



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0157659
(43) 공개일자 2024년11월01일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6801 (2017.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7027679</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2023년01월19일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년08월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/073130</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/143365
국제공개일자 2023년08월03일</p> <p>(30) 우선권주장
202210107800.8 2022년01월28일 중국(CN)
202310015113.8 2023년01월05일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
듀얼리티 바이올로지스 (쑤저우) 컴퍼니 리미티드
중국 215000 지양수, 쑤저우 인더스트리얼 파크
쑤저우, 진구 로드, 넘버 99, 바이오메디컬 인더
스트리얼 파크 페이즈 3, 존 비, 빌딩 3, 유닛
301</p> <p>(72) 발명자
주 중유안
중국, 상하이 201204, 푸둥 뉴 에어리어, 868 잉
화 로드, 유닛 1106</p> <p>장 유
중국, 상하이 201204, 푸둥 뉴 에어리어, 868 잉
화 로드, 유닛 1106</p> <p>리 시
중국, 상하이 201204, 푸둥 뉴 에어리어, 868 잉
화 로드, 유닛 1106</p> <p>(74) 대리인
특허법인한얼</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 HER3 항체-약물 접합체 및 이의 용도

(57) 요약

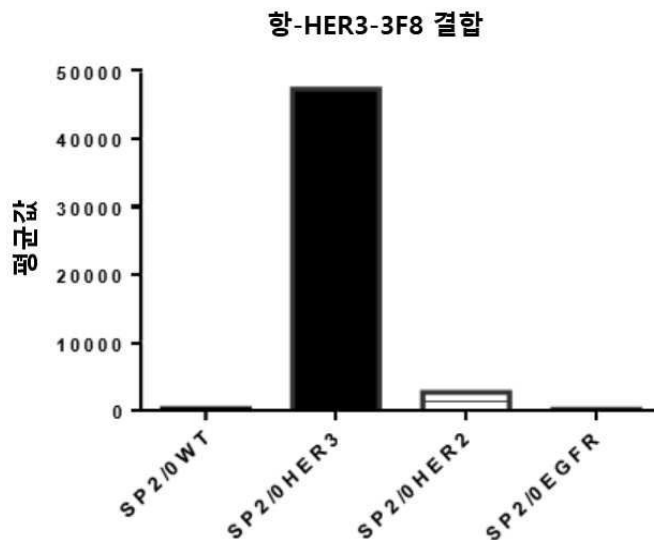
하기 화학식 I의 구조를 갖는, 항-Her3 항체-약물 접합체를 개시한다:

화학식 I



(뒷면에 계속)

대표도



여기서, L 및 M은 링커 단위이고, D는 세포독성 약물이고, P는 평균 연결 수를 나타내고, Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 화학식 I의 항-Her3 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염 또는 혼합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 개시한다. 상기 개시된 항체-약물 접합체 또는 조성물은 Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 약물의 제조에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-Her3 항체-약물 접합체(anti-Her3 antibody-drug conjugate), 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물로서, 상기 항-Her3 항체-약물 접합체가 하기 화학식 I의 구조를 갖는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:

화학식 I



여기서,

L 및 M은 링커 단위(linker unit)이고;

D는 세포독성 약물(cytotoxic drug)이고;

p는 평균 연결 수(average connection number)를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

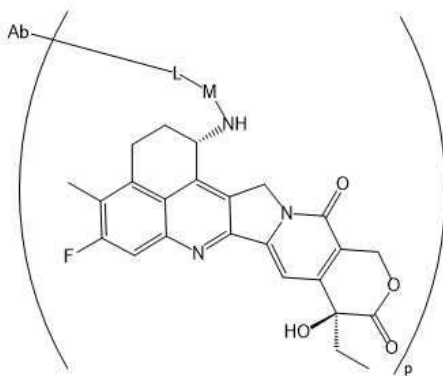
Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서,

항-Her3 항체-약물 접합체가 하기 화학식 I-1의 구조를 갖는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:

화학식 I-1



여기서,

L 및 M은 링커 단위이고;

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1,

LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하기를 포함하는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:

(I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

(II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

(III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 쥐 항체(murine antibody) 또는 이의 단편, 키메라 항체(chimeric antibody) 또는 이의 단편, 또는 인간화 항체(humanized antibody) 또는 이의 단편인, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, sdAb, 이중특이적 항체(bispecific antibody), 또는 선형 항체 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 유형의 것인, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하기를 포함하는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:

(1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄; 또는

(2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄; 또는

(3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

M이 $-L^2-L^3-X-L^1-$ 이고;

L^2 가 -O- 또는 -S-이고;

L^3 이 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-$ 이고, m이 0, 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^3 이 메틸렌 단위를 포함하는 경우, L^3 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위가 -C(O)- 또는 -C(S)-로 대체되고;

L^1 이 $-(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-$ 이고, n이 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^1 이 메틸렌 단위를 포함할 수 있는 경우, L^1 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위가 -C(O)- 또는 -C(S)-로 대체되고;

X가 3-6원의 포화된 카보사이클릴, 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴, 또는 단일 결합 중에서 선택되고, 상기 3-6원의 포화된 카보사이클릴 및 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴이 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환되고;

각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} , 각각의 R^{2a} , 각각의 R^{2b} , 및 각각의 R^{3a} 가 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

각각의 R이 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있는,

항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 9

제8항에 있어서,

L^3 이 단일 결합, $-C(R^{1a})(R^{1b})-$, 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고,

각각의 R^{1a} 및 각각의 R^{1b} 가 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

각각의 R이 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있는,

항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 10

제9항에 있어서,

L^3 이 단일 결합, $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 11

제8항에 있어서,

L^1 이 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,

각각의 R^{2a} 및 각각의 R^{2b} 가 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

각각의 R이 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있는,

항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 12

제11항에 있어서,

L^1 이 $-CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-CH(CH_3)C(O)-$, 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 13

제8항에 있어서,

X가 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합이고,
 각각의 R^{3a} 가 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,
 각각의 R이 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있는
 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 14

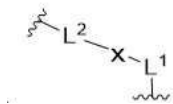
제13항에 있어서,

X가 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합인, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

-M-이 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:



여기서

L^2 는 $-O-$ 또는 $-S-$ 이고;

X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고;

L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,

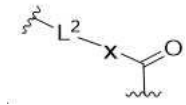
각각의 R^{2a} , 각각의 R^{2b} 또는 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

청구항 16

제15항에 있어서,

-M-이 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:



여기서

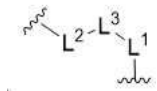
L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

X는 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택된다.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

-M-이 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:



여기서

L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

L^3 은 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고;

L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,

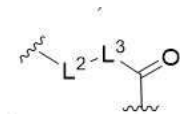
각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} , 각각의 R^{2a} 또는 각각의 R^{2b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

청구항 18

제17항에 있어서,

-M-이 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:



여기서

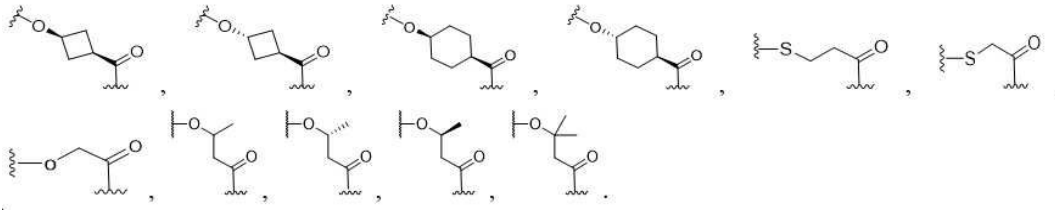
L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

L^3 은 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택된다.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

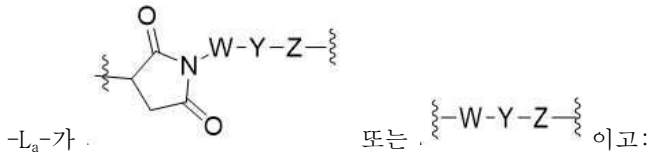
-M-이 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:



청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

L이 $-L_a-L_b-L_c-$ 이고,



여기서

W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$ 이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$ 이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$ 이고,

wn 은 1, 2, 3 또는 6이고,

W의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

yn 은 0, 4 또는 8이고, yp 는 0 또는 1이고;

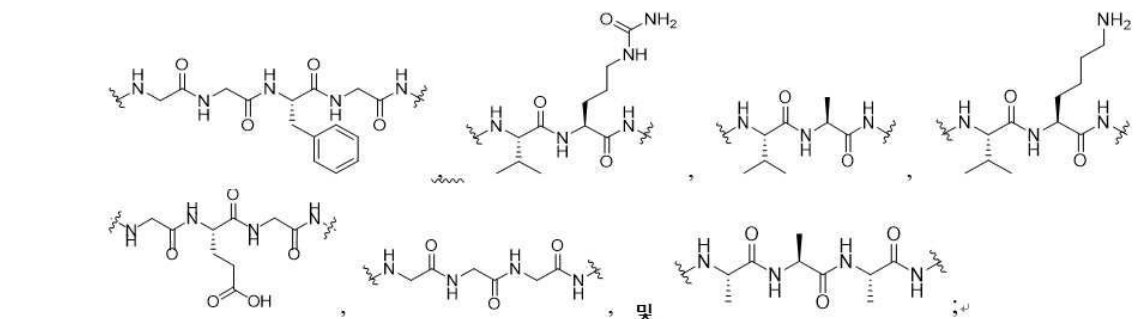
zn 은 1, 2 또는 3이고,

Z의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

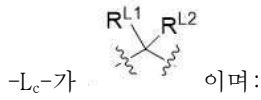
$-Cyr-$ 는 3-10원의 포화된 카보사이클릴렌이고, 상기 $-Cyr-$ 은 비치환되거나 또는 1 내지 3개의 치환체 R^{cx} 에 의해 독립적으로 치환되고;

각각의 R^{wa} , 각각의 R^{wb} , 각각의 R^{za} , 각각의 R^{zb} , 각각의 R^{wx} , 각각의 R^{zx} 및 각각의 R^{cx} 는 독립적으로 수소, 할로젠, $-OR^f$, 또는 R^f 로 임의로 치환된 C_{1-6} 지방족 그룹이고,

각각의 R^f 은 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C_{1-6} 지방족 그룹이며;



로 이루어지는 그룹 중에서 선택되고;

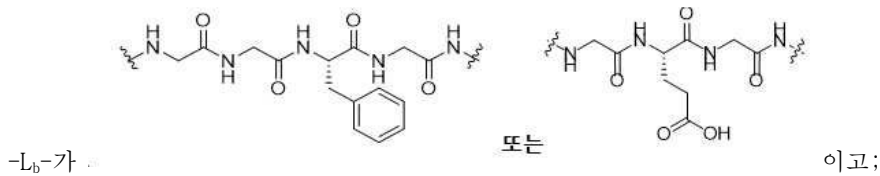
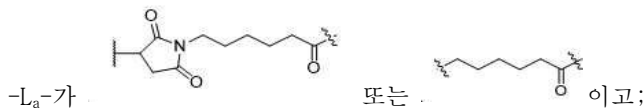


여기서

R^{L1} 및 R^{L2} 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, -OH 및 C_{1-6} 지방족 그룹으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

청구항 21

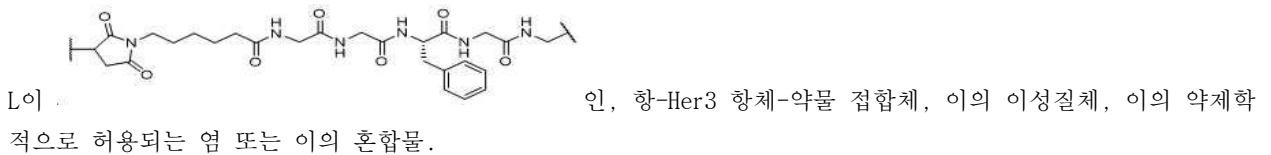
제20항에 있어서,



항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물.

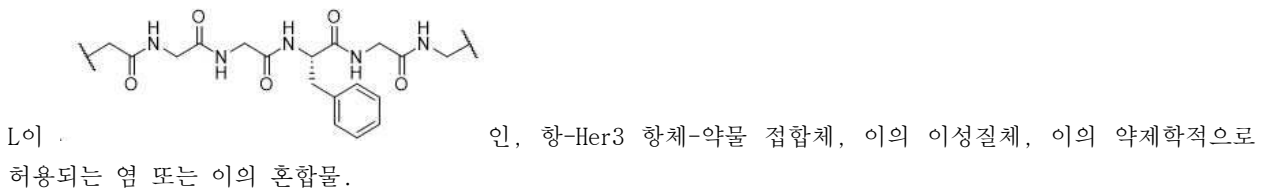
청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,



청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

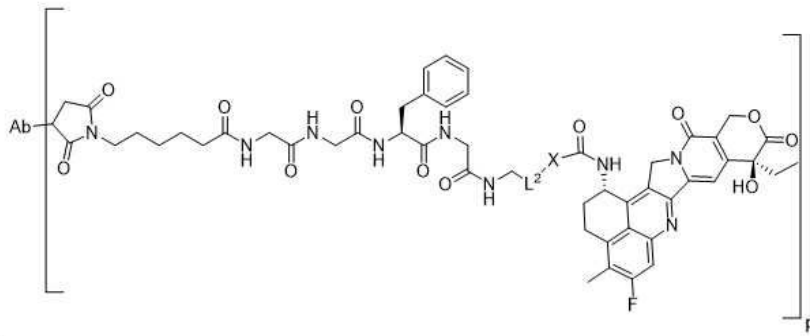


청구항 24

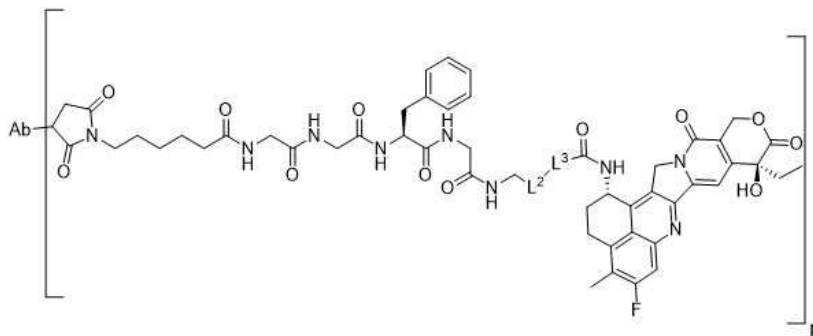
제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

항-Her3 항체-약물 접합체가 하기 화학식 II-1 또는 II-2의 구조를 갖는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:

화학식 II-1



화학식 II-2



여기서

p는 제1항에 기재된 바와 같고,

Ab는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같고;

L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고;

L^3 은 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고;

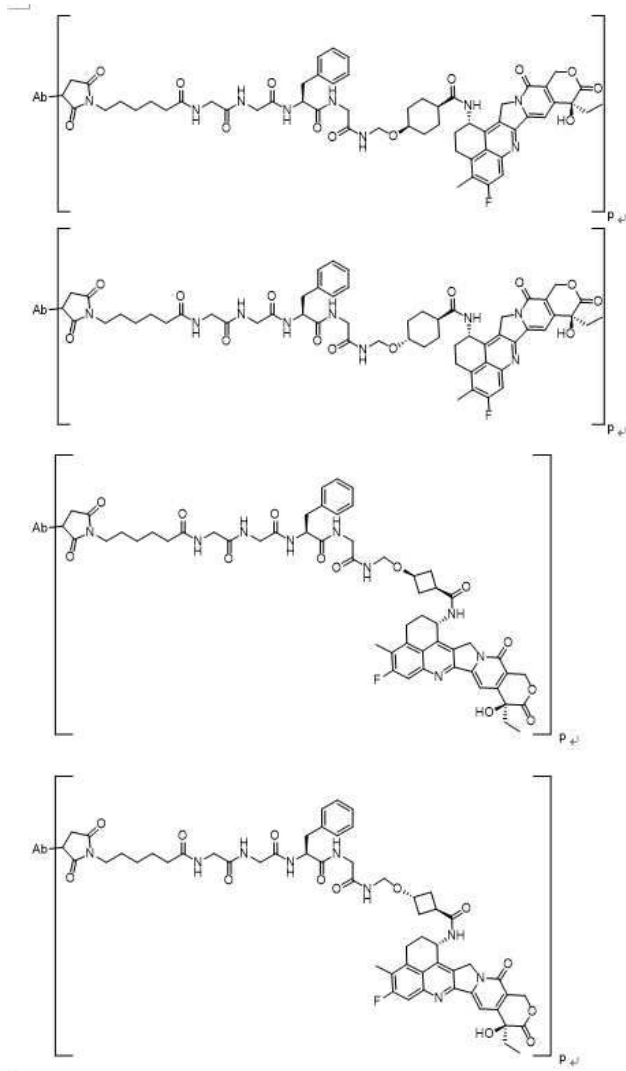
각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} 또는 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

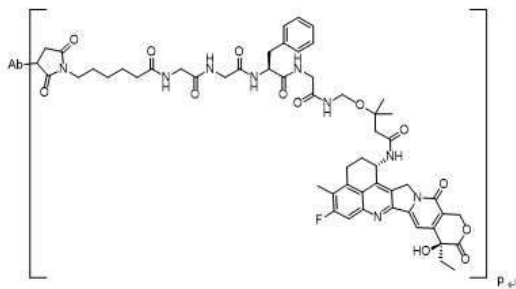
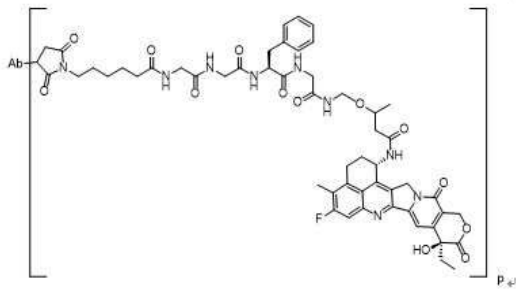
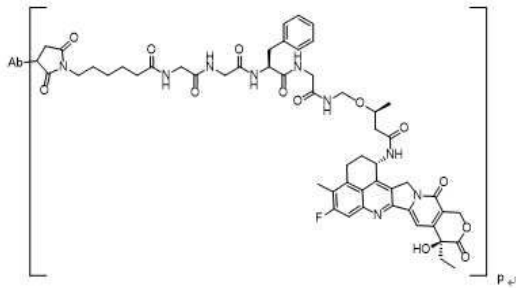
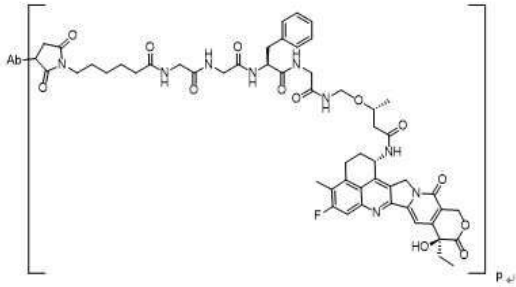
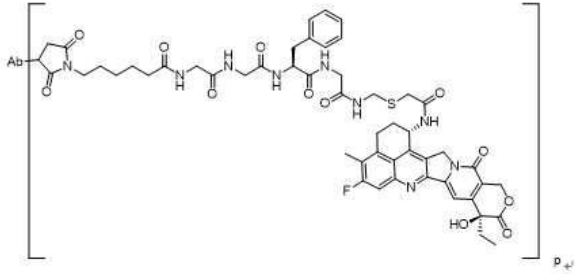
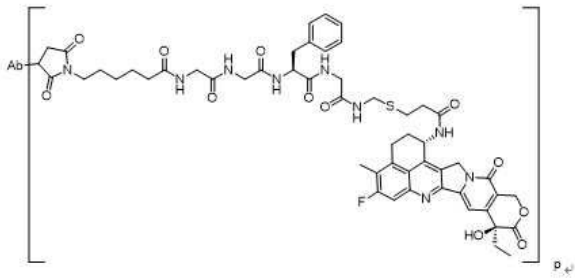
각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

항-Her3 항체-약물 접합체가 하기 구조식 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:





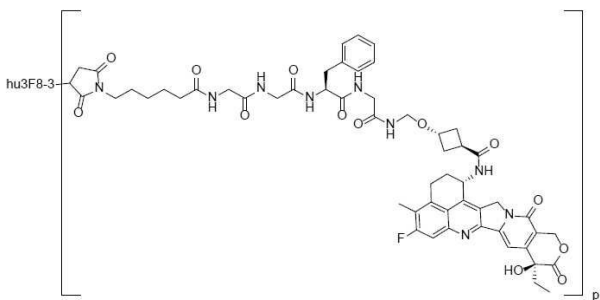
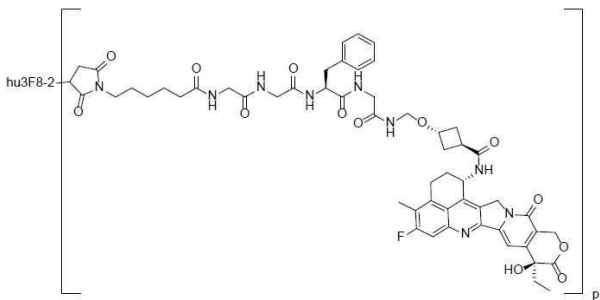
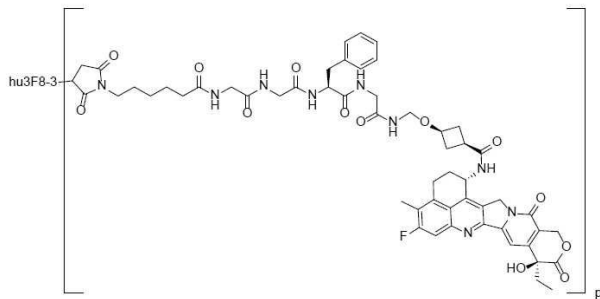
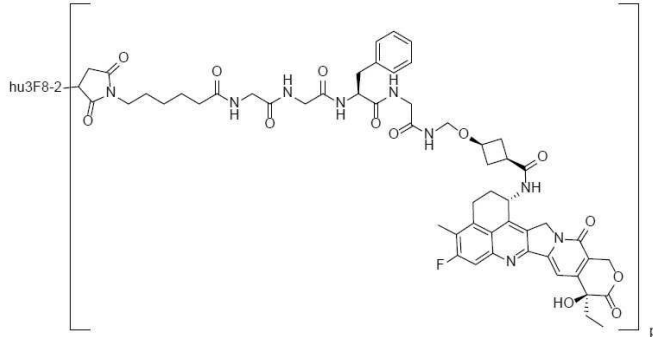
여기서,

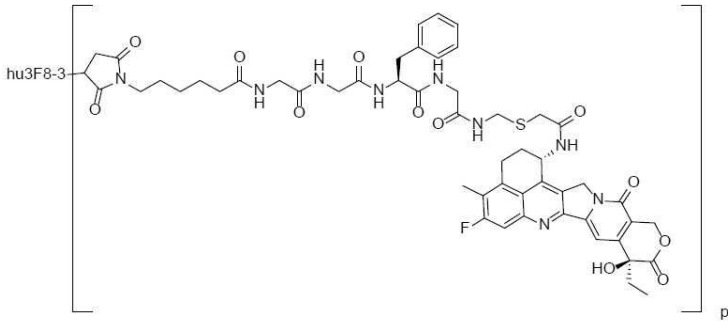
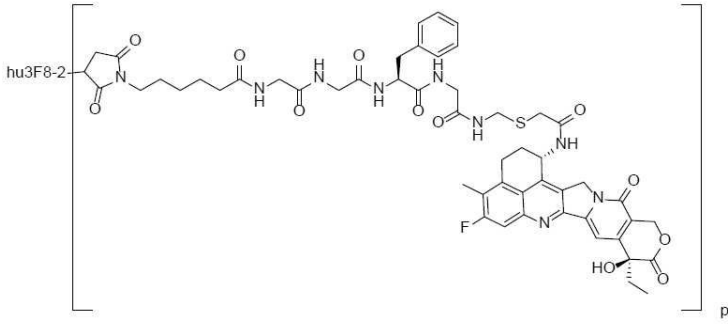
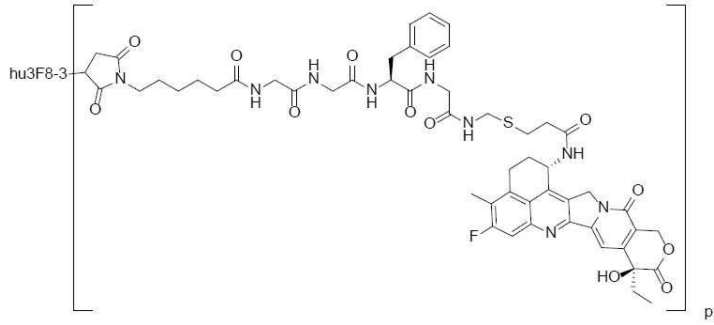
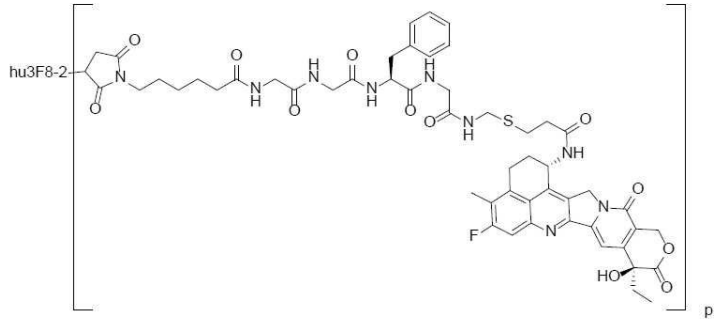
p는 제1항에 기재된 바와 같고;

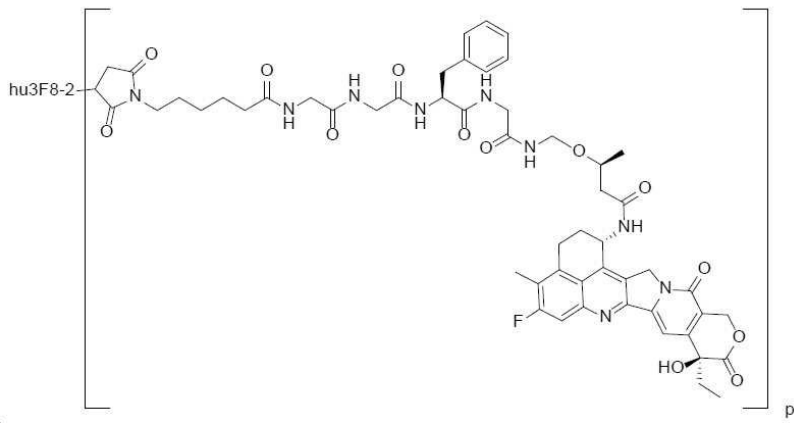
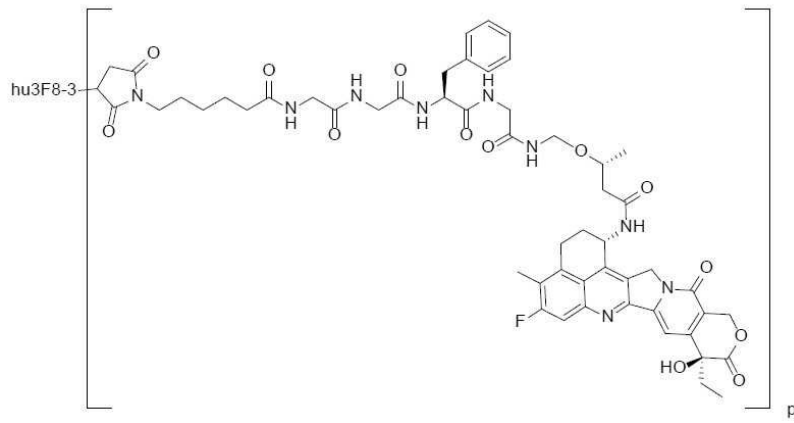
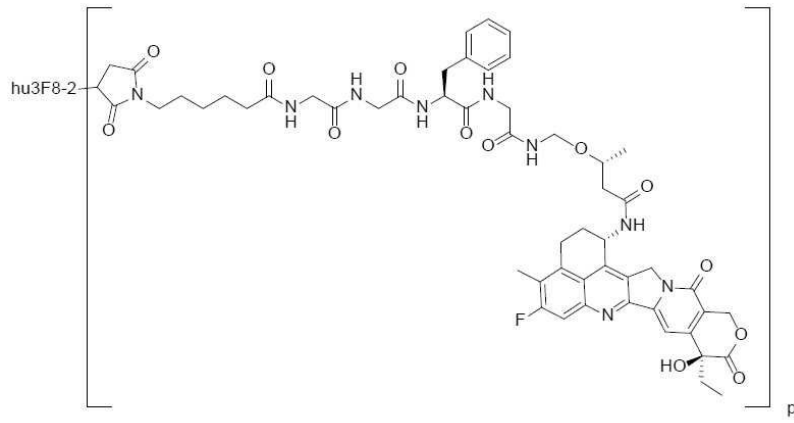
Ab는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같다.

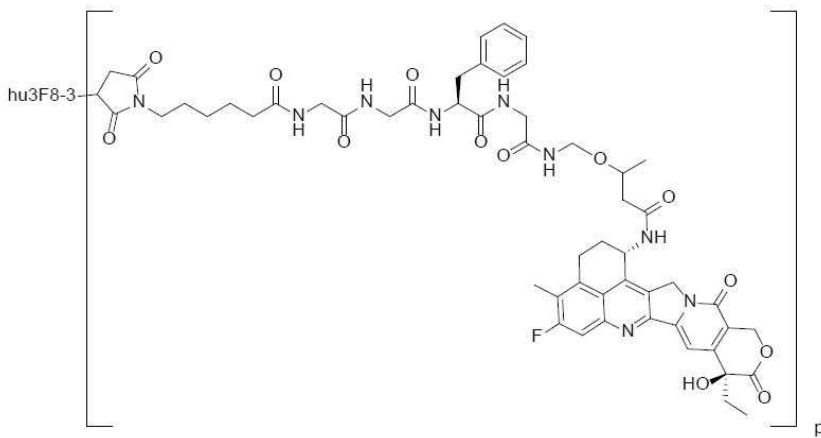
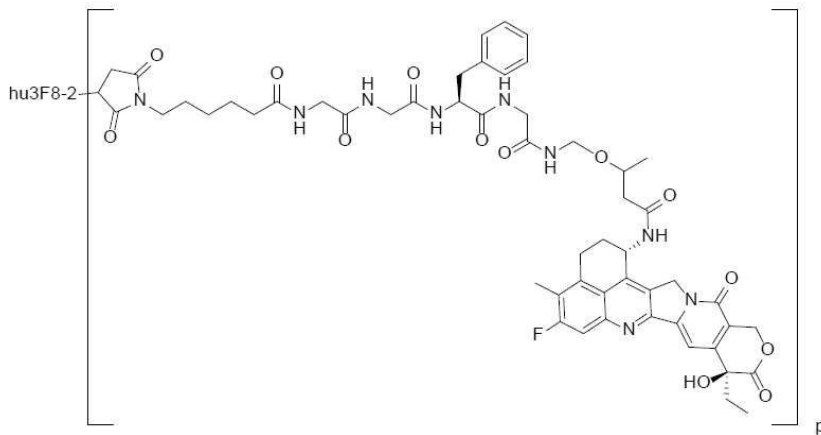
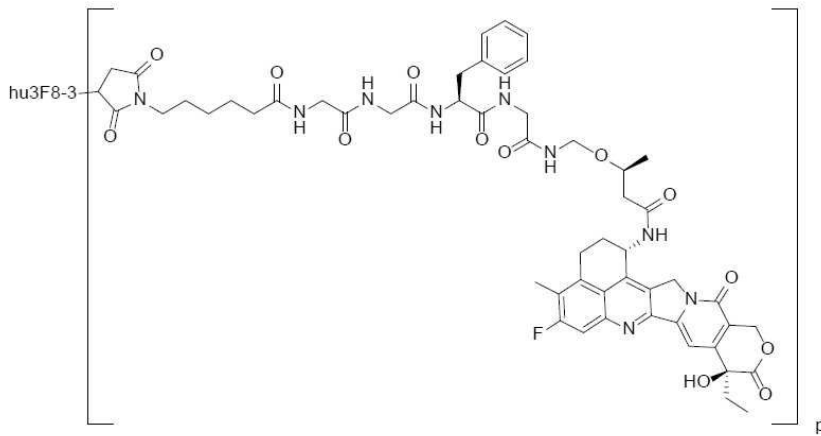
청구항 26

항-Her3 항체-약물 접합체가 하기 중에서 선택되는, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물:









여기서,

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택된다.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제를 제조하는데 있어서의, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 제27항에 따른 약제학적 조성물의 용도로서, 바람직하게는 상기 질병 또는 상태가 암이며; 보다 바람직하게는, 상기 암이 폐암(lung cancer), 신장암(kidney cancer), 요로암증(urinary tract carcinoma), 결장직장

암(colorectal cancer), 전립선암(prostate cancer), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 흑색종(melanoma), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 위암(gastric cancer) 및 식도암(esophageal cancer) 중에서 선택되는, 용도.

청구항 29

Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체에게 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 제27항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 방법으로 서, 바람직하게는 상기 질병 또는 상태가 암이며; 보다 바람직하게는, 상기 암이 폐암, 신장암, 요로암종, 결장직장암, 전립선암, 다형성 교모세포종, 난소암, 췌장암, 유방암, 흑색종, 간암, 방광암, 위암 및 식도암 중에서 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Her3에 특이적으로 결합하는 항체-약물 접합체 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 항체-약물 접합체를 사용하는 방법 및 이의 용도를 또한 제공한다.

