



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0082348
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/68037 (2023.08)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-7011648
(22) 출원일자(국제) 2022년09월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/121776
(87) 국제공개번호 WO 2023/046202
국제공개일자 2023년03월30일
(30) 우선권주장
202111139621.4 2021년09월27일 중국(CN)
202210915323.8 2022년08월01일 중국(CN)

(71) 출원인
에보포인트 바이오사이언시스 컴퍼니 리미티드
중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22
(72) 발명자
후, 용한
중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22
수, 린펑
중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황이남

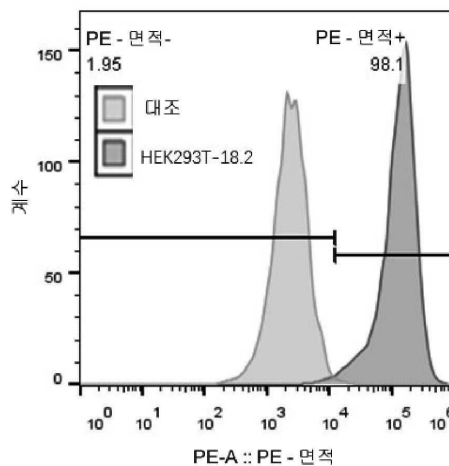
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 항체, 이의 항체-약물 접합체 및 이의 용도

(57) 요약

Claudin 18.2(CLDN18.2)를 표적으로 하는 항체 및 항체-약물 접합체(ADC), 및 상기 항체와 ADC 분자를 함유하는 조성물 및 이의 치료적 응용에 관한 항체 및 항체-약물 접합체.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/68031 (2023.08)

A61K 47/68033 (2023.08)

A61K 47/68035 (2023.08)

A61K 47/6835 (2017.08)

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

우, 즈헨웨이

중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22

루안, 카

중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22

왕, 웡우이

중국, 장쑤 215000, 쑤저우, 쑤저우 인더스트리얼
파크, 생선 스트리트 218, 빌딩 22

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)을 갖는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물로서:



여기서

Ab는 항-Claudin18.2 항체를 나타내며,

L은 링커를 나타내며,

D는 세포독성 또는 세포증식억제 약물, 예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제를 나타내며, 및

q=1~20, 예를 들어, q=1~10, 1~8, 2~8, 4~8 또는 6~8이며,

여기서 Ab는 서열 번호: 1 또는 3의 중쇄 가변 영역(VH) 서열의 3개의 CDR 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역(VL) 서열의 3개의 CDR을 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 CDR은 Kabat 또는 IMGT 또는 이들의 조합에 따라 정의되는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 2

제1항에 있어서, 여기서 Ab는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하며, 여기서

(i) 상기 IMGT 방식에 따르면, 상기 HCDR1은 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 HCDR2는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 HCDR3은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR1은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR2는 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR3은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

(ii) 상기 Kabat 방식에 따르면, 상기 HCDR1은 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 HCDR2는 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 HCDR3은 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR1은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR2는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 LCDR3은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 Ab는:

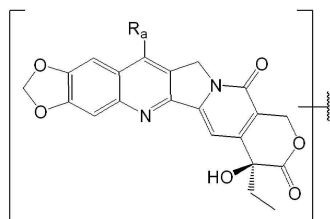
- 서열 번호: 1 또는 3의 중쇄 가변 영역 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는

- 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열;을 포함하며;

바람직하게는, Ab는 IgG1 항체인, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 D는 캄프토테신 약물, 바람직하게는, FL118 또는 이의 유도체, 예를 들어, 하기 구조를 포함하는 캄프토테신 약물을 나타내며:



여기서 R_a 는:

수소;

C_3 - C_8 시클로알킬;

페닐; 및

할로젠, 히드록시, NH_2 , $NH(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $N(C_1-C_4 \text{ 알킬})_2$ 에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_4 알콕시, C_3-C_8 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 NR^1R^2 로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬;로부터 선택되며,

여기서 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로:

수소;

히드록시, 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 알킬에 의해 치환된 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 히드록시알킬에 의해 치환된 아미노 및 $(C_1-C_4 \text{ 히드록시알킬})$ 및 $(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 에 의해 치환된 아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬;

1개 또는 2개의 C_3-C_{10} 시클로알킬, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬, 페닐 또는 헤테로아릴에 의해 치환된 C_1-C_4 알킬;

C_3-C_{10} 시클로알킬;

C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬;

C_2-C_6 헤테로알킬;

