
- [0259] 획득 속도: 1 spectra/s
- [0260] 데이터 분석
- [0261] i개의 약물 분자에 접합된 경쇄는 Li로서 나타내어지고, i개의 소분자에 접합된 중쇄는 Hi로서 나타내어지고, 이는 질량 분광계의 ESI 스캔에 따라 결정될 수 있다.
- [0262] 보정된 피크 면적 비율은 각 쇄의 피크 면적 백분율 (%)을 하기 공식에 대입함으로써 수득될 수 있다.
- [0263] i개의 약물 분자에 접합된 경쇄의 피크 면적 비율 = $100\% \times A_{Li} / (A_{L0} + A_{L1})$
- [0264] i개의 약물 분자에 접합된 중쇄의 피크 면적 비율 = $100\% \times A_{Hi} / (A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3})$
- [0265] 각 항체에 접합된 약물 분자의 평균 수는 하기 공식에 의해 계산될 수 있다.
- [0266] 접합된 약물 분자의 평균 수 = (L0 피크 면적 비율 $\times$ 0 + L1 피크 면적 비율 $\times$ 1 + H0 피크 면적 비율 $\times$ 0 +

H1 피크 면적 비율 $\times 1 + \text{H2 피크 면적 비율} \times 2 + \text{H3 피크 면적 비율} \times 3) \times 2$

- [0267] 작업 G: 각 항체에 연결된 약물 분자의 평균 수 (DAR 값) - (3)
- [0268] 앞서 언급된 "작업 E" 및 "작업 F" 외에도, 항체-약물 접합체에서 각 항체 분자에 접합된 약물 분자의 평균 수는 또한 하기 기재된 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 분석 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0269] 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼에서 항체-약물 접합체의 용출은 용출액 중 염 이온의 농도의 차이에 기초하였다 (염 이온의 농도가 감소함에 따라, 용출된 항체-약물 접합체 중 소분자 약물의 수가 증가하며, 즉 낮은 DAR 값을 갖는 항체-약물 접합체가 우선적으로 용출되었다). 각 구성성분의 피크 시퀀스는 D0 (임의의 링커-페이로드에 비접합된 항체), D2 (2개의 링커-페이로드에 접합된 항체), D4 (4개의 링커-페이로드에 접합된 항체), D6 (6개의 링커-페이로드에 접합된 항체), D8 (8개의 링커-페이로드에 접합된 항체)이었다. 각 구성성분의 백분율 함량은 각 피크의 피크 면적 비율을 측정함으로써 수득될 수 있다. 그 후, 상응하는 샘플의 HIC-DAR은 하기와 같이 계산한다:
- [0270] 접합된 약물 분자의 평균 수 = $D0 \text{ 피크 면적 비율} \times 0 + D2 \text{ 피크 면적 비율} \times 2 + D4 \text{ 피크 면적 비율} \times 4 + D6 \text{ 피크 면적 비율} \times 6 + D8 \text{ 피크 면적 비율} \times 8$
- [0271] 작업 H: 항체-약물 접합체 내의 응집체의 측정
- [0272] 항체-약물 접합체 내의 응집체는 고성능 액체 크로마토그래피에서 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 검출하였다. 방법은 하기와 같다.
- [0273] 고성능 액체 크로마토그래피 시스템: 애질런트 1260 인피니티 II HPLC 시스템
- [0274] 검출기: 자외선 흡수 분광계 (검출 파장: 280 nm)
- [0275] 컬럼 유형: TOSOH TSKgel G3000SWXL (7.8 $\times$ 300 mm, 5 μ m)
- [0276] 이동상: 200 mmol/L KHPO_4 , 150 mmol/L NaCl, 15% (v/v) 이소프로필 알콜, pH7.0
- [0277] 유속: 0.75 mL/min
- [0278] 분석 시간: 18 min
- [0279] 컬럼 온도: 실온
- [0280] 주사 부피: 50 μ g
- [0281] 데이터 분석:
- [0282] 품질 제어 물질 (QC, 02-1 네이키드 항체, 즉 링커-페이로드에 접합되지 않은 02-1로 넘버링된 항체)의 크기 배제 크로마토그램은 도 1a에 제시되었고; 품질 제어 물질 (QC, Hu1H2-2 네이키드 항체, 즉 링커-페이로드에 접합되지 않은 hu1H2-2로 넘버링된 항체)의 크기 배제 크로마토그램은 도 1b에 제시되었고, Hu1H2-2 네이키드 항체의 응집체 함량은 1.17%였다. 150 kDa의 품질 제어 물질의 주요 피크 (단일 피크)의 체류 시간은 9.5 내지 10.5분이었다. 응집체의 체류 시간은 상기 언급된 단량체의 체류 시간보다 빨라야 한다.
- [0283] 작업 I: 항체-약물 접합체의 소수성의 비교
- [0284] 항체-약물 접합체의 소수성은 고성능 액체 크로마토그래피 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)를 사용하여 분석하였다. 방법은 하기와 같다.
- [0285] 고성능 액체 크로마토그래피 시스템: 애질런트 1260 인피니티 II HPLC 시스템
- [0286] 검출기: 자외선 흡수 분광계 (검출 파장: 280 nm)
- [0287] 컬럼 유형: TOSOH TSKgel 부틸-NPR (4.6 mm I.D. $\times$ 3.5 cm, 2.5 μ m)
- [0288] 이동상 A: mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mmol/L KHPO_4 , pH7.0
- [0289] 이동상 B: 50 mmol/L KHPO_4 , 25% (v/v) 이소프로판올, pH7.0
- [0290] 분석 시간: 25 min

- [0291] 컬럼 온도: 실온
- [0292] 용출 절차 (B %): 0%-25% (0 -1분), 25% (1 -3분), 25%-80% (3 -13분), 80% (13 -17분), 80%-0% (17 -17.10분), 0% (17.10 -25분)
- [0293] 주사 부피: 10 μ L
- [0294] 데이터 분석: 품질 제어 물질 (QC, 02-1 네이키드 항체)의 소수성 상호작용 크로마토그래피 크로마토그램은 도 2a에 제시되었다. 품질 제어 물질 (QC, Hu1H2-2 네이키드 항체)의 소수성 크로마토그램은 도 2b에 제시되었고, 이의 체류 시간은 3.387분이었다. 더 짧은 체류 시간을 갖는 샘플은 더 적은 소수성이었다. 항체-약물 접합체는 접합되지 않은 네이키드 항체보다 더 큰 소수성이며, 그러므로 이의 체류 시간이 더 길었다.
- [0295] 실시예 5: 항체-약물 접합체 02-1-LP1 (DAR 8)의 제조
- [0296] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.523 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 23.2 mg/mL였다. 0.482 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 7배 당량에 상응함)을 2.155 mL의 02-1 항체 수용액에 첨가하고, 4.31 mL의 50 mM 포스페이트 버퍼 (pH7.0, PBS7. 0) 및 69.47 μ L의 200 mM EDTA 용액을 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합된 용액을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0297] 02-1 항체의 VH 서열은 서열식별번호: 84에 제시된 아미노산 서열이고, 이의 VL 서열은 서열식별번호: 85에 제시된 아미노산 서열이었다. 실시예에서 제조 및/또는 검출을 위해, 인간 IgG1의 불변 영역 서열을 02-1 항체의 불변 영역으로서 사용하였고, 서열식별번호: 102에 제시된 아미노산 서열을 02-1 항체의 중쇄 불변 영역 서열로서 선택하였고; 서열식별번호: 103에 제시된 아미노산 서열을 02-1 항체의 경쇄 불변 영역 서열로서 선택하였다.
- [0298] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 1에서 제조된 링커-페이로드 LP-1을 N,N-디메틸아세트아미드 (DMA)에 용해시키고, 0.489 mL (항체 함량의 14.2배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C에서 30분 동안 계속하였다.
- [0299] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 02-1-LP1을 수득하였다.
- [0300] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$), 작업 F, 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0301] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 12.13 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 7.78이었다. 작업 F에 의해 측정된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 7.80이었다. 도 3a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 02-1-LP1의 응집체의 함량은 1.18%였다. 도 3b는 항체-약물 접합체 02-1-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 02-1-LP1의 체류 시간은 6.499분이었다.
- [0302] 실시예 6: 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1 (DAR 8)의 제조
- [0303] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.54 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 9.37 mg/mL였다. 80 μ L의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 10배 당량에 상응함)을 640.34 μ L의 Hu1H2-2 (HIS1H2-2) 항체 수용액에 첨가하고, 0.2 mL의 50 mM PBS7.0 및 79.66 μ L의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0304] Hu1H2-2 항체의 VH 서열은 서열식별번호: 100에 제시된 아미노산 서열이고, 이의 VL 서열은 서열식별번호: 104에 제시된 아미노산 서열이었다. 실시예에서 제조 및/또는 검출을 위해, 서열식별번호: 102에 제시된 아미노산 서열을 Hu1H2-2 항체의 중쇄 불변 영역으로서 선택하였고; 서열식별번호: 103에 제시된 아미노산 서열을 Hu1H2-2 항체의 경쇄 불변 영역으로서 선택하였다.
- [0305] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 1에서 제조된 링커-페이로드 LP-1을 DMA에 용해시킨 후, 72 μ L (항체 함량의 18배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액

에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.

- [0306] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1을 수득하였다.
- [0307] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0308] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 6.74 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 9.20이었다. 도 4a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 응집체의 함량은 1.24%였다. 도 4b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 체류 시간은 6.239분이었다.
- [0309] 실시예 7: 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1 (DAR 4)의 제조
- [0310] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.54 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 23 mg/mL였다. 23.52 μL 의 5 mM TCEP 용액을 456.52 μL 의 Hu1H2-2 항체 수용액에 첨가하고, 0.28 mL의 50 mM PBS7.0 및 639.96 μL 의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37℃의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0311] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 1에서 제조된 링커-페이로드 LP-1을 DMA에 용해시킨 후, 112 μL (항체 함량의 8배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.
- [0312] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$) 및 작업 H를 사용하여 특징화하였다.
- [0313] 제조된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1 (DAR4)의 경우, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 6.14 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 3.59였다. 도 5a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1 (DAR4)의 응집체의 함량은 0.44%였다. 도 5b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었다.
- [0314] 실시예 8: 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2 (DAR 8)의 제조
- [0315] 항체의 환원: 실시예 8의 환원 방법은 실시예 6의 항체와 동일하다. 실시예 8의 Hu1H2-2 항체의 아미노산 서열은 실시예 6의 Hu1H2-2 항체와 동일하다.
- [0316] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 항체의 환원 단계에서 혼합된 용액을 4℃의 환경에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 2에서 제조된 링커-페이로드 LP-2를 DMA에 용해시킨 후, 72 μL (항체 함량의 18배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.
- [0317] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2를 수득하였다.
- [0318] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 상기 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5814$ 및 $\epsilon_{D,370}=14742$), 작업 F, 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0319] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 6.64 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 9.92였다. 도 6a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2의 응집체의 함량은 1.37%였다. 도 6b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP2의 체류 시간은 6.561분이었다.
- [0320] 실시예 9: 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3 (DAR 8)의 제조
- [0321] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.54 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및

작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 23.07 mg/mL였다. 70 μ L의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 7배 당량에 상응함)을 325.10 μ L의 Hu1H2-2 항체 수용액에 첨가하고, 0.3 mL의 50 mM PBS7.0 및 804.90 μ L의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.

[0322] Hu1H2-2 항체의 아미노산 서열은 실시예 6의 Hu1H2-2 항체와 동일하다.

[0323] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 3에서 제조된 링커-페이로드 LP-3을 DMA에 용해시킨 후, 90 μ L (항체 함량의 18배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C에서 30분 동안 계속하였다.

[0324] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 작업 D의 방법에 의해 정제하여 최종적으로 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3을 수득하였다.

[0325] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 상기 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5186$ 및 $\epsilon_{D,370}=13688$), 작업 F, 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.

[0326] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 4.10 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 8.50이었다. 도 7a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3의 응집체의 함량은 3.37%였다. 도 7b는 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-LP3의 체류 시간은 5.878분이었다.

[0327] 비교예 1: 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE (DAR 4)의 제조

[0328] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.523 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 31.6 mg/mL였다. 0.076 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 2.3배 당량에 상응함)을 0.759 mL의 02-1 항체 수용액에 첨가하고, 0.48 mL의 50 mM PBS7.0 및 1.084 mL의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다. 02-1 항체의 서열은 실시예 5의 02-1 항체의 서열과 동일하였다.