배경 기술

[0002] 표피 성장 인자 수용체(EGFR)는 분자량이 약 170 kDa인 큰 막관통 당단백질이며, ErbB 수용체 패밀리의 구성원이다. EGFR 수용체 자체는 티로신 키나제로서 EGF, TNF-α 등의 리간드와 결합한 후 이량체(dimer)를 형성하고 인산화 전달을 통해 하류 신호(MAPK, PI3K, Stat 등의 경로)를 활성화할 수 있으며, 따라서 세포 성장이 유지되고 세포 분열과 증식이 촉진된다. ErbB 패밀리의 수용체는 보존적이므로, EGFR은 또한 상기 패밀리의 다른 단백질(예를 들어, Her2, Her3 및 Her4)과 이종이량체를 형성하여 세포 성장을 보다 광범위하게 조절할 수 있다.

[0003] Her3은 ErbB 패밀리의 구성원이며 세포 증식, 종양 전이 및 약물 내성에 중요한 역할을 한다. EGFR 및 Her2를 표적화하는 약물은 다양한 암의 완화에 큰 임상적 이점을 보여주지만, 암 치료를 위한 항-Her3 항체를 개발하려는 이전의 노력은 반복적으로 실패하였으며, 이는 단지 Her3의 치료와 이의 현재 진행 중인 접근 방식만으로는 종양 성장을 억제하기에 충분하지 않을 수 있음을 시사한다.

[0004] 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate; ADC)는 항체 또는 이의 항원-결합 단편(표적화), 링커 및 소분자 약물의 세 부분으로 이루어진다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 절단성 또는 비-절단성 링커를 통해 세포독성을 갖는 세포독소(cytotoxin)와 같은 생물활성 소분자 약물과 접합된다. 이는 소분자 약물의 높은 효율뿐만 아니라 관심 세포(표적 세포)를 표적화하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 특이성 또는 고도로 발현되는 항원에의 결합에 대한 특이성을 효과적으로 활용하며, 비-표적 세포에 대한 독성 부작용을 감소시키거나 방지한다. 이는 종양에 대한 항체-약물 접합체가 기존 종양 화학요법 약물에 비해 종양세포를 정확하게 표적화하고 비-종양세포에 대한 영향을 감소시킬 수 있다는 것을 의미한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 진화성, 특이성 등이 우수한 항-Her3 항체-약물 접합체(anti-Her3 antibody-drug conjugate)에 대한 필요성이 당해 분야에 여전히 남아있다.

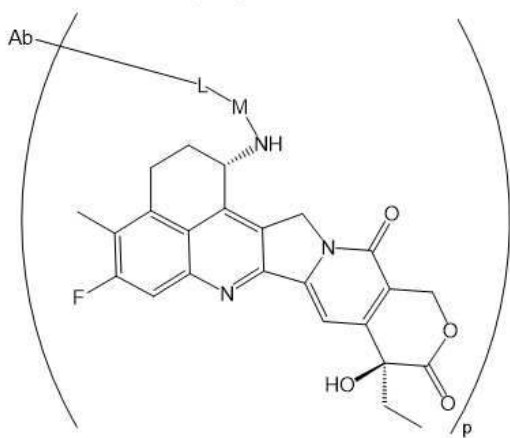
과제의 해결 수단

[0006] 한 양태에서, 본 출원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 제공하며, 상기 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I의 구조를 갖는다:

[0007] [화학식 I]

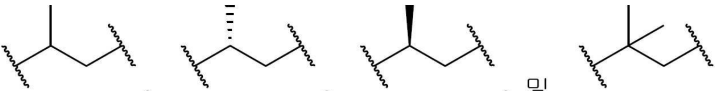
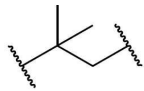
[0008] Ab-(L-M-D)_p

- [0009] 여기서,
- [0010] L 및 M은 링커 단위(linker unit)이고;
- [0011] D는 세포독성 약물(cytotoxic drug)이고;
- [0012] p는 평균 연결 수(average connection number)를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;
- [0013] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 상기 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I-1의 구조를 갖는다:
- [0015] [화학식 I-1]



- [0016]
- [0017] 여기서,
- [0018] L 및 M은 링커 단위이고;
- [0019] p는 평균 연결 수를 나타내고, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;
- [0020] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0021] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0022] (I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0023] (II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0024] (III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역.
- [0025] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

- [0026] (I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는
- [0027] (II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는
- [0028] (III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역.
- [0029] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 항원-결합 단편은 쥐 항체(murine antibody) 또는 이의 단편, 키메라 항체(chimeric antibody) 또는 항원-결합 단편, 인간화 항체(humanized antibody) 또는 항원-결합 단편, 또는 완전 인간 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 단편이다.
- [0031] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, sdAb, 이중특이적 항체(bispecific antibody), 또는 선형 항체 중에서 선택된다.
- [0032] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체는 단클론(monoclonal) 항체이다.
- [0033] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 유형의 것이다.
- [0034] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IgG1 유형의 것이다.
- [0035] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0036] (1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄; 또는
- [0037] (2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄; 또는
- [0038] (3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄, 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄.
- [0039] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0040] (1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는
- [0041] (2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는
- [0042] (3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄.
- [0043] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서
- [0044] M은 $-L^2-L^3-X-L^1-$ 이고;
- [0045] L^2 는 $-O-$ 또는 $-S-$ 이고;
- [0046] L^3 은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-$ 이고, m은 0, 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^3 이 메틸렌 단위를 포함하는 경우, L^3 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위는 $-C(O)-$ 또는 $-C(S)-$ 로 대체되고;
- [0047] L^1 은 $-(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-$ 이고, n은 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^1 이 메틸렌 단위를 포함할 수 있는 경우, L^1 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위는 $-C(O)-$ 또는 $-C(S)-$ 로 대체되고;
- [0048] X는 3-6원의 포화된 카보사이클릴, 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴, 또는 단일 결합 중에서 선택되고, 상기 3-6원의 포화된 카보사이클릴 및 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴은 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환되고;

- [0049] 각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} , 각각의 R^{2a} , 각각의 R^{2b} , 및 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,
- [0050] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.
- [0051] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴은 N, O 및 S 중에서 선택된 1-3개의 헤테로원자를 포함한다.
- [0052] 일부 구현예에서, 본 발명에서 L^3 및 X는 동시에 단일 결합은 아니다.
- [0053] 일부 구현예에서, 본 발명에서 L^2 는 -O-이다. 일부 구현예에서, 본 발명에서 L^2 는 -S-이다.
- [0054] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 링커 단위 M은 L^2 단부에서 링커 단위 L에 연결되고 L^1 단부에서 세포독성 약물 D에 연결된다.
- [0055] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^3 은 단일 결합, $-C(R^{1a})(R^{1b})-$, 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고,
- [0056] 각각의 R^{1a} 및 각각의 R^{1b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,
- [0057] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.
- [0058] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^3 은 단일 결합, $-C(R^{1a})(R^{1b})-$, 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고,
- [0059] 각각의 R^{1a} 및 각각의 R^{1b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, CH_3 , 또는 CH_2CH_3 일 수 있다.
- [0060] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^3 은 단일 결합, $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택된다.
- [0061] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^3 은  , 및  중에서 선택된다.
- [0062] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^3 은 단일 결합 중에서 선택된다.
- [0063] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,
- [0064] 각각의 R^{2a} 및 각각의 R^{2b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,
- [0065] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.
- [0066] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,

[0067] 각각의 R^{2a} 및 각각의 R^{2b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, CH_3 , 또는 CH_2CH_3 일 수 있다.

[0068] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^1 은 $-CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-CH(CH_3)C(O)-$, 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택된다.

[0069] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L^1 은 $-C(O)-$ 중에서 선택된다.

[0070] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 X 는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합이고,

[0071] 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R 로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

[0072] 각각의 R 은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 X 는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합이고,

[0074] 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로젠, CH_3 또는 CH_2CH_3 일 수 있다.

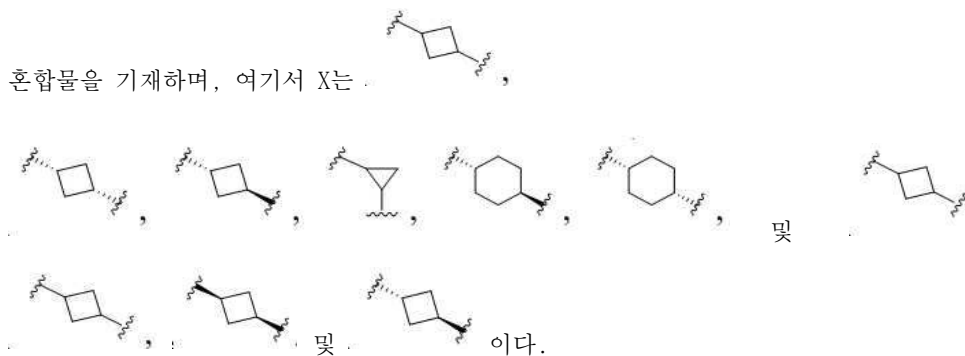
[0075] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 X 는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 또는 단일 결합이다.

[0076] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 X 는 단일 결합이다.

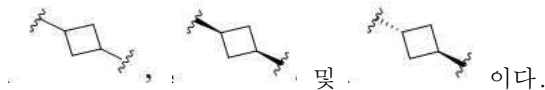
[0077] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 X 는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실, 바람직하게는 사이클로부틸이다.

[0078] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의

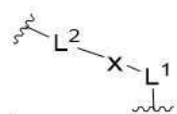
혼합물을 기재하며, 여기서 X 는



[0079] 및 이고; 바람직하게 X 는



[0080] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 $-M-$ 은 하기 중에서 선택된다:



[0081]

[0082] 여기서

[0083] L^2 는 $-O-$ 또는 $-S-$ 이고;

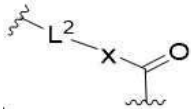
[0084] X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a}로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고;

[0085] L¹은 -C(R^{2a})(R^{2b})-, -C(R^{2a})(R^{2b})C(O)- 또는 -C(O)- 중에서 선택되고,

[0086] 각각의 R^{2a}, 각각의 R^{2b} 또는 각각의 R^{3a}는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0087] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0089]

[0090] 여기서

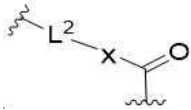
[0091] L²는 -O- 또는 -S-이고;

[0092] X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a}로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고;

[0093] 각각의 R^{3a}는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0094] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있다.

[0095] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



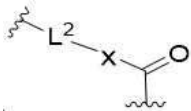
[0096]

[0097] 여기서

[0098] L²는 -O- 또는 -S-이고;

[0099] X는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 중에서 선택된다.

[0100] 일부 구현예에서, 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물이 본원에 기재되며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



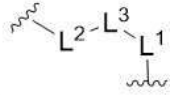
[0101]

[0102] 여기서

[0103] L²는 -O- 또는 -S-이고;

[0104] X는 중에서 선택된다.

[0105] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0106]

[0107]

여기서

[0108]

L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

[0109]

L^3 은 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고;

[0110]

L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고,

[0111]

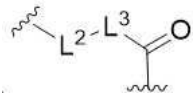
각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} , 각각의 R^{2a} 또는 각각의 R^{2b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

[0112]

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[0113]

일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0114]

[0115]

여기서

[0116]

L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

[0117]

L^3 은 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고;

[0118]

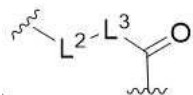
각각의 R^{1a} 및 각각의 R^{1b} 는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고,

[0119]

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[0120]

일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0121]

[0122]

여기서

[0123]

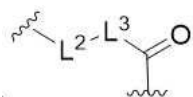
L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

[0124]

L^3 은 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택된다.

[0125]

일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0126]

[0127]

여기서

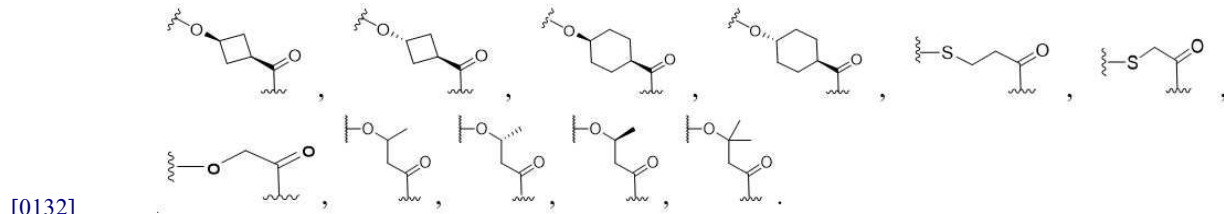
[0128]

L^2 는 -O- 또는 -S-이고;

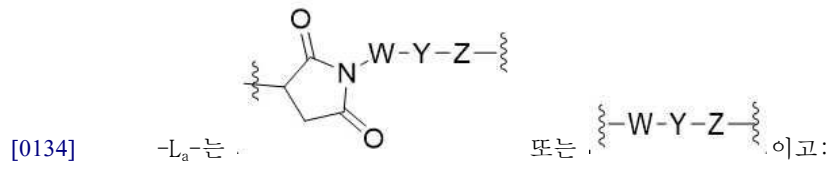
[0129] L^3 은  중에서 선택된다.

[0130] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her853 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 링커 단위 M은 L^2 단부에서 링커 단위 L에 연결된다.

[0131] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0133] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은 $-L_a-L_b-L_c-$ 이고,



[0135] 여기서

[0136] W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$ 이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$ 이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$ 이고,

[0137] wn은 1, 2, 3 또는 6이고,

[0138] W의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{wx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

[0139] yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고;

[0140] zn은 1, 2 또는 3이고,

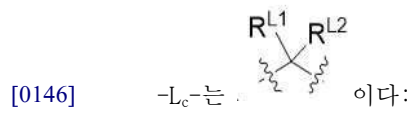
[0141] Z의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

[0142] $-Cyr-$ 는 3-10원의 포화된 카보사이클릴렌이고, 상기 $-Cyr-$ 은 비치환되거나 또는 1 내지 3개의 치환체 R^{cx} 에 의해 독립적으로 치환되고;

[0143] 각각의 R^{wa} , 각각의 R^{wb} , 각각의 R^{za} , 각각의 R^{zb} , 각각의 R^{wx} , 각각의 R^{zx} 및 각각의 R^{cx} 는 독립적으로 수소, 할로젠, $-OR^f$, 또는 R^f 로 임의로 치환된 C_{1-6} 지방족 그룹이고,

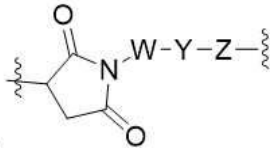
[0144] 각각의 R^f 은 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C_{1-6} 지방족 그룹임;

[0145] $-L_b-$ 는 2 내지 7개의 아미노산으로 이루어지는 펩티드 잔기이고, $-L_b-$ 의 펩티드 잔기는 페닐알라닌, 글리신, 알라닌, 발린, 시트룰린, 리신, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 아미노산으로 형성된 펩티드 잔기이고;



[0147] 여기서 R^{L1} 및 R^{L2} 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, -OH 및 C_{1-6} 지방족 그룹으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.

[0148] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은 $-L_a-L_b-L_c-$ 이고,



[0149] $-L_a-$ 는 이고:

[0150] 여기서

[0151] W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$ 이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$ 이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$ 이고,

[0152] wn은 1, 2, 3 또는 6이고,

[0153] W의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{wx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

[0154] yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고;

[0155] zn은 1, 2 또는 3이고,

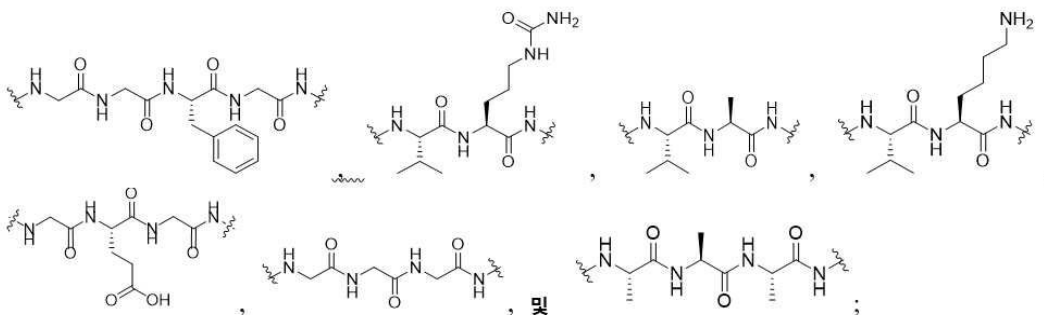
[0156] Z의 1개의 메틸렌 단위는 $-Cyr-$, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 $-C(O)-$ 에 의해 각각 독립적으로 대체되고;

[0157] $-Cyr-$ 는 3-10원의 포화된 카보사이클릴렌이고, 상기 $-Cyr-$ 은 비치환되거나 또는 1 내지 3개의 치환체 R^{cx} 에 의해 독립적으로 치환되고;

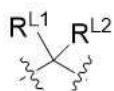
[0158] 각각의 R^{wa} , 각각의 R^{wb} , 각각의 R^{za} , 각각의 R^{zb} , 각각의 R^{wx} , 각각의 R^{zx} 및 각각의 R^{cx} 는 독립적으로 수소, 할로젠, $-OR^f$, 또는 R^f 로 임의로 치환된 C_{1-6} 지방족 그룹이고,

[0159] 각각의 R^f 은 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C_{1-6} 지방족 그룹임;

[0160] $-L_b-$ 는 하기로 이루어지는 그룹 중에서 선택되고:



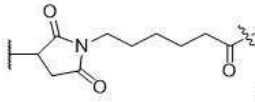
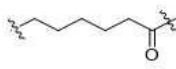
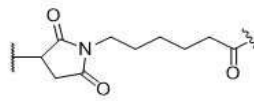
[0161] , 및 ;

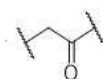


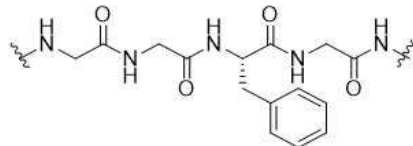
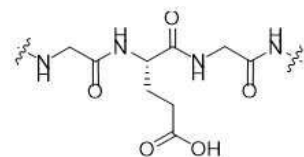
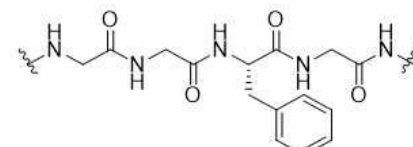
[0162] $-L_c-$ 는 이다:


[0163] 여기서 R^{L1} 및 R^{L2} 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, -OH 및 C_{1-6} 지방족 그룹 으로 이루어지는 그룹 중에서 선택 된다.

[0164] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의

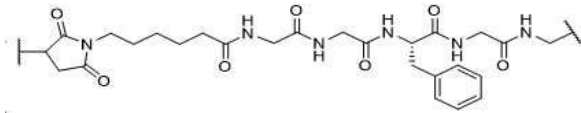
혼합물을 기재하며, 여기서 $-L_a-$ 는  또는 , 바람직하게는  이다.

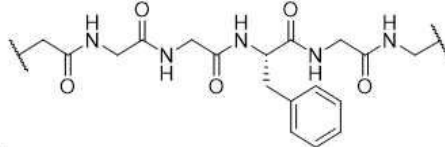
[0165] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 $-L_a-$ 는  이다.

[0166] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 $-L_b-$ 는  또는 , 바람직하게는  이다.

[0167] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 $-L_c-$ 는  이다.

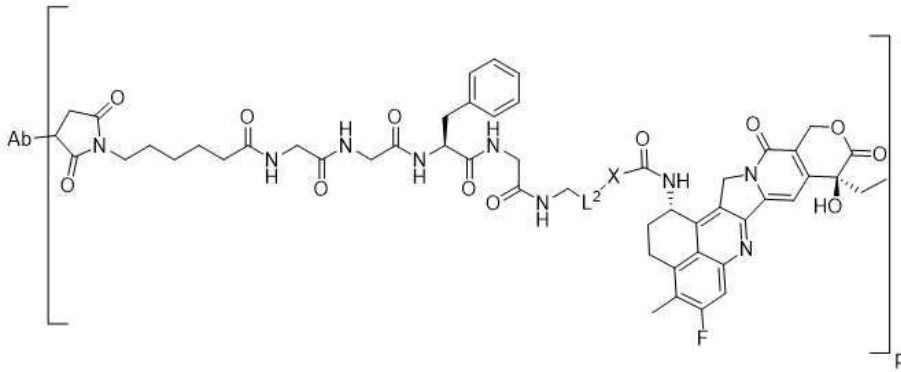
[0168] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 링커 단위 L은 L_a 단부에서 Ab에, 및 L_c 단부에서 링커 단위 M에 연결된다.

[0169] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은  이다.

[0170] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은  이다.

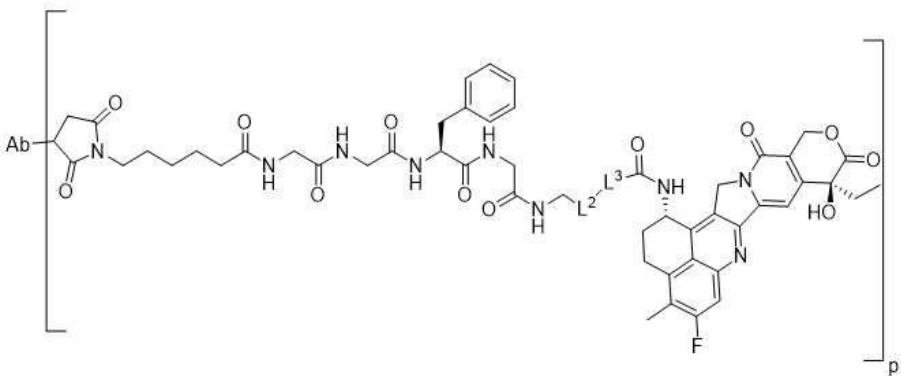
[0171] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 II-1 또는 II-2의 구조를 갖는다:

[0172] [화학식 II-1]



[0173]

[0174] [화학식 II-2]



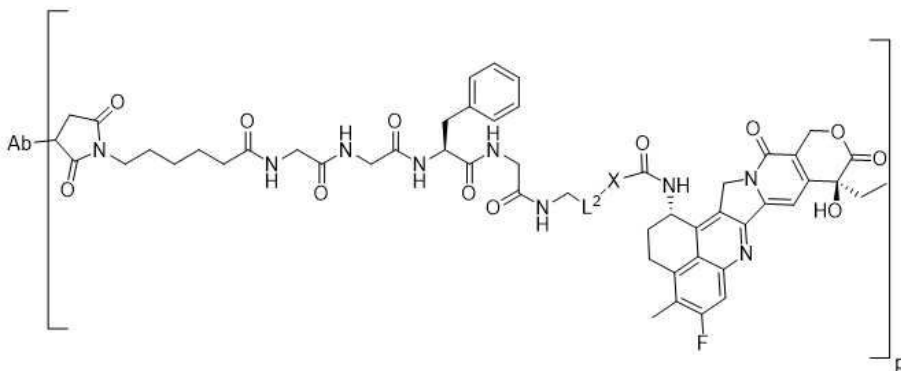
[0175]

[0176] 여기서

[0177] Ab, L², X, p 및 L³은 각각 본원의 구현예 중 어느 하나에 정의된 바와 같다.

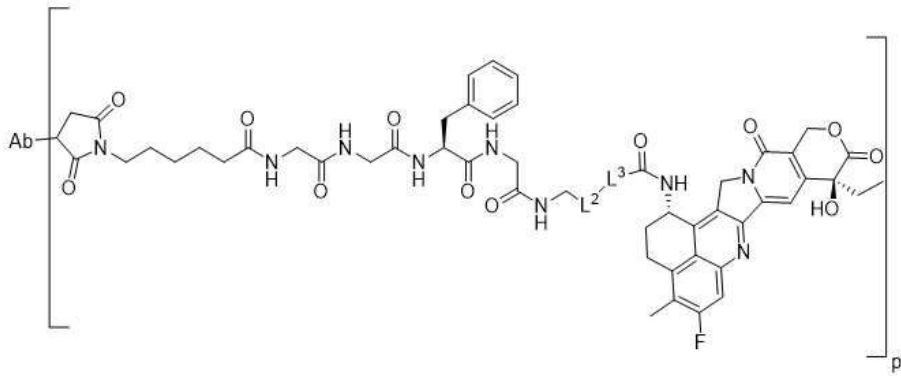
[0178] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 II-1 또는 II-2의 구조를 갖는다:

[0179] 화학식 II-1



[0180]

[0181] 화학식 II-2



[0182]

[0183] 여기서,

[0184] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

[0185] Ab는 본원의 구현예 중 어느 하나에 정의된 바와 같고;

[0186] L²는 -O- 또는 -S-이고;

[0187] X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a}로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고;

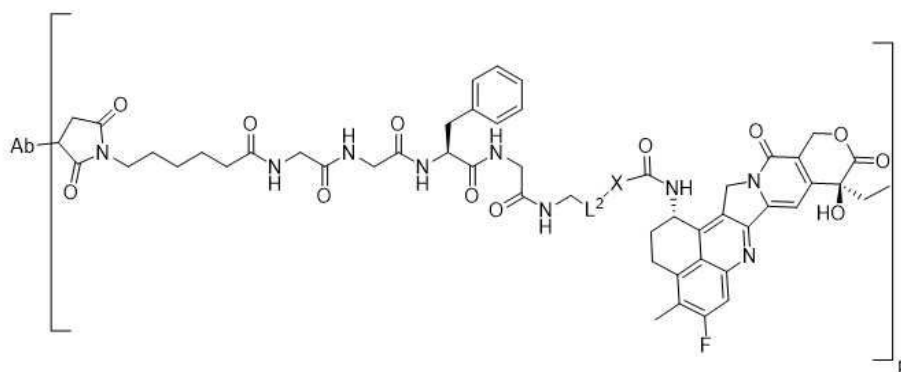
[0188] L³은 -C(R^{1a})(R^{1b})- 또는 -C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})- 중에서 선택되고;

[0189] 각각의 R^{1a}, 각각의 R^{1b} 또는 각각의 R^{3a}는 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0190] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로젠일 수 있다.

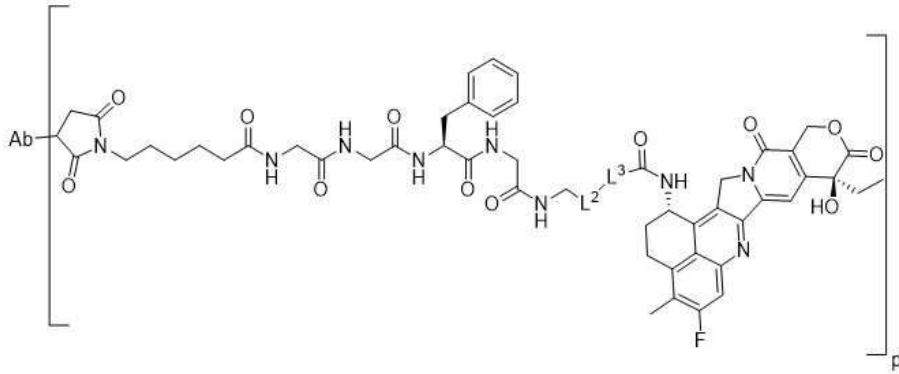
[0191] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 II-1 또는 II-2의 구조를 갖는다:

[0192] 화학식 II-1



[0193]

[0194] 화학식 II-2



[0195]

[0196] 여기서,

[0197] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

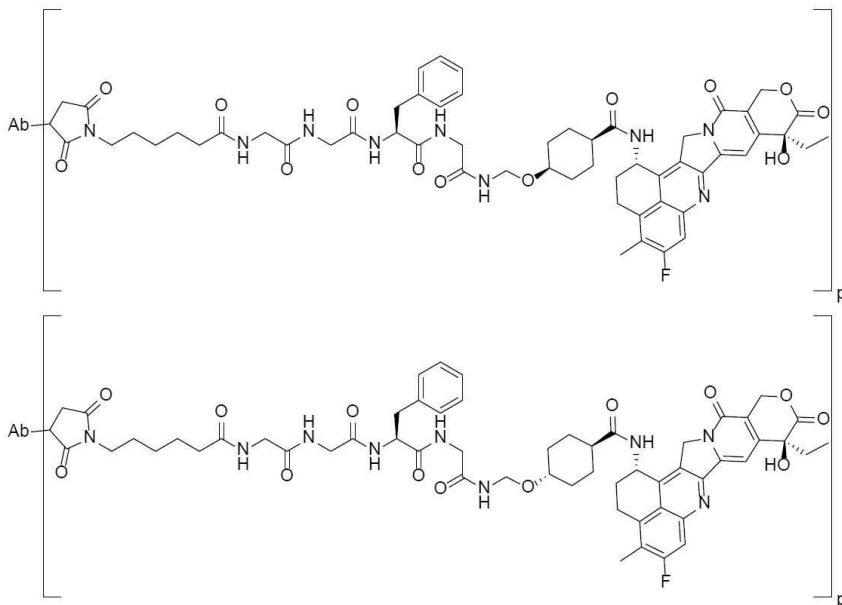
[0198] Ab는 본원의 구현예 중 어느 하나에 정의된 바와 같고;

[0199] L²는 -O- 또는 -S-이고;

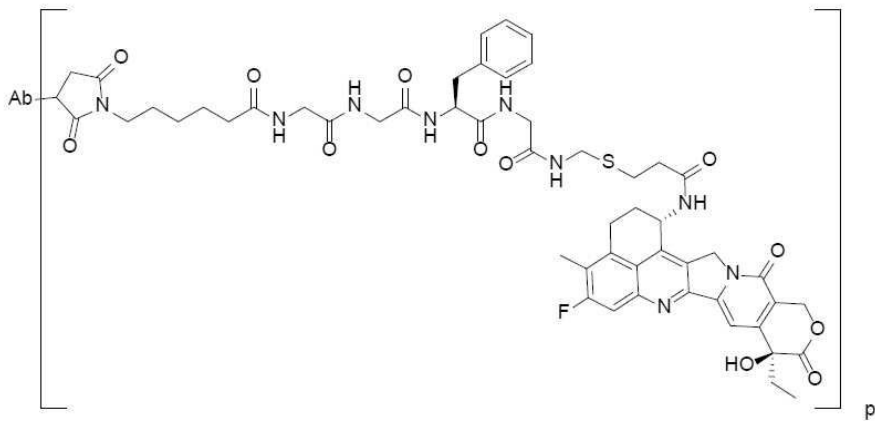
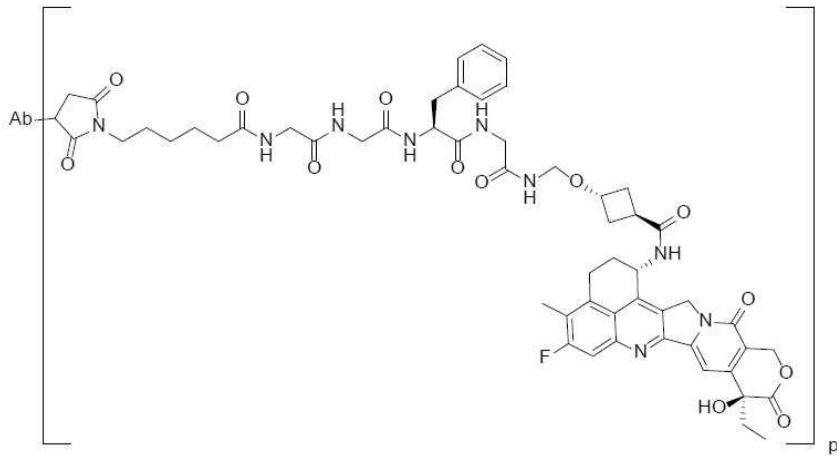
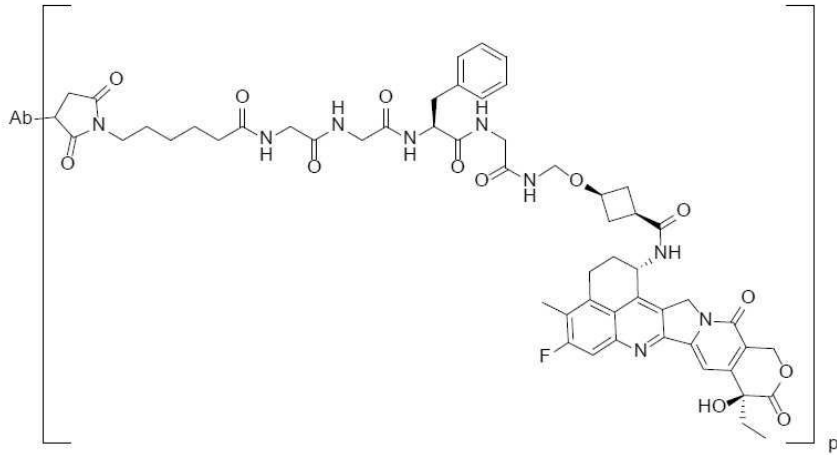
[0200] X는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 중에서 선택되고;

[0201] L³은 -CH₂-, -CH(CH₃)-, -C(CH₃)₂-, -CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂-, 또는 -C(CH₃)₂CH₂- 중에서 선택된다.