헤테로아릴;

선택적으로 할로겐화된 페닐; 및

히드록시 또는 아미노에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬- $C(=O)-$;로부터 선택되거나;

또는 R^1 및 R^2 는 이들이 연결된 질소 원자와 조합하여, 할로젠, C_1-C_4 알킬, OH, C_1-C_4 알콕시, NH_2 , $NH(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $N(C_1-C_4 \text{ 알킬})_2$ 로부터 선택되는 0~3개의 치환기를 갖는 5원, 6원 또는 7원 헤테로시클을 형성하며,

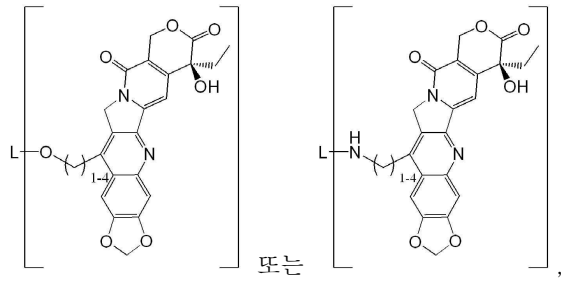
상기 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 헤테로아릴은 매번 나타날 경우, 각각 독립적으로 OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시, NH_2 , $NH(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $N(C_1-C_4 \text{ 알킬})_2$ 로부터 선택되는 0~3개의 치환기에 의해 선택적으로 치환되며;

바람직하게는, R_a 는 $-C_1-C_4 \text{ 알킬-OH}$, $-C_1-C_4 \text{ 알킬-O-C}_1-C_4 \text{ 알킬-NH}_2$ 또는 $-C_1-C_4 \text{ 알킬-NH}_2$ 이며,

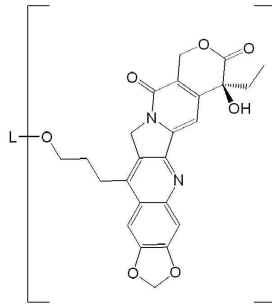
바람직하게는, 상기 약물 D 유닛은 이의 위에 존재하는 히드록시 또는 아미노 기를 통해 상기 링커 L 유닛에 연결되는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 L-D 유닛은 하기 구조를 포함하며:



바람직하게는, 상기 화학식 (I)의 L-D 유닛은 하기 구조:



를 포함하는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 L은 펩티드 함유 링커이며, 화학식 (II)의 하기 구조를 포함하며:

-Z-Y-M-,

여기서

Z는 Ab에 연결된 연결 기이며,

Y는 2~5개의 아미노산의 펩티드, 바람직하게는 디펩티드, 트리펩티드 또는 테트라펩티드이며, 및

M은 부재하거나 상기 약물 D에 연결하기 위한 스페이서 기인, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 7

제6항에 있어서, 여기서 Y는 N-말단에서 C-말단까지 하기 화학식의 아미노산 서열을 갖는 펩티드이며:

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅,

여기서 Xaa₁은 부재하거나 발린, 글라이신, 알라닌 및 글루탐산으로부터 선택되는 아미노산이며;

Xaa₂는 페닐알라닌, 류신 및 발린으로부터 선택되는 아미노산, 바람직하게는, 발린이며;

Xaa₃은 비치환 또는 치환된 라이신이며;

Xaa₄는 류신, 글라이신 및 알라닌으로부터 선택되는 아미노산이며;

Xaa₅는 부재하거나 글라이신 및 알라닌으로부터 선택되는 아미노산이며; 및

상기 아미노산 서열의 상기 N-말단은 Z에 연결되며, 상기 C-말단은 M(M이 존재하는 경우)에 연결되거나 상기 약물 D에 직접 연결되며,

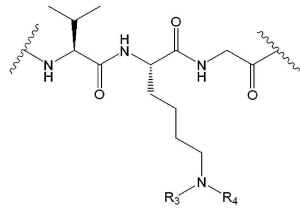
바람직하게는, Xaa₃은 ε-아미노기가 C₁-C₃ 알킬에 의해 단일치환되거나 이치환되는 라이신이며,

보다 바람직하게는, Y는 Phe-Lys-Gly, Leu-Lys-Gly, Gly-Val-Lys-Gly, Val-Lys-Gly-Gly, Val-Lys-Gly, Val-Lys-Ala 및 Val-Lys-Leu로부터 선택되는 펩티드이며, 상기 Lys 잔기는 비치환된 라이신 또는 C₁-C₃ 알킬에 의해