[0329] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 vc-MMAE (DC 케미칼즈(DC Chemicals), DC7556)를 DMA에 용해시킨 후, 0.322 mL (항체 함량의 7배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C에서 30분 동안 계속하였다.

[0330] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE를 수득하였다.

[0331] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 B, 작업 G, 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.

[0332] 작업 B 측정에 의해 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 9.71 mg/mL였다. 도 8a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE의 응집체의 함량은 2.74%였다. 도 8b는 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었다. 작업 G 및 작업 I에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체 02-1-vc-MMAE의 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 3.99 (HIC-DAR)였다.

[0333] 비교예 2: 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE (DAR 4)의 제조

[0334] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.5 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 12 mg/mL였다. 0.015 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 2.2배 당량에 상응함)을 0.438 mL 리톡시맵 항체 수용액 (상하이 민바이오텍 유한회사 (Shanghai Minbiotech Co., Ltd.)로부터 구입)에 첨가하고, 0.14 mL의 50 mM PBS7.0 및 0.107 mL의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.

[0335] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 vc-

MMAE를 DMA에 용해시킨 후, 0.049 mL (항체 함량의 7배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.

- [0336] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE를 수득하였다.
- [0337] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 B, 작업 G, 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0338] 작업 B에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 3.78 mg/mL였다. 도 9a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE의 응집체의 함량은 3.78%였다. 도 9b는 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 G 및 작업 I에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체 리톡시맵-vc-MMAE의 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 4.39 (HIC-DAR)였다.
- [0339] 비교예 3: 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1 (DAR 8)의 제조
- [0340] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.5 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 11.8 mg/mL였다. 0.667 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 7배 당량에 상응함)을 6.05 mL의 리톡시맵 항체 수용액에 첨가하고, 1.02 mL의 100 mM PBS7.0 및 2.46 mL의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37℃의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0341] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 LP-1을 DMA에 용해시킨 후, 0.667 mL (항체 함량의 14배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.
- [0342] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1을 수득하였다.
- [0343] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0344] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 6.23 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 7.30이었다. 도 10a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1의 응집체의 함량은 4.70%였다. 도 10b는 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 리톡시맵-LP1의 체류 시간은 7.094분이었다.
- [0345] 비교예 4: 항체-약물 접합체 인간 IgG-GGFG-DXd (DAR 8)의 제조
- [0346] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.35 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 10 mg/mL였다. 0.327 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 10배 당량에 상응함)을 2.45 mL의 인간 IgG 단백질 수용액 (베이징 솔라바이오 사이언스 & 테크놀로지 유한회사(베이징 Solarbio Science & Technology Co., Ltd.)로부터 구입, 제품 번호 SP001)에 첨가하고, 0.7 mL의 50 mM PBS7.0 및 23 μL 의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37℃의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0347] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 GGFG-DXd (DC 케미칼즈로부터 구입, DC50025)를 DMA에 용해시킨 후, 0.294 mL (항체 함량의 18배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22℃에서 30분 동안 계속하였다.
- [0348] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 인간 IgG-GGFG-DXd ("인간 IgG-DXd"로 지칭됨)를 수득하였다. 인간 IgG 및 HuIgG는 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0349] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5178$ 및 $\epsilon_{D,370}=20217$), 작

업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.

- [0350] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 8.20 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 7.08이었다. 도 11a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-DXD의 응집체의 함량은 4.25%였다. 도 11b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-DXD의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-DXD의 체류 시간은 8.222분이었다.
- [0351] 비교예 5: 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 (DAR 8)의 제조
- [0352] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.35 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 10 mg/mL였다. 0.267 mL의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 10배 당량에 상응함)을 1.33 mL의 인간 IgG 단백질 수용액 (베이징 솔라바이오 사이언스 & 테크놀로지 유한회사로부터 구입, 제품 번호 SP001)에 첨가하고, 0.4 mL의 50 mM PBS7.0을 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0353] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 LP-1을 DMA에 용해시킨 후, 0.2 mL (항체 함량의 15배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C에서 30분 동안 계속하였다.
- [0354] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1을 수득하였다.
- [0355] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0356] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 11.08 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 9.15였다. 도 12a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 응집체의 함량은 4.38%였다. 도 12b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 체류 시간은 6.213분이었다.
- [0357] 비교예 6: 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 (DAR 4)의 제조
- [0358] 항체의 환원: 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.35 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 15 mg/mL였다. 34.02 μL 의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 2.43배 당량에 상응함)을 0.7 mL의 인간 IgG 단백질 수용액 (베이징 솔라바이오 사이언스 & 테크놀로지 유한회사로부터 구입, 제품 번호 SP001)에 첨가하고, 0.28 mL의 50 mM PBS7.0을 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C의 환경에서 배치하여 2시간 동안 반응시켰다.
- [0359] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 LP-1을 DMA에 용해시킨 후, 0.112 mL (항체 함량의 8배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C에서 30분 동안 계속하였다.
- [0360] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1(DAR4)을 수득하였다.
- [0361] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 및 $\epsilon_{D,370}=16180$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0362] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 5.75 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 3.53이었다. 도 13a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1 (DAR4)의 응집체의 함량은 1.90%였다. 도 13b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP1의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었다.
- [0363] 비교예 7: 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2 (DAR 8)의 제조

- [0364] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.35 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 10 mg/mL 였다. 0.093 mL 의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 10배 당량에 상응함)을 0.467 mL 의 인간 IgG 단백질 수용액 (베이징 솔라바이오 사이언스 & 테크놀로지 유한회사로부터 구입, 제품 번호 SP001)에 첨가하고, 0.2 mL 의 50 mM PBS7.0 및 0.24 mL 의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C 의 환경에서 배치하여 2 시간 동안 반응시켰다.
- [0365] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 LP-2를 DMA에 용해시킨 후, 0.07 mL (항체 함량의 15배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C 에서 30분 동안 계속하였다.
- [0366] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2를 수득하였다.
- [0367] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5814$ 및 $\epsilon_{D,370}=14742$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0368] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 4.68 mg/mL 였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 9.18이었다. 도 14a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2의 응집체의 함량은 2.92%였다. 도 14b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP2의 체류 시간은 6.506분이었다.
- [0369] 비교예 8: 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3 (DAR 8)의 제조
- [0370] 항체의 환원: 항체의 배지를 실시예 4의 작업 B (280 nm에서 항체의 소광 계수는 $1.35 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었음) 및 작업 C에 의해 PBS7.0/EDTA로 교환하였고, 배지 교환 후 항체의 농도는 18 mg/mL 였다. 0.672 mL 의 5 mM TCEP 용액 (항체 함량의 7배 당량에 상응함)을 4 mL 의 인간 IgG 단백질 수용액 (베이징 솔라바이오 사이언스 & 테크놀로지 유한회사로부터 구입, 제품 번호 SP001)에 첨가하고, 1.44 mL 의 50 mM PBS7.0 및 1.088 mL 의 탈이온수를 여기에 동시에 첨가하였다. 용액의 pH가 7.0 ± 0.1 인 것을 확인한 후, 혼합물을 37°C 의 환경에서 배치하여 2 시간 동안 반응시켰다. 인간 IgG 단백질의 자원은 비교예 4의 인간 IgG 단백질의 자원과 동일하였다.
- [0371] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 LP-3을 DMA에 용해시킨 후, 0.672 mL (항체 함량의 14배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C 에서 30분 동안 계속하였다.
- [0372] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 실시예 4의 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3을 수득하였다.
- [0373] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 실시예 4의 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5186$ 및 $\epsilon_{D,370}=13688$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0374] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 7.42 mg/mL 였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 7.28이었다. 도 15a는 응집체의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3의 응집체의 함량은 5.37%였다. 도 15b는 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3의 소수성 상호작용 크로마토그래피의 검출 그래프를 보여주었고, 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 인간 IgG-LP3의 체류 시간은 6.450분이었다.
- [0375] 비교예 9: 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-GGFG-DXD (DAR 8)의 제조
- [0376] 항체의 환원: 비교예 9의 환원은 실시예 6과 동일하였다. Hu1H2-2 항체의 서열은 실시예 6의 Hu1H2-2 항체와 동일하였다.
- [0377] 항체 및 링커-페이로드의 접합: 상기 혼합된 용액을 4°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 링커-페이로드 GGFG-DXD를 DMA에 용해시킨 후, 72 uL (항체 함량의 18배 당량에 상응함)의 용액을 혼합된 용액에 첨가하였다. 혼합된 용액의 반응은 22°C 에서 30분 동안 계속하였다.

- [0378] 항체-약물 접합체의 정제: 상기 반응 용액을 작업 D의 방법에 의해 정제하여 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-GGFG-DXd ("Hu1H2-2- DXD"로 지칭됨)를 수득하였다.
- [0379] 항체-약물 접합체의 특징화: 수득된 항체-약물 접합체는 상기 작업 E ($\epsilon_{D,280}=5178$ 및 $\epsilon_{D,370}=20217$), 작업 H 및 작업 I를 사용하여 특징화하였다.
- [0380] 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체-약물 접합체의 농도는 6.53 mg/mL였고, 작업 E에 의해 측정되고 계산된 항체당 접합된 페이로드의 평균 수는 6.75였다. 작업 H에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-DXD의 응집체의 함량은 도 16a에 제시된 바와 같이 1.70%였다. 작업 I에 의해 측정된 항체-약물 접합체 Hu1H2-2-DXD의 체류 시간은 도 16b에 제시된 바와 같이 7.764분이었다.
- [0381] 실험예 1: MUC18을 과발현하는 종양 세포에 의한 02-1-LP1의 세포내이입
- [0382] 50 μ g/mL 02-1-LP1을 A375 세포 (중국과학원의 상하이생명과학연구소(Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences)로부터 구입), HMVII 세포 (바이오펙터 NTCC의 유형배양보존센터 (Center for Type Culture Collection, Biovector NTCC)로부터 구입), SK-MEL-2 세포 (상하이 원칭 바이오테크놀로지 유한회사(Shanghai Xunqing Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구입) 및 GAK 세포 (바이오펙터 NTCC의 유형배양보존센터로부터 구입)와 각각 조합하였다. 과도한 ADC를 세척한 후, 세포를 37°C의 인큐베이터에서 배양하였다. 0, 0.5, 1, 2, 4 및 8시간에, 중간값 형광 강도 (MFI)를 유동 세포계측법에 의해 측정하였다. 도 17에 제시된 바와 같이, 02-1-LP1 항체는 A375 (A) 세포, HMVII (B) 세포, SK-MEL-2 (C) 세포 및 GAK (D) 세포에 의해 세포내이입될 수 있다.
- [0383] 실험예 2: A375 이종이식 종양의 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과
- [0384] 6주령 Balb/c 마우스를 장쑤 쥘파마텍 유한회사(Jiangsu GemPharmatech Co. Ltd.)로부터 구입하였고, 각 마우스에 400만개의 A375 세포를 피하로 접종하여 MUC18-양성 A375 흑색종 마우스 이종이식 모델을 구축하였다. 접종 후 24일차 (평균 종양 부피는 약 230 mm³임)에, 비교예 2에서 제조된 리톡시맵-vc-MMAE (6 mpk (mg/kg)), 비교예 1에서 제조된 02-1-vc-MMAE (1.5, 3, 6 mpk), 비교예 3에서 제조된 리톡시맵-LP1 (2.5, 5 mpk) 및 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1 (2.5, 5 mpk)을 각각 정맥내로 주사하였고; 비히클 그룹을 음성 대조군으로 설정하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: TV = (길이 × 폭)²/2. A375 세포는 CD20을 거의 발현하지 않기 때문에, 리톡시맵을 그 당시 02-1 항체에 대한 이소타입 대조군으로서 사용하였다.
- [0385] 도 18ai 및 도 18aii는 A375 이종이식에 대한 MUC18 표적화 항체-약물 접합체 02-1-LP1 및 02-1-vc-MMAE의 성장 억제 효과를 보여주었다. 도 18ai는 02-1-vc-MMAE가 종양 성장 속도를 감소시킨 반면, 02-1-LP1은 종양 부피의 유의한 제거를 유발하였음을 보여주었다. 도 18aii는 도 18ai의 부분도이며, 이는 활성 성분의 추세 그래프를 더 명확히 하기 위해 02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE 및 비히클 그룹의 곡선을 보여준다.
- [0386] 도 18bi 및 도 18bii는 MUC18 표적화 항체-약물 접합체 02-1-LP1 및 02-1-vc-MMAE가 마우스의 체중에 유의한 영향을 미치지 않았음을 보여주었다. 도 18bii는 18B1의 부분도이며, 이는 활성 성분의 추세 그래프를 더 명확히 하기 위해 02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE 및 비히클 그룹의 곡선을 보여준다.
- [0387] 실험예 3: 시노물구스 원숭이에 대한 02-1-LP1 및 02-1-vc-MMAE의 독성학적 실험
- [0388] 시노물구스 원숭이에게 02-1-LP1 (실시예 5에서 제조됨)의 반복된 투여의 실험: 6마리의 시노물구스 원숭이 (광시 프론티어 바이오테크놀로지 유한회사(Guangxi Frontier Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구입)를 무작위로 3개 그룹으로 나누었고, 각 그룹에 1마리의 수컷 및 1마리의 수컷이 있었다. 비히클, 10 mg/kg의 02-1-LP1 및 30 mg/kg의 02-1-LP1을 각각 1일차, 22일차 및 43일차에 정맥내로 주입하였다. 실험 동안, 동물을 임의의 이상에 대해 관찰하였고, 혈액학 및 혈액 생화학 지수 분석을 위해 이의 혈액 샘플을 수집하였다. 50일차에, 동물을 안락사시키고, 병리학적 분석을 위해 샘플링하였다. 표 6에 제시된 바와 같이, 본 실험에서, 테스트 물질의 모든 용량은 동물의 사망을 유발하지 않았다. 테스트 물질과 관련된 표적 장기는 망상적혈구, 소화관, 신장 및 비장이었다. HNSTD (중증 독성이 없는 최대 용량)는 30 mg/kg이었다.
- [0389] 시노물구스 원숭이에게 02-1-vc-MMAE (비교예 1에서 제조됨)의 반복된 투여의 실험: 6마리의 시노물구스 원숭이를 무작위로 3개 그룹으로 나누었고, 각 그룹에 1마리의 수컷 및 1마리의 수컷이 있었다. 3 mg/kg 02-1-vc-MMAE, 6mg/kg 02-1-vc-MMAE 및 10 mg/kg 02-1-vc-MMAE를 각각 1일차, 22일차에 정맥내로 주입하였다. 실험 동