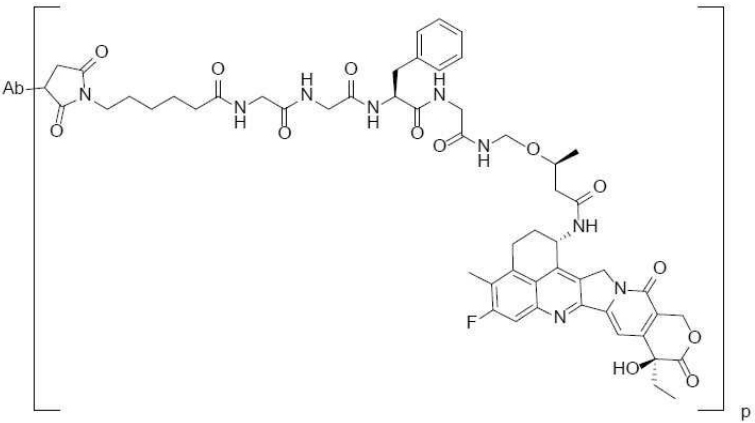
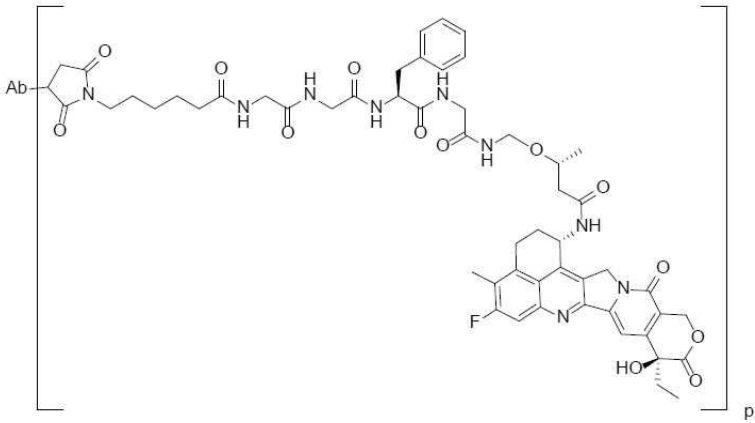
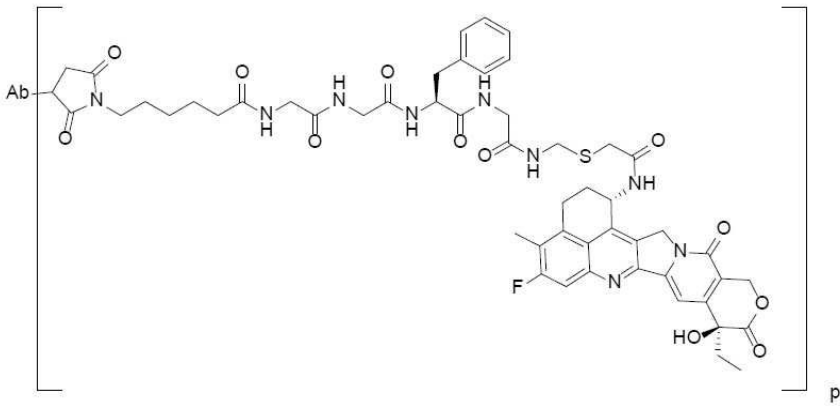
[0202] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 구조식 중에서 선택된다:



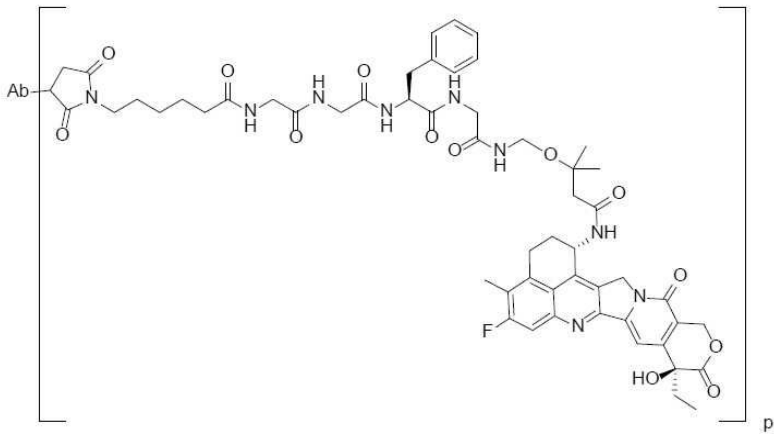
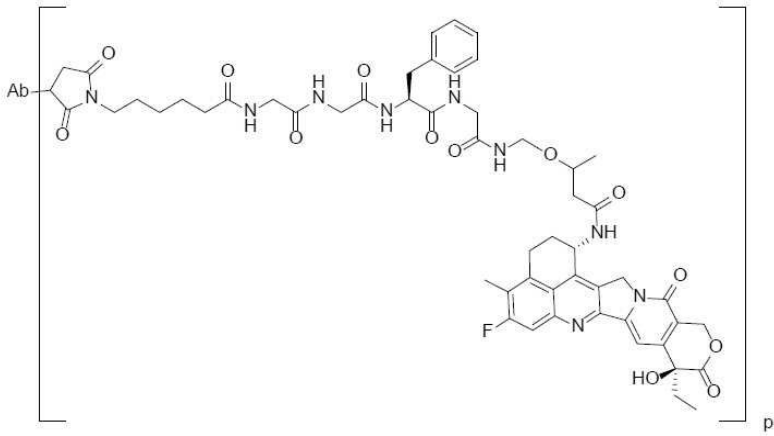
[0203]



[0204]



[0205]



[0206]

[0207]

여기서,

[0208]

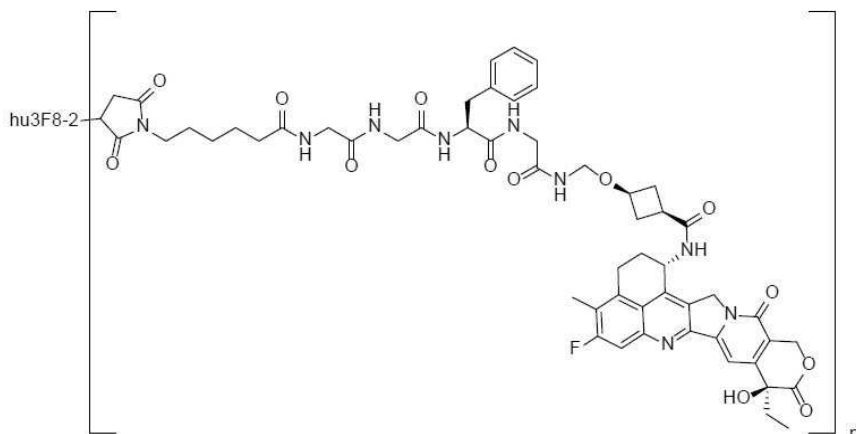
p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

[0209]

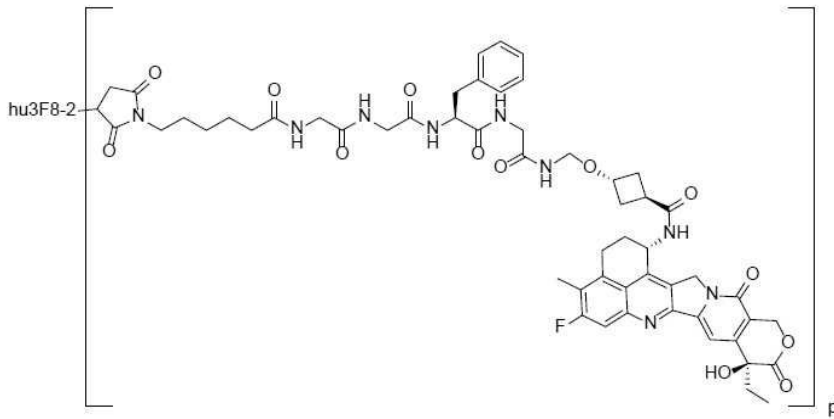
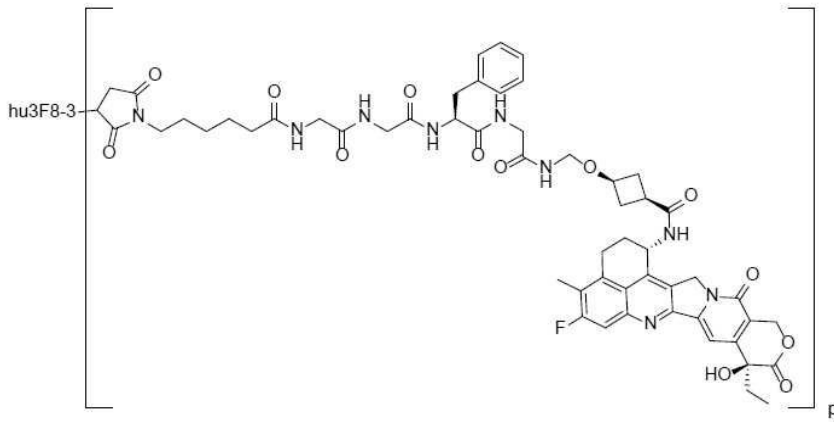
Ab는 본원의 구현예 중 어느 하나에 정의된 바와 같다.

[0210]

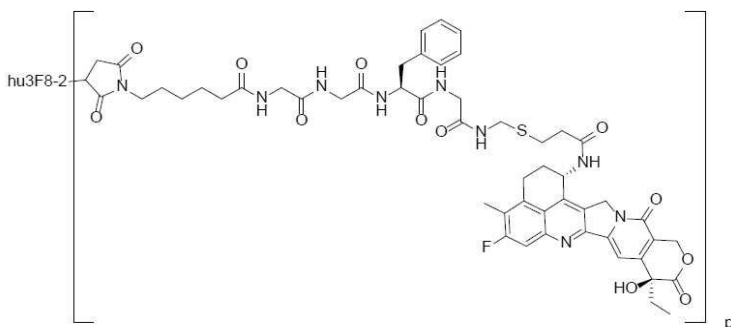
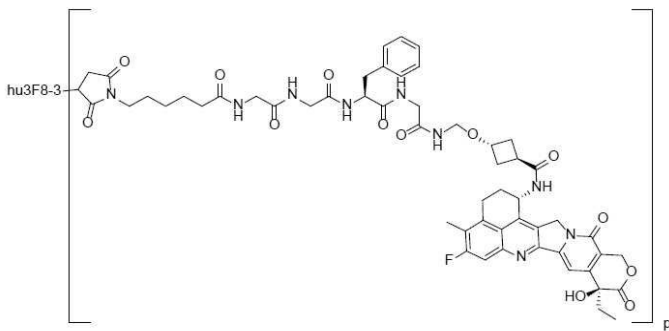
더욱 또 다른 양태에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 중에서 선택된다:



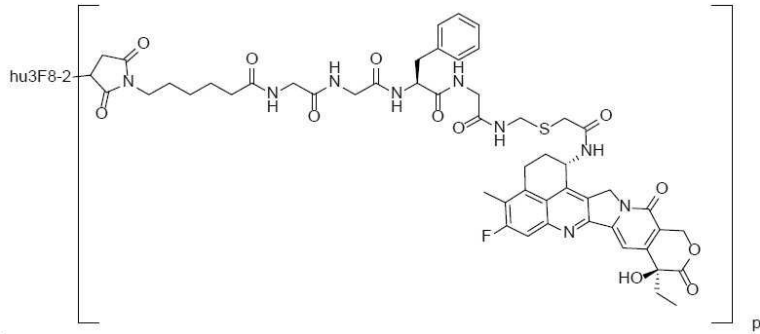
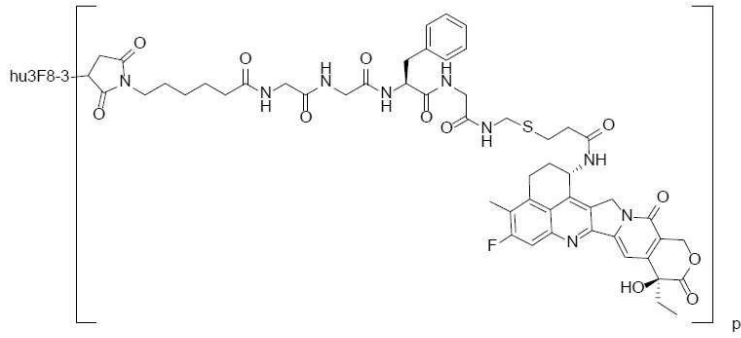
[0211]



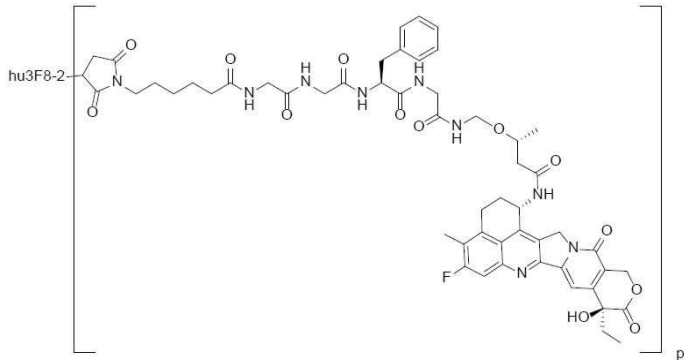
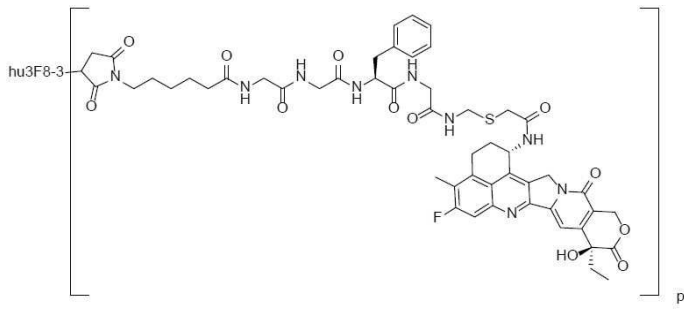
[0212]



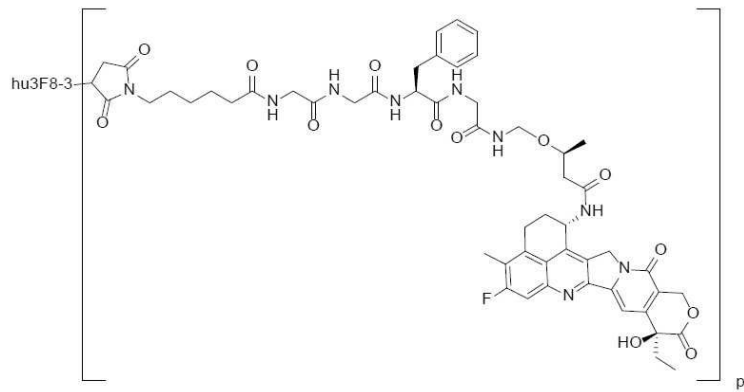
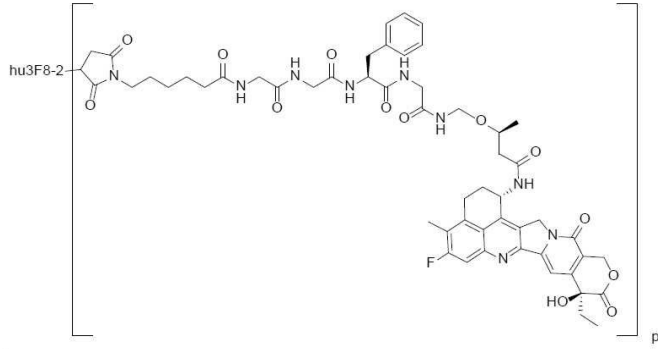
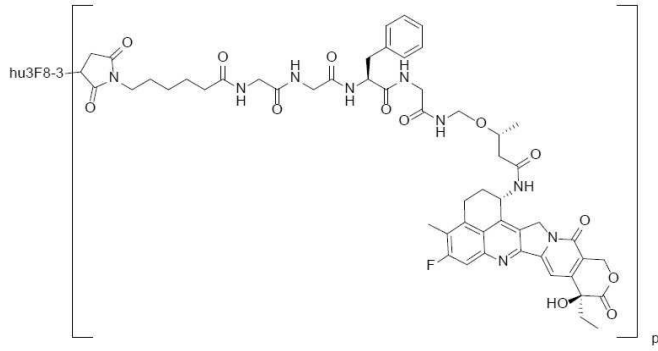
[0213]



[0214]

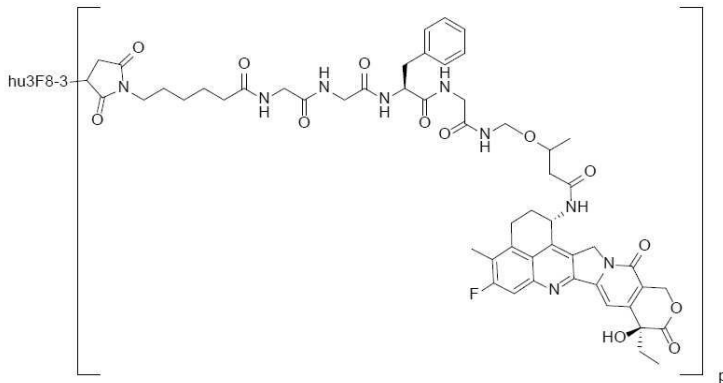
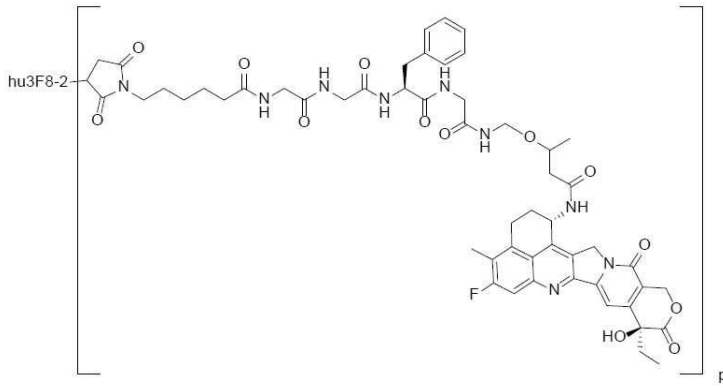


[0215]



[0216]

[0217]



[0218]

[0219]

[0220]

[0221]

[0222]

[0223]

[0224]

[0225]

[0226]

[0227]

여기서,

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택된다.

본 발명의 hu3F8-2 및 hu3F8-3은 항-Her2 항체이다. 항-Her2 항체 hu3F8-2는 서열번호 13에 제시된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 12에 제시된 경쇄 아미노산 서열을 포함하고; 항-Her2 항체 hu3F8-3은 서열번호 14에 제시된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 12에 제시된 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

일부 구현예에서, 본원에 기재된 평균 연결 수 p는 2 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 n은 3 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 n은 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4, 4 내지 5, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10의 정수 또는 소수일 수 있다.

더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제(medicament)를 제조하는데 있어서의 본원에 기재된 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공하며, 바람직하게 상기 질병 또는 상태는 암이다.

더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체(subject)에게 본원에 기재된 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 방법을 제공하며, 바람직하게 상기 질병 또는 상태는 암이다.

더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질환 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 본원에 기재된 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물을 제공하며, 바람직하게 상기 질병 또는 상태는 암이다.

일부 구현예에서, 본원에 기재된 암은 폐암(lung cancer), 신장암(kidney cancer), 요로암증(urinary tract carcinoma), 결장직장암(colorectal cancer), 전립선암(prostate cancer), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 흑색종

(melanoma), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 위암(gastric cancer) 및 식도암(esophageal cancer) 중에서 선택된다.

[0228] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물, 및 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 약제 조합을 제공한다.

[0229] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체-약물 접합체 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0230] 도 1은 쥐 3F8이 SP2/0-HER3 세포에 특이적으로 결합한다는 것을 도시한다.
- 도 2는 ELISA에 의해 측정된 인간 HER3, HER2 및 EGFR에 대한 쥐 3F8의 결합 친화도를 도시한다.
- 도 3은 ELISA에 의해 측정된 인간 및 원숭이 HER3을 인식하는 쥐 3F8의 효능을 도시한다.
- 도 4는 쥐 3F8이 NRG1-유도된 HER3 인산화를 차단하였음을 도시한다.
- 도 5는 쥐 3F8이 상이한 표면 HER3 수준으로 세포에 의해 신속하게 흡수되었음을 도시한다.
- 도 6은 항-HER3 항체가 BT474 피하 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제하였음을 도시한다.
- 도 7은 위 PDX 모델 GAS078의 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 이미지이다.
- 도 8은 6개 PDX 모델의 전형적인 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 이미지를 도시한다.
- 도 9A-9C는 hu3F8이 열, 산 및 반복된 동결-해동의 스트레스 시험 후에 결합 친화도를 유지한다는 것을 도시한다. 도 9A hu3F8의 3개 클론을 pH 3.5에서 0, 2, 4 및 6시간 동안 배양한 후, ELISA를 수행하여 결합 친화도를 측정하였다. 9B hu3F8의 3개 클론을 40°C에서 상이한 날 동안 배양한 후, ELISA를 수행하여 결합 친화도를 측정하였다. 도 9C hu3F8의 3개 클론을 3 또는 5주기 동안 반복적으로 동결-해동시킨 후, ELISA를 수행하여 결합 친화도를 측정하였다.
- 도 10은 항체-약물 접합체의 내재화(internalization) 활성을 도시한다.
- 도 11A-11C는 항체-약물 접합체 ADC-1-X1 및 ADC-1-X2에 의한 HER3 표적의 종양 세포의 시험관내 증식 억제에 대한 시험을 도시하고; 도 11A는 Her3의 발현이 높은 HCC1569 종양 세포를 도시하고; 도 11B는 Her3의 발현이 높은 MDA-MB-453 종양 세포를 도시하고; 도 11C는 Her3을 발현하지 않는 MDA-MB-231 종양 세포를 도시한다.
- 도 12A-12B는 HCC1569 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체 ADC-1-X1 및 ADC-1-X2의 생체내 항-종양 효능을 도시한다. 도 12A는 종양 부피의 변화를 도시한다. 도 12B는 종양 성장 억제를 도시한다.
- 도 13A-13B는 Colo205 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체 ADC-1-X1 및 ADC-1-X2의 생체내 항-종양 효능을 도시한다. 도 13A는 종양 부피의 변화를 도시한다. 도 13B는 종양 성장 억제를 도시한다.
- 도 14는 NCI-H441 폐암 세포 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체 ADC-1-X2의 생체내 항-종양 효능을 도시한다.
- 도 15는 인간 폐암 LU1542 피하 이종이식 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체 ADC-1-X2의 생체내 항-종양 효능을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0231] 이하, 본 발명의 구현예를 구체적인 실시예를 참조하여 기재하며, 본 발명의 다른 장점 및 효과는 본 명세서의 개시내용으로부터 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

[0232] 용어의 정의

[0233] 달리 언급하지 않는 한, 본 발명의 구현예는 모두 당해 기술 분야에 속하는 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포생물학, 생화학 및 면역학의 기존 기술을 사용할 것이다.

[0234] 본 발명의 이해를 돕기 위해 몇 가지 기술적, 과학적 용어를 구체적으로 하기와 같이 정의한다. 본원에서 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통

상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 당업계 정의 및 용어에 대해, 숙련가는 구체적으로 문헌[Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel)]를 참조할 수 있다. 아미노산 잔기에 대한 약어는 통상적으로 사용되는 20개의 L-아미노산 중 하나를 나타내기 위해 당업계에서 사용되는 표준 3문자 및/또는 1문자 코드이다. 본원(청구항 포함)에 사용된 단수형은 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다.

- [0235] "약"이라는 용어는 일반적으로 명시된 값의 0.5%-10% 초과 또는 미만, 예를 들어 명시된 값의 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5% 또는 10% 초과 또는 미만까지의 변동을 의미한다.
- [0236] 수용체 티로신-단백질 키나제 ERBB-3(ERBB3)으로도 공지된 "인간 상피 성장 인자 수용체 3(Her3)"이라는 용어는 EGFR/erBB 패밀리의 구성원이다. 다른 erBB 패밀리의 구성원인 Her2 및 EGFR과 달리, Her3 자체에는 키나제 활성이 없다. 따라서 Her3은 이중이량체로서 이의 하류 활성을 촉발하기 위해 이의 키나제 활성 구성원인 EGFR 또는 Her2에 결합해야 한다. 천연 리간드 NRG1에 결합하면 Her3은 형태 변화, 이중이량체화 및 인산화를 겪은 다음 신호 전달을 통해 MAPK, PI3K/Akt 및 PLC γ 를 활성화한다.
- [0237] "항체"라는 용어는 원하는 생물활성(bioactivity)을 갖는 임의의 형태의 항체를 지칭한다. 따라서 이는 가장 넓은 의미로 사용되며 구체적으로는 단클론 항체(전장(full-length) 단클론 항체 포함), 다클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 인간화 항체, 완전 인간 항체, 키메라 항체, 및 카멜화된(camelized) 단일-도메인 항체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0238] "단클론 항체"는 실질적으로 동종의 항체 집단(population)으로부터 획득된 항체를 지칭한다, 즉 집단을 구성하는 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 매우 특이적이고 단일 항원 에피토프(epitope)를 표적화한다. 대조적으로, 통상적인(다클론) 항체 제제는 전형적으로 다양한 에피토프를 표적화하는(또는 이에 특이적인) 다수의 항체를 포함한다. 수식어 "단클론성"은 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 획득된 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의해 항체를 생산하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0239] "전장 항체"라는 용어는 자연적으로 발생하는 경우 4개의 펩티드 쇄를 포함하는 면역글로불린 분자를 지칭하며, 여기에는 2개의 중(H) 쇄(전체 길이 약 50-70 kDa)와 2개의 경(L) 쇄(전체 길이 약 25 kDa)가 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서는 VH로 약칭함)과 중쇄 불변 영역(본원에서는 CH로 약칭함)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 이루어진다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 VL로 약칭함)과 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 높은 가변성을 갖는 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)과, CDR에 의해 이격되어 있는 프레임워크 영역/framework region; FR)이라고 불리는 보다 보존적인 영역으로 추가로 나눌 수 있다. 각각의 VH 또는 VL 영역은 아미노 말단부터 카복실 말단까지 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어 효과기 세포)와 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)의 결합을 포함하여, 면역글로불린이 숙주 조직 또는 인자에 결합하는 것을 매개할 수 있다.
- [0240] "CDR"이라는 용어는 항체 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역에는 각각 3개의 CDR이 존재하는 데, 중쇄 가변 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 경쇄 가변 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로 명명된다. 본 발명의 항체의 가변 영역 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는, 항체의 3차원 구조 및 CDR 루프의 위상에 기초한 Chothia(Chothia et al., (1989) Nature 342: 877-883; Al-Lazikani et al., Standard Conformations for the canonical Structure of immunoglobulins, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), 항체 서열 가변성에 기초한 Kabat(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health(1987)), AbM(University of Bath), Contact(University College London), 국제 Immunogenetics 데이터베이스(IMGT)(1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212) 및 다수의 결정 구조를 사용하는 친화성 전파 클러스터링에 기초한 North CDR 정의를 포함하는 다수의 주지된 방식 중 하나를 사용하여 결정될 수 있다. 본원에 개시된 항체의 CDR의 경계는 당업계의 임의의 방식(예를 들어, 상이한 할당 시스템 또는 조합)에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0241] 상이한 할당 시스템에 의해 결정된 동일한 항체의 가변 영역에서 CDR의 경계가 상이할 수 있다는 점에 유의해야

한다. 즉, 상이한 할당 시스템에 의해 정의된 동일한 항체의 가변 영역의 CDR 서열은 상이하다. 따라서, 본 발명에 정의된 특정 CDR 서열을 갖는 항체를 정의하는 경우, 항체의 범위는 또한 가변 영역 서열이 특정 CDR 서열을 포함하지만 청구된 CDR 경계가 상이한 방식(예를 들어, 상이한 할당 시스템 또는 조합)의 적용으로 인해 본 발명에서 정의된 특정 CDR 경계와 상이한 항체도 포함한다.

- [0242] 항체("모 항체")의 "항원-결합 단편"이라는 용어는, 일반적으로 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 보유하는 상기 모 항체의 항원-결합 영역 또는 가변 영역(예를 들어, 하나 이상의 CDR)의 적어도 하나의 단편을 포함하는 항체의 단편 또는 유도체를 포함한다. 항체의 결합 단편의 예는 비제한적으로, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 이중특이적 항체; 선형 항체; scFv와 같은 단쇄 항체 분자; 및 나노바디 및 항체 단편에 의해 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 결합 단편 또는 유도체는 일반적으로 항원-결합 활성이 몰 농도 기준으로 표현되는 경우 항원-결합 활성의 적어도 10%를 유지한다. 바람직하게, 결합 단편 또는 유도체는 모 항체의 항원-결합 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 이상을 유지한다. 또한, 항체의 항원-결합 단편은 이의 생물활성을 크게 변경시키지 않는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환(항체의 "보존적 변이체" 또는 "기능-보존적 변이체"로 지칭됨)을 포함할 수 있는 것으로 고려된다.
- [0243] "키메라 항체"는 제1 항체의 가변 도메인과 제2 항체의 불변 도메인을 갖는 항체이며, 상기 제1 항체와 제2 항체는 상이한 종으로부터 유래된다. 전형적으로, 가변 도메인은 설치류와 같은 실험 동물의 항체("모 항체")로부터 획득되고, 불변 도메인 서열은 인간 항체로부터 획득되므로, 생성되는 키메라 항체는 모 설치류 항체와 비교하여 인간 대상체에서 면역 반응 부작용을 유발할 가능성이 적다.
- [0244] "인간화 항체"는 인간 및 비-인간(예를 들어, 마우스 및 래트) 항체 모두의 서열을 함유하는 항체 형태를 지칭한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 상기 고가변 루프의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 프레임워크 영역(FR)의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 인간 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 임의로 포함할 수 있다.
- [0245] "완전 인간 항체"라는 용어는 인간 면역글로불린 서열만을 포함하는 항체를 지칭한다. 완전 인간 항체는 마우스, 마우스 세포 또는 마우스 세포에서 유래된 하이브리도마에서 생성되는 경우 마우스 당쇄(glycochain)를 함유할 수 있다. 마찬가지로, "마우스 항체"는 마우스 면역글로불린 서열만을 포함하는 항체를 지칭한다. 대안적으로, 완전 인간 항체는 래트, 래트 세포 또는 래트 세포로부터 유래된 하이브리도마에서 생성되는 경우 래트 당쇄를 함유할 수 있다. 마찬가지로, "래트 항체"는 래트 면역글로불린 서열만을 포함하는 항체를 지칭한다.
- [0246] 항체의 "아이소타입"이라는 용어는 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 제공되는 항체 유형(예를 들어, IgM, IgE 및 IgG(예를 들어, IgG1, IgG2 또는 IgG4))을 지칭한다. 아이소타입은 또한 Fc 기능을 변경시키기 위해, 예를 들어 효과기 기능(effector function) 또는 Fc 수용체에 대한 결합을 향상시키거나 약화시키기 위해 변형이 이루어진 이들 유형 중 하나의 변형된 형태를 포함한다.
- [0247] "Fc 영역"이라는 용어는 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 이 용어에는 고유 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역이 포함된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG 중쇄의 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실 말단까지 연장된다. 그러나 Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다(이 단락의 넘버링은 EU 지수로도 공지된 EU 넘버링 시스템을 따른다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)).
- [0248] "교차 반응"이라는 용어는 인간, 원숭이 및/또는 쥐(마우스 또는 래트) 기원의 동일한 표적 분자의 항원 단편에 결합하는 것을 지칭한다. 따라서 "교차 반응"은 다른 종에서 발견되는 동일한 분자 X와의 중간 반응으로 이해되어야 한다. 인간 Her3R, 및 원숭이 및/또는 쥐(마우스 또는 래트) Her3R을 인식하는 단클론 항체의 교차반응 특이성은 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0249] "친화도" 또는 "결합 친화도"라는 용어는 결합 쌍의 구성원 사이의 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 상대 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 속도 상수 대 결합 속도 상수(각각 k_{dis} 및 k_{on})의 비인 평형 해리 상수(KD)로 표시될 수 있다. 친화도는 당업계에 공지된 일반적인 방법으로 측정될 수 있다. 친화도를 측정하는 한 가지 구체적인 방법은 본원에 기재된 ForteBio 동역학 결합 분석이다.
- [0250] 단백질 또는 세포에 "결합하지 않는다"라는 용어는 단백질 또는 세포에 결합하지 않거나 높은 친화도로 결합하지 않는 것, 즉 1.0 X 10⁻⁶ M 이상, 보다 바람직하게는 1.0 X 10⁻⁵ M 이상, 보다 바람직하게는 1.0 X 10⁻⁴ M

이상, 보다 바람직하게는 1.0×10^{-3} M 이상, 및 보다 바람직하게는 1.0×10^{-2} M 이상의 K_D 로 단백질 또는 세포에 결합하지 않는 것을 의미한다.

[0251] IgG 항체의 "고 친화도"라는 용어는 1.0×10^{-6} M 이하, 보다 바람직하게는 5.0×10^{-8} M 이하, 보다 바람직하게는 1.0×10^{-8} M 이하 및 5.0×10^{-9} M 이하, 및 보다 바람직하게는 1.0×10^{-9} M 이하의, 항원에 대한 K_D 를 지칭한다. 다른 항체 하위 유형의 경우, "고 친화도" 결합은 변할 수 있다. 예를 들어, IgM 하위 유형의 "고 친화도" 결합은 10^{-6} M 이하, 바람직하게는 10^{-7} M 이하, 및 보다 바람직하게는 10^{-8} M 이하의 K_D 를 지칭한다.

[0252] "세포독성 약물"이라는 용어는 일반적으로 독성 약물을 지칭하며, 세포독성 약물은 정상적인 성장을 방해할 만큼 강한 종양 세포 내의 화학 분자일 수 있다. 세포독성 약물은 충분히 높은 농도에서 종양 세포를 죽일 수 있다. "세포독성 약물"에는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소와 같은 독소, 방사성 동위원소(예를 들어, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 또는 Lu의 방사성 동위원소), 독성 약물, 화학요법 약물, 항생제 및 핵산분해 효소가 포함될 수 있으며; 예를 들어, 세포독성 약물은 비제한적으로 캄토테신 유도체(이는 예를 들어 캄토테신 유도체 엑사테칸(화학명: (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]이미다조[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온)일 수 있다)를 포함한 독성 약물일 수 있다.

[0253] "링커 단위" 또는 "링커 구조"라는 용어는 일반적으로 한쪽 단부는 리간드에 연결되고 다른 쪽 단부는 세포독성 약물에 연결되거나, 또는 세포독성 약물에 연결되기 전에 다른 링커에 연결되는 화학적 구조 단편 또는 결합을 지칭한다. 리간드의 직접 또는 간접 연결은 그룹이 공유 결합을 통해 리간드에 직접 연결되고, 또한 링커 구조를 통해 리간드에 연결될 수도 있음을 의미할 수 있다. 예를 들어, 링커 구조는 본원에 기재된 -Lax-Lb-Lc- 및/또는 -La-Lb-Lc-로 나타낸 구조일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커 구조(acid-labile linker structure)(예를 들어, 하이드라존), 프로테아제 민감성(예를 들어, 펩티다제 민감성) 링커 구조, 광불안정성 링커 구조, 디메틸 링커 구조 또는 디설파이드-함유 링커 구조를 포함하는 화학 구조 단편 또는 결합이 링커 구조로서 사용될 수 있다.