단일치환되거나 이치환되는 라이신인, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 8

제6항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 Y는



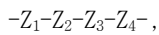
여기서 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 메틸, 에틸 및 프로필로부터 선택되며,

바람직하게는, R₃ 및 R₄는 동일하며, 보다 바람직하게는, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 프로필이며; 및

여기서 왼쪽 물결선은 Y가 Z에 연결된 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Y가 M에 연결된 위치를 나타내는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 Z는 하기 구조를 가지며:

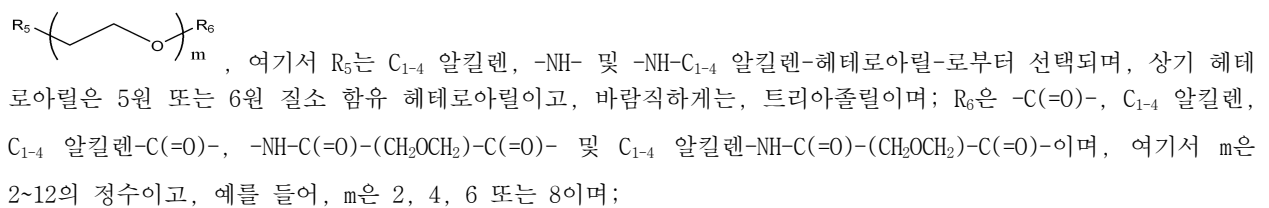


여기서 Z₁은 Ab의 황 원자이며;

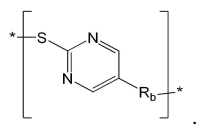
Z₂는 5원 내지 10원 헤테로시클릴이며, 바람직하게는 N, S 및 O로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자를 함유하며;

Z₃은 결합, -C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₁₀ 알킬닐렌-C(=O)-, -C₃-C₁₀ 알케닐렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 헤테로알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈ 시클로알킬렌-C(=O)-, -O-C₁-C₈ 알킬렌-C(=O)-, -아릴렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-아릴렌-C(=O)-, -아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C₃-C₈ 시클로알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈ 시클로알킬렌-C₁-C₁₀-알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈-헤테로시클릴렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C₃-C₈-헤테로시클릴렌-C(=O)- 및 -C₃-C₈ 헤테로시클릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-로부터 선택되며; 및

Z₄는 결합 또는 하기 화학식으로 표시되는 PEG 유닛인 것으로:

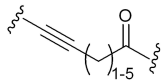


바람직하게는, Z는 하기 구조를 가지며:



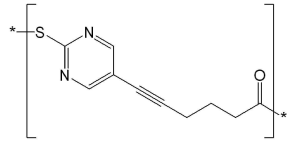
여기서 R₆는 알킬닐렌-C(=O)- 또는 알케닐렌-C(=O)-이며,

바람직하게는, R_b 는 다음과 같고:



상기 왼쪽 물결선은 Z가 상기 항체(Ab)에 연결된 위치를 나타내며, 상기 오른쪽 물결선은 Z가 Y에 연결된 위치를 나타내며;

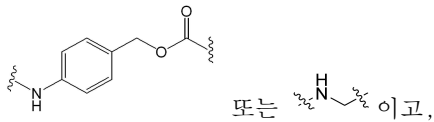
보다 바람직하게는 Z는 하기 구조:



를 갖는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 M은 부재하거나 아미노- C_1-C_3 알킬렌, 예를 들어, $-NH-CH_2-$ 또는 아미노-페닐- C_1-C_3 알킬렌- $O-C(=O)-$ 이며, 바람직하게는, M은:

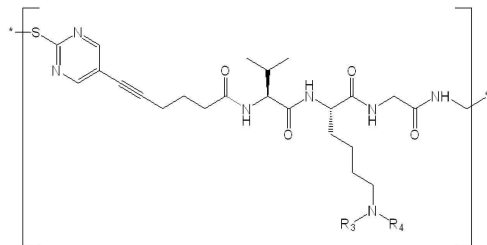


또는 $-NH-CH_2-$ 이고,

상기 왼쪽 물결선은 Y에 대한 상기 연결을 나타내며, 상기 오른쪽 물결선은 상기 약물 D 유닛에 대한 상기 연결을 나타내는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 L은 하기 구조를 포함하는 링커이며:



여기서 R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 메틸, 에틸 및 프로필로부터 선택되는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 12