안, 동물을 임의의 이상에 대해 관찰하였고, 혈액학 및 혈액 생화학 지수 분석을 위해 이의 혈액 샘플을 수집하였다. 43일차에, 동물을 안락사시키고, 병리학적 분석을 위해 샘플링하였다. 표 6에 제시된 바와 같이, 본 실험에서, 높은-용량 그룹 (10 mg/kg)의 2마리의 동물은 제1 용량 후 10일차에 사망하였고, 3 mg/kg 및 6 mg/kg 그룹에서는 사망이 발생하지 않았다. 테스트 물질과 관련된 표적 장기는 망상적혈구, 백혈구 및 피부였다. HNSTD (중증 독성이 없는 최대 용량)는 6 mg/kg이었다.

표 6. 시노물구스 원숭이에게 02-1-LP1 및 02-1-vc-MMAE의 반복된 투여의 독성학적 결과의 요약

실험 동물	시노물구스 원숭이	시노물구스 원숭이
테스트 물질	02-1-vc-MMAE	02-1-LP1
	3, 6 및 10mg/kg	0, 10 및 30mg/kg
	정맥내 주사	정맥내 주사
	1일차 및 22일차에 투약 (총 2회)	1일차, 22일차 및 43일차에 투약 (총 3회)
동물 수	각 그룹에 1마리의 수컷 및 1마리의 수컷	각 그룹에 1마리의 수컷 및 1마리의 수컷
치사 용량	10 mg/kg	> 30 mg/kg
체중 변화	ADC는 동물에서 체중 변화를 유발하지 않았음	ADC는 동물에서 체중 변화를 유발하지 않았음
혈액학 지수	3 mg/kg: 망상적혈구의 약간 증가	≥10 mg/kg: 망상적혈구 수의 변동 약간 감소; 망상적혈구 수의 변동
	6 mg/kg: 백혈구 및 헤모글로빈의 약간 감소; 망상적혈구 수의 변동	
혈액 생화학	≤6 mg/kg: 정상	≤30 mg/kg: 정상
HNSTD 용량에서 표적화된 독성 장기	6 mg/kg: 흉골 골수 10 mg/kg: 소화관, 서혜 림프절 및 피부	30 mg/kg: 소화관, 신장 및 비장
HNSTD*	6 mg/kg	30 mg/kg
HNSTD*: 중증 독성이 없는 최대 용량		

결과는 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1의 안전성이 비교예 1에서 제조된 02-1-vc-MMAE보다 유의하게 더 나았음을 보여주었다.

실험예 2와 함께, 02-1-LP1은 02-1-vc-MMAE보다 더 높은 관용가능한 용량 및 더 나은 안전성을 가졌고, 동시에 02-1-LP1의 더 낮은 용량이 더 나은 항종양 효과를 달성할 수 있다.

실험예 4: 디트로이트562 세포에 대한 ADC의 시험관내 사멸 검증

디트로이트 562 세포 (난징 코비오어 바이오사이언시스 유한회사(Nan Jing cobioer biosciences Co., Ltd.)로부터 구입)를 배양하여 세포 밀도가 80%에 도달하도록 하였다. 세포를 수집하고, 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 세포 밀도를 $2-5 \times 10^4$ /ml로 조정하였다. 각 웰을 100 μ L의 세포로 플레이팅하고, ADC 분자를 300 nM의 초기 농도로 3회 연속 희석하였다. 희석이 완료된 후, ADC 분자를 세포 배양 배지에 첨가하고, 5일 동안 배양하였으며, 그 동안 세포의 아포토시스를 정기적으로 관찰하였다. 5일 후, 15 μ L의 CCK-8 키트 스톱 용액을 96-웰 플레이트에 첨가하고, 37℃의 인큐베이터에서 0.5-2시간 동안 반응시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하고, OD (광학 밀도) 관독값 및 ADC 희석 구배에 기초하여 세포 생존 곡선을 그렸다.

비교예 4에서 제조된 인간 IgG-DXD, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1, 비교예 7에서 제조된 인간 IgG-LP2, 실시예 6에서 제조된 Hu1H2-2-LP1, 실시예 8에서 제조된 Hu1H2-2-LP2, 및 비교예 9에서 제조된 Hu1H2-2-DXD를

ADC 분자로서 선택하였다. 여기서 인간 IgG를 Hu1H2-2 항체의 이소타입 대조군으로서 사용하고, DXD를 양성 약물로서 사용하였다.

[0397] 도 19는 두경부 편평 세포 암종 세포주 디트로이트 562에 대한 상기 ADC 분자의 시험관내 사멸 효과를 보여주었고, 도 19ai 및 도 19aii는 도 19의 부분도였다. 도 19ai는 양성 대조군 Hu1H2-2-DXD와 비교하여, 본 개시내용의 Hu1H2-2-LP2 및 Hu1H2-2-LP1이 디트로이트 562에 대해 시험관내에서 더 우수한 사멸 효과를 가졌음을 보여주었다. 도 19aii는 인간 IgG-LP2 및 인간 IgG-LP1이 인간 IgG-DXD보다 시험관내에서 더 나은 사멸 효과를 가졌음을 보여주었으며, 이는 GGFG-DXd와 비교하여, 링커-페이로드 LP-1 및 링커-페이로드 LP-2가 디트로이트562에 대해 시험관내에서 더 우수한 사멸 효과를 가졌음을 나타낸다.

[0398] 실험예 5: 디트로이트 562의 CDX 마우스 모델의 생체내 효능 및 마우스의 체중 변화에 대한 ADC의 효과

[0399] 6주령 Balb/c 누드 마우스를 장쑤 쥔파마텍 유한회사로부터 구입하였다. 각 마우스에 500만개의 디트로이트 562 세포를 피하로 접종하여 CDX (세포 유래된 이종이식) 마우스 모델을 구축하였다. 접종 후 10일차 (평균 종양 부피는 약 150 mm³)에, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1 (10 mg/kg), 실시예 6에서 제조된 Hu1H2-2-LP1 (10 mg/kg) 및 실시예 8에서 제조된 Hu1H2-2-LP2 (10 mg/kg)를 각각 정맥내로 주사하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: TV= (길이 × 폭)²/2.

[0400] 도 20은 디트로이트562 세포로 구축된 두경부 편평 세포 암종 모델 마우스에서 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2 및 인간 IgG-LP1의 생체내 효능 데이터를 보여주었다. 결과는 Hu1H2-2-LP1 및 Hu1H2-2-LP2가 마우스에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0401] 도 21은 마우스의 체중에 대한 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2 및 인간 IgG-LP1의 효과를 보여주었다. 실험 기간 동안, Hu1H2-2-LP1 그룹 및 Hu1H2-2-LP2 그룹에서 마우스의 체중은 계속 증가하였지만, 대조군에서 인간 IgG-LP1의 체중은 변동하였다. 결과는 Hu1H2-2-LP1 및 Hu1H2-2-LP2가 마우스의 체중 변화에 대해 더 적은 효과를 가졌음을 보여주었다.

[0402] 실험예 6: PC-9의 CDX 마우스 모델의 생체내 효능 및 마우스의 체중 변화에 대한 ADC의 효과

[0403] 6주령 Balb/c 누드 마우스를 장쑤 쥔파마텍 유한회사로부터 구입하였다. 각 마우스에 500만개의 PC-9 세포 (메이센 중국 조직배양보존센터(Meisen Chinese Tissue Culture Collections)로부터 구입)를 피하로 접종하여 CDX 모델을 구축하였다. 접종 후 13일차 (평균 종양 부피는 약 200 mm³)에, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1, 비교예 6에서 제조된 인간 IgG-LP1 (DAR4), 비교예 8에서 제조된 인간 IgG-LP3, 실시예 6에서 제조된 Hu1H2-2-LP1, 실시예 7에서 제조된 Hu1H2-2-LP1 (DAR4) 및 실시예 9에서 제조된 Hu1H2-2-LP3을 각각 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 모두 10 mpk (mg/kg)였으며, 2회에 대해 주 1회 (QW×2)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: TV= (길이 × 폭)²/2.

[0404] 도 22는 PC-9 세포로 구축된 폐암 모델 마우스에 대한 상기 ADC의 생체내 효능 데이터를 보여주었다. 결과는 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1(DAR4) 및 Hu1H2-2-LP3이 마우스에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0405] 도 23은 PC-9로 구축된 폐암 모델 마우스의 체중에 대한 상기 ADC의 효과를 보여주었다. 결과는 Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1(DAR4) 및 Hu1H2-2-LP3이 마우스의 체중에 대해 거의 효과를 갖지 않았고 명백한 소화관 독성을 갖지 않았음을 보여주었다.

[0406] 실험예 7: SCC-9 인간 두경부 편평 세포 암종 CDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과

[0407] 6주령 Balb/c 누드 마우스를 상하이 BK/KY 바이오테크놀로지 유한회사(Shanghai BK/KY Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구입하였다. 각 마우스에 800만개의 SCC-9 세포 (ATCC로부터 구입)를 피하로 접종하여 CDX 모델을 구축하였다. 접종 후 29일차 (평균 종양 부피는 약 200 mm³)에, 비교예 3에서 제조된 리톡시맵-LP1 (10mpk) 및 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1 (2.5, 5, 10 mpk)을 각각 정맥내로 주사하였다. DPBS (둘베코 포스페이트-완충 식염수)는 음성 대조군이었다. 투여를 2회에 대해 주 1회 (QW×2)로 수행하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: TV= (길이 × 폭)²/2.

[0408] 도 24a는 02-1-LP1이 SCC-9 CDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 24b는 02-

1-LP1이 SCC-9 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.

[0409] 실험예 8: Huh-7 인간 간암 CDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과

[0410] 6주령 Balb/c 누드 마우스를 상하이 BK/KY 바이오테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. 각 마우스에 500만개의 Huh-7 세포 (상하이 바이오진 바이오텍 유한회사(Shanghai BioGene Biotech Co., Ltd.)로부터 구입)를 피하로 접종하여 CDX 모델을 구축하였다. 접종 후 9일차 (평균 종양 부피는 약 230 mm³)에, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1 및 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1을 각각 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 모두 10 mpk였으며, 2회에 대해 주 1회 (QW×2)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (길이 \times 폭)^2 / 2$.