[0254] "다른 분자 모이어티에 임의로 연결되는" 구조라는 용어는 일반적으로 구조가 임의의 다른 화학 구조에 연결되지 않거나, 또는 구조가 상기 구조와 상이한 하나 이상의 다른 화학 구조(예를 들어, 본원에 기재된 리간드)에 연결(예를 들어 화학 결합 또는 링커 구조를 통해)됨을 의미한다.

[0255] "리간드-약물 접합체"라는 용어는 일반적으로 리간드가 안정한 연결 단위를 통해 생물학적 활성 세포독성 약물에 연결되어 있음을 의미한다. 본 출원에서, "리간드-약물 접합체"는 항체-약물 접합체(ADC)일 수 있으며, 이는 단클론 항체 또는 항체 단편이, 생물학적으로 활성인 세포독성 약물과 안정적인 연결 단위를 통해 연결되어 있음을 의미할 수 있다.

[0256] 본 출원에서, "메틸렌"이라는 용어는 일반적으로 1개의 탄소 원자를 갖는 그룹으로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 유도된 잔기를 지칭한다. 메틸렌은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 대체되지 않을 수 있다. "알킬렌"이라는 용어는 일반적으로 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 모 알칸으로부터 유도된 2개의 잔기를 갖는 포화된 선형 또는 분지된 지방족 탄화수소 그룹을 지칭하며, 이는 1 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지된 그룹, 예를 들어 1 내지 12개의 탄소 원자(예를 들어, 1 내지 6개의 탄소 원자)를 함유하는 알킬렌일 수 있다. 알킬렌의 비제한적인 예는 비제한적으로, 메틸렌(-CH₂-), 1,1-에틸리텐(-CH(CH₃)-), 1,2-에틸리텐(-CH₂CH₂-), 1,1-프로필리텐(-CH(CH₂CH₃)-), 1,2-프로필리텐(-CH₂CH(CH₃)-), 1,3-프로필리텐(-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-부틸리텐(-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,5-부틸리텐(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-) 등을 포함한다. 알킬렌 그룹은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 대체되지 않을 수 있다. 예를 들어, 치환되는 경우, 치환체에 의한 치환은 임의의 이용 가능한 연결 지점에서 수행될 수 있으며, 치환체는 바람직하게는 독립적으로 알킬, 알케닐, 알킬닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소 중 하나 이상으로부터 임의로 선택되고, 이는 예를 들어 수소, 경수소, 중수소, 삼중수소, 할로젠, -NO₂, -CN, -OH, -SH, -NH₂, -C(O)H, -CO₂H, -C(O)C(O)H, -C(O)CH₂C(O)H, -S(O)H, -S(O)₂H, -C(O)NH₂, -SO₂NH₂, -OC(O)H, -N(H)SO₂H 또는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있다.

- [0257] "아릴렌"이라는 용어는 일반적으로 방향족 고리의 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 유도된 2개의 잔기를 갖는 그룹을 지칭한다. "방향족 고리"라는 용어는 공액 π -전자 시스템을 갖는 6원 내지 14원의 전-탄소 모노사이클릭 고리 또는 융합된 폴리사이클릭 고리(즉, 인접한 탄소 원자 쌍을 공유하는 고리)를 지칭할 수 있고, 6- 내지 10-원, 예를 들어 벤젠 및 나프탈렌일 수 있다. 방향족 고리는 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있으며, 상기 모 구조에 연결된 고리는 아릴 고리이다. 아릴은 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 치환되는 경우 치환체는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어지는 그룹 중에서 독립적으로 선택된 그룹 중 하나 이상이다.
- [0258] 본 출원에서, "헤테로아릴렌"이라는 용어는 일반적으로 헤테로방향족 고리의 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 유도된 2개의 잔기를 갖는 그룹을 지칭한다. "헤테로방향족 고리"라는 용어는 1 내지 4개의 헤테로원자 및 5 내지 14개의 고리 원자를 포함하는 헤테로방향족 시스템을 지칭하며, 상기 헤테로원자는 산소, 황 및 질소로 이루어지는 그룹 중에서 선택될 수 있다. 헤테로아릴렌은 5- 내지 10-원일 수 있고, 5- 또는 6-원일 수 있으며, 예를 들어 푸라닐, 티에닐, 피리디닐, 피롤릴, N-알킬피롤릴, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸릴 및 테트라졸릴일 수 있다. 헤테로아릴 고리는 아릴, 헤테로사이클릭 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있으며, 상기 모 구조에 연결된 고리는 헤테로아릴 고리이다. 헤테로아릴렌은 임의로 치환되거나 비치환될 수 있고, 치환되는 경우 치환체는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어지는 그룹 중에서 독립적으로 선택된 그룹 중 하나 이상이다.
- [0259] "헤테로사이클릴렌"이란 용어는 일반적으로 안정하고 비-방향족인 3- 내지 7-원 모노사이클릭 구조, 융합된 7- 내지 10-원 바이사이클릭 헤테로사이클릭 구조 또는 가교된 6- 내지 10-원 바이사이클릭 헤테로사이클릭 구조를 지칭한다. 이들 사이클릭 구조는 포화되거나 부분적으로 포화될 수 있고, 탄소 원자 외에 하나 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있으며, 상기 헤테로원자는 산소, 황 및 질소로 이루어지는 그룹 중에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 구조는 상기에 정의된 바와 같이 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유한다. 헤테로사이클릭 사이클릭 구조의 원자를 지칭하는 데 사용되는 경우, "질소"라는 용어는 치환 반응을 겪은 질소를 포함할 수 있다. 헤테로사이클릴렌은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0260] "카보사이클릴렌"이란 용어는 일반적으로 탄소 고리의 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 유도된 2개의 잔기를 갖는 그룹을 지칭한다. "탄소 고리"라는 용어는 일반적으로 포화되거나 또는 부분적으로 불포화된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 사이클릭 탄화수소를 지칭하며, 이는 3 내지 20개의 탄소 원자를 함유할 수도 있고, 3 내지 12개의 탄소 원자를 함유할 수도 있고, 3 내지 10개의 탄소 원자를 함유할 수도 있으며, 3 내지 8개의 탄소 원자, 예를 들어 3 내지 6개의 탄소 원자를 함유할 수도 있다. 모노사이클릭 탄소 고리의 비제한적인 예에는 사이클로프로판, 사이클로부탄, 사이클로펜탄, 사이클로헥센, 사이클로헥센, 사이클로헥사디엔, 사이클로헵탄, 사이클로헵타트리엔, 사이클로옥탄 등이 포함되며; 폴리사이클릭 탄소 고리는 스피로, 융합 및 가교 탄소 고리를 포함할 수 있다. 예를 들어, "3-6원의 포화된 카보사이클릴"에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로프로필렌, 사이클로부틸렌, 사이클로펜틸렌 또는 사이클로헥실렌이 포함된다. 카보사이클릴 및 카보사이클릴렌은 치환되거나 비치환될 수 있다. 예를 들어, 이들은 하나 이상의 할로젠, C_{1-6} 지방족 그룹, 또는 할로젠으로 치환된 C_{1-6} 지방족 그룹으로 치환될 수 있다.
- [0261] 본 출원에서, "부분적으로 불포화된"이라는 용어는 일반적으로 사이클릭 구조가 고리 분자 사이에 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 함유한다는 것을 의미한다. "부분적으로 불포화된"이라는 용어는 다중 불포화 부위를 갖는 사이클릭 구조를 포함하지만, 본원에 정의된 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하려는 의도는 아니다. "불포화된"이라는 용어는 모이어티가 1 이상의 불포화도를 갖는다는 것을 의미한다.
- [0262] "할로젠"이라는 용어는 일반적으로 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭하며, 예를 들어 불소 또는 염소일 수 있다.
- [0263] "지방족 그룹"이라는 용어는 일반적으로 탄소수 1 내지 12의 선형 탄화수소, 분지된 탄화수소 또는 사이클릭 탄화수소를 지칭하며, 탄화수소는 완전히 포화된 탄화수소 또는 하나 이상의 불포화된 단위를 갖는 탄화수소일 수 있으나, 불포화된 단위는 방향족 그룹이 아니다. 예를 들어, 적합한 지방족 그룹은 치환되거나 비치환된 선형,

분지된 또는 사이클릭 알킬, 알케닐, 알키닐 및 이들 그룹의 혼합물, 예를 들어 (사이클로알킬)알킬, (사이클로알케닐)알킬 또는 (사이클로알킬)알케닐을 포함할 수 있다. 예를 들어, 지방족 그룹은 1-12, 1-8, 1-6, 1-4 또는 1-3개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어, "C₁₋₆ 지방족 그룹"은 비제한적으로, 1-6개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분지된 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐을 포함하는 1-6개의 탄소 원자를 갖는 상술한 바와 같은 지방족 그룹, 예를 들어 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 3급-부틸, 펜틸 및 헥실을 지칭한다.

[0264] 본 출원에서, "임의의" 또는 "임의로"라는 용어는 일반적으로 이후에 기재되는 사건 또는 상황이, 반드시 아니지만, 발생할 수 있고, 상기 기재가 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, "알킬로 임의로 치환된 헤테로사이클릭 그룹"은 알킬이, 반드시 아니지만, 존재할 수 있고, 상기 기재가 헤테로사이클릭 그룹이 알킬로 치환되거나 치환되지 않는 경우를 포함할 수 있음을 의미한다.

[0265] "치환된"이라는 용어는 일반적으로 그룹 내 하나 이상의 수소 원자, 예를 들어 최대 5개(예를 들어, 1-3개)의 수소 원자가 각각 독립적으로 상응하는 수의 치환체로 치환되는 것을 의미한다. 치환체는 가능한 화학적 위치에만 있으며, 당업자는 과도한 노력 없이도 (실험이나 이론에 의해) 가능하거나 불가능한 치환을 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 치환체는 유리 수소를 갖는 아미노 또는 하이드록시가 불포화된(예를 들어, 올레핀) 결합을 갖는 탄소 원자에 결합되면 불안정해질 수 있다.

[0266] 본 출원에서, "0개 이상(예를 들어, 0개 또는 적어도 1개, 0개 또는 1개, 또는 0개)의 메틸렌 단위가 대체된다"라는 용어는 일반적으로 구조가 하나 이상의 메틸렌 단위를 포함하는 경우, 상기 하나 이상의 메틸렌 단위가 대체되지 않거나 메틸렌이 아닌 하나 이상의 그룹(예를 들어, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NH-, -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -PH-, -P(=O)H-, -NHSO₂-, -SO₂NH-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -N=N-, -C=N-, -N=C- 또는 -C(=N₂)-)으로 대체될 수 있음을 의미한다.

[0267] 그룹 내 하나 이상의 수소 원자, 예를 들어 최대 5개(예를 들어, 1-3개)의 수소 원자는 각각 독립적으로 상응하는 수의 치환체로 치환된다. 치환체는 가능한 화학적 위치에만 있으며, 당업자는 과도한 노력 없이도 (실험이나 이론에 의해) 가능하거나 불가능한 치환을 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 치환체는 유리 수소를 갖는 아미노 또는 하이드록시가 불포화된(예를 들어, 올레핀) 결합을 갖는 탄소 원자에 결합되면 불안정해질 수 있다.

[0268] "약제학적으로 허용되는 염"이라는 용어는 일반적으로 본원에 개시된 약물 접합체의 염을 지칭한다. 이러한 염은 포유동물에 사용될 때 안전하고/하거나 유효할 수 있고 필요한 생물학적 활성을 가질 수 있으며, 본원에 개시된 항체-약물 접합체는 산과 염을 형성할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염의 비제한적인 예에는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오데이트, 설페이트, 바이설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트, 아스코르베이트, 옥살레이트, 니트레이트, 소르베이트, 하이드로포스페이트, 디하이드로포스페이트, 살리실레이트, 하이드로시트레이트, 타르트레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 메실레이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트 및 p-톨루엔설포네이트가 포함된다.

[0269] "용매화물" 또는 "용매 화합물"이란 용어는 일반적으로 본원에 개시된 약물 접합체 및 하나 이상의 용매 분자에 의해 형성된 약제학적으로 허용되는 용매화물을 지칭하며, 용매 분자의 비제한적인 예에는 물, 에탄올, 아세토니트릴, 이소프로판올, DMSO 및 에틸 아세테이트가 포함된다.

[0270] "약물 로딩"이라는 용어는 일반적으로 리간드당 로딩된 세포독성 약물의 평균 양을 지칭하고 세포독성 약물 대 항체의 비로 표현될 수도 있으며, 세포독성 약물 로딩의 범위는 리간드(Ab) 당 0 내지 12(예를 들어, 1-10) 세포독성 약물일 수 있다. 본 출원의 구현예에서, 약물 로딩은 Na로서 표현되며, 예시적으로는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 평균일 수 있다. 커플링 반응 후 ADC 분자당 약물 로딩을 UV/가시광선 분광학, 질량 분석법, ELISA 분석 및 HPLC와 같은 기존 방법으로 특성화할 수 있다.

[0271] "약제학적으로 허용되는 담체"는 대상체에게 무독성인 활성 성분 이외의 약학 제형(formulation) 또는 조성물 내 성분을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0272] "포함하다" "포함하는", "함유하다" 또는 "함유하는"이라는 용어는 일반적으로 다른 요소를 배제하지 않고 명시적으로 지정한 특징을 포함하도록 의도된다. "이상" 및 "이하"라는 용어는 일반적으로 해당 숫자 자체가 포함되는 상황을 지칭한다.

[0273] "대상체"에는 인간 또는 비-인간 동물이 포함된다. "비-인간 동물"이라는 용어는 모든 척추동물, 예를 들어 포

유동물 및 비-포유동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "시노"라는 용어는 시노물구스 원숭이를 지칭한다.

[0274] 하나 이상의 다른 치료제와 "병용하여" 투여하는 것은 동시(공-) 투여 및 임의의 순서의 순차적 투여를 포함한다.

[0275] "치료학적 유효량", "치료학적 유효 용량" 및 "유효량"은 세포, 조직 또는 대상체에게 단독으로 또는 다른 치료제와 병용 투여되는 경우 질병 또는 상태의 하나 이상의 증상 또는 질병 또는 상태의 발병을 예방 또는 개선하는데 유효한 본 발명의 Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양을 지칭한다. 치료학적 유효량은 또한 증상의 개선을 유발하기에 충분한 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양, 예를 들어 관련 상태를 치료, 치유, 예방 또는 개선하거나 또는 상기와 같은 상태의 치료, 치유, 예방 또는 개선을 촉진하기 위한 양을 지칭한다. 활성 성분을 개인에게 단독으로 투여하는 경우, 치료학적 유효 용량은 단지 성분의 양만을 지칭한다. 병용 투여하는 경우, 치료학적 유효 용량이란 활성 성분을 병용 투여하든, 순차적으로 투여하든, 동시에 투여하든 관계없이 치료 효과를 생성시키는 활성 성분을 합친 양을 지칭한다. 치료제의 유효량은 진단 지수 또는 매개변수를 적어도 10%, 일반적으로 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 및 가장 바람직하게는 적어도 50% 까지 증가시킬 것이다.

[0276] 본원에서 사용된 "암"이라는 용어는 비정상적으로 높은 수준의 증식 및 성장을 나타내는 세포 그룹을 지칭한다. 암은 양성(양성 종양이라고도 함), 전암성 또는 악성일 수 있다. 암세포는 고형암 세포일 수도 있고 백혈병 암 세포일 수도 있다. 본원에 사용된 "종양"이라는 용어는 암을 포함하는 하나 이상의 세포를 지칭한다. "종양 성장"이라는 용어는 암을 포함하는 하나 이상의 세포의 증식 또는 성장을 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 이는 암의 크기 또는 정도의 상응하는 증가를 초래한다.

[0277] **항-Her3 항체**

[0278] 본 출원은 시험관내 및 생체내에서 종양 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있고 안전성이 양호한 신규의 항-HER3 항체를 개시한다. HER3 항체 3F8은 인간 HER3을 과발현하는 SP2/0 세포로 면역화된 마우스 하이브리도마에서 확인되었다. 3F8은 나노물 결합 친화도로 인간 및 원숭이 HER3를 인식하고 다른 ERBB 패밀리에 대해 높은 선택성을 갖는다. 또한, 상이한 HER3 수준을 가진 세포는 HER3를 빠르고 효과적으로 흡수할 수 있다. HER3는 이상적인 ADC 약물의 필수 특성으로 간주된다. PET 이미지 연구에서는 [⁸⁹Zr]Zr-3F8이 PDX 모델의 종양에 유의미하게 축적되는 것으로 나타났으며, 이는 3F8이 종양 세포에 세포독성을 가져오는 유효 벡터일 수 있음을 나타낸다. 3F8 및 hu3F8은 PDX 모델에서 상기 결합 친화도, 선택성 및 종양 억제 특징을 유지한다. hu3F8은 양호한 전개성을 가지며, 반복적인 동결-해동 처리, 산 배양 및 40°C 보관의 스트레스 시험에서 결합 친화도, 응집 및 번역-후 변형에 거의 변화가 없음을 보여준다.

[0279] 본 발명에서 "항-Her3 항체", "항-Her3", "Her3 항체" 또는 "Her3에 결합하는 항체"라는 용어는 항체가 Her3을 표적화하는 진단 및/또는 치료제로 사용될 수 있기에 충분한 친화도로 Her3 단백질 또는 이의 단편과 결합할 수 있는 항체를 지칭한다.

[0280] 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 출원 번호 PCT/CN2021/099998(이의 내용은 전체가 본원에 참고로 포함된다)에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에 사용되는 항체의 CDR 서열은 PCT/CN2021/099998에 기재된 항체 hu3F8-2의 CDR 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물 또는 용도에 사용되는 항체의 가변 영역 서열은 PCT/CN2021/099998에 기재된 항체 hu3F8-1의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물 또는 용도에 사용되는 항체의 가변 영역 서열은 PCT/CN2021/099998에 기재된 항체 hu3F8-2의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물 또는 용도에 사용되는 항체의 가변 영역 서열은 PCT/CN2021/099998에 기재된 항체 hu3F8-3의 가변 영역 서열을 포함한다.

[0281] 본원의 실시예에 사용된 비제한적이고 예시적인 항체는 PCT/CN2021/099998에 기재된 인간화 항체 hu3F8-1, hu3F8-2 및 hu3F8-3 중에서 선택되며, 이의 아미노산 서열은 하기 표에 제시되어 있다.

[0282] 본원에 사용된 바와 같이, hu3F8-1, hu3F8-2 및 hu3F8-3은 각각 PCT/CN2021/099998의 클론 1(클론-1), 클론 2(클론-2) 및 클론 3(클론-3)에 상응한다.

[0283] 인간화 항-Her3 항체의 아미노산 서열(KABAT 방식)

인간화 항체	hu3F8-1	hu3F8-2	hu3F8-3
HCDR1	서열 번호 1	서열 번호 1	서열 번호 1
HCDR2	서열 번호 2	서열 번호 2	서열 번호 2
HCDR3	서열 번호 3	서열 번호 3	서열 번호 3
LCDR1	서열 번호 4	서열 번호 4	서열 번호 4
LCDR2	서열 번호 5	서열 번호 5	서열 번호 5
LCDR3	서열 번호 6	서열 번호 6	서열 번호 6
VH	서열 번호 7	서열 번호 9	서열 번호 10
VL	서열 번호 8	서열 번호 8	서열 번호 8
HC	서열 번호 11	서열 번호 13	서열 번호 14
LC	서열 번호 12	서열 번호 12	서열 번호 12

[0284]

[0285]

항체를 생산하기에 적합한 임의의 방법을 사용하여 본 발명의 항체를 생산할 수 있다. 임의의 적합한 형태의 Her3은 항체 생산을 위한 면역원(항원)으로 사용될 수 있다. 예로서 제한 없이, 임의의 Her3 변이체 또는 이의 단편이 면역원으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 쥐 단클론 항-인간 Her3 항체를 생산하는 하이브리도마 세포는 당업계에 주지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 설치류(예를 들어, 마우스)로부터 유래된 항체는 생체내에서 치료제로 사용될 때 항체의 원치 않는 면역원성을 유도할 수 있다. 이러한 항체를 반복적으로 사용하면 치료 항체에 대한 인체의 면역 반응이 유도된다. 이러한 면역 반응으로 인해 적어도 치료 효능이 상실되고, 심한 경우에는 잠재적으로 치명적인 알레르기 반응이 나타날 수 있다. 설치류 항체의 면역원성을 감소시키는 한 가지 방법은 마우스 가변 영역이 인간 불변 영역에 융합된 키메라 항체를 생산하는 것을 포함한다(Liu et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-43). 그러나 키메라 항체에서 온전한 설치류 가변 영역의 보존은 여전히 환자에게 유해한 면역원성을 유도할 수 있다. 설치류 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR) 루프를 인간 프레임워크에 접목시키는 것(즉, 인간화)이 설치류 서열을 추가로 최소화하는 데 사용되었다(Jones et al., (1986) Nature 321: 522; Verhoeyen et al., (1988) Science 239: 1534).

[0286]

일부 구현예에서, 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 제조된 쥐 단클론 하이브리도마 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA는 관심의 쥐 하이브리도마로부터 획득될 수 있고 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 비-쥐(예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.

[0287]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 키메라 Her3 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 하이브리도마 기원의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인간 IgG 불변 영역에 작동적으로 연결하여 키메라 중쇄 및 키메라 경쇄를 획득함으로써 제조될 수 있다(예를 들어, Cabilly 등의 미국특허 번호 4,816,567 참조). 일부 구현예에서, 본 발명의 키메라 항체는 임의의 인간 IgG 하위유형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 바람직하게는 IgG4 중에서 선택될 수 있는 불변 영역을 포함한다.

[0288]

일부 구현예에서, 본 발명의 키메라 Her3 항체는 키메라 중쇄 발현 플라스미드와 키메라 경쇄 발현 플라스미드를 "혼합 및 합치"시켜 발현 세포를 형질감염시킴으로써 수득될 수 있다. 이러한 "혼합 및 합치" 항체의 Her3 결합은 상술한 결합 분석 및 기타 통상적인 결합 분석(예를 들어, ELISA)을 사용하여 시험될 수 있다.

[0289]

본원에 기재된 인간화 항체의 경우, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 쥐 CDR 영역을 인간 생식계열 프레임워크 영역에 삽입할 수 있다. Winter 등의 미국특허 번호 5,225,539 및 Queen 등의 미국특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370을 참조하시오.

[0290]

일부 구현예에서, 아미노산 변화는 아미노산 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 아미노산 결실, 삽입 또는 치환에 의해 돌연변이되었으나, 상술한 항체의 아미노산 서열(특히 상기 서열에 제시된 CDR 영역 중의)에 여전히 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 특정 서열에 제시된 CDR 영역과 비교할 때, 본 발명의 항체는 CDR 영역에 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이(결실, 삽입 또는 치환)를 갖는다.

[0291]

일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체를 생산할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는

인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0292] 일부 구현예에서, 시스템인 조작에 의해 변형된 항체, 예를 들어 "설폰-MAb"를 생산할 필요가 있을 수 있으며, 상기 항체의 하나 이상의 잔기는 시스템인 잔기로 치환된다.

[0293] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되어 있고 쉽게 이용가능한 다른 비-단백질 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체 유도체화에 적합한 모이어티에는 수용성 중합체가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 공중합체, 카복시메틸 셀룰로오스, 글루칸, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리-1,3-디옥산, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 글루칸 또는 폴리(n-비닐피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이의 혼합물이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0294] **약물 접합체**

[0295] 본 출원은 하기로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 효과를 가질 수 있는 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 제공한다: (1) 종양 세포의 시험관내 증식에 대한 억제 활성을 갖고; (2) 표적화 억제를 갖고; (3) 혈장 안정성을 갖고; (4) 생체내 종양-억제 효과를 갖고; (5) 방관자 효과(bystander effect)를 갖고; (6) 수송체에 의한 수송을 억제하는 능력을 갖고; (7) 생체내 종양 표적화 능력을 갖고; (8) 생체내에서 양호한 안전성을 갖는다.

[0296] 본 출원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 제공하며, 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I의 구조를 갖는다:

[0297] 화학식 I

[0298] $Ab-(L-M-D)_p$

[0299] 여기서,

[0300] L 및 M은 링커 단위이고;

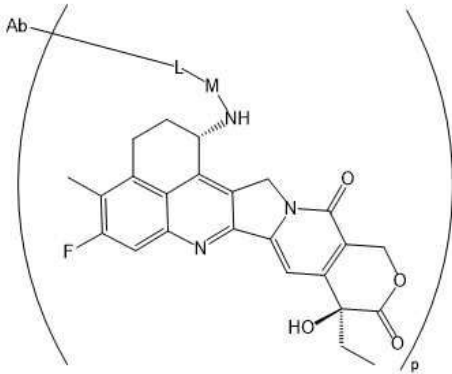
[0301] D는 세포독성 약물이고;

[0302] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

[0303] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함하고; (I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 보다 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다: (1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄.

[0304] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 제공하며, 상기 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 I-1의 구조를 갖는다:

[0305] 화학식 I-1



[0306]

[0307] 여기서,

[0308] L 및 M은 링커 단위이고;

[0309] p는 평균 연결 수를 나타내고, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

[0310] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함하고; (I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 보다 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다: (1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄.

[0311] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서

[0312] M은 $-L^2-L^3-X-L^1-$ 이고;

[0313] L^2 는 $-O-$ 또는 $-S-$ 이고;

[0314] L^3 은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-$ 이고, m은 0, 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^3 이 메틸렌 단위를 포함하는 경우, L^3 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위는 $-C(O)-$ 또는 $-C(S)-$ 로 대체되고; 바람직하게, L^3 은 단일 결합, $-C(R^{1a})(R^{1b})-$, 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고; 보다 바람직하게, L^3 은 단일 결합, $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택되고;

[0315] L^1 은 $-(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-$ 이고, n은 1, 2, 또는 3 중에서 선택되고, 상기 L^1 이 메틸렌 단위를 포함할 수 있는 경우, L^1 의 0 또는 1개의 메틸렌 단위는 $-C(O)-$ 또는 $-C(S)-$ 로 대체되고; 바람직하게, L^1 은 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$, $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$, 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고; 보다 바람직하게, L^1 은 $-CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-CH(CH_3)C(O)-$, 또는 $-C(O)-$ 중에서 선택되고;

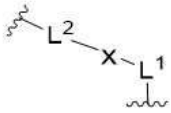
[0316] X는 3-6원의 포화된 카보사이클릴, 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴, 또는 단일 결합 중에서 선택되고, 상기 3-6원의 포화된 카보사이클릴 및 3-6원의 포화된 헤테로사이클릴은 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환되고; 바

람직하게, X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a}로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합이고; 보다 바람직하게, X는 3-6원의 포화된 카보사이클릴 또는 단일 결합이고;

[0317] 각각의 R^{1a}, 각각의 R^{1b}, 각각의 R^{2a}, 각각의 R^{2b}, 및 각각의 R^{3a}는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0318] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있다.

[0319] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0320]

[0321] 여기서

[0322] L²는 -O- 또는 -S-이고; 바람직하게, L²는 -O-이고;

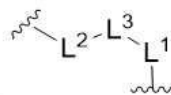
[0323] X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a}로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고; 바람직하게, X는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 중에서 선택되고; 보다 바람직하게, X는 사이클로프로필이고; 보다 바람직하게, X는 사이클로부틸이고; 보다 바람직하게, X는 사이클로헥실이고;

[0324] L¹은 -C(R^{2a})(R^{2b})-, -C(R^{2a})(R^{2b})C(O)- 또는 -C(O)- 중에서 선택되고; 바람직하게, L¹은 -C(O)-이고,

[0325] 각각의 R^{2a}, 각각의 R^{2b} 또는 각각의 R^{3a}는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0326] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있다.

[0327] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0328]

[0329] 여기서

[0330] L²는 -O- 또는 -S-이고; 바람직하게, L²는 -O-이고; 바람직하게, L²는 -S-이고;

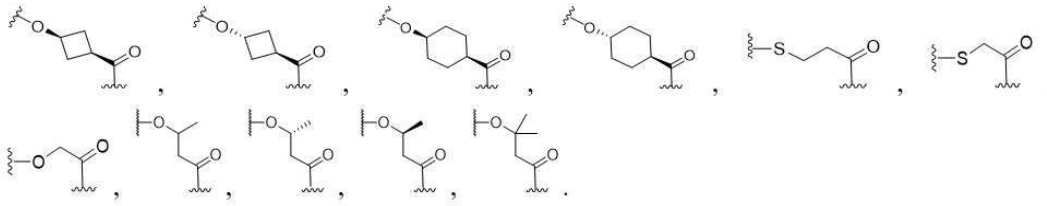
[0331] L³은 -C(R^{1a})(R^{1b})-, 또는 -C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})- 중에서 선택되고; 바람직하게, L³은 -CH₂-, -CH(CH₃), -C(CH₃)₂, -CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂-, 또는 -C(CH₃)₂CH₂- 중에서 선택되고; 바람직하게, L³은 CH₂-, -CH(CH₃), 및 -CH₂CH₂- 중에서 선택되고,

[0332] L¹은 -C(R^{2a})(R^{2b})-, -C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-, 또는 -C(O)- 중에서 선택되고; 바람직하게, L¹은 -C(O)-이고;

[0333] 각각의 R^{1a}, 각각의 R^{1b}, 각각의 R^{2a}, 또는 각각의 R^{2b}는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C₁₋₆ 지방족 그룹일 수 있고,

[0334] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있다.

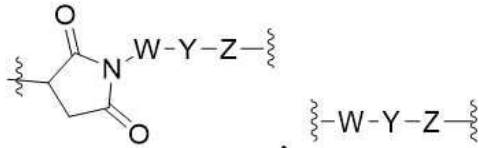
[0335] 일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 -M-은 하기 중에서 선택된다:



[0336]

[0337]

일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은 -L_a-L_b-L_c-이고,



[0338]

-L_a-는 이고:

[0339]

여기서

[0340]

W는 -(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-이고, wn은 1, 2, 3 또는 6이고, W의 1개의 메틸렌 단위는 -Cyr-, -N(R^{wx})C(O)-, -C(O)N(R^{wx})- 또는 -C(O)-에 의해 각각 독립적으로 대체되고; 바람직하게, W는 -(C(R^{wa})(R^{wb}))₂- 또는 -(C(R^{wa})(R^{wb}))₃-이고; 바람직하게, W는 -CH₂CH₂CH₂- 또는 -CH₂CH₂-이고;

[0341]

Y는 -(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-이고, yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고; 바람직하게, Y는 단일 결합이고;

[0342]

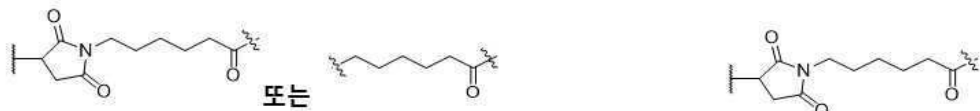
Z는 -(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}이고, zn은 1, 2 또는 3이고, Z의 1개의 메틸렌 단위는 -Cyr-, -N(R^{zx})C(O)-, -C(O)N(R^{zx})- 또는 -C(O)-에 의해 각각 독립적으로 대체되고; 상기 -Cyr-는 3-10원의 포화된 카보사이클릴렌이고, 상기 -Cyr-은 비치환되거나 또는 1 내지 3개의 치환체 R^{cx}에 의해 독립적으로 치환되고; 바람직하게, Z는 -(C(R^{wa})(R^{wb}))₂C(O)- 또는 -(C(R^{wa})(R^{wb}))₃C(O)-이고; 바람직하게, Z는 -CH₂CH₂CH₂C(O)- 또는 CH₂CH₂C(O)-이고;

[0343]

각각의 R^{wa}, 각각의 R^{wb}, 각각의 R^{za}, 각각의 R^{zb}, 각각의 R^{wx}, 각각의 R^{zx} 및 각각의 R^{cx}는 독립적으로 수소, 할로젠, -OR^f, 또는 R^f로 임의로 치환된 C₁₋₆ 지방족 그룹이고,

[0344]

각각의 R^f은 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C₁₋₆ 지방족 그룹임;

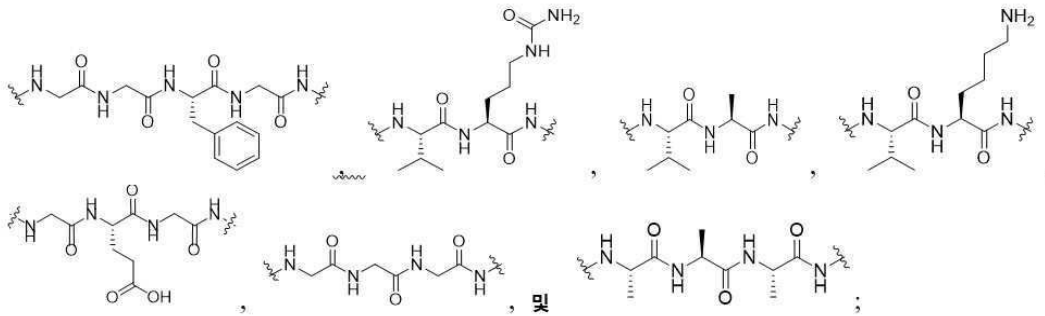


[0345]

바람직하게, -L_a-는 이고; 바람직하게는 이

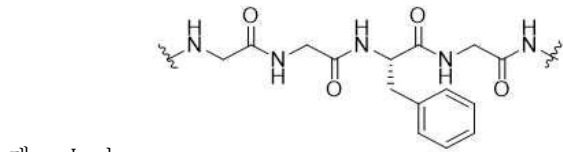
[0346]

-L_b-는 하기로 이루어지는 그룹 중에서 선택되고:

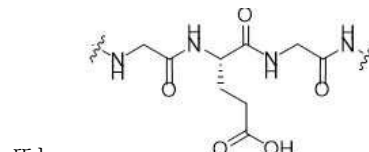


[0347]

이고; 바람직하

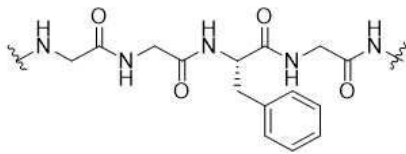


게, -L_b-는

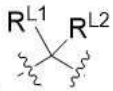


또는

이고; 바람직하게 -L_b-는



이고;



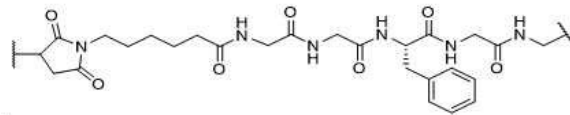
[0348]

-L_c-는 이고, 여기서 R^{L1} 및 R^{L2}는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, -OH 및 C₁₋₆ 지방족 그룹으로 이루어

어지는 그룹 중에서 선택됨; 바람직하게, -L_c-는 이다.