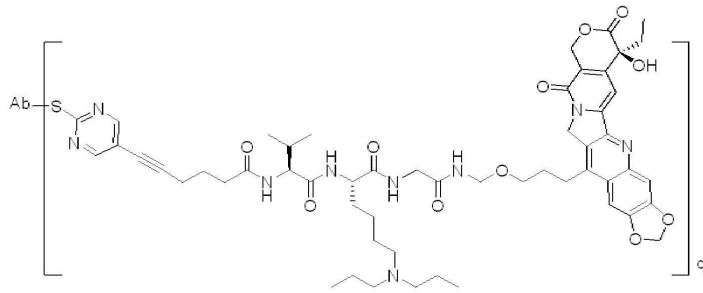
제11항에 있어서, 여기서 R_3 및 R_4 는 모두 메틸이거나; 또는 R_3 및 R_4 는 모두 에틸이거나; 또는 R_3 및 R_4 는 모두 프로필인, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 13

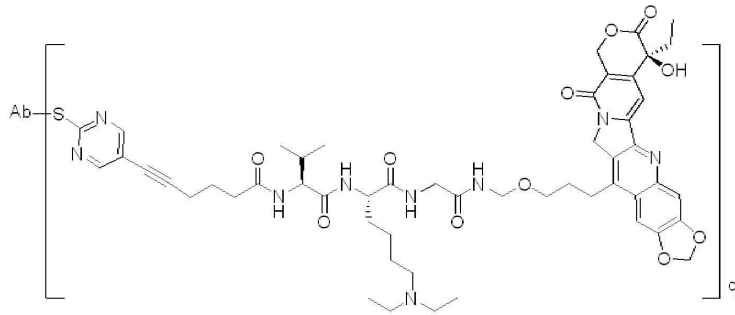
제1항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 L-D 유닛은 상기 Ab의 경쇄 및/또는 중쇄의 시스테인의 설프히드릴 기와 티오에터 결합을 형성함으로써 상기 항체에 연결하게 되는, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 14

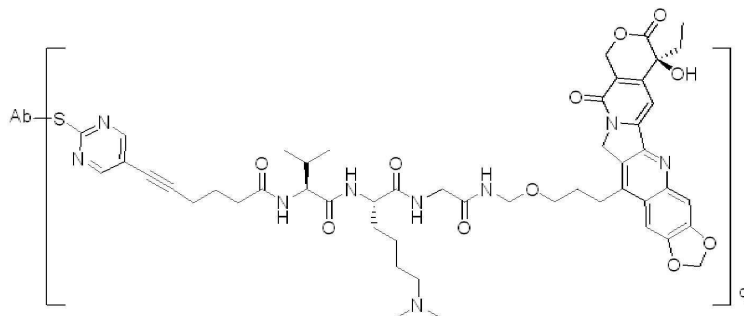
제1항에 있어서, 상기 ADC는:



또는



또는



로부터 선택되며,

여기서 q는 1~8의 평균 DAR 값이며, 바람직하게는, q는 약 2, 약 4, 약 6, 약 7 또는 약 8인, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 및 선택적으로 약학적 보조 물질을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 16

CLAUDIN 18.2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서:

- (i) 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 2에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- (ii) 서열 번호: 21에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 22에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- (iii) 서열 번호: 23에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 24에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- (iv) 서열 번호: 38 또는 40에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 39에 제시된 경쇄

가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는

(v) 서열 번호: 44에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 45에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는

(vi) 서열 번호: 46에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 47에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는

(vii) 서열 번호: 48에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 49에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는

(viii) 서열 번호: 50에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 51에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는

(ix) 서열 번호: 52에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 53에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열을 포함하며,

여기서 바람직하게는, 상기 CDR은 Kabat 또는 IMGT 또는 이의 조합에 따라 정의되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

(i) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(ii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 22에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(iii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(iv) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 38 또는 40에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 39에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(v) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 44에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 45에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(vi) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 46에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 47에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(vii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 48에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 49에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(viii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 50에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 51에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(ix) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 52에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 53에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

여기서 바람직하게는,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(i) 서열 번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

(ii) 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

(iii) 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하거나;

또는

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

(iv) 서열 번호: 38에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

(v) 서열 번호: 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

(vi) 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제16항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

상기 항체는 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 인간 Kappa 경쇄 불변 영역을 갖는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이거나; 또는

상기 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, 단쇄 항체, scFv, scFab, 이황화 연결 scFv, 이황화 연결 scFab 또는 (Fab')₂ 단편으로부터 선택되는 항체 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 무린 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체, 바람직하게는 인간화 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항-CLAUDIN 18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 21

백터로서, 제20항에 따른 핵산을 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 백터는 발현 백터인, 백터.