[0411] 도 25a는 02-1-LP1이 Huh-7 CDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 25b는 02-1-LP1이 Huh-7 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.

[0412] 실험예 9: LD1-0015-200617 인간 식도 편평 세포 암종 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과

[0413] LD1-0015-200617 (리데바이오텍 유한회사(LideBiotech CO., LTD))은 인간 MUC18을 발현하는 인간 식도 편평 세포 암종 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=75)이다. 6-8주령 Nu/Nu 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.)로부터 구입하였다. LD1-0015-200617의 종양을 약 3 mm × 3 mm × 3 mm 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 39일차 (평균 종양 크기 ~171 mm³)에, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1 및 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1을 각각 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 모두 10 mpk였으며, 3회에 대해 주 1회 (QW×3)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (길이 \times 폭)^2 / 2$.

[0414] 도 26a는 02-1-LP1이 LD1-0015-200617 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 26b는 02-1-LP1이 LD1-0015-200617 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.

[0415] 실험예 10: LD1-0016-390730 인간 식도 선암종 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과

[0416] LD1-0016-390730 (리데바이오텍 유한회사)은 인간 MUC18을 발현하는 인간 식도 선암종 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=115)이다. 6-8주령 Nu/Nu 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. LD1-0016-390730의 종양을 약 3 mm × 3 mm × 3 mm 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 45일차 (평균 종양 크기 ~191 mm³)에, 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1을 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 10 mpk였으며, 2회에 대해 주 1회 (QW×2)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (길이 \times 폭)^2 / 2$.

[0417] 도 27a는 02-1-LP1이 LD1-0016-390730 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 27b는 02-1-LP1이 LD1-0016-390730 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.

[0418] 실험예 11: LD1-2025-362797 인간 소세포 폐암 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과

[0419] LD1-2025-362797 (리데바이오텍 유한회사)은 인간 MUC18을 발현하는 인간 소세포 폐암 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=110)이다. 6-8주령 Nu/Nu 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. LD1-2025-362797의 종양을 약 3 mm × 3 mm × 3 mm 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 21일차 (평균 종양 크기 ~144 mm³)에, 실시예 5에서 제조된 10 mpk 02-1-LP1의 제1 용량을 정맥내로 주사하였다. 그리고, 종양 부피가 약 700 mm³로 재성장할 때 (제1 용량 후 49일차), 10 mpk 02-1-LP1의 제2 용량을 또한 정맥내로 주사하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (길이 \times 폭)^2 / 2$.

[0420] 도 28a는 02-1-LP1이 LD1-2025-362797 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 특히, 종양이 02-1-LP1의 제2 용량 이후에 다시 감소하였으며, 이는 02-1-LP1이 재성장된 종양에 대해 여전히 활성성을 나타낸다. 도 28b는 02-1-LP1이 LD1-2025-362797 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았

음을 보여주었다.

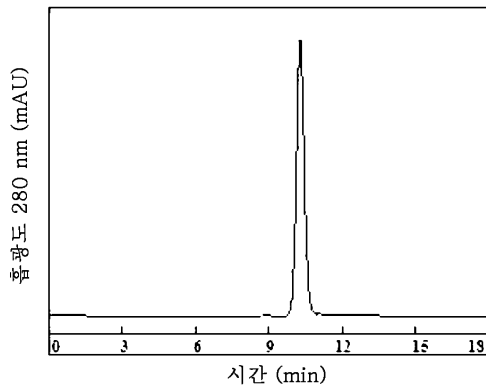
- [0421] 실험예 12: LD1-2009-362263 인간 삼중 음성 유방암 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과
- [0422] LD1-2009-362263 (리데바이오텍 유한회사)은 인간 MUC18을 발현하는 인간 삼중 음성 유방암 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=240)이다. 6-8주령 Nu/Nu 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. LD1-2009-362263의 종양을 약 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 49일차 (평균 종양 크기 $\sim 152\text{ mm}^3$)에, 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1을 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 10 mpk였으며, 2회에 대해 주 1회 (QW $\times$ 2)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (\text{길이} \times \text{폭})^2/2$.
- [0423] 도 29a는 02-1-LP1이 LD1-2009-362263 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 29b는 02-1-LP1이 LD1-2009-362263 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.
- [0424] 실험예 13: LD1-0060-200770 인간 담관암종 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과
- [0425] LD1-0060-200770 (리데바이오텍 유한회사)은 인간 MUC18을 발현하는 인간 담관암종 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=15)이다. 6-8주령 Nu/Nu 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. LD1-0060-200770의 종양을 약 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 42일차 (평균 종양 크기 $\sim 155\text{ mm}^3$)에, 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1을 정맥내로 주사하였다. 투여 용량은 10 mpk였으며, 2회에 대해 주 1회 (QW $\times$ 2)로 투여하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (\text{길이} \times \text{폭})^2/2$.
- [0426] 도 30a는 02-1-LP1이 LD1-0060-200770 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 30b는 02-1-LP1이 LD1-0060-200770 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.
- [0427] 실험예 14: OV-10-0073 인간 난소암 PDX 모델에 대한 생체내 억제 효과 및 마우스의 체중 변화에 대한 이의 효과
- [0428] OV-10-0073 (우시 앵텍 (상하이) 유한회사(WuXi AppTech (Shanghai) Co., Ltd))은 인간 MUC18을 발현하는 인간 난소암 환자 유래된 이종이식 모델 (H-점수=40)이다. 6-8주령 BALB/c 누드 마우스를 베이징 바이탈 리버 래보러토리 애니멀 테크놀로지 유한회사로부터 구입하였다. OV-10-0073의 종양을 약 30 mm^3 단편으로 슬라이스하고, 마우스의 옆구리에 피하로 이식하였다. 이식 후 34일차 (평균 종양 크기 $\sim 185\text{ mm}^3$)에, 비교예 5에서 제조된 인간 IgG-LP1 (2.5, 5mpk) 및 실시예 5에서 제조된 02-1-LP1 (1.25, 2.5, 5 mpk)의 단일 용량을 각각 정맥내로 주사하였다. 투여 후, 종양 부피를 버니어 캘리퍼스로 주 2회 측정하였고, 종양 부피를 하기 공식에 따라 계산하였다: $TV = (\text{길이} \times \text{폭})^2/2$.
- [0429] 도 31a는 02-1-LP1이 OV-10-0073 PDX 모델에서 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 도 31b는 02-1-LP1이 OV-10-0073 PDX 모델에서 마우스의 체중에 거의 효과를 갖지 않았음을 보여주었다.
- [0430] 상기 실험 결과로부터, 본 개시내용에 의해 제공된 ADC에서, 엑사테칸과 결합한 후, 링커는 간단한 화학적 방법에 의해 MUC18 또는 CD44v7/8을 표적화하는 항체와 커플링된다는 것을 알 수 있다. 기존의 무작위 접합 방법과 비교하여, 이러한 링커를 사용하여 수득된 항-MUC18 항체-약물 접합체 또는 항-CD44v7/8 항체-약물 접합체의 DAR 값 (DAR8)은 더 높다. HIC 검출은 본 개시내용에 의해 제공된 ADC의 크로마토그래피 피크가 vc-MMAE 또는 GGFG-DXd의 링커-페이로드보다 더 좁았음을 보여주었으며, 이는 제조된 생성물이 고도로 균질하고 친수성을 시사한다. 기존의 vc-MMAE 및 GGFG-DXd 접합체와 비교하여, 본 개시내용의 접합체의 시험관내 종양 세포 증식 억제 활성은 생물학적 활성 및 안전성 측면에서 개선되거나 유지된다.
- [0431] 본 개시내용에서 제조된 ADC는 특이적 MUC18 또는 CD44v7/8-의존적 항종양 활성을 갖고, MUC18 또는 CD44v7/8의 높은 발현을 갖는 종양 세포에 대해 극히 높은 사멸 활성을 갖는다. 본 개시내용에서 제조된 MUC18 특이성을 갖는 ADC는 증가된 HNSTD를 가지며, 이는 개선된 안전성 및 감소된 독성 및 부작용을 나타낸다. 놀랍게도, 실험예 9-14의 결과는 또한 본 개시내용에서 제조된 MUC18 특이성을 갖는 ADC가 MUC18의 상이한 발현 수준 (낮음, 보통 및 높음)을 갖는 종양 세포에 대해 우수한 사멸 활성을 나타냄을 보여주었다.

[0432] 본 개시내용에서 제조된 ADC는 vc-MMAE 또는 GGFG-DXd와 접합된 ADC보다 생체내에서 더 우수한 항종양 효능을 갖고, 동시에 vc-MMAE에 접합된 ADC보다 유의하게 더 나은 안전성을 나타내고, GGFG-DXd ADC와 유사한 MTD (최대 관용 용량)를 갖는다 (Yusuke OgitaniClin, et al., Cancer Res. 2016 Oct 15;22(20):5097-5108.). 이 약물 접합체는 기존의 임상 분자 vc-MMAE 또는 GGFG-DXd보다 더 높은 치료 윈도우를 가질 것으로 예상된다.

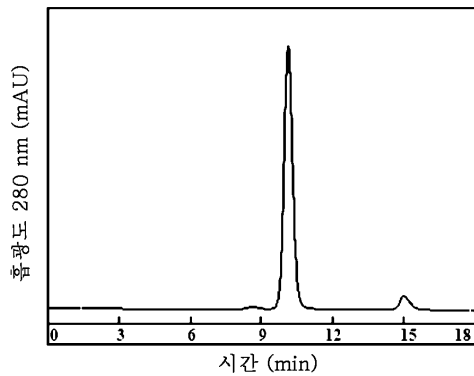
[0433] 본 개시내용에 의해 제공된 ADC는 시험관내에서 더 나은 안정성을 갖고, 제조 프로세스에서 감소된 응집을 갖는다. 화학식 I의 링커를 갖는 ADC는 혈장에서 더 나은 안정성을 갖고, ADC는 생체내에서 더 나은 약물 대사 특성, 예컨대 더 긴 반감기, 더 낮은 양의 유리 소분자 독소 등을 가질 것으로 예상된다.