[0349]

일부 특히 바람직한 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되



는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 L은

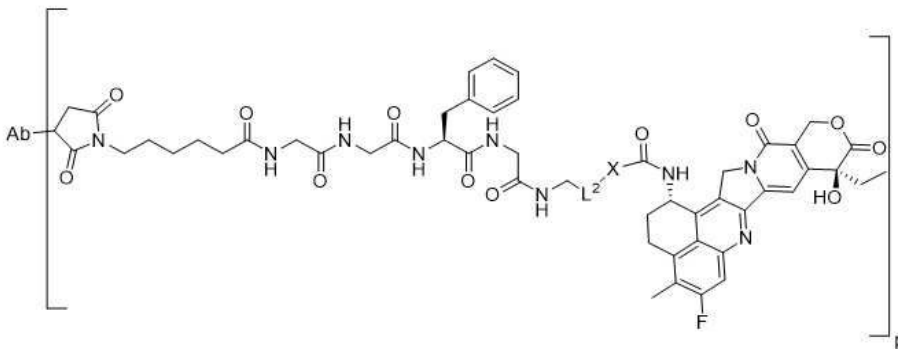
이다.

[0350]

일부 구현예에서, 본원은 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물을 기재하며, 여기서 항-Her3 항체-약물 접합체는 하기 화학식 II-1 또는 II-2의 구조를 갖는다:

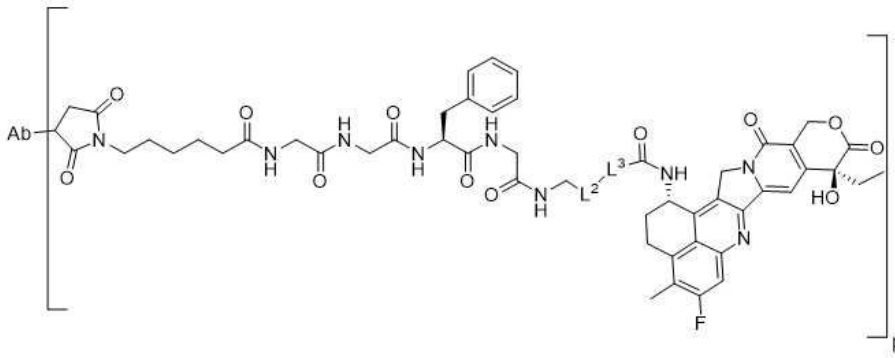
[0351]

화학식 II-1



[0352]

[0353] 화학식 II-2



[0354]

[0355] 여기서

[0356] L^2 는 -O- 또는 -S-이고; 바람직하게, L^2 는 -O-이고; 바람직하게, L^2 는 -S-이고;

[0357] X는 0, 1, 2 또는 3개의 R^{3a} 로 임의로 치환된 3-6원의 포화된 카보사이클릴 중에서 선택되고; 바람직하게, X는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 중에서 선택되고;

[0358] L^3 은 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$, 또는 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ 중에서 선택되고, 각각의 R^{1a} , 각각의 R^{1b} , 또는 각각의 R^{3a} 는 독립적으로 수소, 할로겐, 또는 R로 임의로 치환될 수 있는 C_{1-6} 지방족 그룹일 수 있고, 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있고; 바람직하게, L^3 은 $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, 또는 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 중에서 선택되고;

[0359] p는 평균 연결 수를 나타내고, n은 1 내지 10의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수 중에서 선택되고;

[0360] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함하고; (I) 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (II) 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 또는 (III) 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역; 보다 바람직하게, 본원에 기재된 항-Her3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다: (1) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (2) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄; 또는 (3) 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열의 중쇄 및 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 경쇄.

[0361] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 평균 연결 수 p는 2 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 n은 3 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 n은 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4, 4 내지 5, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10의 정수 또는 소수일 수 있다.

[0362] 약제학적 조성물 및 약학 제형

[0363] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-Her3 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0364] 본원에 제공된 항-Her3 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 이의 약제학적 조성물이, 병용 투여되는 제형 내 적합한 담체, 부형제 및 기타 시약에 통합되어 개선된 전이, 전달, 허용성 등을 제공할 수 있음이 이해되어야 한다.

- [0365] "약제학적 조성물"이란 용어는 조성물 중에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 유효한 형태로 존재하도록 하고, 제형이 투여되는 대상체에게 허용될 수 없는 독성을 갖는 추가 성분을 함유하지 않는 제형을 지칭한다.
- [0366] 본원에 기재된 항-Her3 항체를 포함하는 약학 제형, 바람직하게는 수용액 또는 동결건조 제형의 형태의 상기 제형은 하나 이상의 선택적 약학 보조제와 함께 원하는 순도를 갖는 본 발명의 항-Her3 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 혼합하여 제조될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)).
- [0367] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 제형은 치료되는 특정 적응증에 필요한 하나 이상의 추가 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 보완적인 활성을 갖는 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 활성 성분은 화학요법제, 면역 체크포인트 억제제, 성장 억제제, 항생제 또는 공지된 다양한 항종양제 또는 항암제이며, 이는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 항-Her3 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조성물을 포함한다.
- [0368] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물, 및 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 약제 조합을 제공한다.
- [0369] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물, 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 포함하고, 바람직하게는 약물 전달 장치를 추가로 포함하는 키트를 제공한다.
- [0370] **의학적 용도**
- [0371] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질병 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 본원에 기재된 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물의 용도를 제공하며, 바람직하게는 상기 질병 또는 상태는 암이다.
- [0372] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 본원에 기재된 항체-약물 접합체, 이의 이성체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 제공하며, 바람직하게는 상기 질병 또는 상태는 암이다.
- [0373] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 Her3-매개된 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체에게 본원에 기재된 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 혼합물 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병 또는 상태의 치료 및/또는 예방 방법을 제공하며, 바람직하게는 상기 질병 또는 상태는 암이다.
- [0374] 일부 구현예에서, 암은 폐암, 신장암, 요로암종, 결장직장암, 전립선암, 다형성 교모세포종, 난소암, 췌장암, 유방암, 흑색종, 간암, 방광암, 위암 및 식도암 중에서 선택된다.
- [0375] 일부 구현예에서, 본 발명의 투여 경로는 경구 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 관절내 투여(예를 들어, 관절염 관절에서), 흡입, 에어로졸 전달, 종양내 투여 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0376] 일부 구현예에서, 본 발명은 치료학적 유효량을 대상체에게 공-투여하는 하나 이상의 치료법(예를 들어, 치료 양식 및/또는 다른 치료제)을 제공한다. 일부 구현예에서, 치료법은 외과적 치료 및/또는 방사선 요법을 포함한다.
- [0377] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법 또는 용도는 개체에게 하나 이상의 치료법(예를 들어, 치료 양식 및/또는 다른 치료제)을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 본 발명의 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 치료법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 추가 치료제와 공-투여될 수 있다.
- [0378] 본원에 기재된 약물 접합체는 종양 세포의 시험관내 증식에 대해 억제 활성을 가질 수 있다. 억제 활성은 하기와 같을 수 있다: 본원에 개시된 약물 접합체를 종양 세포가 있는 배지에 첨가하면 음성 대조군 또는 참조 약물을 투여하는 것과 비교하여, 종양 세포의 증식 능력이 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상으로 감소하게 된다. 예를 들어 억제 활성은 하기와 같을 수 있다: 종양 세포에 대한 IC50 값 (nM)은 10000 이하, 5000 이하, 4000 이하, 3000 이하, 2000 이하, 1000 이하, 500 이하, 400 이하, 300 이하,

200 이하, 150 이하, 120 이하, 110 이하, 100 이하, 99 이하, 98 이하, 97 이하, 95 이하, 90 이하, 80 이하, 75 이하, 70 이하, 65 이하, 62 이하, 60 이하, 50 이하, 40 이하, 30 이하, 25 이하, 23 이하, 22 이하, 20 이하, 19 이하, 18 이하, 18.5 이하, 17 이하, 15 이하, 12 이하, 10 이하, 9 이하, 8.5 이하, 7 이하, 6.7 이하, 6 이하, 5.9 이하, 5.5 이하, 5.0 이하, 4.8 이하, 4.5 이하, 4.4 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1.0 이하, 0.5 이하, 0.3 이하, 0.29 이하, 0.25 이하, 0.21 이하, 0.20 이하, 0.18 이하, 0.17 이하, 0.15 이하, 0.12 이하, 0.10 이하, 0.09 이하, 0.08 이하, 0.07 이하, 0.06 이하, 0.05 이하, 0.04 이하, 0.03 이하, 0.02, 또는 0.01 이하일 수 있다. 예를 들어, 종양 세포는 비제한적으로 고휘 종양 세포를 포함할 수 있고; 예를 들어, 종양 세포는 비제한적으로 위암 세포 또는 유방암 세포를 포함하고; 예를 들어, 종양 세포는 비제한적으로 HCC1569 세포 또는 MDA-MB-453 세포를 포함할 수 있다.

[0379] 본원에 기재된 약물 접합체는 표적화 억제력을 가질 수 있다. 표적화 억제는 음성 대조군 또는 참조 약물이 첨가된 특정 표적이 고 발현된 종양 세포의 배지와 비교하여, 특정 표적이 고 발현된 종양 세포의 증식 능력이 본원에 개시된 약물 접합체가 첨가된 배지에서 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상까지 감소된다. 예를 들어, 표적화 억제는 하기와 같을 수 있다: 특정 표적이 고 발현된 종양 세포에 대한 IC50 값(nM)은 10000 이하, 5000 이하, 4000 이하, 3000 이하, 2000 이하, 1000 이하, 500 이하, 400 이하, 300 이하, 200 이하, 185 이하, 150 이하, 120 이하, 110 이하, 100 이하, 99 이하, 98 이하, 97 이하, 95 이하, 91 이하, 80 이하, 74 이하, 70 이하, 65 이하, 62 이하, 60 이하, 50 이하, 40 이하, 30 이하, 25 이하, 23 이하, 22 이하, 20 이하, 19 이하, 18 이하, 18.5 이하, 17 이하, 15 이하, 12 이하, 10 이하, 9 이하, 8.5 이하, 7 이하, 6.7 이하, 6 이하, 5.9 이하, 5.5 이하, 5.0 이하, 4.8 이하, 4.5 이하, 4.4 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1.0 이하, 0.5 이하, 0.3 이하, 0.29 이하, 0.25 이하, 0.21 이하, 0.20 이하, 0.18 이하, 0.17 이하, 0.15 이하, 0.12 이하, 0.10 이하, 0.09 이하, 0.08 이하, 0.07 이하, 0.06 이하, 0.05 이하, 0.04 이하, 0.03 이하, 0.02 이하 또는 0.01 이하일 수 있다. 예를 들어, 특정 표적이 고 발현된 종양 세포는 비제한적으로 고휘 종양 세포를 포함할 수 있고; 예를 들어, 특정 표적이 고 발현된 종양 세포는 비제한적으로 위암 세포 또는 유방암 세포를 포함하고; 예를 들어, 특정 표적이 고 발현된 종양 세포는 비제한적으로 HCC1569 세포 또는 MDA-MB-453 세포를 포함할 수 있다. 특정 표적은 비제한적으로 Her3을 포함할 수 있다.

[0380] 본원에 기재된 약물 접합체는 혈장 안정성을 가질 수 있다. 혈장 안정성은 하기와 같을 수 있다: 본원에 개시된 약물 접합체는 상기 약물 접합체를 혈장에 첨가한 지 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 20일 또는 30일 후에 세포독성 약물의 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 7% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.9% 이하, 1.8% 이하, 1.7% 이하, 1.6% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 1.0% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하, 0.2% 이하 또는 0.1% 이하를 방출한다.

[0381] 본원에 기재된 약물 접합체는 생체내 종양-억제 효과를 가질 수 있다. 종양-억제 효과는 하기와 같을 수 있다: 음성 대조군 또는 참조 약물이 동물에게 투여된 경우와 비교하여, 동물의 종양이 본원에 개시된 약물 접합체를 투여한 지 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 20일, 21일 또는 30일 후에 부피 기준으로 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 73% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상까지 감소되거나, 또는 동물의 종양이 본원에 개시된 약물 접합체를 투여한 지 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 20일, 21일 또는 30일 후에 부피 기준으로 1.1배 이상, 1.3배 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 22배 이상, 30배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상 또는 1500배 이상까지 감소된다. 동물은 포유동물을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 동물은 고양이, 개, 말, 돼지, 소, 양, 토끼, 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 투여는 경구 투여, 정맥내 주사, 정맥내 점적, 복강내 주사 또는 국소 투여를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0382] 본원에 기재된 약물 접합체는 방관자 효과를 가질 수 있다. 방관자 효과는 하기와 같을 수 있다: 본원에 개시된 약물 접합체는 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포의 세포 증식에 대해 명백한 억제 효과를 갖지 않지만, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포와 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포의 공-배양에서, 본원에 개시된 약물 접합체는 상기 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포 및 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포의 세포 증식을 동시에 억제할 수 있다. 예를 들어, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포와 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포의 공-배양에서 억제 활성은 하기와 같을 수 있다: 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포에 대한 IC50 값(nM)은 10000 이하,

5000 이하, 4000 이하, 3000 이하, 2000 이하, 1000 이하, 500 이하, 400 이하, 300 이하, 200 이하, 185 이하, 150 이하, 120 이하, 110 이하, 100 이하, 99 이하, 98 이하, 97 이하, 95 이하, 91 이하, 80 이하, 74 이하, 70 이하, 65 이하, 62 이하, 60 이하, 50 이하, 40 이하, 30 이하, 25 이하, 23 이하, 22 이하, 20 이하, 19 이하, 18 이하, 18.5 이하, 17 이하, 15 이하, 12 이하, 10 이하, 9 이하, 8.5 이하, 7 이하, 6.7 이하, 6 이하, 5.9 이하, 5.5 이하, 5.0 이하, 4.8 이하, 4.5 이하, 4.4 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1.0 이하, 0.5 이하, 0.3 이하, 0.29 이하, 0.25 이하, 0.21 이하, 0.20 이하, 0.18 이하, 0.17 이하, 0.15 이하, 0.12 이하, 0.10 이하, 0.09 이하, 0.08 이하, 0.07 이하, 0.06 이하, 0.05 이하, 0.04 이하, 0.03 이하, 0.02 이하, 또는 0.01 이하일 수 있다. 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포와 비교하여, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포에서 특정 표적의 발현은 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상까지 감소될 수 있다. 예를 들어, 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포는 비제한적으로 고휘 종양 세포를 포함할 수 있고; 예를 들어, 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포는 비제한적으로 위암 세포 또는 유방암 세포를 포함하고; 예를 들어, 특정 표적의 발현이 높은 종양 세포는 비제한적으로 HCC1569 세포 또는 MDA-MB-453 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포는 비제한적으로 고휘 종양 세포를 포함할 수 있고; 예를 들어, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포는 비제한적으로 유방암 세포를 포함하고; 예를 들어, 특정 표적의 발현이 낮은 종양 세포는 비제한적으로 HCC1187 세포를 포함할 수 있다.

[0383] 본원에 기재된 약물 접합체는 수송체에 의한 수송을 억제하는 능력을 가질 수 있다. 수송을 억제하는 능력은 본원에 기재된 약물 접합체의 유출 비를 수송 기질의 표준과 비교하여 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상까지 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 유출 비의 시험은 당업자가 일반적으로 사용하는 방법이거나, 또는 본 출원의 실시예에 기재될 수 있다.

[0384] 본원에 기재된 약물 접합체는 생체내 종양 표적화 능력을 가질 수 있다. 생체내 표적화 능력은 하기와 같을 수 있다: 신호 물질로 표지된 약물 접합체를 동물에 투여하는 경우, 상기 동물의 다른 조직 및 기관에 비해 종양 조직 내 표지된 약물 접합체의 분포가 1% 이상, 2% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 8% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상까지 증가되거나, 또는 1.1배 이상, 1.3배 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 22배 이상, 30배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상 또는 1500배 이상까지 증가될 수 있다. 신호 물질은 방사성 물질일 수 있다; 예를 들어, 신호 물질에는 125I가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 동물은 포유동물을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 동물은 고양이, 개, 말, 돼지, 소, 양, 토끼, 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 투여에는 경구 투여, 정맥내 주사, 정맥내 점적, 복강내 주사 또는 국소 투여가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 조직 또는 기관은 심장, 간, 비장, 폐, 신장, 뇌 또는 골수를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0385] 본원에 기재된 약물 접합체는 양호한 생체내 안전성을 가질 수 있다. 생체내 안전성은 하기와 같을 수 있다: 본원에 개시된 약물 접합체를 동물에게 투여한 후, 상기 동물에서 생체내 유리 독소의 방출율은 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 7% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.9% 이하, 1.8% 이하, 1.7% 이하, 1.6% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 1.0% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하, 0.2% 이하, 또는 0.1% 이하이다. 예를 들어, 생체내 안전성은 하기와 같을 수 있다: 본원에 기재된 약물 접합체를 동물에서 독성 발현을 일으키지 않으면서 0.5 mg/kg 이상, 1 mg/kg 이상, 2 mg/kg 이상, 3 mg/kg 이상, 4 mg/kg 이상, 5 mg/kg 이상, 10 mg/kg 이상, 20 mg/kg 이상, 30 mg/kg 이상, 50 mg/kg 이상, 70 mg/kg 이상, 100 mg/kg 이상, 200 mg/kg 이상, 500 mg/kg 이상 또는 1000 mg/kg 이상의 농도로 투여할 수 있다. 예를 들어, 동물은 고양이, 개, 말, 돼지, 소, 양, 토끼, 마우스, 래트, 원숭이 또는 인간을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 투여에는 경구 투여, 정맥내 주사, 정맥내 점적, 복강내 주사 또는 국소 투여가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0386] **샘플 분석**

[0387] 1. ADC DAR 값 분석 방법 - 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC-HPLC)

[0388] 고성능 액체 크로마토그래프: Waters E2965 고성능 액체 크로마토그래피 시스템.

[0389] 크로마토그래피 컬럼: MabPac™ HIC-Butyl 5 μm 4.6×100 mm(제조사: Thermo).

[0390] 이동상 A: 1.5 M(NH₄)₂SO₄ + 50 mM 칼륨 포스페이트(pH 7.0).

[0391] 이동상 B: 50 mM 나트륨 포스페이트(pH 7.0)/이소프로판올(75:25 V/V).

[0392] 용출을 하기 용출 절차에 따라 수행하였다.

시간	이동상 B
0-2분	0%-10%
2-22분	10%-65%
22-24분	65%-100%
24-26분	100%-0%
26-30분	0%

[0393]

[0394] 검출 조건: 이동상의 유량은 1 ml/분, 검출 파장은 280 nm, 컬럼 온도는 30°C로 설정된다.

[0395] 2. SEC 순도 분석 - 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)

[0396] 고성능 액체 크로마토그래프: Agilent 1260 액체 크로마토그래프.

[0397] 크로마토그래피 컬럼: Waters Xbridge BEH200 SEC(7.8×300 mm, 3.5 μm)

[0398] 이동상: 50 mM 칼륨 포스페이트 + 200 mM 아르기닌(pH 6.80) + 10% 이소프로판올

시간	이동상
0-30분	100%

[0399]

[0400] 검출 조건: 이동상의 유량은 0.5 ml/분, 검출 파장은 280 nm, 컬럼 온도는 30°C로 설정된다.

[0401] 본 발명은 기재된 특정 구현예의 임의의 조합을 포함한다. 본 발명의 추가 구현예 및 적용 가능성의 전체 범위는 하기에 제공된 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내기에는 하지만 단지 예시로서 제공되는 것이며, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변경 및 수정이 상기 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것임을 이해해야 한다. 인용을 포함하여 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 내용 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0402] **실시예**

[0403] 하기 실시예는 본 발명의 일부 바람직한 구현예 및 양태를 입증하고 추가로 설명하기 위해 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0404] 실시예 1. 항-Her3 항체

[0405] **물질 및 방법:** 하기 시약을 Southern Biotech에서 구입하여 명시된 희석으로 사용하였다: 염소 항-마우스 IgG-HRP(1030-05, 1:5000 희석), 염소 항-인간 IgG-PE(2040-09, 1:1000 희석), 염소 항-인간 카파 IgG-HRP, (2061-05, 1:20000 희석), 염소 항-토끼 IgG-HRP(4030-05, 1:5000 희석), FITC 표지 스트렙타비딘(7100-02, 1:500 희석), 마우스 항-인간 카파-APC(9230-11, 1:500 희석) 및 마우스 IgG APC(0107-11, 0.1 mg/ml). NRG1은 Origene(TP723155) 제품이였다. 세포 배양 배지 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640, Dulbecco 변형 배지(DMEM) 및 소 태아 혈청은 Hyclone 제품이였다. 재조합 파트리투맵은 사내에서 제조되었다. HER3 항체 3F8은 하이브리도마에 의해 또는 재조합적으로 생성되었다. m3F8은 쥐 3F8 항체를 나타내는 반면, ch3F8 및 hu3F8은 각각 키메라 및 인간화 3F8 항체를 나타낸다.

[0406] **세포 배양:** 연구에 사용된 SP2/0, SP2/0-HER3, SP2/0-HER2, SP2/0-EGFR, NCI-N87, MDA-MB-468, MDA-MB-453, 7901, HT29, MCF-7 및 SK-BR-3은 ATCC에서 구입하여 ATCC에서 권장하는 적절한 배지를 사용하여 배양하였다. 인간 EGFR, HER2 및 HER3을 안정적으로 발현하는 SP2/0-EGFR, SP2/0-HER2 및 SP2/OHER3 세포는 사내에서 생성되었다.

[0407] **항-HER3 하이브리도마의 제조:** 첫째 날, BALB/c 마우스(암컷, 8-10주령)에 인간 HER3를 발현하는 1-2 x 10⁶ SP2/0-HER3 세포를, 프로인트 완전 항원보강제와 함께 복강내 주사하였다. 8일차에, 프로인트 불완전 항원보강제와 함께 동일한 수의 세포를 사용하여 강화된 면역화를 수행하였다. 14일차부터, 3일마다 상기 양의 세포로 마우스를 면역시키고, 이 절차를 3회 반복하였다. 최종 면역화 3일차에, B 림프구를 비장에서 단리하고 불멸화 된 골수종 세포 NS-1과 융합시켜 하이브리도마 세포를 생성시켰다.

- [0408] 하이브리도마 세포를 96웰 플레이트에서 구배 희석으로 배양하였다. 상등액을 수집하고 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 SP2/0 세포의 표면에서 발현된 HER3를 인식하는 항체에 대해 스크리닝하거나 ELISA에 의해 재조합 HER3 항체에 대해 스크리닝하였다.
- [0409] **DNA 클로닝 및 항체 가변 영역의 서열분석:** Trizol(ThermoFisher)을 사용하여 하이브리도마에서 추출한 전체 RNA를 첫 번째 cDNA 가닥으로 역전사시킨 후, 5' 상보적 DNA(5' RACE)를 5' RACE 키트(Invitrogen, 18374-058)의 지시에 따라 PCR을 사용하여 신속하게 증폭시켜 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열을 증폭시켰다. PCR 산물을 pGM-T 벡터에 클로닝하였다. 양성 클론에 대해 DNA 서열분석을 실시하였으며, 이로부터 단백질 서열을 추론하였다. 가변 영역의 아미노산을 Kabat 넘버링 체계로 분석하였다.
- [0410] **항체 발현:** 항체 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA를 발현 벡터 pCDNA3.1(+)(Invitrogen)에 클로닝하고 293T 세포에서 발현시켰다. 항체를 단백질 A 또는 G 컬럼(GE)을 사용하여 정제하였다.
- [0411] **인간화:** 인간화는 GenScript에 의해 수행되었다. 먼저, 쥐 항체 중쇄의 불변 영역을 인간 IgG1의 불변 영역 서열로 교체하고, 쥐 항체의 경쇄 불변 영역을 인간 Igκ의 불변 영역 서열로 교체하여 쥐-인간 키메라 항체(ch3F8)를 생산하였다. 이어서, 참고문헌[Kuramochi et al.]에 따라 키메라 항체에 대해 인간화를 수행하였다. 친화성 및 특이성에 필요한 마우스 항체 프레임워크 잔기가 유지되었으며, 마우스 프레임워크를 인간 생식계열 프레임워크로 교체하면서 이를 유지시켜 인간화 항체를 생산하였다. 인간화 항체를 암호화하는 코돈 최적화 DNA 서열은 GenScript에 의해 합성되었다.
- [0412] **항체 발현 및 정제:** 상기 항체 DNA 서열을 암호화하는 플라스미드를 ExpiCHO-S(Cat1.# A2910001, Gibco) 세포에 형질감염시킨 후, 세포를 32°C, 5% CO₂ 배지에서 생육시키고 12일 동안 유지시켰다. 4000 g에서 30분 동안 원심분리한 후 상등액을 수집하고 0.22 μm 멤브레인(membrane)을 통해 여과시켰다. 단백질 A(Cat1.# 17508001, GE)에 결합하는 항체를 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 7.0)로 세척하고 제조사 설명서에서 권장하는 대로 0.1 M 글리신(pH 3.0)으로 용출시켰다. 용출된 분획을 0.1 M Tris 완충액(pH 9.0)으로 중화시킨 후 한외여과 원심분리를 통해 PBS 완충액으로 전환하였다. 단백질 농도를 BCA에 의해 결정하였다.
- [0413] **표면 플라스몬 공명(SPR)에 의한 친화도 분석:** Biacore T200을 사용하여 항체 동역학 및 친화도를 결정하였다. 간략하게, 재조합 인간 HER3 항체를 단백질 A 칩(GE, Cat. 29-1275-5)에 고정화하였다. 50 nM에서 최종 농도 0.78125 nM까지의 항원 농도를 2배 연속 희석에 의해 생성하였으며, 친화도 및 동역학을 상기 칩을 통해 결정하였다.
- [0414] **FACS 분석:** 배양된 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 절단하고 이어서 1500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 5% FBS 및 0.2% ProClin300을 함유하는 PBS FACS 용액을 사용하여 세포 펠릿을 5 x 10⁶ 세포/ml로 재생시켰다. 50 μl의 세포 현탁액을 1 시간 동안 빙상에서 1 μg/ml 농도의 1차 항체 100 μl와 함께 배양하였다. 세포를 FACS 용액으로 2회 세척하였다. 펠릿을 염소 항-마우스 IgG-PE(1:1000 희석)를 함유하는 100 μl의 FACS 용액을 사용하여 재생시키고, 암실에서 1시간 동안 빙상에서 배양하였다. 이어서 세포를 2회 세척하고 200 μl의 FACS 용액에 재현탁시켰다.
- [0415] **웨스턴 블롯 분석:** SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 웨스턴 블롯을 위해 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 사용된 1차 항체는 하기와 같았다: 항-HER2(cell signaling, Cat1#: 2165S), 항-HER3(cell signaling, Cat1#: 12708), 항-p-HER3(cell signaling, Cat1#: 4791), 및 항-β-액틴(cell signal transduction, Cat1#: 4967).
- [0416] **ELISA 분석:** 인간 HER2-ex-huFc, 인간 HER3-huFc 및 인간 EGFR-his를 96-웰 플레이트에서 2 μg/ml 및 50 μl/웰로 희석하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 플레이트를 0.5× PBST로 세척한 다음, 100 μl의 차단 완충액(PBS + 3% BSA)과 함께 37°C에서 2시간 동안 배양하고, 0.5× PBST로 세척하였다. 3F8 항체를 차단 완충액으로 1:3 연속 구배로 희석하고, 50 μl/웰로 첨가하고, 37°C에서 40-50분 동안 배양하고, 이어서 0.5X PBST로 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG-HRP(Southern Biotech, 1030-05)를 차단 완충액으로 1:20000으로 희석하고, 50 μl/웰로 첨가하고, 암실에서 30분 동안 배양한 후, 0.5X PBST로 세척하였다. 분석 전, 50 μl의 루미놀 완충액 A + B를 1:1 믹스로 각 웰에 첨가하였다.
- [0417] **NRG1에 의해 유도된 HER3 인산화:** 세포를 6웰 플레이트에서 배양하고 세포밀집도가 80%에 도달했을 때 실험에 사용하였다. 실험 당일 세포를 PBS로 2회 세척하고 무혈청 배지에서 6시간 동안 배양한 후 10 μg/ml의 항체로 밤새 유도하였다. HER3 인산화를 유도하기 위해, 웨스턴 블롯용 세포를 수집하기 30분 전에 NRG1을 작용 농도

100 ng/ml로 첨가하였다.

[0418] **항체 안정성 시험:** 5 mg/ml의 정제된 항체를 일반 관행대로 4°C에서 보관하고 열 안정성 평가를 위해 40°C에서 7일 및 14일 동안 배양하고, 재생을 위해 pH 3.5의 글리신 용액으로 옮기고, 산 안정성 평가를 위해 2, 4, 및 6 시간 동안 보관하거나, 또는 동결-해동 안정성 평가를 위해 4 내지 6주기 동안 반복된 동결-해동을 수행하였다. 응집을 SEC-HPLC에 의해 측정하고, 결합 친화도를 ELISA에 의해 측정하였다.

[0419] **항체 [⁸⁹Zr]Zr 표지화:** DFO-NCS를 참고문헌[Zeglis and Lewis, 2015]에 나타낸 바와 같이 항체에 접합시켰다. DFO 및 항체를 5:1의 몰비로 혼합하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. DFO-접합된 항체를 SEC-HPLC에 의해 정제하였다.

[0420] ⁸⁹Zr 옥살레이트 용액(0.8mCi)을 HEPES/Na₂CO₂ 완충액(pH 7.0-7.5)에서 DFO-접합된 항체(0.2 mg/ml)와 혼합하고 실온에서 30분 동안 배양하였다. 방사화학적 순도를 TLC에 의해 평가하였다. [⁸⁹Zr]Zr 항체의 R_f는 0-0.3인 반면, 유리 ⁸⁹Zr의 R_f는 0.6-1.0이었다.

[0421] **PET 영상화:** 각 동물에게 대략 100 μCi의 [⁸⁹Zr]Zr 항체를 정맥내로 주사하였다. 주사 후 지정된 시간에 소-동물 PET 스캐너를 사용하여 이미지를 수집하고 분석하였다.

[0422] **생체내 효능 연구:** 동물을 IACUC 지침에 따라 유지시켜 사용하였다. Charles River와 SPF Biotech로부터 각각 구입한 BALC/b 누드 마우스와 NPG 마우스를 12시간 명/암 주기로 25°C에서 수용하고 음식과 음료에 자유롭게 접근시켰다. 환자-유래된 이중이식(PDX) 모델을 동결보존된 조직 단편의 피하 이식에 의해 생성하였다. 종양 크기가 100-200 mm³에 도달했을 때 동물에게 약물 치료를 시작하고 종양 크기가 1000 mm³에 도달되면 안락사시켰다. 건강 상태를 매일 모니터링하였다. 종양 크기 및 체중을 모니터링하고 3일마다 기록하였다.

[0423] 소프트웨어: Olinda, GraphPad Prism 6.0 또는 EXCEL을 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0424] 실시예 1.1

[0425] 쥐 3F8을 SP2/0 야생형 세포 또는 HER3, HER2 또는 EGFR을 과발현하는 세포와 함께 배양하였다. 결합 강도를 PE-항-마우스 2차 항체와 함께 FACS 장비에서 측정하였다.

[0426] 결과를 도 1에 나타낸다. 3F8은 SP2/0-HER3 세포에 특이적으로 결합하였지만 다른 세포에는 결합하지 않았다.

[0427] 실시예 1.2

[0428] 인간 HER3, HER2 및 EGFR에 대한 쥐 3F8의 결합 친화도를 ELISA에 의해 결정하였다.

[0429] 결과를 도 2에 나타내었다. 쥐 3F8은 단지 HER3만 인식하였으며 HER2 또는 EGFR은 인식하지 않았다.

[0430] 실시예 1.3

[0431] 인간 HER3, HER2 및 EGFR에 결합하는 쥐 3F8의 EC₅₀을 GraphPad Prism 6.0을 사용하여 분석하였다. 결과를 표 1에 나타낸다. 쥐 3F8은 나노몰 미만 범위에서 강한 결합 친화도를 나타내었다.

[0432] [표 1]

[0433] 인간 HER3, HER2 또는 EGFR에 결합하는 쥐 3F8의 EC₅₀

3F8	huHER3	huHER2	huEGFR
EC ₅₀ (nM)	0.11	NA	NA
EC ₅₀ (ng/mL)	16.50	NA	NA
HillSlope	1.04	NA	NA
R 제곱	0.99	NA	NA

[0434]

[0435] 실시예 1.4

[0436] 인간, 원숭이, 래트 및 마우스 HER3에 대한 쥐 3F8의 종 선택성을 ELISA에 의해 결정하였다.