청구항 22

숙주 세포로서, 제20항에 따른 핵산 또는 제21항에 따른 벡터를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 23

치료제 또는 진단제에 접합된 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 면역접합체.

청구항 24

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 용도로서, 다음과 같이 체내 또는 체외에서의 용도로부터 선택되며:

- (1) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포에 대한 표적화 및 결합; 및/또는
 - (2) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포에 대한 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성을 유도함; 및
 - (3) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포를 억제 및/또는 사멸시킴,
- 또는 상기 용도 중 임의의 하나에서 사용하기 위한 약제를 제조하기 위한, 용도.

청구항 25

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제23항에 따른 면역접합체 및 선택적으로 약학적 보조 물질을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 26

대상체의 CLAUDIN 18.2 양성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 상기 대상체에게 치료적 유효량의 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 또는 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바람직하게는, 상기 종양은 소화계 종양 또는 이의 전이, 예컨대, 위암, 췌장암, 식도암, 결장암, 담낭암 또는 간암, 특히, 위암, 예를 들어, HER2 음성 위암인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 CLAUDIN 18.2 양성 종양은 진행성 또는 전이성 위암 또는 식도위 접합부 선암종(EGJA)인, 방법.

청구항 28

샘플에서 CLAUDIN 18.2를 검출하기 위한 방법으로서:

- (a) 상기 샘플을 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 CLAUDIN 18.2에 의한 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 선택적으로, 상기 항체는 검출 가능하게 표지되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항체 및 항체-약물 접합체에 관한 것이며, 특히, Claudin18.2(CLDN18.2)를 표적으로 하는 항체 및 항체-약물 접합체(ADC), 상기 항체 또는 ADC 분자를 포함하는 조성물, 및 이의 치료적 응용에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 위암은 전 세계적으로 암 사망의 세 번째 주요 원인으로, 전이성 위암과 식도위 접합부 선암종(EGJA)이 있는 환자의 전체 5년 생존율은 20% 미만이다. 수많은 관련 연구에도 불구하고, 위암 환자군이 너무 커서 아직까지 위암 치료에 대한 수요가 충족되지 않은 상태이다. 특히, 효과적인 표적 치료 요법이 부족한 HER2 음성 환자의 경우, 치료 선택사항이 상대적으로 부족하고 환자 생존도 낙관적이지 않다.
- [0003] Claudin18.2는 Claudin 밀착 연결 단백질 계열의 구성원이며 세포 간 밀착 연결을 매개한다. Claudin18.2는 위암과 췌장암에서 높게 발현되며, 정상 조직에서는 위 점막 세포에서만 발현이 제한되고 다른 정상 조직에서는 발현이 없기 때문에 ADC(항체-약물 접합체) 약물 개발에 이상적인 표적이다.
- [0004] Claudin18.2는 2개의 세포외 루프와 1개의 세포내 루프를 포함하는 테트라스파닌에 속하고, 이의 서열은 이의 계열 구성원인 Claudin18.1과 매우 유사하며, 제1 세포외 루프에서만 8개의 아미노산으로 차이가 있다. Claudin18.1은 폐에서 특이적으로 발현되므로 Claudin18.2만 식별하고 Claudin18.1은 식별하지 못하는 ADC 약물의 개발은 매우 난해하고 도전이 된다.
- [0005] 2016년 ASCO 회의에서 공개된 데이터에서, 국소 진행성 또는 전이성 위암이 있는 환자의 치료를 위한 Claudin18.2를 표적으로 하는 아스텔라스(Astellas) 인간-마우스 키메라 항체 IMAB362 플러스 화학 요법은 깊은 인상을 남긴 결과를 달성하여 환자의 무진행 생존 기간을 연장하고 전체 생존율을 거의 절반까지 연장하였다. 그러나, 현재, 시판 허락을 받은 Claudin18.2를 표적으로 하는 모노클로날 항체나 ADC 약물은 아직 없다. 따라서, 차별화되고 우수한 표적화 특성과 우수한 체내 종양 사멸 효과를 지닌 항-Claudin18.2 항체 및 ADC 약물의 개발은 위암 환자에게 더 광범위하고 더 양호한 약물 선택사항을 제공할 수 있다.