도면

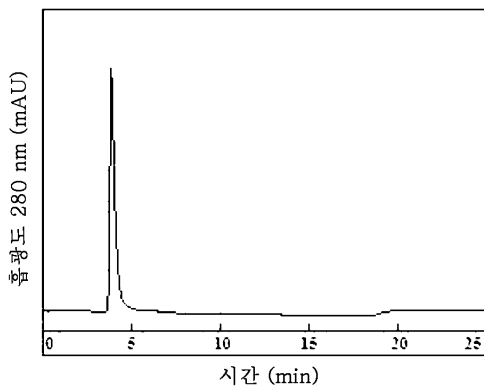
도면1a



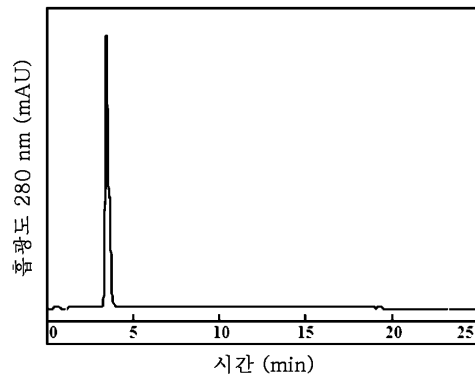
도면1b



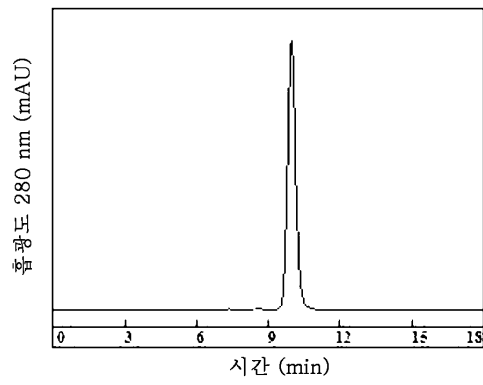
도면2a



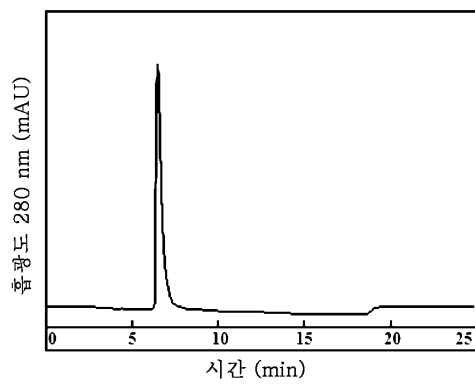
도면2b



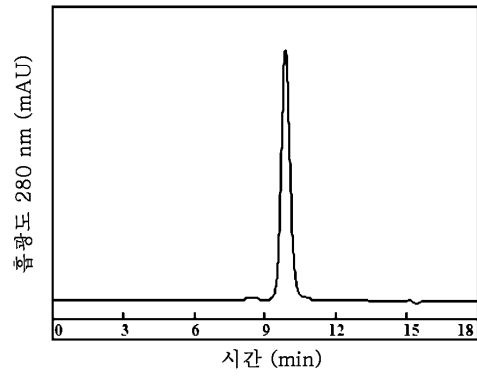
도면3a



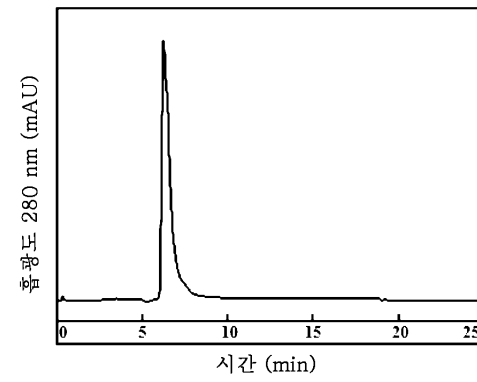
도면3b



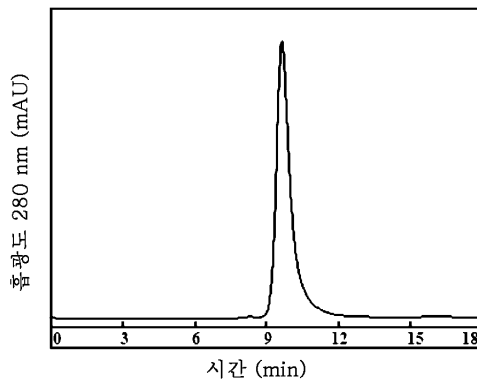
도면4a



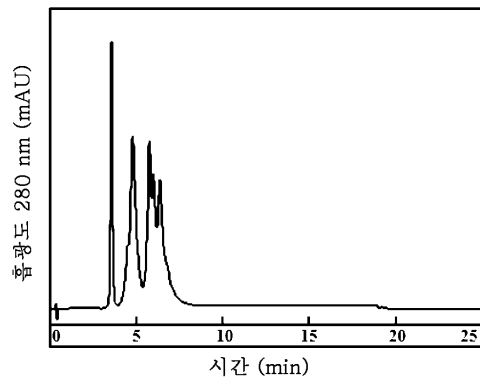
도면4b



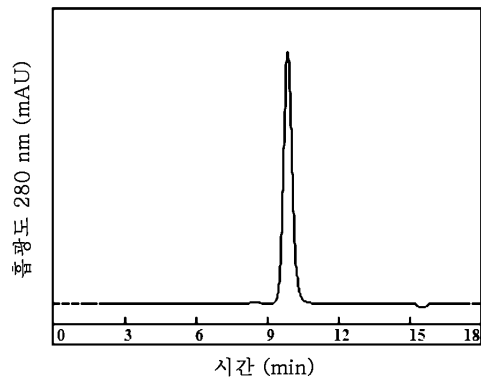
도면5a



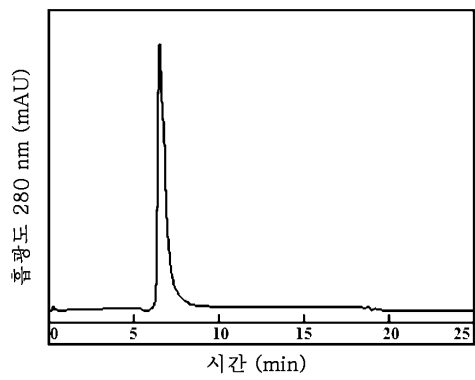
도면5b



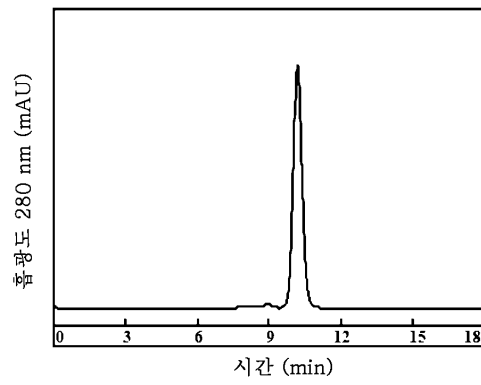
도면6a



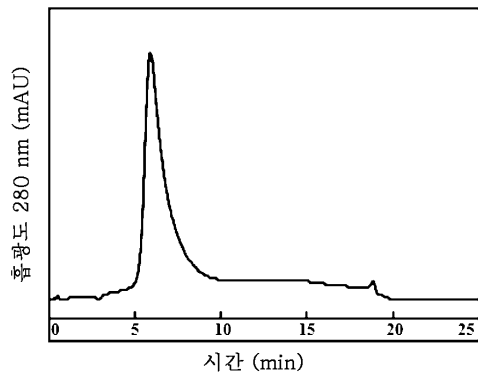
도면6b



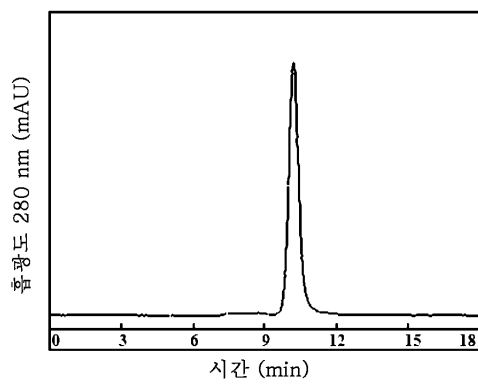
도면7a



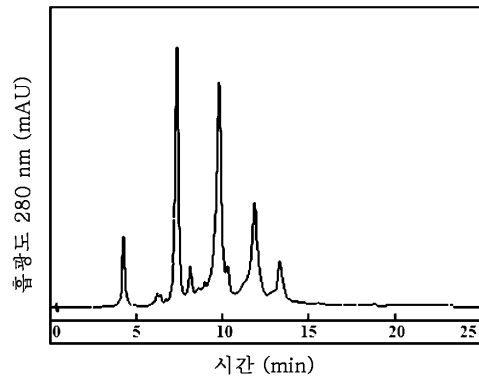
도면7b



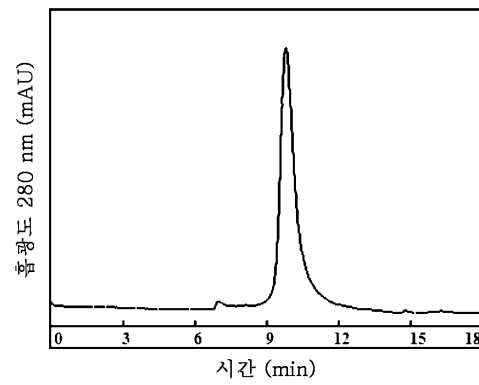
도면8a



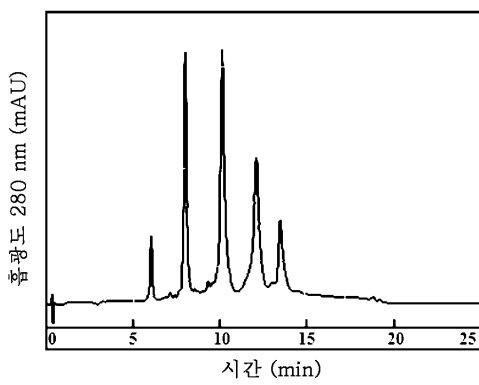