[0437] 결과를 도 3에 나타낸다. 쥐 3F8은 유사한 효능으로 인간 및 원숭이 HER3를 인식하였지만, 마우스 및 래트 HER3

은 인식하지 않았다.

[0438]

실시예 1.5

[0439]

인간, 원숭이, 래트 및 마우스 HER3에 결합하는 쥐 3F8의 EC50을 GraphPad Prism 6.0을 사용하여 분석하였다. 결과를 표 2에 나타낸다. 쥐 3F8은 나노몰 이하 범위에서 인간 및 시노몰구스 원숭이 HER3에 대해 동일한 결합 친화도를 나타내었다.

[0440]

[표 2]

[0441]

인간, 시노몰구스 원숭이, 래트 또는 마우스 HER3에 결합하는 쥐 3F8의 EC50

	인간 HER3	시노몰구스 원숭이 HER3	마우스 HER3	래트 HER3
HillSlope	1.015	1.102	NA	NA
EC ₅₀ (nM)	0.1635	0.1855	NA	NA
EC ₅₀ (ng/mL)	24.525	27.825	NA	NA
R 계급	0.9957	0.9969	NA	NA

[0442]

[0443]

실시예 1.6

[0444]

쥐 3F8은 NRG1-유도된 HER3 인산화를 차단시켰다. NCI-N87, MDA-MB-468 및 MDA-MB-453을 HER3 리간드인 NRG1로 처리하여 HER3의 하류 인산화를 유도하였다. NRG1-유도된 p-HER3을 억제하는데 있어서 쥐 3F8의 효과를 웨스턴 블롯에 의해 결정하였다. 3D4는 HER3에의 결합에 대해 NRG1과 경쟁하는 이전에 입증된 항-HER3 항체이며, 본원에서 양성 대조군으로서 적용된다.

[0445]

결과를 도 4에 나타낸다. 데이터는 쥐 3F8이 HER3 단백질의 인산화 수준을 감소시켰지만 전체 HER3 단백질 수준에는 영향을 미치지 않았음을 보여준다. HER2의 웨스턴 블롯은 또한 3F8이 HER2 단백질 수준에 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0446]

실시예 1.7

[0447]

쥐 3F8은 상이한 HER3 표면 수준의 세포에 의해 빠르게 흡수되었다. 상이한 HER3 표면 수준의 세포를 빙상에서 쥐 3F8과 함께 배양하거나(대조군) 또는 37°C에서 1시간 또는 4시간 동안 배양하였다. 내재화 분율을, 상기 얼음 배양된 대조군에서 37°C 배양된 세포 표면 신호를 감하여 결정하였다.

[0448]

결과를 도 5에 나타낸다. 데이터는 쥐 3F8이 세포 내로 빠르게 내재화되었음을 나타낸다. 대부분은 1시간 이내에 흡수되었고, 배양 시간이 4시간으로 연장되면서 세포내 단편의 수가 약간 증가하였는데, 이는 3F8 내재화가 신속하고 지속적인 과정임을 가리킨다.

[0449]

실시예 1.8

[0450]

항-HER3 항체는 BT474 피하 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 데 유효하였다. 항-HER3 항체 3F8, 3D4 또는 3F8 + 3D4 조합을 3주 동안 2주에 한 번씩 25 mg/kg으로 정맥내 주사하였다. 종양 크기를 3-4일마다 모니터링하였다. 3F8과 3D4는 모두 항-HER3 항체이다. 3F8은 쥐 항체이다.

[0451]

결과를 도 6에 나타낸다. 3F8과 3D4 모두 종양 성장을 유의하게 억제하였으며(일원 분산 분석, $p < 0.05$), 3F8이 더 양호한 효능을 나타내었다. 3F8과 3D4의 조합은 효능 면에서 3F8 단독에 필적하였다.

[0452]

실시예 1.9

[0453]

[⁸⁹Zr]Zr-ch3F8을 사용하여 위 PDX 모델 GAS078을 이미징하였다. [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8을 위 모델 GAS078에 정맥내 주사하였다. 주사 후 4, 24, 48, 72, 96 및 168시간째에 이미지를 수집하였다. 각 기관의 방사성 흡수를 Olinda에 의해 분석하고 % ID/g(주사 용량 퍼센트/조직의 그램)으로 나타내었다.

[0454]

도 7은 GAS078 모델의 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8의 전형적인 이미지를 도시한다. Ch3F8은 키메라 3F8 항체를 나타낸다. 데이터는 시간이 지남에 따라 종양에서의 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 흡수의 점진적인 증가를 보여준다. 종양 흡수는 주사 후 96시간째에 안정적으로 유지된 다음, 주사 후 168시간째에 약간 감소하였다.

[0455]

데이터를 또한 표 3에 나타낸다. 종양 및 심장, 간, 신장 및 비장의 주요 기관에서의 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8의 흡수량을

% ID/g(주사 용량 퍼센트/조직의 g)으로 평가하였다.

[0456] [표 3]

[0457] 종양 및 주요 기관에 의한 방사성 흡수

%ID/g		심장	간	신장	비장	종양
4h	마우스 1	23.03	20.37	11.64	15.28	5.26
	마우스 2	14.75	14.97	8.77		5.38
24h	마우스 1	12.39	10.59	7.94	7.84	10.33
	마우스 2	8.66	8.41	6.41	9.74	10.31
48h	마우스 1	6.02	8.36	6.72	10.69	12.15
	마우스 2	3.44	6.77	6.31	5.15	11.33
72h	마우스 1	3	8.28	3.51	12.13	12.67
	마우스 2	2.19	7.09	4.19	12.64	10.86
96h	마우스 1	1.61	6.94	3.42	11.49	12.07
	마우스 2	1.44	6.93	2.81	10.89	8.2

[0458]

[0459] 실시예 1.10

[0460] [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8을 다수의 PDX 모델 이미징화에 사용하였다. [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8을 정맥내 주사하였다. 주사 후 72시간째에 이미지를 수집하였다. 도 8은 6개 동물 모델의 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 이미징화의 전형적인 이미지를 도시한다. 표 4에는 ELISA에 의해 결정된 종양 조직에서의 HER3 발현 수준과, 주사 후 72시간째의 주요 기관 및 종양 조직에서의 방사성 흡수가 나열되어 있다. 시험된 6개 PDX 모델 모두에서 상당한 양의 종양 흡수가 있었다.

[0461] [표 4]

[0462] 종양 조직의 HER3 발현 수준(ng/mg) 및 주요 기관 및 종양 조직에서의 방사성 흡수(% ID/g)

No.	모델	HER3 (ng/mg, Elisa)	심장	신장	간	비장	종양
1	175P6	9.78	4.80	5.52	15.12	19.24	14.10
2	078P7	11.61	3.09	4.29	12.78	14.19	12.29
3	194P5	4.38 (P3)	7.37	5.56	5.48	15.42	14.92
4	142P7	0.05 (P6)	4.15	4.13	4.93	13.09	18.27
5	143P6	6.07	7.90	8.30	13.64	18.01	15.48
6	176R	13.15	5.12	31.61	11.89	9.03	5.37

[0463]

[0464] 실시예 1.11

[0465] 인간화 3F8(hu3F8) 및 키메라 3F8의 결합 친화도. 3개의 인간화 3F8 클론 및 키메라 3F8의 결합 동역학을 Biacore에 의해 결정하였다. 3개의 인간화 3F8 클론(클론 1, 클론 2 및 클론 3)은 상이한 중쇄와 하나의 동일한 경쇄를 가졌다. 클론 1, 클론 2 및 클론 3은 각각 hu3F8-1, hu3F8-2 및 hu3F8-3에 상응하였다.

[0466] 표 6에 나열된 모든 데이터는 Biacore T200 평가 소프트웨어 버전 3.1을 사용하여 처리되었다.

[0467] [표 6]

[0468] 인간화 3F8(hu3F8) 및 키메라 3F8의 결합 친화도

리간드	분석물	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)	Chi ² (RU ²)
키메라	His-HER3	6.28E+05	3.91E-04	6.24E-10	103.1	8.35E-02
클론 1	His-HER3	5.60E+05	6.12E-04	1.09E-09	110.1	9.52E-02
클론 2	His-HER3	6.66E+05	3.28E-04	4.92E-10	113.2	4.63E-02
클론 3	His-HER3	6.44E+05	3.48E-04	5.40E-10	124	3.60E-02

[0469]

[0470] 실시예 1.12

[0471] hu3F8의 3개 클론을 pH 3.5에서 0, 2, 4 및 6시간 동안 배양한 후, ELISA를 수행하여 결합 친화도를 측정하였다. 결과(도 9A)는 산 처리가 결합 친화도에 거의 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0472] pH 3.5에서 0, 2, 4 및 6시간 배양 후 hu3F8의 3개 클론에 대한 EC50 분석. EC50을 ELISA에 의해 결정하였다. 결과(표 7)는 산 처리가 결합 친화도에 거의 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0473] [표 7]

[0474] pH 3.5에서 0, 2, 4 및 6시간 배양 후 hu3F8의 3개 클론의 EC50

배양 시간 (hr)	EC ₅₀ ng/mL		
	클론 1	클론 2	클론 3
0	38.74	45.04	38.71
2	38.11	48.31	41.71
4	40.89	44.54	39.45
6	38.96	41.18	38.06

[0475]

[0476] hu3F8의 3개 클론을 상이한 시간 동안 40°C에서 배양한 다음 ELISA를 수행하여 결합 친화도를 결정하였다. 키메라 항체를 병행 분석하였다. 결과를 도 9B에 나타낸다.

[0477] 40°C에서 상이한 시간 동안 배양된 hu3F8의 3개 클론에 대한 EC50 분석. 3개의 인간화 3F8 항체 클론을 생리식염수에서 40°C에서 7일 또는 14일 동안 배양하고, 열 스트레스 시험 후 결합 친화도를 ELISA에 의해 측정하였다. 키메라 항체 3F8을 병행 분석하였다. 결과(표 8)는 열 스트레스가 결합 친화도에 거의 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0478] [표 8]

[0479] 다양한 날 동안 40°C에서 배양된 hu3F8의 3개 클론의 EC50

배양 시간 (40°C에서)(일)	EC ₅₀ ng/mL			
	키메라 항체	클론 1	클론 2	클론 3
0	47.37	39.16	45.40	42.44
7	/	42.35	48.09	46.96
14	/	41.00	52.03	41.25

[0480]

[0481] hu3F8의 3개의 클론을 3 또는 5주기 동안 동결-해동시킨 후, ELISA를 통해 결합 친화도를 측정하였다. 키메라 항체를 병행 분석하였다. 결과(도 9C)는 반복된 동결-해동이 결합 친화도에 거의 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0482] 표 9는 또한 수회의 동결-해동 스트레스 시험을 거친 hu3F8의 3개 클론의 EC50을 보여준다.

[0483] [표 9]

[0484] 수회의 동결-해동 스트레스 시험을 거친 hu3F8의 3개 클론의 EC50

동결-해동 주기	EC ₅₀ ng/mL			
	키메라 항체	클론 1	클론 2	클론 3
0	47.06	45.41	42.46	42.25
3	/	44.29	46.66	37.42
5	/	38.58	43.79	33.63

[0485]

[0486] 요약하면, 데이터는 hu3F8이 열, 산 및 반복된 동결-해동 시험 후에도 결합 친화도를 유지함을 나타내며, 이는 hu3F8이 양호한 안정성을 가짐을 나타낸다.

[0487] 실시예 1.13

[0488] 안정성 시험 후 hu3F8의 3개 클론의 응집 및 4℃ 보관 시 이의 응집 평가. 산 처리, 반복된 동결-해동 및 40℃에서의 배양 후 3개의 hu3F8 항체의 응집을 SEC-HPLC에 의해 측정하고 4℃에 보관된 각각의 항체와 비교하였다. 결과는 표 10에 나열되어 있다. 모든 클론은 스트레스 시험 후 95% 초과와 단량체를 유지하였으며, 이는 응집 경향이 거의 없음을 나타낸다.

[0489] [표 10]

[0490] 스트레스 시험 후 hu3F8의 3개 클론의 응집 평가 결과

시험 항목	클론 1			클론 2			클론 3		
	단량체	이량체	사량체	단량체	이량체	사량체	단량체	이량체	사량체
체류 시간	8.84-8.85	7.33-7.35	6.66-6.68	8.86-8.87	7.36-7.37	6.70-6.73	8.86-8.87	7.36-7.37	6.70-6.73
4 °C에서 보관된 항체	94.68%	4.36%	0.96%	96.67%	3.16%	0.17%	97.10%	2.90%	-
40 °C에서 7일	95.02%	4.22%	0.76%	96.94%	3.03%	0.03%	97.09%	2.91%	-
40 °C에서 14일	95.03%	4.22%	0.75%	96.44%	3.39%	0.17%	97.04%	2.96%	-
2시간 동안 pH 3.5	94.63%	4.41%	0.96%	96.98%	2.99%	0.04%	97.04%	2.96%	-
4시간 동안 pH 3.5	95.06%	4.22%	0.73%	96.52%	3.27%	0.22%	97.13%	2.87%	-
6시간 동안 pH 3.5	94.80%	4.29%	0.91%	96.57%	3.27%	0.16%	97.06%	2.94%	-
3주기 동안 동결-해동	94.63%	4.41%	0.96%	96.65%	3.22%	0.13%	96.97%	2.90%	0.13%
5주기 동안 동결-해동	94.69%	4.43%	0.88%	96.31%	3.44%	0.25%	97.01%	2.87%	0.12%

[0491]

[0492] 실시예 1.14

[0493] hu3F8의 번역-후 변형(PHM) 분석. P1: hu3F8은 스트레스를 받지 않았고; P2: hu3F8은 40℃에서 2주 동안 스트레스를 받았다. 2주 동안 40℃에서 스트레스를 받지 않거나 스트레스를 받은 hu3F8을 트립신으로 절단하고, 이어서 번역-후 변형을 질량 분석법에 의해 분석하였다. 결과는 HC:372-393에서 탈아미드화의 약간의 증가를 보인다. 일반적으로 PHM은 스트레스 전후에 큰 차이가 없었으며, 이는 양호한 전개성을 가리킨다.

[0494] [표 11]

[0495] hu3F8의 PTM 분석 결과

일련 번호	펩티드 단편	펩티드 서열	체류시간 (분)	번역-후 변형	EIC 비(%)	
					P1	P2
1	HC:1-13	QVQLQESGPGLVK	29.44	/	/	/
		Q VQLQESGPGLVK	37.65	pE (Q)	99.4	99.7
2	HC:58-65	NNFNPSLK	22.99	/	/	/
		N NNFNPSLK	24.67	탈아미드화 (N)	1.1	1.1
3	HC:250-256	DTLMISR	25.38	/	/	/
		D TLMISR	22.07	산화 (M)	2.2	3.1
5	HC:298-313	VVSVLTVVHQDWLNGK	62.21	/	/	/
		VVSVLTVVHQDWL N GK	63.86	탈아미드화 (N)	2.6	2.7
		VVSVLTVVHQDWL N GK	63.55			
		VVSVLTVVHQDWL N GK	65.32	숙신아미드 형성 (N)	3.9	3.9
6	HC:372-393	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	50.8	/	/	/
		GFYPSDIAVEWES N GQPENNYK	51.73	탈아미드화 (N)	2.2	5.8
		GFYPSDIAVEWES N GQPENNYK	51.55			
7	HC:418-440	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	37.78	/	/	/
		WQQGNVFSCSVMHEAL H NHYTQK	38.52	탈아미드화 (N)	1.8	1.9
8	HC:441-448	SLSLSPGK	23.18	/	/	/
		S LSLSPG K	27.46	-K	96.1	96.0
9	LC:127-142	SGTASVVCLLNNFYPR	64.43	/	/	/
		SGTASVVCLL N NFYPR	53.82	탈아미드화 (N)	0.9	1.0
		SGTASVVCLL N NFYPR	67.25			

[0496]

본원에 개시된 항체의 아미노산 서열을 하기에 나열한다.

[0497]

쥐 3F8의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열:

[0498]

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTFKLLIYYTSILHSGVPSRFS
GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPPTFG AGTKLELK (서열번호 15)

[0499]

쥐 3F8의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열:

[0500]

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSAYYWNWIRQPGDKLEWMGYISYDGRNNFN
PSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTSGDTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 16)

[0501]

인간화 3F8(클론 1/hu3F8-1)의 중쇄의 아미노산 서열

[0502]

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKLEWIGYISYDGRNNFN
SLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLS LSPGK (서열번호 11)

[0503]

인간화 3F8(클론 2/hu3F8-2)의 중쇄의 아미노산 서열

[0504]

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFKLEWIMGYISYDGRNNFN
PSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSL SLSGK (서열번호 13)

[0505]

[0506] 인간화 3F8(클론 3/hu3F8-3)의 중쇄의 아미노산 서열

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFQKLEWWMGYISYDGRNRFN
 PSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLVSSVAADTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM
 HEALHNHYTQKSLS LSPGK (서열번호 14)

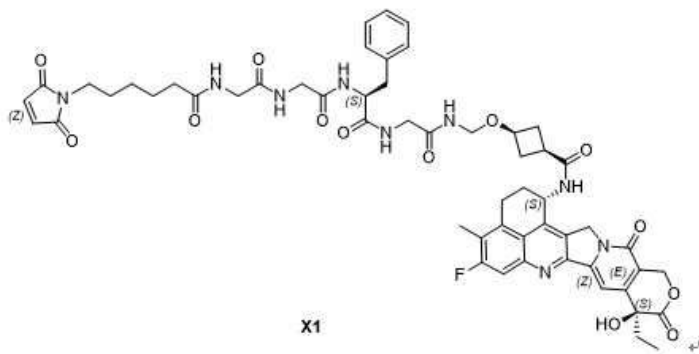
[0507]
 [0508] 인간화 3F8(클론 1-3/hu3F8-1-3)의 경쇄의 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYSILHSGVPSRFS
 GSGSGTDYFTFISLQPEDATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 12)

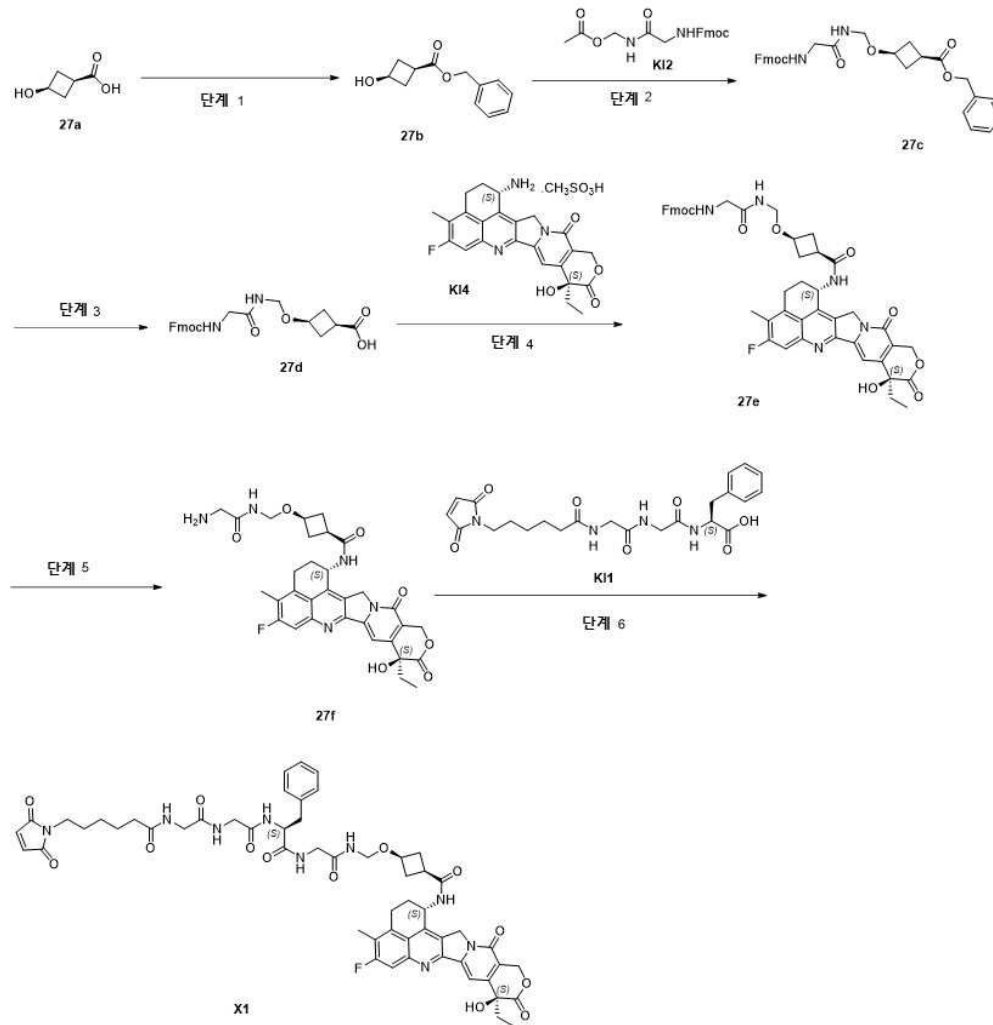
[0509]
 [0510] 실시예 2. 항-Her3 항체-약물 결합체(ADC)의 제조

[0511] 1.1. 링커-세포독소(링커-페이로드)의 제조

[0512] 링커-페이로드 X1



[0513]



[0514]

[0515]

단계 1

[0516]

벤질 브로마이드(11.0 g, 64.6 mmol)를 질소 대기 하에 DMF(50 ml) 중의 27a(5.00 g, 43.0 mmol) 및 NaHCO₃(10.9 g, 129 mmol) 용액에 적가하고 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액에 물(500 ml)을 첨가하고 EA(250 ml)로 2회 추출하였다. 유기상을 분리시키고, 포화된 염화나트륨 수용액(500 ml)으로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 3:2)로 정제하여 무색 액체(5.1 g, 수율 57.1%)를 제공하였다.

[0517]

단계 2

[0518]

THF(10 ml) 중의 27b(4.50 g, 21.8 mmol)의 용액을 0℃에서 질소 대기 하에 THF(30 ml) 중의 KI2(4.00 g, 10.9 mmol) 및 TsOH(800 mg, 4.65 mmol) 용액에 적가하고, 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 1/2)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액에 물(200 ml)을 첨가하고 EA(200 ml)로 2회 추출하였다. 유기상을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 3/2)로 정제하여 백색 고체(1.56 g, 수율 26%)를 제공하였다.

[0519]

단계 3

[0520]

Pd/C(80 mg)를 수소 대기 하에 0℃에서 EtOH(8 ml) 및 EA(8 ml) 중의 27c(800 mg, 1.55 mmol)의 혼합 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2.5시간 동안 교반하였다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 셀라이트를 통해 여과하고, 필터 케이크를 EA(200 ml)로 세척하였다. 여액을 농축시키고 THF(20 ml)에 용해시키고, 회전 증발에 의해 건조시켜 백색 고체(600 mg, 91% 수율)를 제공하였다.

[0521]

단계 4

[0522]

DIEA(152 mg, 1.18 mmol)를 질소 대기 하에 0℃에서 DMF(6 ml) 중의 27d(220 mg, 0.515 mmol), HY-13631A(250

mg, 0.47 mmol) 및 HATU(214 mg, 0.56 mmol)의 용액에 첨가하고 혼합물을 0°C에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 시트르산 수용액(pH=4)(150 ml)에 첨가하고 여과 하였다. 필터 케이크를 물(175 ml)로 세척하고, 여과에 의해 건조시키고, 오일 펌프로 건조시켜 갈색 고체(260 mg, 수율 66%)를 제공하였다.

[0523] 단계 5

[0524] 디에틸아민(8 ml)을 질소 대기 하에 0°C에서 DCM(30 ml) 중의 27e(260 mg, 0.309 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 0°C에서 3시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 0°C의 석유 에테르 용액(600 ml)에 첨가하였으며, 고체가 침전되었다. 고체가 플라스크 바닥에 흡착될 때까지 생성 혼합물을 방치한 후 용액을 붓고 오일 펌프로 건조시켜 갈색 고체(90 mg, 수율 47.1%)를 제공하였다.

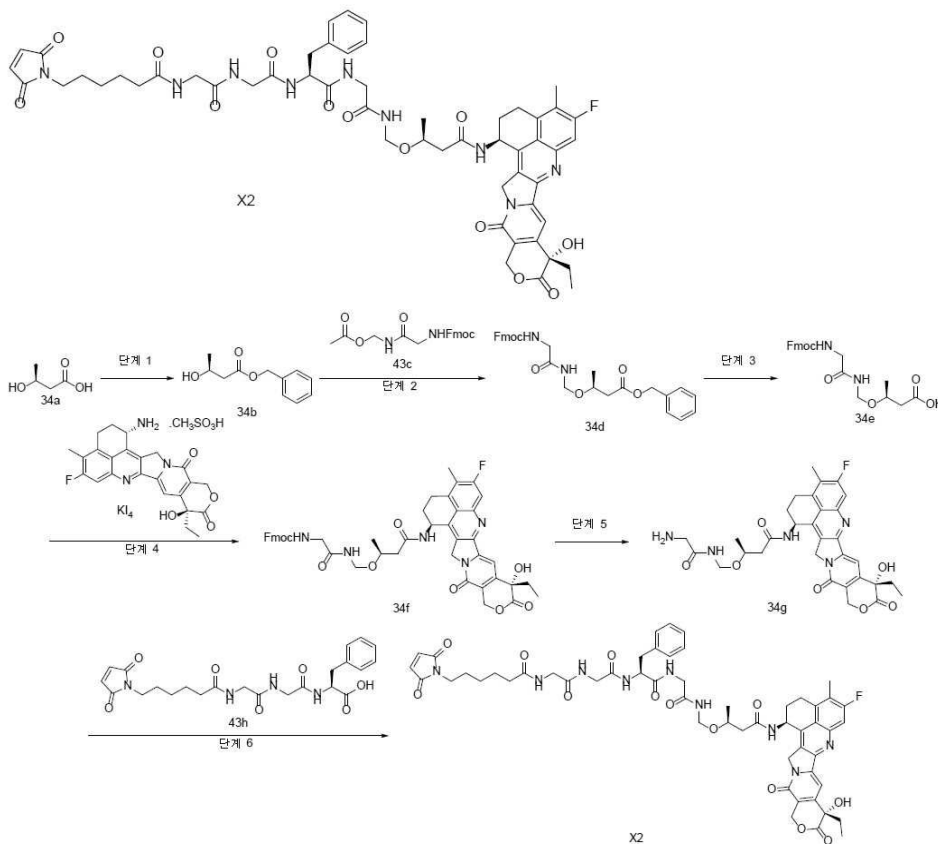
[0525] 단계 6

[0526] HATU(74 mg, 0.19 mmol)를 질소 대기 하에 0°C에서 DMF(2.5ml) 중의 27f(90 mg, 0.13 mmol), KI-1(92 mg, 0.19 mmol) 및 DIEA(50 mg, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 0°C에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 거의 완료된 후, 반응 용액을 0°C, pH 4의 시트르산 수용액(30 ml)에 첨가하였으며, 응집성 고체가 침전되었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 예비 플레이트(DCM/MecOH = 10/1) 상에서 정제하여 X1을 담황색 고체(9.2 mg, 수율 6%)로서 제공하였다.

MS m/z (ESI): 1074 [M+1]⁺

H-NMR (400 MHz, MeOD): 7.65 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.30-7.21(m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.69-5.65 (m, 1 H), 5.57 (d, 1H), 5.43-5.10 (m, 3H), 4.70 (d, 2H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.01-3.75 (m, 5H), 3.46 (t, 2H), 3.22-3.15 (m, 2H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37-2.20 (m, 6H), 2.10-2.02 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 2H) 1.68-1.57 (m, 6H), 1.01 (t, 3H)⁺

[0527] 링커-페이로드 X2



[0529]

[0530] 단계 1

[0531] 34a(5 g, 48.0 mmol) 및 K₂CO₃(19.9 g, 144.0 mmol)을 DMF(20 ml)에 용해시킨 후, 벤질 브로마이드(12.3 g,

72.0 mmol)를 적가하였다. 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 3/1)에 의해 검출된 바와 같이 출발 물질이 완전히 소모된 후, 반응 용액에 물(200 ml)을 첨가하고 EA(250 ml)로 추출하였다. 유기상을 분리시키고, 포화 NaCl로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축시키고, 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 2:1)로 정제하여 34b(8.7 g, 수율 93%)를 무색 액체로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 195.1 [M+H]⁺.

[0532] 단계 2

[0533] 34c(7.3 g, 19.8 mmol) 및 TsOH(1.46 g, 8.5 mmol)를 THF(20 ml)에 용해시키고, 혼합물을 질소 대기 하에 0℃로 냉각시켰다. THF(10 ml) 중의 43b(7.7 g, 39.6 mmol)의 용액을 적가하고, 첨가 후 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)에 의해 검출된 바와 같이 대부분의 출발 물질이 소비된 후, 반응 용액을 물(100 ml)에 붓고 DCM(100 ml)으로 추출하였다. 유기 상을 분리시키고, 포화된 NaCl로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 1/1)로 정제하여 34d를 무색 점착성 물질(3.9 g, 39% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 503.3 [M+H]⁺.

[0534] 단계 3

[0535] Pd/C(1 g, 10 중량%)를 질소 대기 하에 0℃에서 EtOH(100 ml) 및 EA(100 ml)중의 34d(1.9 g, 3.78 mmol)의 혼합 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 셀라이트를 통해 여과하고, 필터 케이크를 EA/EtOH(1:1, 100 ml × 3)로 세척하였다. 여액을 농축시키고 THF(50 ml x 3)에 용해시키고, 회전 증발에 의해 건조시키고; 이 절차를 3회 반복하여 34e를 회색 고체(1 g, 64% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 435.2 [M+Na]⁺.

[0536] 단계 4

[0537] DIEA(303 mg, 2.35 mmol)를 질소 대기 하에 0℃에서 DMF(20 ml) 중의 34e(426 mg, 1.03 mmol), KI₄(500 mg, 0.94 mmol) 및 HATU(429 mg, 1.13 mmol)의 용액에 적가하고, 첨가가 완료된 후 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 물(300 ml)에 적가하였다. 생성된 혼합물을 교반한 후, 5분 동안 방치하고, 여과하고, 필터 케이크를 DCM/MeOH(10:1, 100ml) 용액에 용해시켰다. 생성된 용액을 건조시키고, 회전 증발에 의해 농축 건조시키고, 잔사를 실리카겔과 혼합하고 컬럼 크로마토그래피(EA:MeOH = 30:1)에 의해 정제하여 34f를 황색 고체(600 mg, 77% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 830.3 [M+H]⁺.

[0538] 단계 5

[0539] 디에틸아민(5 ml)을 DCM(5 ml) 중의 34f(150 mg, 0.18 mmol) 용액에 질소 대기 하에 0℃에서 적가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액에 석유 에테르 용액(100 ml x 6)을 첨가하였으며, 고체가 침전되었다. 생성된 혼합물을 고체가 정지될 때까지 방치하고, 용액을 부었다. 잔사를 오일 펌프로 건조시켜 34g를 백색 분말(120 mg, 76% 수율)로서 제공하였으며, 이때 LCMS에 의해 측정된 생성물 함량은 70%였다. MS-ESI: m/z 608.3 [M+H]⁺.

[0540] 단계 6

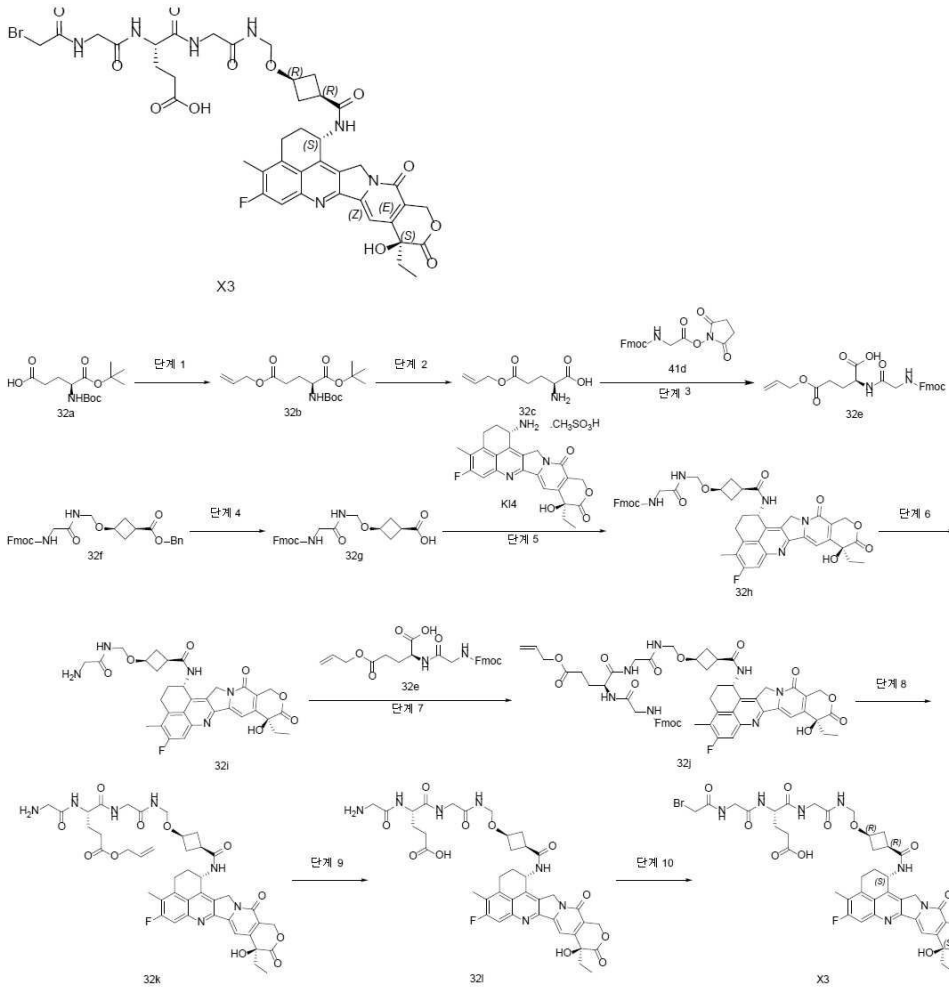
[0541] DMF(1 ml) 중의 HATU(45 mg, 0.118 mmol) 용액을 질소 대기 하에 0℃에서 DMF(1 ml) 중의 34g(60 mg, 0.099 mmol), 43h(51 mg, 0.108 mmol) 및 DIEA(32 mg, 0.25 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 출발 물질이 완전히 소모된 후, 반응 용액을 역상 컬럼 크로마토그래피(용출제: (MeCN/MeOH = 1/1):H₂O = 60%:40%)로 직접 정제시켜 X2를 황색 고체(14.8 mg, 14% 수율)로서 제공하였다.