도면8b



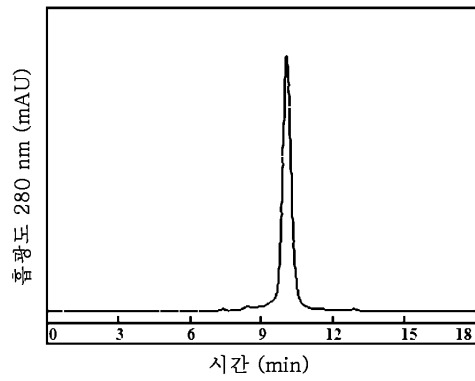
도면9a



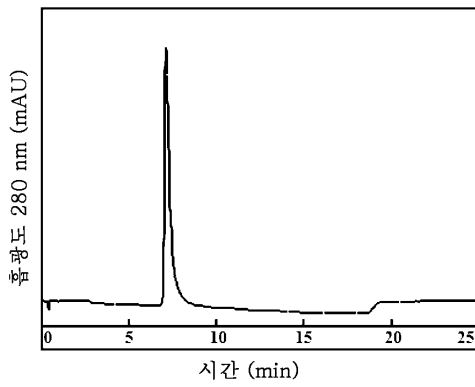
도면9b



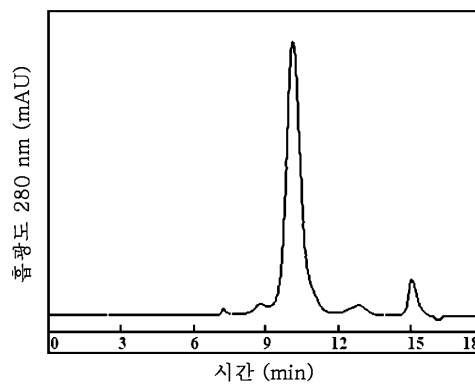
도면10a



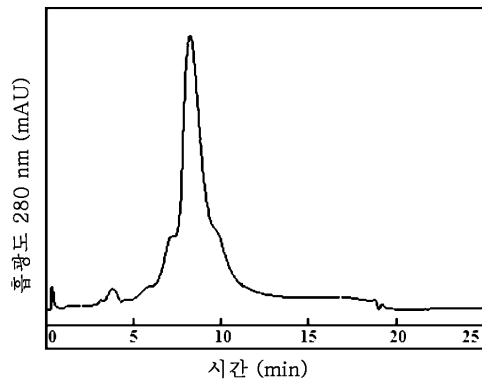
도면10b



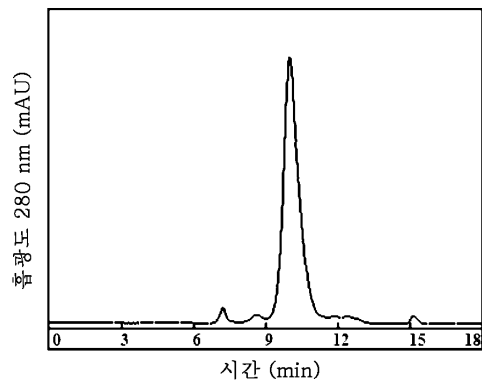
도면11a



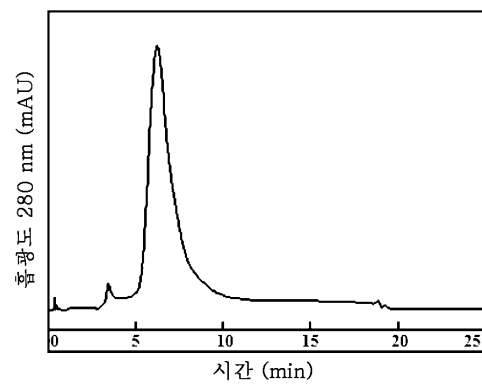
도면11b



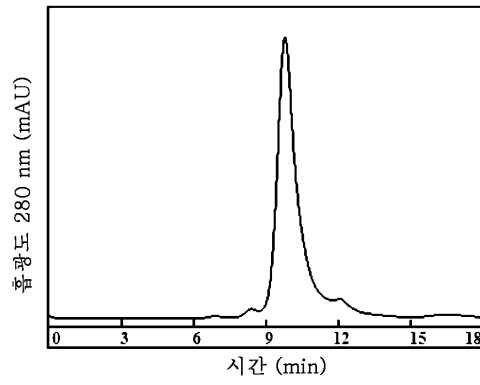
도면12a



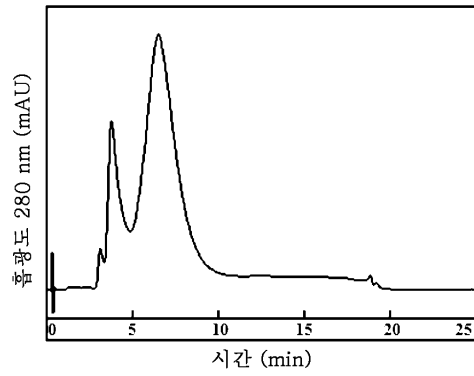
도면12b



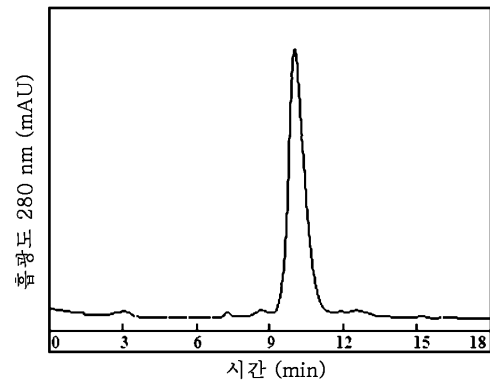
도면13a



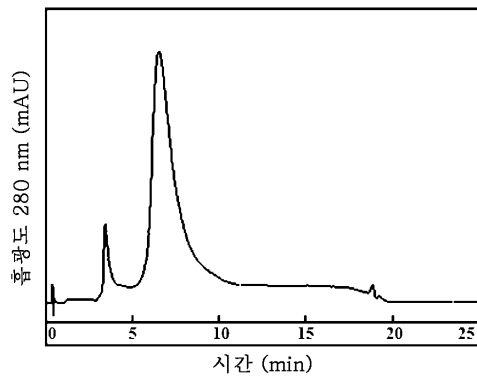
도면13b



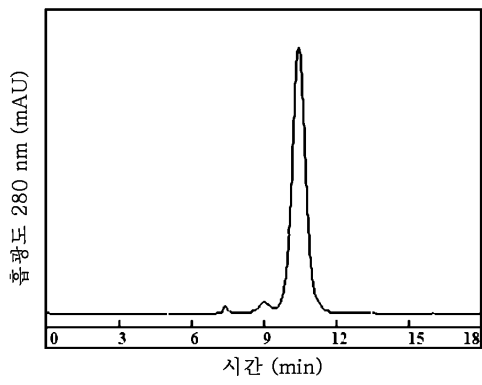
도면14a



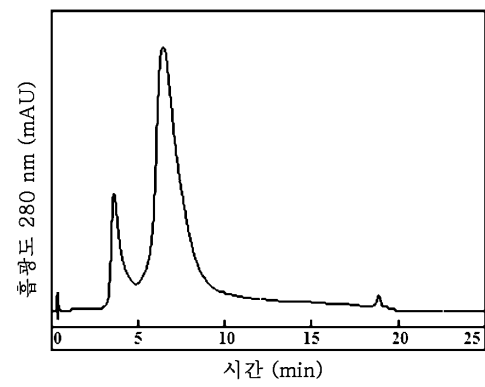
도면14b



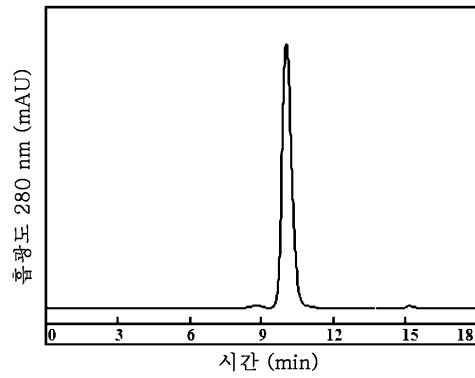
도면15a



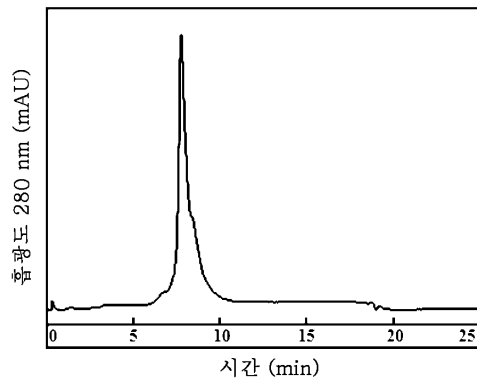
도면15b



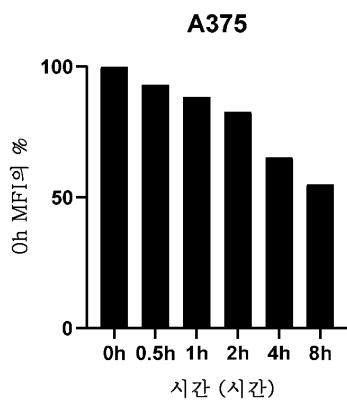
도면16a