MS-ESI: m/z 1062.4 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.69 - 7.61 (m, 2H), 7.22 - 7.16 (m, 2H), 7.16 - 7.09 (m, 3H), 6.76 (s, 2H), 5.70 - 5.64 (m, 1H), 5.60 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.40 - 5.31 (m, 2H), 5.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.65 - 4.50 (m, 7H), 4.25 - 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.83 - 3.76 (m, 3H), 3.72 (d, J = 17.0 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.25 - 3.17 (m, 2H), 3.10 - 3.02 (m, 1H), 2.92 - 2.83 (m, 1H), 2.45 - 2.39 (m, 5H), 2.32 - 2.20 (m, 5H), 1.97 - 1.89 (m, 2H), 1.63 - 1.50 (m, 4H), 1.34 - 1.20

[0542]) (m, 6H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0543] 링커-페이로드 X3



[0544]
[0545] 단계 1

[0546] 브로모프로펜(960 mg, 7.92 mmol)을 MeCN(20 ml) 중의 32a(2.00 g, 6.6 mmol) 및 K₂CO₃(1.82 g, 13.2 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 20°C에서 5시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/2)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 물(100 ml)에 붓고 pH 5로 조절하고 EA(100 ml)로 3회 추출하였다. 유기상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 회전 증발로 농축 건조시키고, 잔사를 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 2/1)로 정제하여 32b를 백색 고체(1.83g, 81% 수율)로서 제공하였다.

[0547] 단계 2

[0548] TFA(10 ml)를 DCM(10 ml) 중의 32b(1.38 g, 4.02 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/3)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 회전 증발에 의해 농축 건조시켜 황색의 점착성 물질로서 32c(0.91 g, 수율은 계산되지 않음)을 제공하였다.

[0549] 단계 3

[0550] 41d(1.92 g, 4.87 mmol)를 DME/H₂O(20 ml/10 ml) 중의 32c(910 mg, 4.87 mmol) 및 NaHCO₃(613 mg, 7.3 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 3시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 1/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 물(100 ml)에 붓고, 수성 HCl(1N)로 pH 5로 조절하고, EA(150 ml)로 2회 추출하였다. 유기상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 회전 증발로 농축 건조시키고, 잔사를 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 20/1)로 정제하여 32e를 백색 고체(1.53 g, 67% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 467.4 [M+H]⁺.

[0551] 단계 4

[0552] Pd/C(600 mg)를 MeOH(50 ml) 중의 32f(3 g, 5.83 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 수소 하에 25°C에서 5시간 동안

교반하였다. TLC(EA)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 여과하고, 여액을 회전 증발기로 농축 건조시켜 백색 고체로서 32g(1.9 g, 77% 수율)를 제공하였다.

[0553] 단계 5

[0554] HATU(707 mg, 1.86 mmol)를 DMF(10 ml) 중의 32g(789 mg, 1.86 mmol), KI4(900 mg, 1.69 mmol) 및 트리에틸아민(342 mg, 3.38 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 0°C에서 3.5시간 동안 교반하였다. TLC(EA)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 H₂O(80 ml)에 붓고 EA(100 ml)로 2회 추출하였다. 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 회전 증발에 의해 농축 건조시키고, 잔사를 컬럼 크로마토그래피(EA)로 정제하여 32h를 백색 고체(1.186 g, 83% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 842.3 [M+H]⁺.

[0555] 단계 6

[0556] DCM/디에틸아민(20 ml, 20/1) 중의 32h(1.186 g, 1.41 mmol)를 25°C에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 10/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 석유 에테르(200 ml)에 붓고, 생성된 혼합물을 여과하여 32i를 백색 고체(768 mg, 88%)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 620.3 [M+H]⁺.

[0557] 단계 7

[0558] HATU(414 mg, 1.09 mmol)를 DMF(10 ml) 중의 32i(676 mg, 1.09 mmol), 32e(508 mg, 1.09 mmol) 및 DIEA(423 mg, 3.27 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 20°C에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/5)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 물(30 ml)에 부었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 50/1)로 정제하여 32j를 백색 고체(511 mg, 44% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 1068.3 [M+H]⁺.

[0559] 단계 8

[0560] 디에틸아민/DCM(10 ml, 1/5) 중 32j(482 mg, 0.451 mmol)의 용액을 10°C에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(EA)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 PE(300 ml)에 붓고, 생성된 혼합물을 여과하여 32k를 백색 고체(301 mg, 수율 계산되지 않음)로서 제공하였다.

[0561] 단계 9

[0562] 모르폴린(93 mg, 1.07 mmol)을 THF(5 ml) 중의 32k(301 mg, 0.356 mmol) 및 Pd(PPh₃)₄(82 mg, 0.071 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 5시간 동안 교반하였다. LCMS에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 예비 크로마토그래피로 정제하여 32l를 백색 고체(108 mg, 38% 수율)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 806.3 [M+H]⁺.

[0563] 단계 10

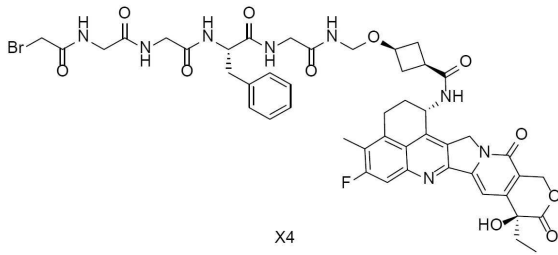
[0564] 브로모아세틸 브로마이드(27 mg, 0.134 mmol)를 THF(2 ml) 및 DMF(2 ml) 중의 32l(108 mg, 0.134 mmol) 및 트리에틸아민(41 mg, 0.402 mmol)에 첨가하고 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 10/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 예비 크로마토그래피로 직접 정제하여 X3을 백색 고체(15 mg, 12% 수율)로서 제공하였다.

MS-ESI: m/z 926.3 [M+H]⁺.

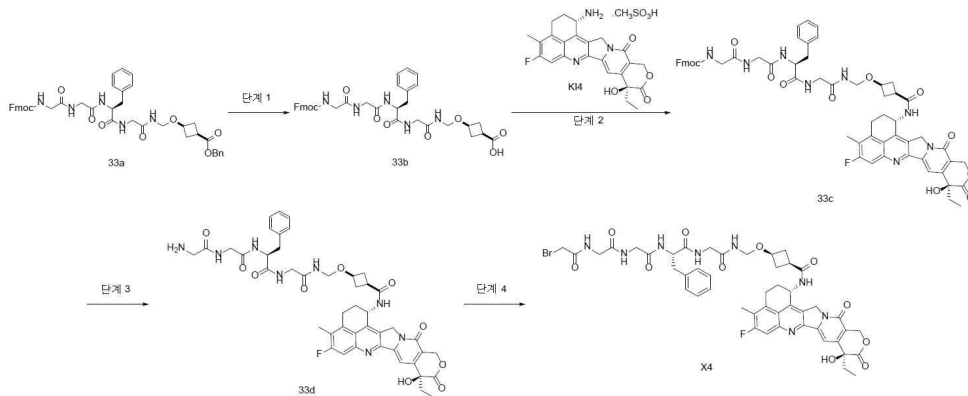
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.11 (s, 1H), 8.54 - 8.42 (m, 3H), 8.27 - 8.16 (m, 2H), 7.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61 - 5.51 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 - 5.05 (m, 2H), 4.56 - 4.42 (m, 2H), 4.32 - 4.22 (m, 1H), 3.96 - 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.25 - 3.08 (m, 2H), 2.61 - 2.53 (m, 2H), 2.45 - 2.36 (m, 4H), 2.36 - 2.22 (m, 3H), 2.20 - 2.03 (m, 4H), 1.99 - 1.68 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0565]

[0566] 링커-페이로드 X4



[0567]



[0568]

[0569] 단계 1

[0570] Pd/C(400 mg, 10 중량%)를 MeOH(20 ml) 중의 33a(2.00 g, 2.58 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 20℃에서 5시간 동안 교반하였다. TLC(EA)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 여과하고, 여과액을 회전 증발로 농축 건조시켜 33b를 백색 고체(1.3 g, 74% 수율)로서 제공하였다.

[0571] 단계 2

[0572] HATU(305 mg, 0.802 mmol)를 DMF(5 ml) 중의 33b(0.55 g, 0.802 mmol), KI4(427 mg, 0.802 mmol) 및 DIPEA(310 mg, 2.40 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 1/10)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 물(40 ml)에 부었다. 생성된 혼합물을 여과하여 조 생성물을 제공하고, 이를 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 20/1)로 정제하여 33c를 황색 고체(360 mg, 41% 수율)로서 제공하였다.

[0573] 단계 3

[0574] 디에틸아민(2 ml)을 DCM(10 ml) 중의 33c(360 mg, 0.326 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 5/1)에 의해 검출된 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 PE(100 ml)에 붓고 생성된 혼합물을 여과하여 33d를 백색 고체(205 mg, 71%)로서 제공하였다. MS-ESI: m/z 881.3 [M+H]⁺.

[0575] 단계 4

[0576] THF(2 ml) 중의 브로모아세틸 브로마이드(94 mg, 0.446 mmol)의 용액을 DMF(1 ml) 및 물(1 ml) 중의 33d(205 mg, 0.233 mmol) 및 트리에틸아민(118 mg, 1.17 mmol)에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 예비 크로마토그래피로 직접 정제시켜 X4를 백색 고체(15 mg, 6% 수율)로서 제공하였다.

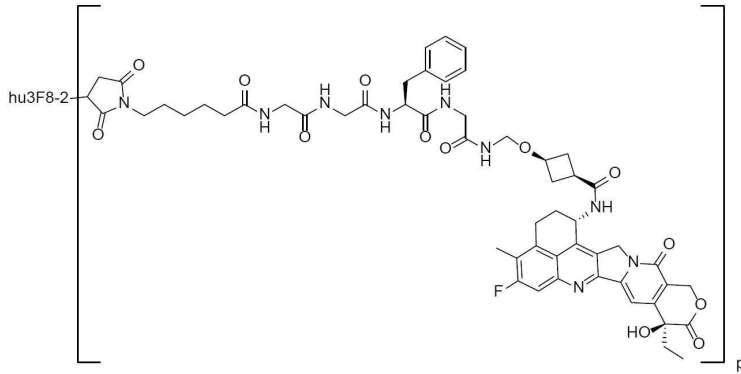
MS-ESI: m/z 1001.2 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.57 - 8.50 (m, 1H), 8.50 - 8.43 (m, 2H), 8.35 - 8.29 (m, 1H), 8.19 - 8.12 (m, 2H), 7.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.27 - 7.14 (m, 7H), 6.53 (s, 1H), 5.59 - 5.51 (m, 1H), 5.44 - 5.39 (m, 2H), 5.20 - 5.07 (m, 2H), 4.56 - 4.44 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.80 - 3.68 (m, 5H), 3.41 (s, 1H), 3.21 - 3.12 (m, 2H), 2.83 - 2.74 (m, 1H), 2.58 - 2.55 (m, 3H), 2.39 (s, 4H), 2.18 - 2.03 (m, 4H), 1.93 - 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0577]

[0578] 2.2. 항-Her3 항체-약물 접합체의 제조

[0579] 항체-약물 접합체 ADC-1-X1(hu3F8-2-X1)의 제조



[0580]

[0581]

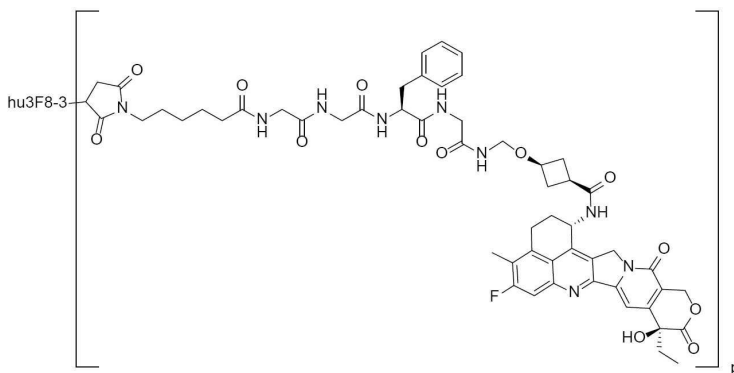
환원제 및 보호제를, 초순수: 2 mg/ml TCEP(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염(제조사: Sigma)을 사용하여 제형화하였다. 7.4 mg/ml 항-Her3 항체(hu3F8-2) 150 mg을 50 ml 원심분리 튜브에 넣고 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.5)을 첨가하여 항체 반응 농도가 5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염을 반응 용액 전체 부피의 5%의 양으로 첨가하고, 생성 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하였다. 이어서 6.0:1의 TCEP 대 항체 몰비로 2 mg/ml TCEP를 첨가하여 항체를 환원시키고, 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고, 써모믹서(thermomixer)에서 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 디메틸 설폭사이드(제조사: Sinopharm) 중의 링커-페이로드 X1의 10 mg/ml 용액을 제조하고 18.0:1의 약물 대 항체 몰비에 따라 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플을 한외여과 튜브(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)를 사용하여 저장 완충액으로 교환하였다. 먼저, 10% 디메틸설폭사이드를 함유하는 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행한 후, DMSO가 포함되지 않은 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행하고, 이어서 한외여과 농축을 수행하여 ADC-1-X1(26.8 mg/ml 농도, 73% 수율)을 제공하였다. 순도 및 DAR 값을 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 결정하였다.

[0582]

시험 결과, 항체-약물 접합체 ADC-1-X1의 순도는 98.68%이고, DAR 값 p는 7.12인 것으로 나타났다.

[0583]

항체-약물 접합체 ADC-2-X1(hu3F8-3-X1)의 제조



[0584]

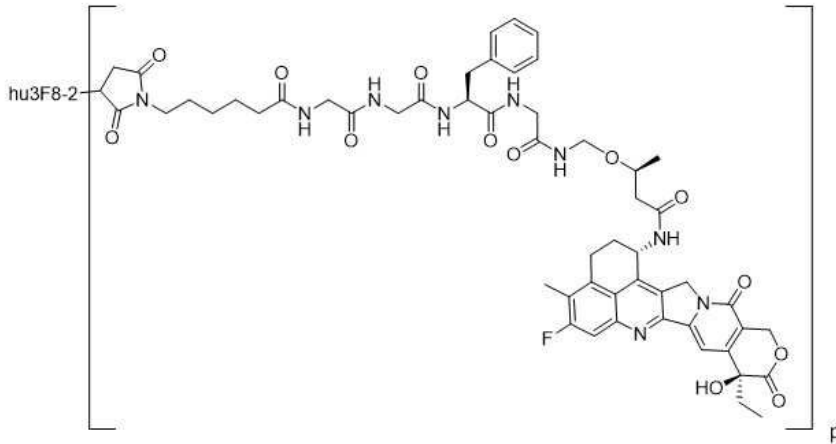
[0585]

환원제 및 보호제를, 초순수: 2 mg/ml TCEP(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염(제조사: Sigma)을 사용하여 제형화하였다. 7.5 mg/ml 항-Her3 항체(hu3F8-2) 150 mg을 50 ml 원심분리 튜브에 넣고 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.5)을 첨가하여 항체 반응 농도가 5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염을 반응 용액 전체 부피의 5%의 양으로 첨가하고, 생성 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하였다. 이어서 6.0:1의 TCEP 대 항체 몰비로 2 mg/ml TCEP를 첨가하여 항체를 환원시키고, 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고, 써모믹서에서 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 디메틸 설폭사이드(제조사: Sinopharm) 중의 링커-페이로드 X1의 10 mg/ml 용액을 제조하고 18.0:1의 약물 대 항체 몰비에 따라 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플을 한외여과 튜브(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)를 사용하여 저장 완충액으로 교환하였다. 먼저, 10% 디메틸설폭사이드를 함유하는 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH

5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행한 후, DMSO가 포함되지 않은 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행하고, 이어서 한외여과 농축을 수행하여 항체-약물 접합체 ADC-2-X1(21.15 mg/ml 농도, 67.3% 수율)을 제공하였다. 순도 및 DAR 값을 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 결정하였다.

[0586] 시험 결과, 항체-약물 접합체 ADC-2-X1의 순도는 99.08%이고, DAR 값 p는 7.01인 것으로 나타났다.

[0587] 항체-약물 접합체 ADC-1-X2(hu3F8-2-X2)의 제조

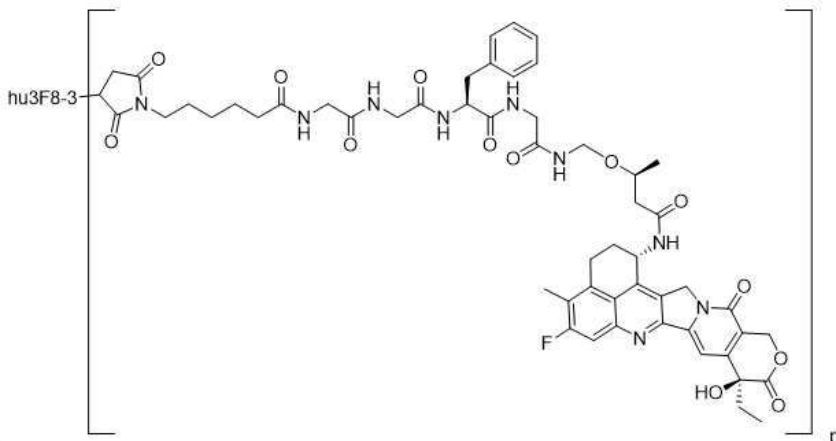


[0588]

[0589] 환원제 및 보호제를, 초순수: 2 mg/ml TCEP(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염(제조사: Sigma)을 사용하여 제형화하였다. 7.4 mg/ml 항-Her3 항체(hu3F8-2) 150 mg을 50 ml 원심분리 튜브에 넣고 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.5)을 첨가하여 항체 반응 농도가 5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염을 반응 용액 전체 부피의 5%의 양으로 첨가하고, 생성 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하였다. 이어서 6.0:1의 TCEP 대 항체 몰비로 2 mg/ml TCEP를 첨가하여 항체를 환원시키고, 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 디메틸 설펝사이드(제조사: Sinopharm) 중의 링커-페이로드 X2의 10 mg/ml 용액을 제조하고 21:1의 약물 대 항체 몰비에 따라 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플을 한외여과 튜브(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)를 사용하여 저장 완충액으로 교환하였다. 먼저, 10% 디메틸설펝사이드를 함유하는 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행한 후, DMSO가 포함되지 않은 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행하고, 이어서 한외여과 농축을 수행하여 항체-약물 접합체 ADC-1-X2(20.56 mg/ml 농도, 64% 수율)을 제공하였다. 순도 및 DAR 값을 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 결정하였다.

[0590] 시험 결과, 항체-약물 접합체 ADC-1-X2의 순도는 99.02%이고, DAR 값 p는 7.53인 것으로 나타났다.

[0591] 항체-약물 접합체 ADC-2-X2(hu3F8-2-X2)의 제조



[0592]

- [0593] 환원제 및 보호제를, 초순수: 2 mg/ml TCEP(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염(제조사: Sigma)을 사용하여 제형화하였다. 7.5 mg/ml 항-Her3 항체(hu3F8-2) 150 mg을 50 ml 원심분리 튜브에 넣고 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.5)을 첨가하여 항체 반응 농도가 5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염을 반응 용액 전체 부피의 5%의 양으로 첨가하고, 생성 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하였다. 이어서 6.0:1의 TCEP 대 항체 몰비로 2 mg/ml TCEP를 첨가하여 항체를 환원시키고, 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합한 후 써모믹서에서 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 디메틸 설펝사이드(제조사: Sinopharm) 중의 링커-페이로드 X2의 10 mg/ml 용액을 제조하고 18.0:1의 약물 대 항체 몰비에 따라 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플을 한외여과 튜브(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)를 사용하여 저장 완충액으로 교환하였다. 먼저, 10% 디메틸설펝사이드를 함유하는 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행한 후, DMSO가 포함되지 않은 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행하고, 이어서 한외여과 농축을 수행하여 항체-약물 접합체 ADC-2-X2(21.63 mg/ml 농도, 67.3% 수율)을 제공하였다. 순도 및 DAR 값을 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 결정하였다.
- [0594] 시험 결과, 항체-약물 접합체 ADC-2-X2의 순도는 99.24%이고, DAR 값 p는 7.11인 것으로 나타났다.
- [0595] 참조 ADC-1(U3-1402)의 제조
- [0596] 환원제 및 보호제를, 초순수: 2 mg/ml TCEP(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염(제조사: Sigma)을 사용하여 제형화하였다. 40 mg의 6.9 mg/ml 파트리투마단클론 항체(항체 서열은 특허 "W02007077028"에서 서열번호 70에 제시된 중쇄와 서열번호 72에 제시된 경쇄를 포함하며; 항체는 CHO 세포의 형질감염에 이어서 통상적인 항체 발현 및 정제(순도 >95%)에 의해 생성되었다)를 50 ml 원심분리 튜브에 넣고 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.5)을 첨가하여 항체 반응 농도가 5 mg/ml가 되도록 희석하였다. 100 mmol/L 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트 염을 반응 용액 전체 부피의 5%의 양으로 첨가하고, 생성 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하였다. 이어서 6.0:1의 TCEP 대 항체 몰비로 2 mg/ml TCEP를 첨가하여 항체를 환원시키고, 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 디메틸 설펝사이드(제조사: Sinopharm) 중의 테록스테칸(CAS 1599440-13-7, Shanghai Haoyuan Chemexpress Co. Ltd.에서 구입)의 10 mg/ml 용액을 제조하고 18.0:1의 약물 대 항체 몰비에 따라 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 진탕시켜 충분히 혼합하고 써모믹서에서 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플을 한외여과 튜브(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)를 사용하여 저장 완충액으로 교환하였다. 먼저, 10% 디메틸설펝사이드를 함유하는 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행한 후, DMSO가 포함되지 않은 30 mM 히스티딘 아세테이트 완충액(pH 5.5)을 사용하여 3회 한외여과를 수행하여 참조 ADC-1(8.77 mg/ml 농도, 65% 수율)을 제공하였다. 순도 및 DAR 값을 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 결정하였다.
- [0597] 시험 결과, 참조 ADC-1의 순도는 99.42%이고, DAR 값 p는 7.58인 것으로 나타났다.
- [0598] 실시예 3. 항체-약물 접합체의 내재화 활성
- [0599] 목적
- [0600] HER3를 발현하는 MDA-MB-453 세포에서 HER3 표적에 대한 본 출원의 항체-약물 접합체의 흡수가 검출되었다. 세포, 고정된 농도의 항체-약물 접합체(ADC) 및 내재화 지시 시약 pHrodo를 함께 배양하고, 항체-약물 접합체의 세포내이입 능력을, 상이한 시점에서 세포 중의 항체-약물 접합체와 함께 세포에 진입하는 pHrodo에 의해 발생한 밝은 형광 신호 점의 수를 관찰하여 평가하였다.
- [0601] 절차
- [0602] 1. 세포 배양물: MDA-MB-453 세포를 10% FBS Leibovitz's L-15 배지를 사용하여 배양하였다.
- [0603] 2. 세포 제조: 대수기의 MDA-MB-453 세포를 채취하고, PBS로 1회 세척하고, 2-3 ml의 Versene으로 2-3분 동안 절단하였다. 세포가 완전히 절단된 후, 10-15 ml의 세포 배양액을 첨가하여, 절단된 세포를 용출시켰다. 용출물을 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 버렸다. 생성된 세포를 세포 배양물에 재현탁시켜 단일 세포 현탁액을 제공하였으며, 이를 3×10^5 세포/ml의 생육성 세포 밀도로 조절하였다.
- [0604] 3. 세포 도말: 세포 현탁액을 96웰 세포 배양 플레이트에 50 μ l/웰로 첨가하였다. 배양 플레이트를 배양기에서

18시간 동안 배양하였다(37°C, 5% CO₂).

[0605] 4. 샘플 첨가: 시험 항체-약물 접합체를 Fab-pHrodo와 함께 배양하여 복합체를 형성시키고, 10 nM의 농도로 조절하고, 50 µl/웰로 세포에 첨가하였다.

[0606] 5. 세포 배양: 배양 플레이트를 배양기에서 2, 4, 6, 24 또는 48시간 동안(37°C, 5% CO₂) 배양하였다.

[0607] 6. 플레이트 관독: 상응하는 시점에 도달하면, 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, Hoechst33342를 첨가하여 세포핵 염색을 수행하고, 플레이트를 사진촬영을 위해 operatta CLS에 넣고, 세포 수 및 각 세포 중의 밝은 형광 점의 수를 관독하였다. Harmony® 이미지화 및 분석 소프트웨어를 사용하여 세포 형광 점의 평균 수를 계산하였다.

[0608] [표 12]

[0609] MDA-MB-453 세포에서 상이한 시점에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 내재화에 의해 생성된 밝은 형광 신호 점

항체-약물 접합체	세포 중 형광 점의 평균 수				
분석 시간 (h)	2	4	6	24	48
참조 ADC-1	1.0	1.5	1.8	2.7	2.8
ADC-1-X1	1.1	2.0	2.5	2.7	4.0
ADC-1-X2	2.1	2.3	2.5	3.4	3.7
ADC-2-X1	1.4	2.1	2.5	3.3	3.5
ADC-2-X2	1.4	2.1	2.6	2.6	3.9
IgG1	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7

[0610]

[0611] 결론: 도 10 및 표 12의 결과에 따라, 본 출원의 항체-약물 접합체는 HER3의 발현이 높은 MDA-MB-453 세포에서 흡수되며, 세포내이입 능력은 참조 ADC-1의 경우보다 더 강하다.

[0612] 실시예 4. 시험관내 HER3 표적화 항체-약물 접합체에 의한 종양 세포의 증식 억제

[0613] 목적

[0614] Her3의 고 발현을 갖는 HCC1569 및 MDA-MB-453 세포 및 Her3을 발현하지 않는 MDA-MB-231 종양 세포에 대해 HER3를 표적화하는 본 출원의 항체-약물 접합체의 증식 억제 활성을 시험관내에서 시험하기 위한 것이다. 세포를 시험관내에서 상이한 농도의 항체-약물 접합체로 처리하고, 배양 6일 후에 CTG 시약을 사용하여 세포의 증식을 검출하고, 50% 성장 억제 농도(IC₅₀) 값에 따른 화합물의 시험관내 활성을 평가하였다.

[0615] 절차

[0616] 1. 세포 배양물: HCC1569, MDA-MB-453 또는 MDA-MB-231 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다.

[0617] 2. 세포 제조: 대수기의 HCC1569, MDA-MB-453 또는 MDA-MB-231 세포를 채취하고, PBS로 1회 세척하고, 2-3 ml의 트립신으로 2-3분 동안 절단하였다. 세포가 완전히 절단된 후, 10-15 ml의 세포 배양물을 첨가하여 절단된 세포를 용출시켰다. 용출물을 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 버렸다. 생성된 세포를 10-20 ml의 세포 배양물에 재현탁시켜 단일 세포 현탁액을 제공하였다. 세포를 트립판 블루로 염색하고 생육성 세포 수를 카운트하였다.

[0618] 3. 세포 도말: HCC1569, MDA-MB-453 또는 MDA-MB-231 단일 세포 현탁액을 충분히 혼합하고 세포 배양을 통해 6 x 10⁴ 세포/ml의 생육성 세포 밀도로 조절하였다. 밀도가 조절된 세포 현탁액을 충분히 혼합하고 96웰 세포 배

양 플레이트에 50 μ l/웰로 첨가하였다. 배양 플레이트를 배양기에서 18시간 동안 배양하였다(37°C, 5% CO₂).

[0621] 4. 항체-약물 접합체 농도: 항체-약물 접합체를 100 nM에서 출발하여 0.0152 nM까지 총 9개의 농도에 대해 3배 희석하였다.

[0620] 5. 샘플 첨가: 검출하고자 하는 제조된 샘플을 상이한 농도로 배양 플레이트에 첨가하고, 각 샘플에 대해 2개의 중복 웰을 설정하였다. 배양 플레이트를 배양기에서 6일 동안 배양하였다(37°C, 5% CO₂).

[0621] 6. 전개: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내어 실온으로 평형화되도록 30분간 방치하였다. CTG 시약을 50 μ l/웰로 첨가하고 플레이트를 케도 진탕기에서 2분간 진탕시키고 암실에서 10분간 실온에서 배양하였다.

[0622] 7. 플레이트 관독: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내어, 2104 EnVision 마이크로플레이트 관독기에 넣고, 마이크로플레이트 관독기를 사용하여 화학발광을 측정하였다.

[0623] 데이터 분석

[0624] 검출된 화합물의 억제율(IR)을 하기 식에 따라 계산하였다: IR(%) = (1-(RLU 화합물 - RLU 블랭크 대조군) / (RLU 비히클 대조군 - RLU 블랭크 대조군)) × 100%. 상이한 농도의 화합물의 억제율을 Microsoft Excel을 사용하여 계산하였으며 데이터는 Graphpad Prism 9를 사용하여 처리 및 분석하였다.

[0625] [표 13]

[0626] 본 출원의 항체-약물 접합체에 의한 HCC1569 및 MDA-MB-453 세포의 시험관내 증식의 억제에 대한 IC₅₀ 값

항체-약물 접합체	HCC1569	MDA-MB-453	MDA-MB-231
	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
참조 ADC-1	40.7	9.619	-
ADC-1-X1	0.115	0.042	-
ADC-1-X2	5.167	0.094	-

[0627]

[0628] 참고: "-"는 증식 억제 활성이 없음을 가리킨다.

[0629] 결론: 표 13 및 도 11(11A/11B/11C)에 나타난 결과에 따라, 본 출원의 항체-약물 접합체는 Her3-양성 고 발현 세포인 HCC1569 및 MDA-MB-453의 증식에 대해 유의한 억제 활성을 가지며, 그 억제 활성은 참조 ADC-1의 경우보다 강한 반면, HER3를 발현하지 않는 MDA-MB-231 세포의 증식에 대한 억제 활성이 없으므로 선택성이 양호하다.

[0630] 실시예 5. HCC1569 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체의 효능 평가

[0631] 목적

[0632] HCC1569 유방암 세포의 피하 이종이식편을 갖는 암컷 NOD/SCID 마우스 모델에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 항-종양 효과를 평가하기 위한 것이다.

[0633] 1. 시험 화합물 및 물질

[0634] 블랭크 대조군(음성 대조군): PBS

[0635] 참조 ADC-1(양성 대조군): 1 mg/kg

[0636] ADC-1-X1(처리 그룹): 1 mg/kg

[0637] ADC-1-X2(처리 그룹): 1 mg/kg

[0638] 2. 제조 방법: 모든 샘플을 PBS로 희석하였다.

[0639] 3. 시험 동물

[0640] 8 내지 10주령 NOD/SCID 마우스(Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd.에서 구입)

[0641] 4. 실험 과정

[0642] PBS/Matrigel(1:1) 혼합물(0.1 ml/마우스)에 재현탁된 2×10^6 개의 HCC1569 세포를 시험 마우스의 우측 견갑골에 피하 접종하였다. 종양의 성장을 모니터링하였다. 종양이 평균 부피 100-150 mm³까지 성장했을 때, 마우스를 종양 크기 및 마우스 체중에 따라, 그룹당 마우스 6마리씩 무작위로 분류하였다. 각 그룹의 투여일을 0일로 정의하였다.

[0643] 투여를 주 1회 꼬리 정맥 주사로 수행하였으며, 투여 후 21일차에 실험을 종료하였다. 종양의 부피 및 중량을 일주일에 2회 측정하고, 그 데이터를 기록하였다. 실험 종료 시, 마우스를 안락사시키고 종양 성장 억제 TGI%를 하기와 같이 계산하였다: $(TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)))$. Ti: 투여 i일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; T0: 투여 0일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; Vi: 투여 i일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피; V0: 투여 0일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피.

[0644] 데이터 분석

[0645] 데이터를 Excel 2016 통계 소프트웨어를 사용하여 분석하였으며, 여기서 평균 값은 avg로서 계산되었고; SD 값은 STDEV로 계산되었으며; 그룹 간 차이의 P 값은 TTEST로 계산되었다.

[0646] 실험 결과를 표 14 및 도 12에 나타낸다. 실험 종료 시, 블랭크 대조군의 평균 종양 부피는 1078.32 mm³이었다.

[0647] [표 14]

[0648] HCC1569 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 생체내 종양-억제 효과

항체-약물 접합체	평균 종양 부피	종양 성장 억제 %
참조 ADC-1	308.64 ±66.78mm ³	71.38%
ADC-1-X1	254.63±57.6 mm ³	76.39%
ADC-1-X2	25.84±14.38 mm ³	97.60%

[0649]

[0650] 결론: 본 출원의 항체-약물 접합체는 종양 부피를 유의하게 감소시킬 수 있다. 더욱이, 본 출원의 항체-약물 접합체는 참조 ADC-1의 경우보다 더 양호한 생체내 종양 억제 효과를 갖는다.