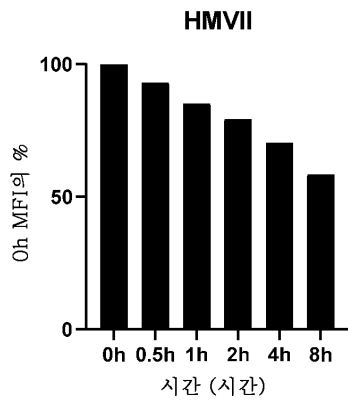
도면16b



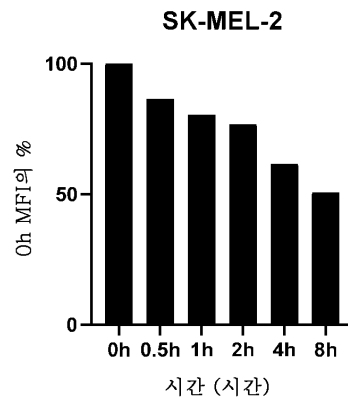
도면17a



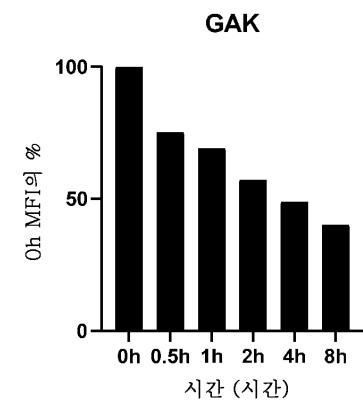
도면17b



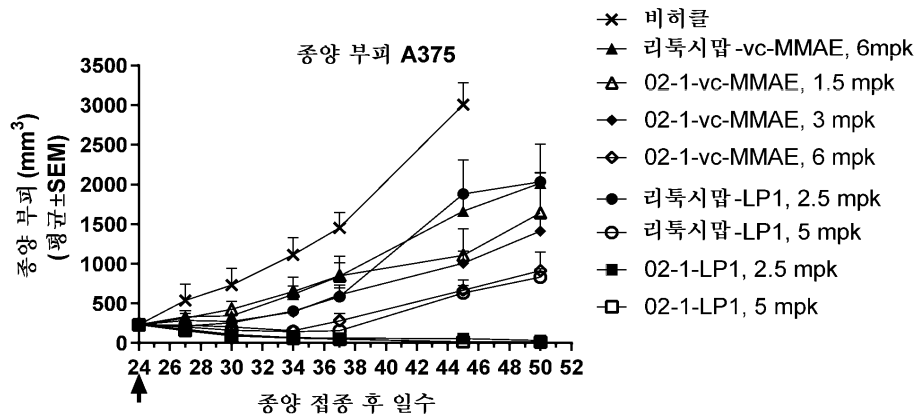
도면17c



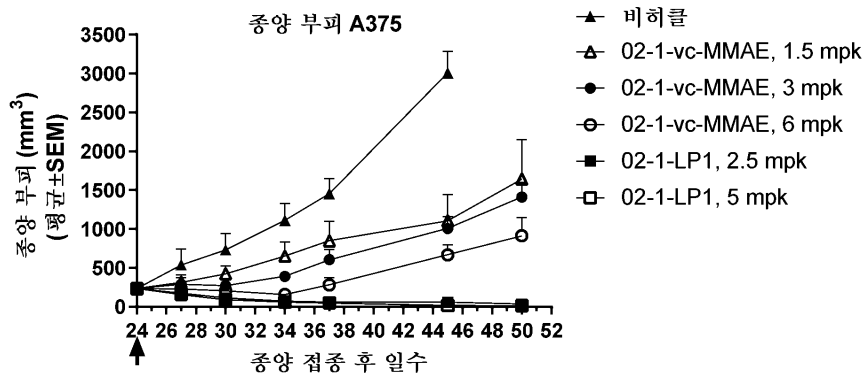
도면17d



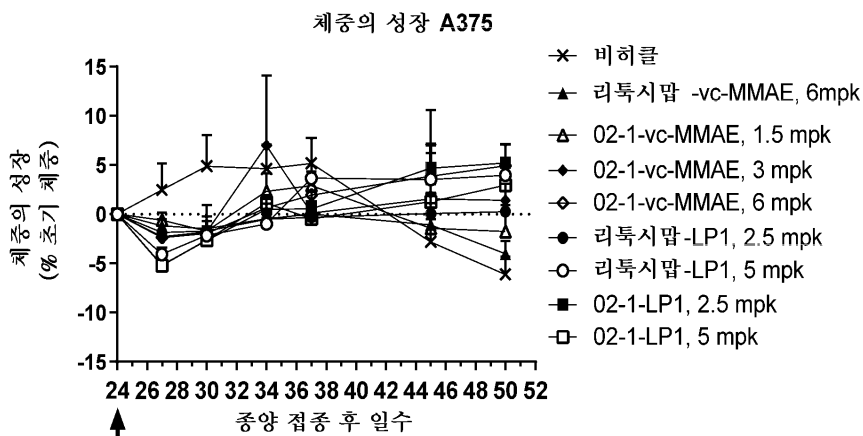
도면18ai



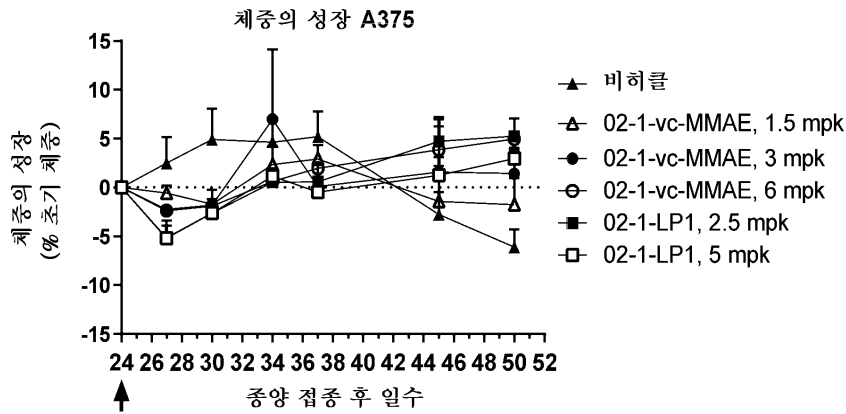
도면18aii



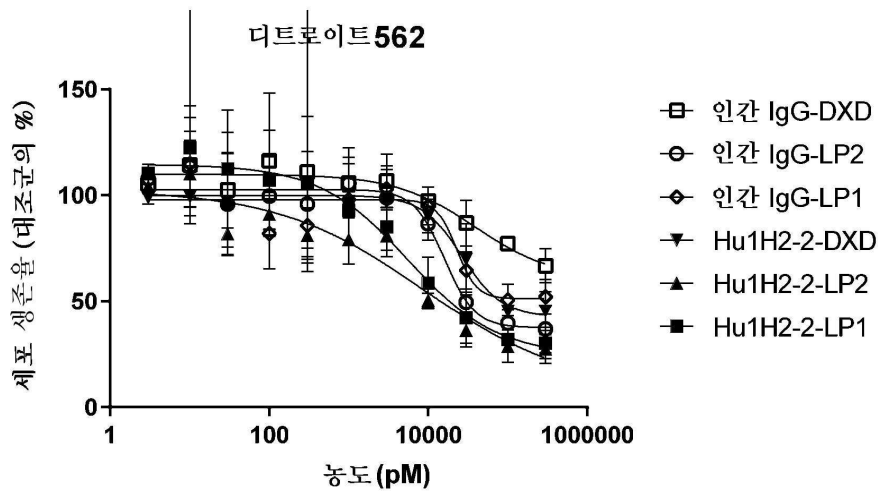
도면18bi



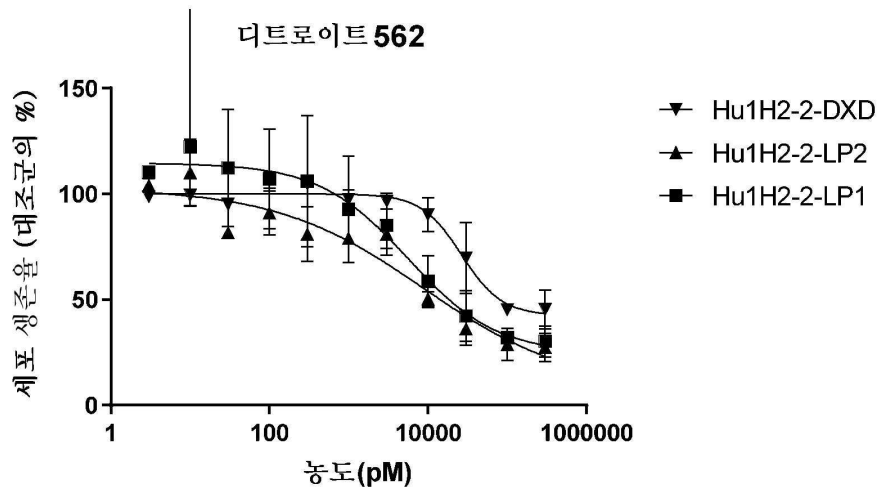
도면18bii



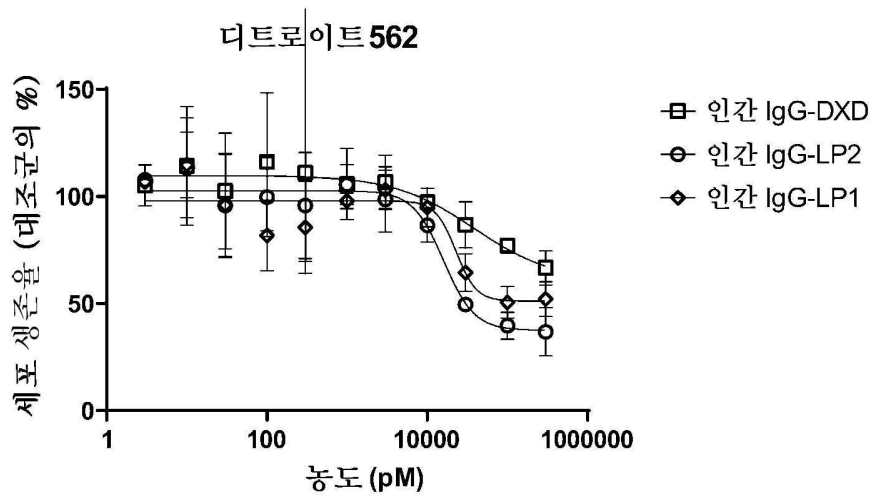
도면19



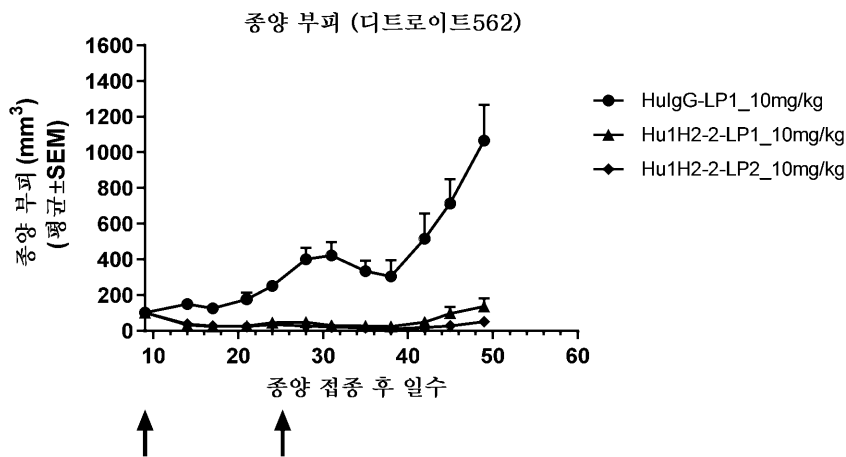
도면19ai



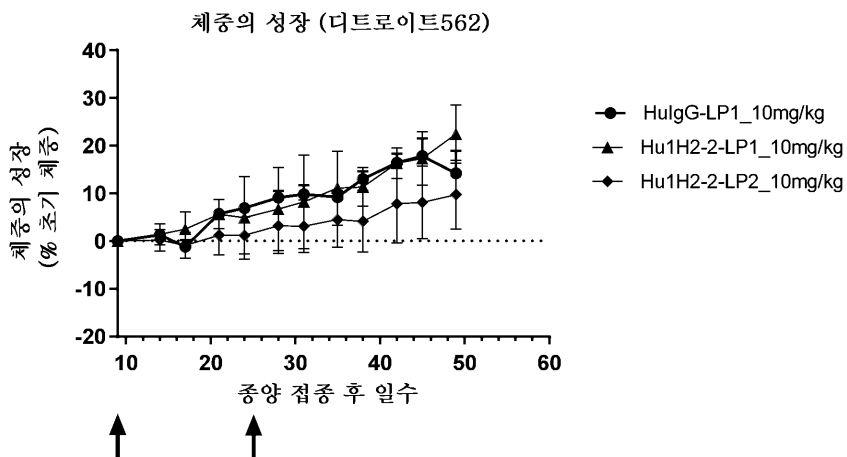
도면19aii



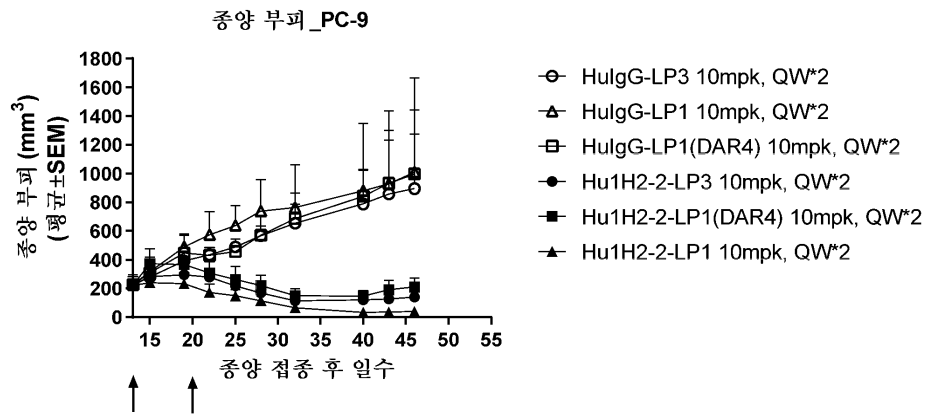
도면20



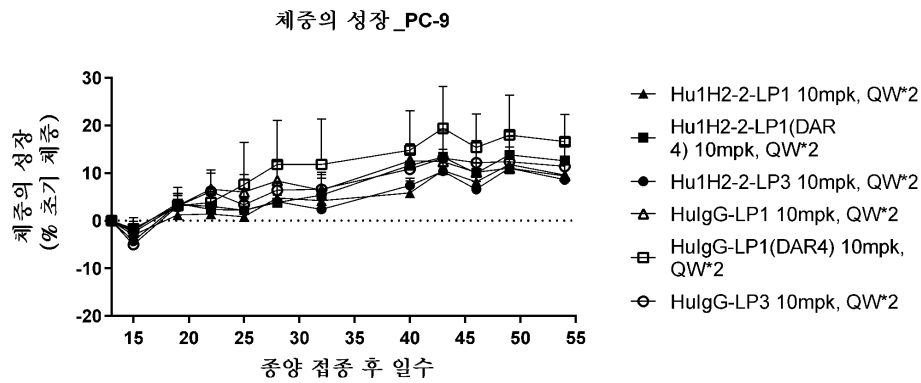
도면21



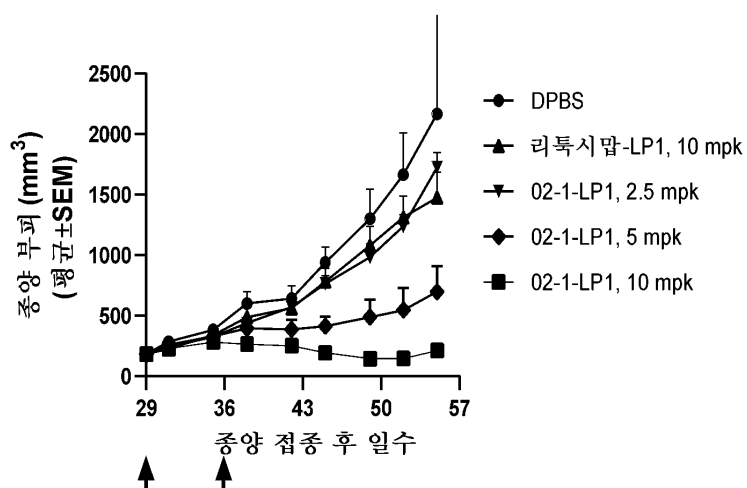
도면22



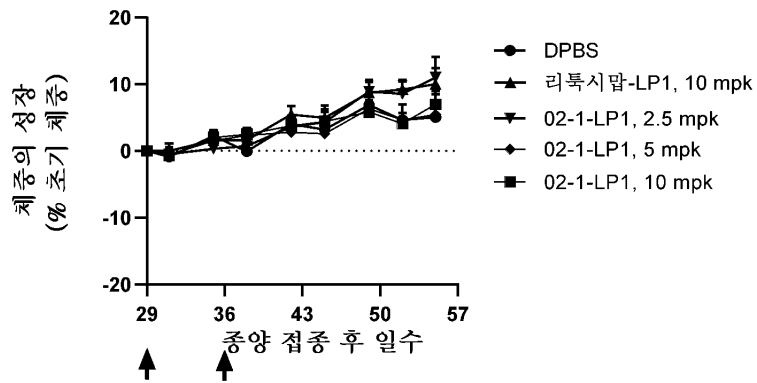