[0651] 실시예 6. Colo205 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체의 효능 평가

[0652] 목적

[0653] BALB/c 누드 마우스를 시험 동물로서 사용하여 본 출원의 항체-약물 접합체의 항-종양 효과를 평가하고;

[0654] 복강내 주사 후 Colo205 이종이식 종양-보유 누드 마우스에 대한 ADC-III-28 및 참조 ADC-2의 효능을 평가하기 위한 것이다.

[0655] 1. 시험 화합물 및 물질

[0656] 블랭크 대조군(음성 대조군): PBS

[0657] 참조 ADC-1(양성 대조군): 1 mg/kg

[0658] ADC-1-X1(처리 그룹): 1 mg/kg

[0659] ADC-1-X2(처리 그룹): 1 mg/kg

[0660] 2. 제조 방법: 모든 샘플을 PBS로 희석하였다.

[0661] 3. 시험 동물

[0662] 8 내지 10주령 BALB/c-누드 마우스(Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd.에서 구입)

[0663] 4. 실험 과정

[0664] Colo205 세포를, 1×10^7 개의 세포(100 μl/마우스)로 마우스의 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 80-120 mm³까지 성장했을 때, 동물을 그룹당 동물 5마리씩 무작위로 분류하였다. 각 그룹의 투여일을 0일로 정의하였다.

투여를 2주 마다 1회씩 꼬리 정맥 주사로 수행하였으며, 투여 후 22일차에 실험을 종료하였다. 종양의 부피 및 중량을 일주일에 2회 측정하고, 그 데이터를 기록하였다. 실험 종료 시, 마우스를 안락사시키고 종양 성장 억제 TGI%를 하기와 같이 계산하였다: ($TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0))$). Ti: 투여 i일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; T0: 투여 0일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; Vi: 투여 i일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피; V0: 투여 0일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피.

[0665] 데이터 분석

[0666] 데이터를 Excel 2016 통계 소프트웨어를 사용하여 분석하였으며, 여기서 평균 값은 avg로서 계산되었고; SD 값은 STDEV로 계산되었으며; 그룹 간 차이의 P 값은 TTEST로 계산되었다.

[0667] 실험 결과를 표 15 및 도 13에 나타낸다. 실험 종료 시, 블랭크 대조군의 평균 종양 부피는 515.92 mm³이었다.

[0668] [표 15]

[0669] Colo205 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 생체내 종양-억제 효과

항체-약물 접합체	평균 종양 부피	종양 성장 억제 %
참조 ADC-1	545.75±252 mm ³	-6.38%
ADC-1-X1	385.11±111 mm ³	24.33%
ADC-1-X2	263.20 ±105mm ³	49.09%

[0670]

[0671] 결론: 본 출원의 항체-약물 접합체는 종양 부피를 유의하게 감소시킬 수 있다. 더욱이, 종양-억제 효과는 본 출원의 항체-약물 접합체에서 참조 ADC-1의 경우보다 더 낮은 투여 농도에서 관찰되었다.

[0672] 실시예 7. NCI-H441 폐암 세포 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체의 효능 평가

[0673] 수컷 NU/NU 누드 마우스를 시험 동물로서 사용하여 NCI-H441 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 항-종양 효과를 평가하기 위한 것이다.

[0674] 1. 시험 화합물 및 물질

[0675] 블랭크 대조군(음성 대조군): 생리 식염수

[0676] 참조 ADC-1(양성 대조군): 0.3 mg/kg 또는 1 mg/kg

[0677] ADC-1-X2(처리 그룹): 0.3 mg/kg 또는 1 mg/kg

[0678] 2. 제조 방법: 모든 샘플을 생리 식염수로 희석하였다.

[0679] 3. 시험 동물

[0680] 6 내지 8주령 NU/NU 누드 마우스(Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.에서 구입)

[0681] 4. 실험 과정

[0682] 시험 마우스를 5×10^6 NCI-H441 세포로 우측 등에 피하 접종하고, 세포를 PBS 및 Matrigel(1:1) 0.1 ml에 재현탁시켰다. 종양의 성장을 주기적으로 모니터링하였다. 종양이 평균 부피 115.24 mm³까지 성장했을 때, 마우스를 종양 크기 및 마우스 체중에 따라, 그룹당 동물 6마리씩 무작위로 분류하였다. 각 그룹의 투여일을 0일로 정의하였다. 투여를 1회 꼬리 정맥 주사로 수행하였으며, 투여 후 28일차에 실험을 종료하였다. 종양의 부피 및 중량을 일주일에 2회 측정하고, 그 데이터를 기록하였다. 실험 종료 시, 마우스를 안락사시키고 종양 성장 억제 TGI%를 하기와 같이 계산하였다: ($TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0))$). Ti: 투여 i일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; T0: 투여 0일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; Vi: 투여 i일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피; V0: 투여 0일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피.

[0683] 데이터를 Excel 2016 통계 소프트웨어를 사용하여 분석하였으며, 여기서 평균 값은 avg로서 계산되었고; SD 값은 STDEV로 계산되었으며; 그룹 간 차이의 P 값은 TTEST로 계산되었다.

[0684] 실험 결과를 표 16 및 도 14에 나타낸다. 실험 종료 시, 블랭크 대조군의 평균 종양 부피는 1138.85 mm³이었다.

[0685] [표 16]

[0686] NCI-H441 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 생체내 종양-억제 효과

그룹	투여	용량 (mg/kg)	28일			
			종양 부피 (평균 ± SE M)	T/C (%)	TGI (%)	p 값 (블랭크 대조군과 비교된)
1	블랭크 대조군	-	882.81 ± 114.09	-	-	-
2	ADC-1-X2	1	162.00 ± 42.47	18.35	81.65	0.00787
3	ADC-1-X2	0.3	546.52 ± 109.10	61.91	38.09	0.497
4	참조 ADC-1	1	760.76 ± 208.92	86.17	13.83	0.987
5	참조 ADC-1	0.3	823.01 ± 109.69	93.23	6.77	1

[0687]

[0688] 결론: 본 출원의 항체-약물 접합체는 종양 부피를 유의하게 감소시킬 수 있으며; 본 출원의 항체-약물 접합체는 동일한 농도 하에서 참조 ADC-1의 경우보다 더 양호한 생체내 종양 억제를 갖는다.

[0689]

실시예 8. 인간 폐암 LU1542 피하 이종이식 종양-보유 마우스에서 항체-약물 접합체의 효능 평가

[0690]

목적

[0691]

시험 동물로서 암컷 BALB/c 누드 마우스를 사용하여 인간 폐암 LU1542 피하 이종이식 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 항-종양 효과를 평가하기 위한 것이다.

[0692]

1. 시험 화합물 및 물질

[0693]

블랭크 대조군(음성 대조군): PBS

[0694]

참조 ADC-1(양성 대조군): 3 mg/kg 또는 10 mg/kg

[0695]

ADC-1-X2(처리 그룹): 3 mg/kg 또는 10 mg/kg

[0696]

2. 제조 방법: 모든 샘플을 PBS로 희석하였다.

[0697]

3. 시험 동물: 6 내지 8주령 BALB/c 누드 마우스(Beijing AniKeeper Biotech Co., Ltd.에서 구입)

[0698]

4. 실험 과정

[0699]

HuPrime® 폐암 이종이식 모델 LU1542의 종양-보유 마우스로부터 종양 조직을 수집하고, 직경 2-3 mm의 종양 덩어리로 절단한 후 Balb/c 누드 마우스의 우측 전방 견갑골에 피하 접종하였다. 종양-보유 마우스의 평균 종양 부피가 136.8 mm³에 도달했을 때, 마우스를 그룹당 동물 6마리씩 무작위로 분류하였다. 각 그룹의 투여일을 0일로 정의하였다. 투여를 1회 꼬리 정맥 주사로 수행하였으며, 투여 후 28일차에 실험을 종료하였다. 종양의 부피 및 중량을 일주일에 2회 측정하고, 그 데이터를 기록하였다. 실험 종료 시, 마우스를 안락사시키고 종양 성장 억제 TGI%를 하기와 같이 계산하였다: (TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0))). Ti: 투여 i일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; T0: 투여 0일차의 처리 그룹 및 양성 대조군의 평균 종양 부피; Vi: 투여 i일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피; V0: 투여 0일차의 음성 대조군의 평균 종양 부피.

[0700]

데이터를 Excel 2016 통계 소프트웨어를 사용하여 분석하였으며, 여기서 평균 값은 avg로서 계산되었고; SD 값은 STDEV로 계산되었으며; 그룹 간 차이의 P 값은 TTEST로 계산되었다.

[0701]

실험 결과를 표 17 및 도 15에 나타낸다. 실험 종료 시, 블랭크 대조군의 평균 종양 부피는 1580.09 mm³이었다.

[0702]

[표 17]

[0703]

NCI-H441 종양-보유 마우스에서 본 출원의 항체-약물 접합체의 생체내 종양-억제 효과

항체-약물 접합체	평균 종양 부피	종양 성장 억제 %
ADC-1-X2 3mg/kg	461.39±106.26 mm ³	77.50%
ADC-1-X2 10mg/kg	302.78±129.69 mm ³	88.49%
참조 ADC-1 3 mg/kg	1219.23 ±187.13 mm ³	24.98%
참조 ADC-1 10 mg/kg	602.13± 898 mm ³	67.75%

[0704]

[0705]

결론: 본 출원의 항체-약물 접합체는 종양 부피를 유의하게 감소시킬 수 있다. 더욱이, 종양-억제 효과는 본 출원의 항체-약물 접합체에서 참조 ADC의 경우보다 낮은 투여 농도에서 관찰되었으며, 본 출원의 항체-약물 접합체는 동일한 농도 하에서 더 양호한 종양 억제를 갖는다.

[0706] 본 출원의 서열(서열번호):

번호	표시	서열
1	HCDR1	SAYYWN
2	HCDR2	YISYDGRNNFNPSLKN
3	HCDR3	DGDYDYFDY
4	LCDR1	RASQDISNYLN
5	LCDR2	YTSILHS
6	LCDR3	QQGDTLPPT
7	hu3F8-1 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDG RNNFNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSS
8	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDYFTFISLQPEDYATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIK
9	hu3F8-2 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIMGYISYDG RNNFNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSS
10	hu3F8-3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIMGYISYDG RNNFNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSS
11	hu3F8-1 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDG RNNFNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
12	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDYFTFISLQPEDYATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS

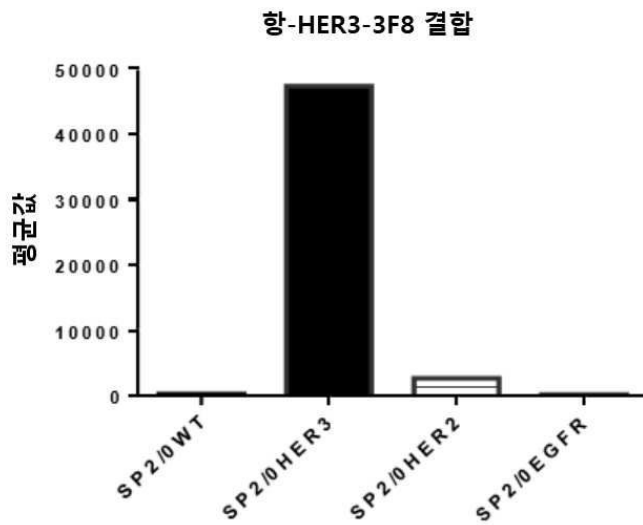
[0707]

		VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	hu3f8-2 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFQKLEWMGYISYDG RNNFNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
14	hu3f8-3 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFQKLEWMGYISYDG RNNFNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAADTATYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
15	m3f8-VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTFKLLIYYTSLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPPTFG AGTKLELK
16	m3f8-VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSAYYWNWIRQFPGDKLEWMGYISYD GRNRFNPSLKNRISITRDTSKNQFSLKLSVTSVSGDTATYYCARDGDYDYFDYWGQ GTTLTVSS

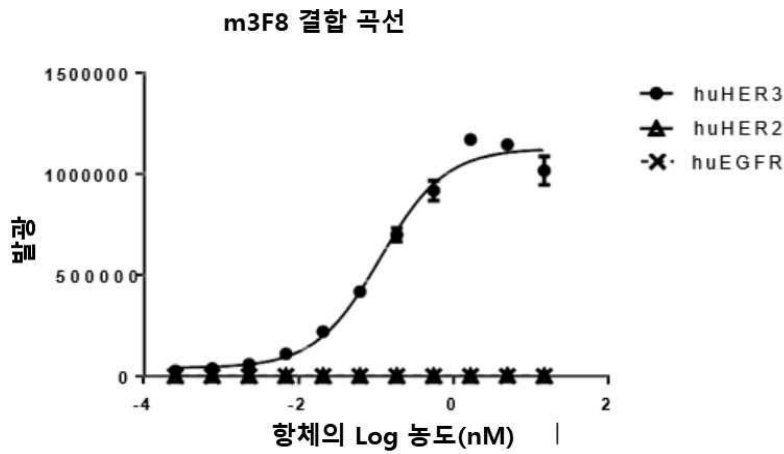
[0708]

도면

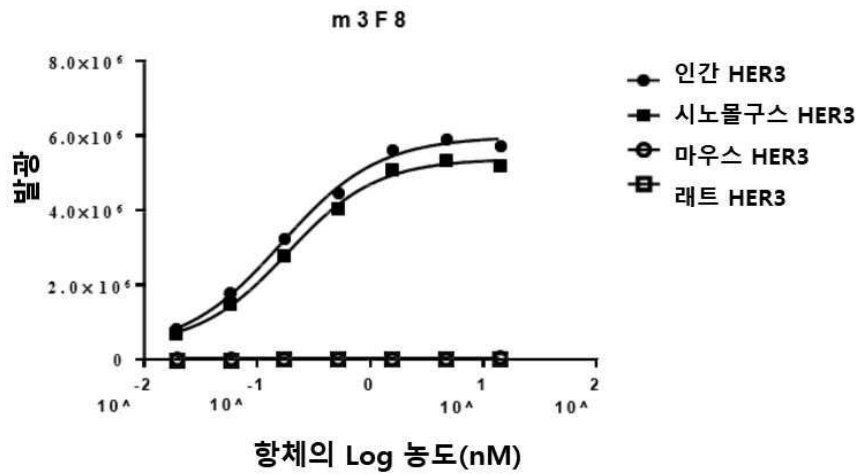
도면1



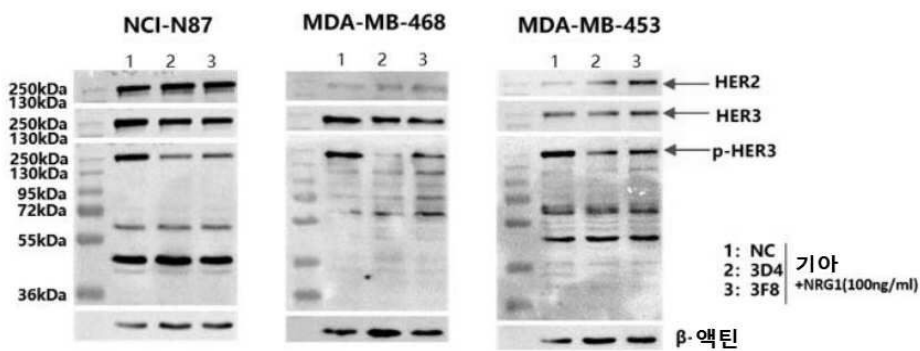
도면2



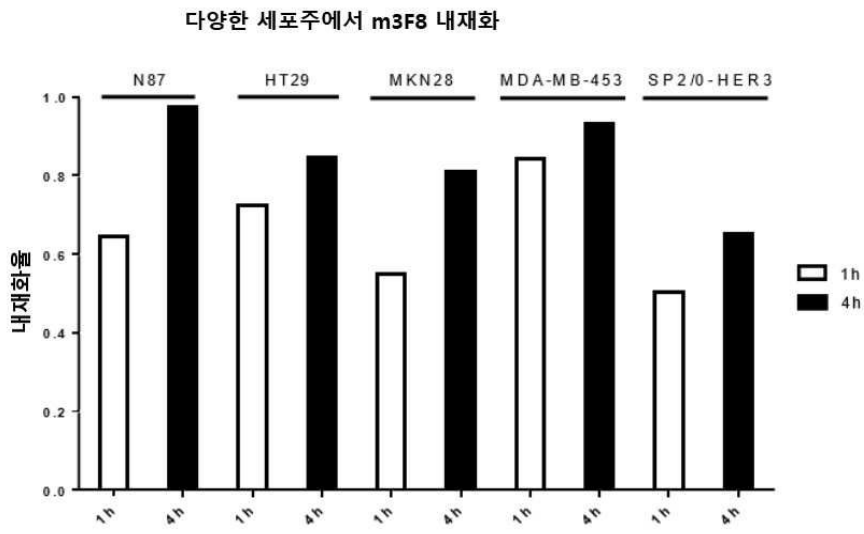
도면3



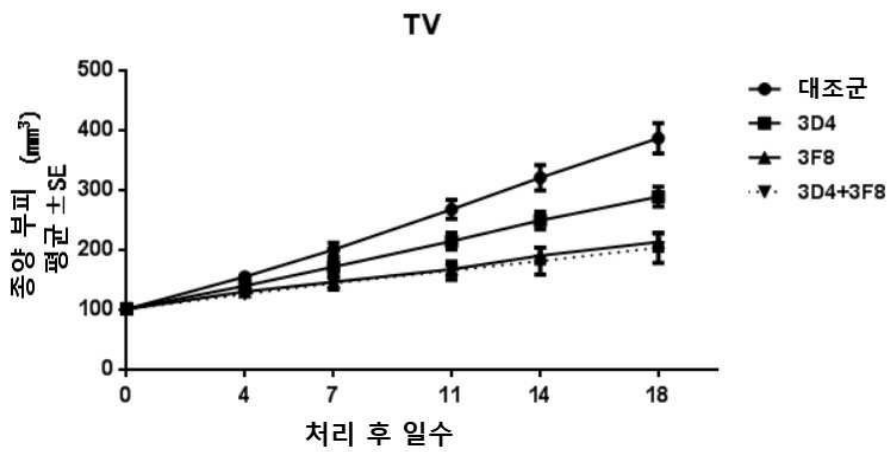
도면4



도면5

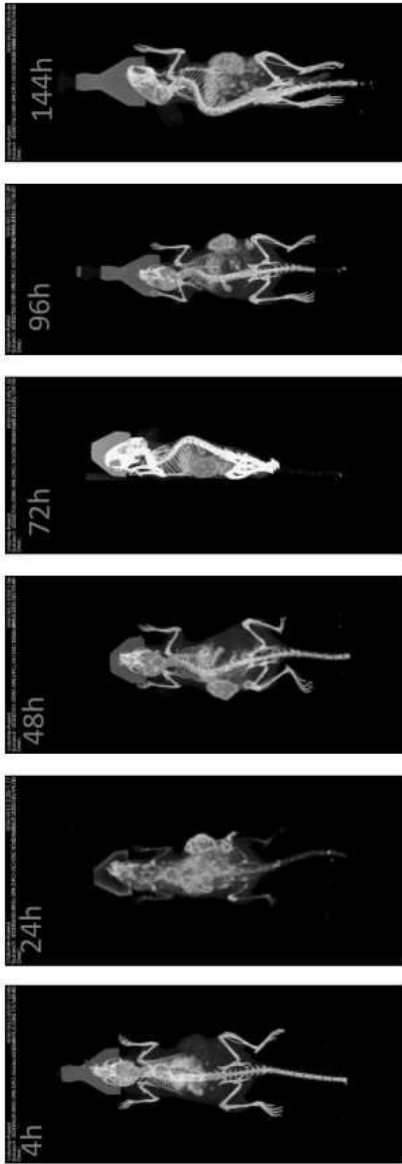


도면6

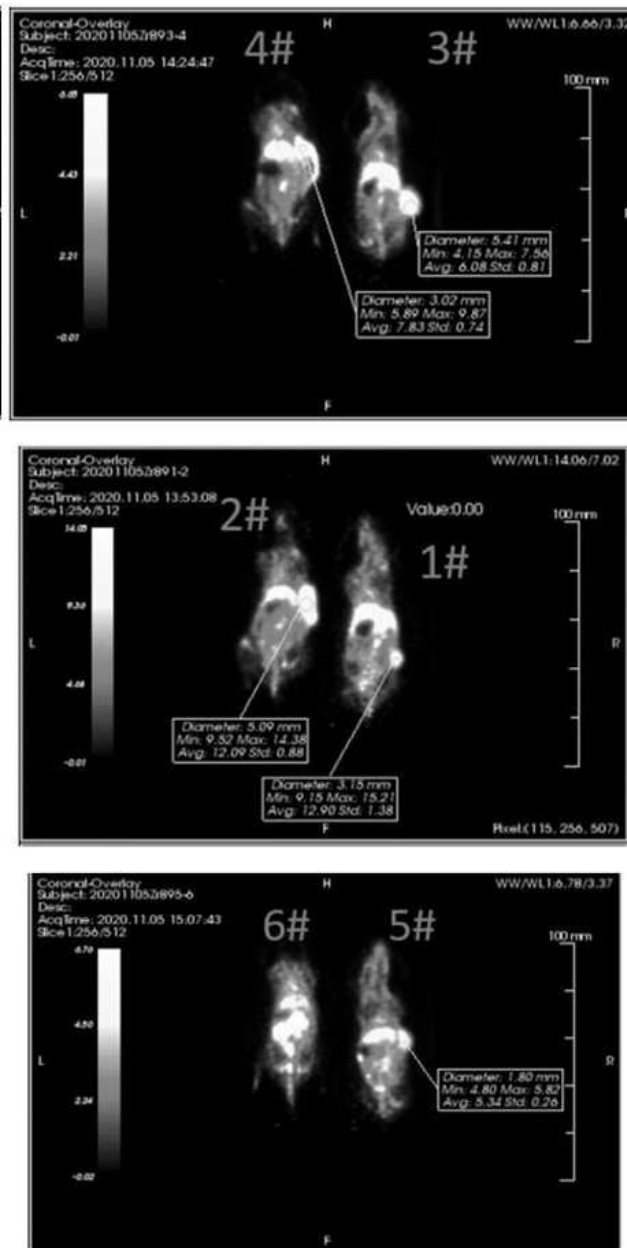


도면7

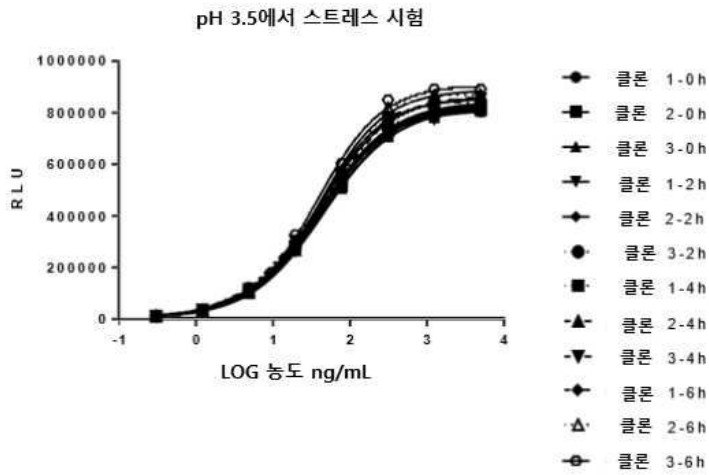
스캐닝: 4h, 1d, 2d, 3d, 4d, 7d



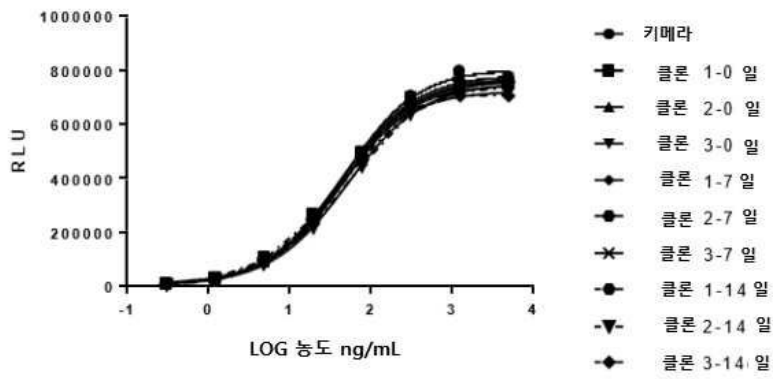
도면8



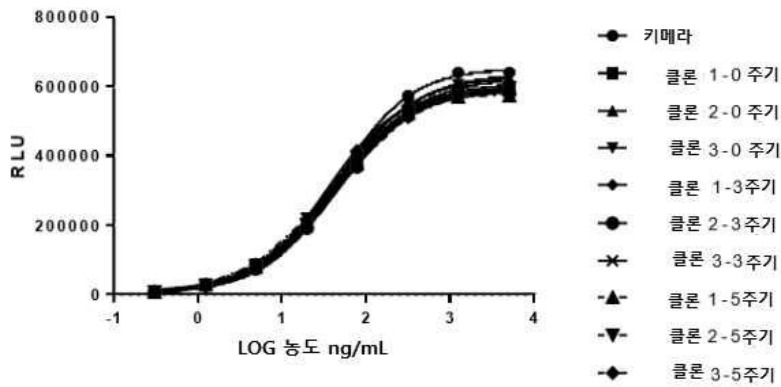
도면9a



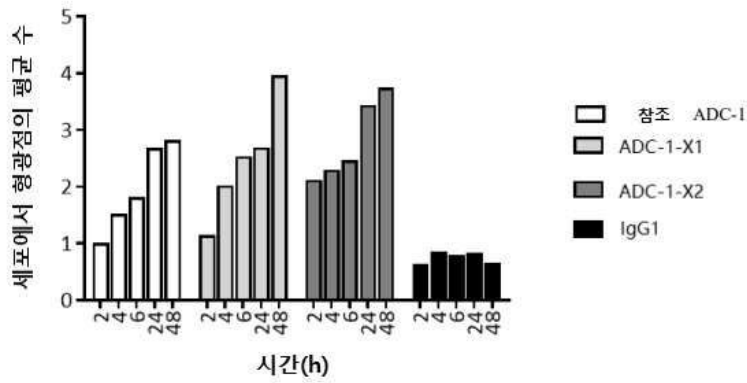
도면9b



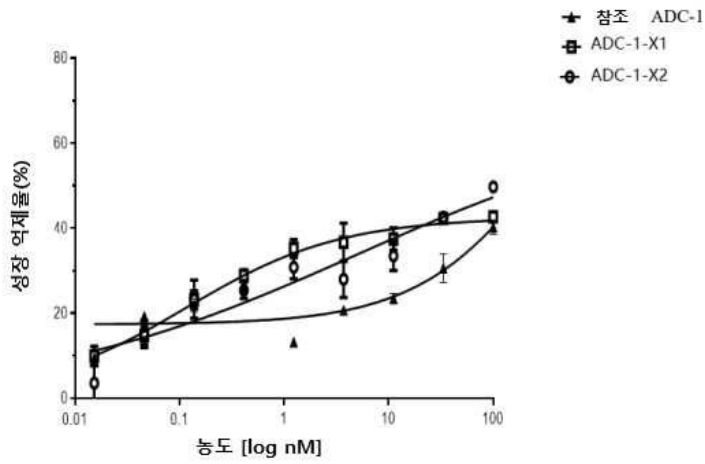
도면9c



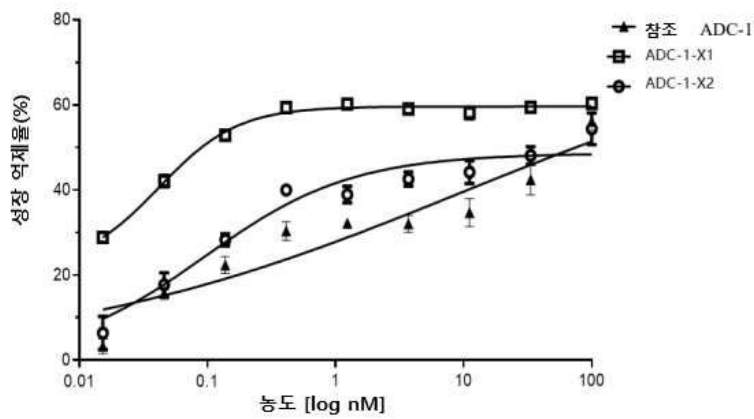
도면10



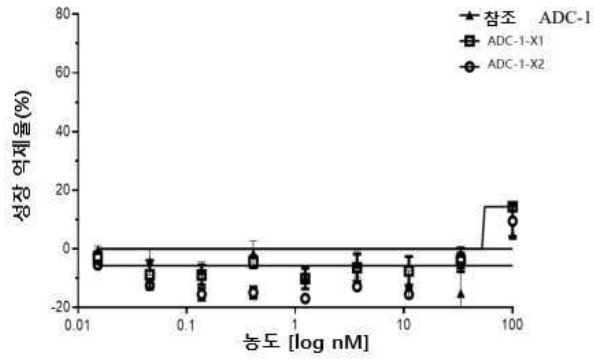
도면11a



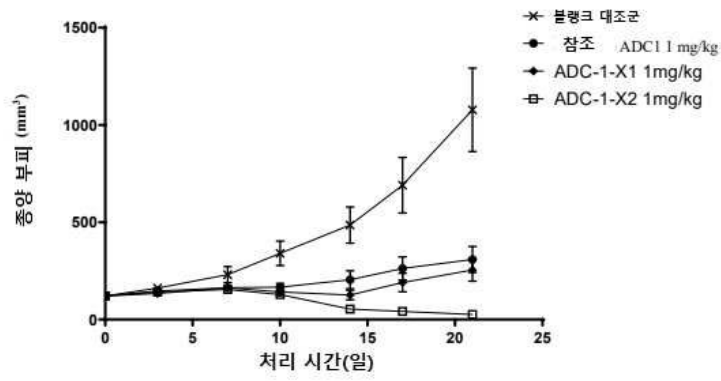
도면11b



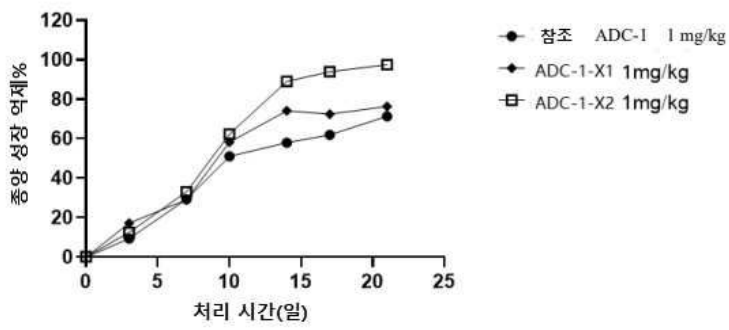
도면11c



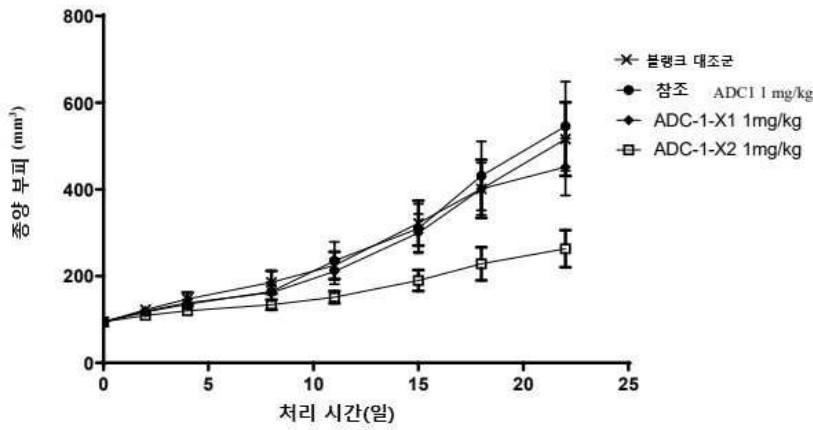
도면12a



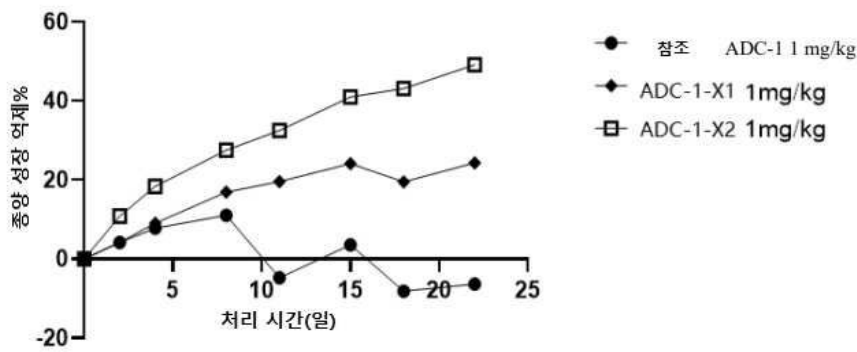
도면12b



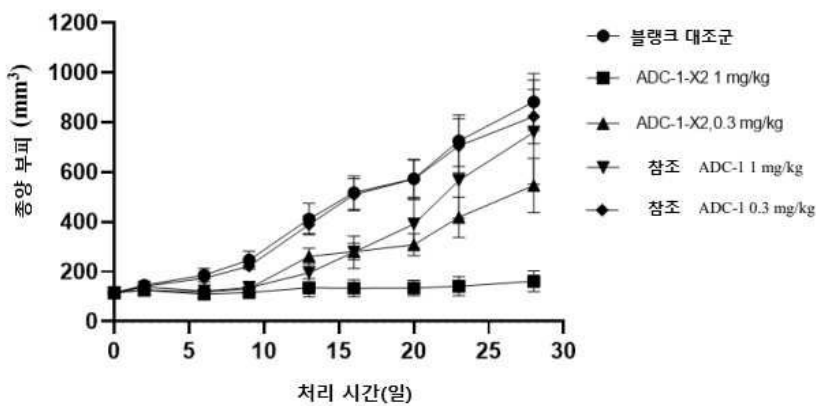
도면13a



도면13b



도면14



도면15