도면23



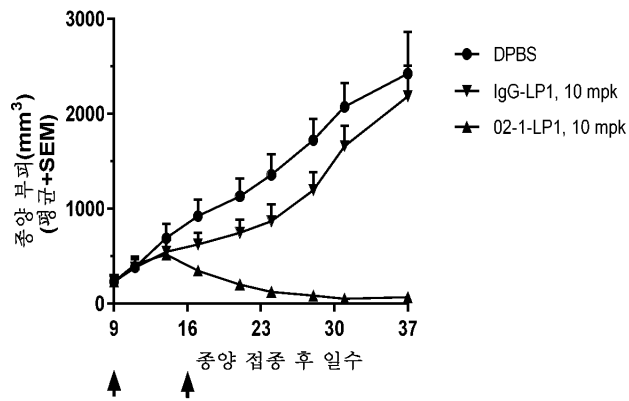
도면24a



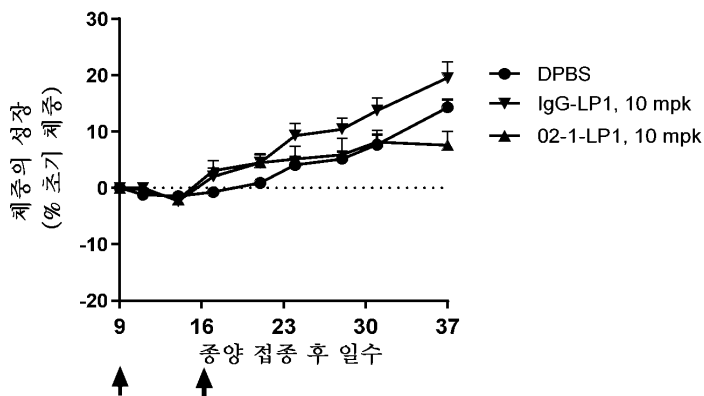
도면24b



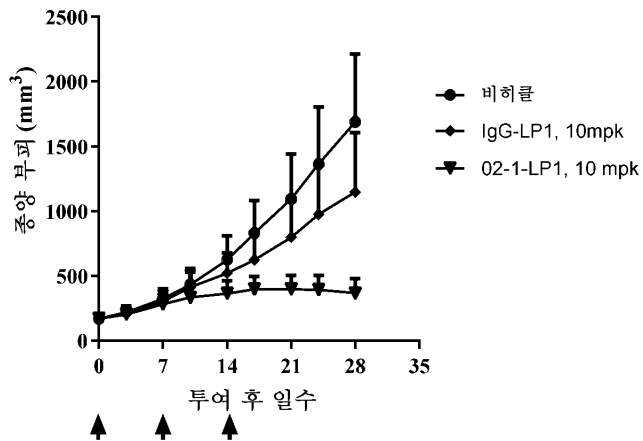
도면25a



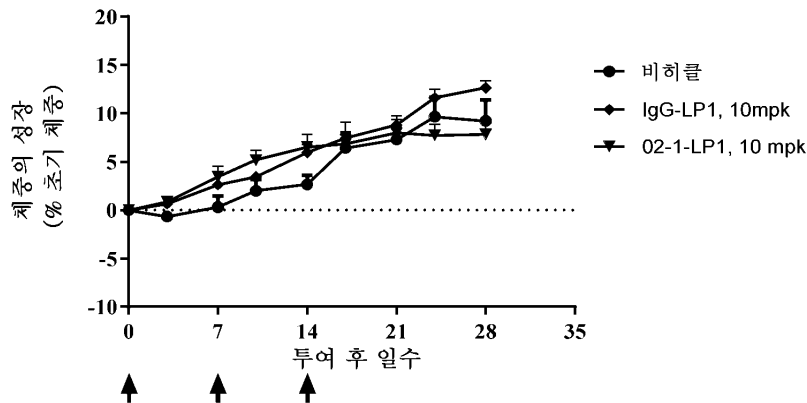
도면25b



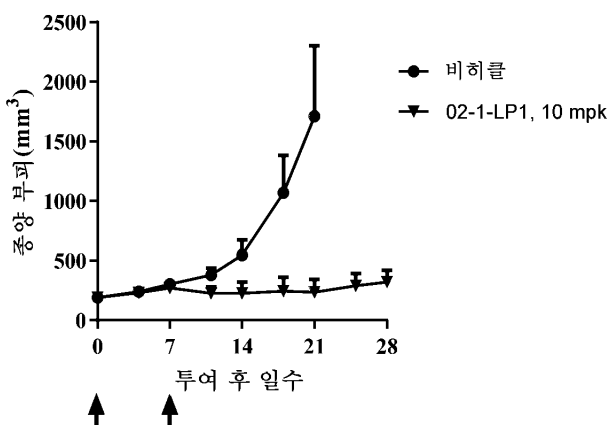
도면26a



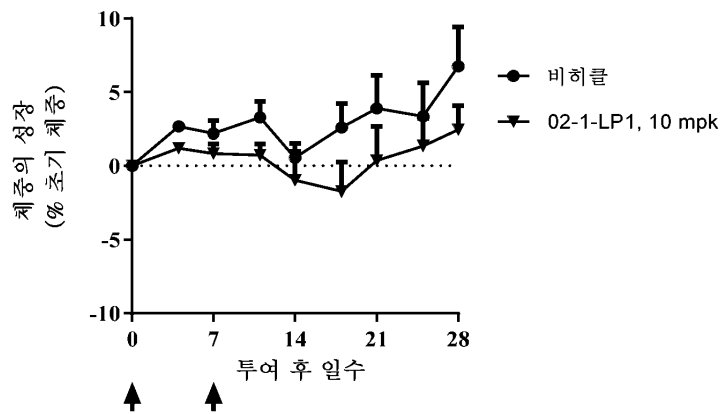
도면26b



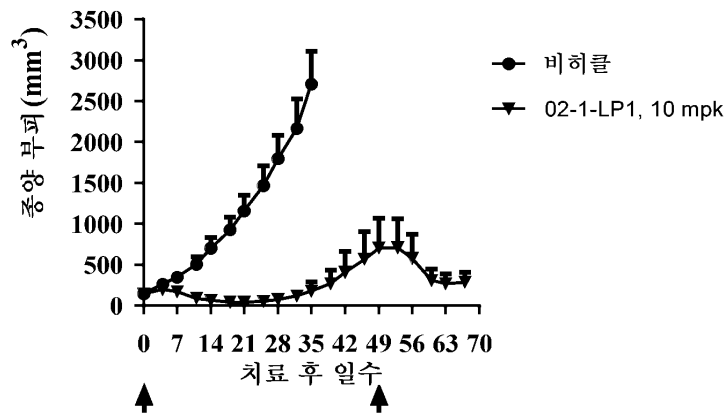
도면27a



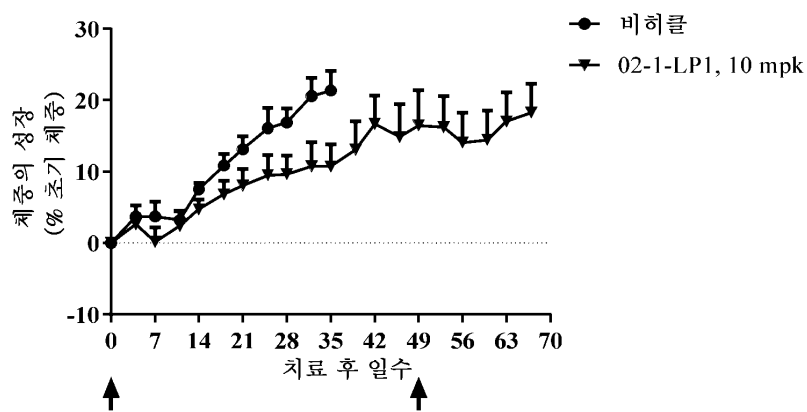
도면27b



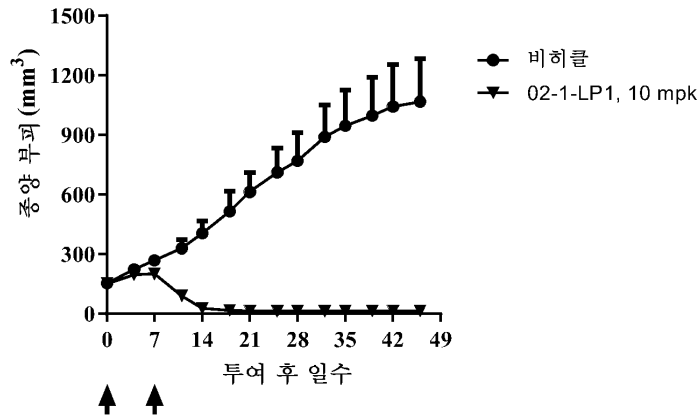
도면28a



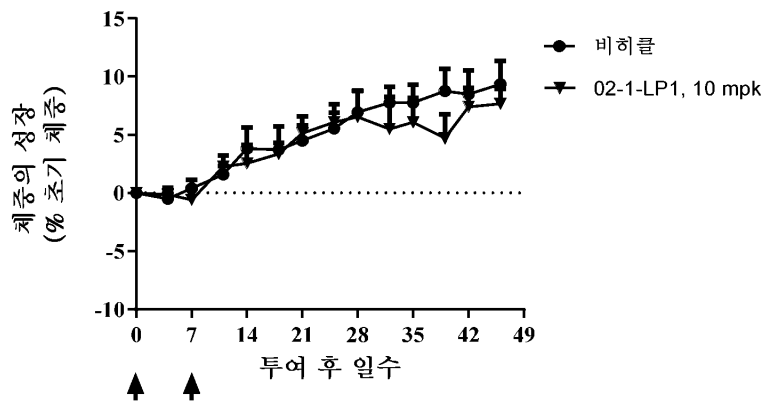
도면28b



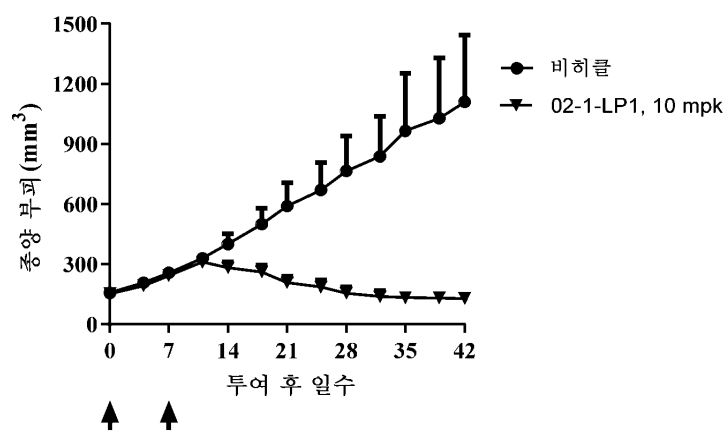
도면29a



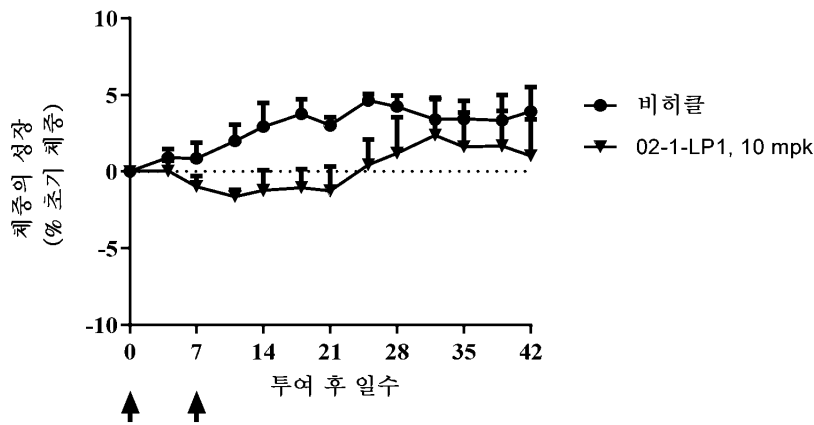
도면29b



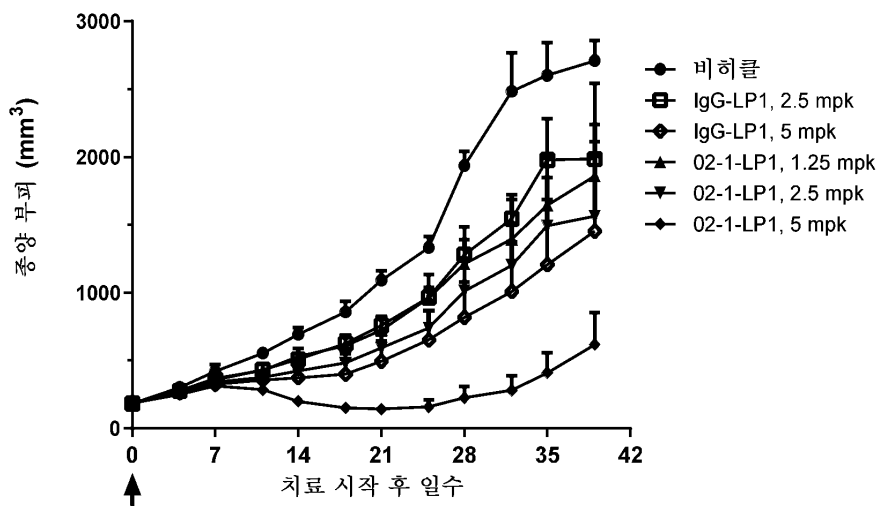
도면30a



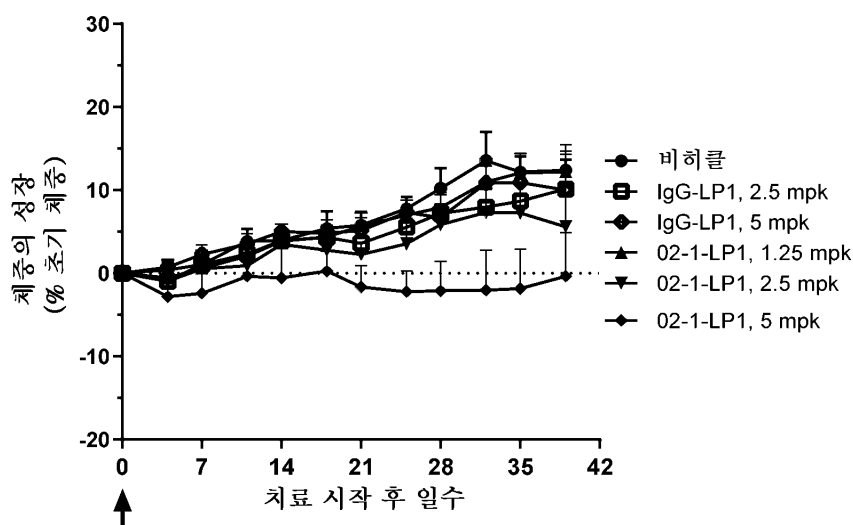
도면30b



도면31a



도면31b



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.