발명의 내용

- [0006] 제1 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 (I)을 갖는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공한다:
- [0007]
$$\text{Ab-[L-D]}_q \quad (\text{I}),$$
- [0008] 여기서
- [0009] Ab는 항-Claudin18.2 항체를 나타내며,
- [0010] L은 링커를 나타내며,
- [0011] D는 세포독성 또는 세포증식억제 약물, 예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제를 나타내며, 및
- [0012] $q=1\sim 20$, 예를 들어, $q=1\sim 8$, $2\sim 8$, $4\sim 8$ 또는 $6\sim 8$ 이며,
- [0013] 여기서 Ab는 서열 번호: 1 또는 3의 중쇄 가변 영역(VH) 서열의 3개의 CDR 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역(VL) 서열의 3개의 CDR을 포함하며, 여기서 바람직하게는 CDR은 Kabat 또는 IMGT 또는 이들의 조합에 따라 정의된다.
- [0014] 제2 양태에서, 본 발명은 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0015] 제3 양태에서, 본 발명은 Claudin18.2 양성 종양의 치료에 있어서, 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 및 이의 조성물의 용도를 제공한다.
- [0016] 제4 양태에서, 본 발명은 항-Claudin18.2 항체, 이의 약학적 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1A 내지 도 1I는 형광 표지된 항체를 사용한 FACS 기법에 의한 실시예 I-1의 상이한 세포주에서의 Claudin18.2 또는 Claudin18.1 발현의 양성물에 대한 검출을 나타낸다. 아이소타입 대조 항체가 대조군으로서 사용된다. 도 1A는 PE 형광 표지된 항-인간 Claudin18.2 항체를 사용한 HEK293T-Claudin18.2(인간) 안정 세포주의 검출을 나타내며; 도 1B는 APC 형광 표지된 항-인간 Claudin18.1 항체를 사용한 HEK293T-Claudin18.1(인간) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1C는 APC 형광 표지된 항-인간 Claudin18.2 항체를 사용한 L929-Claudin18.2(인간) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1D는 APC 형광 표지된 항-인간 Claudin18.2 항체를 사용한 CHO-Claudin18.2(인간) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1E는 PE 형광 표지된 항-원숭이 Claudin18.2 항

체를 사용한 HEK293T-Claudin18.2(시노물구스 원숭이) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1F는 APC 형광 표지된 항-랫트 Claudin18.2 항체를 사용한 HEK293T-Claudin18.2(랫트) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1G는 APC 형광 표지된 항-마우스 Claudin18.2 항체를 사용한 HEK293T-Claudin18.2(마우스) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1H는 APC 형광 표지된 항-인간 Claudin18.2 항체를 사용한 NUGC4-Claudin18.2(인간) 안정 세포주의 검출을 나타낸다. 도 1I는 APC 형광 표지된 항-인간 Claudin18.2 항체를 사용한 NUGC4 종양 세포주의 검출을 나타낸다.

도 2A 내지 도 2B는 세포 기반 ELISA 분석에서 NUGC4-Claudin18.2(인간) 세포(도 2A) 및 NUGC4 세포(도 2B)에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체 및 참조 항체 IMAB362의 친화성 검출을 나타낸다.

도 3A 내지 도 3C는 유세포 분석법에 의한 HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포(도 3A), NUGC4-Claudin18.2(인간) 세포(도 3B) 및 NUGC4 세포(도 3C)에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체 및 참조 항체 IMAB362의 친화성 검출을 나타낸다.

도 4A 내지 도 4C는 유세포 분석법에 의한 HEK293T-Claudin18.2(시노물구스 원숭이) 세포(도 4A), HEK293T-Claudin18.2(랫트) 세포(도 4B) 및 HEK293T-Claudin18.2(마우스) 세포(도 4C)에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체 및 참조 항체 IMAB362의 친화성 검출을 나타낸다.

도 5는 HEK293T-Claudin 18.2(인간) 세포에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 ADCC 사멸 활성 검정 결과를 나타낸다.

도 6은 HEK293T-Claudin 18.2(인간) 세포에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 CDC 사멸 활성 검정 결과를 나타낸다.

도 7은 랫트에서 항-Claudin18.2 인간화 항체에 대한 체내 약동학적 검정을 나타낸다.

도 8A 내지 도 8B는 독소에 대한 접합 전후 L929-Claudin18.2 세포(도 8A) 및 NUGC4 세포(도 8B)에 대한 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC의 결합을 나타낸다.

도 9A 내지 도 9E는 체외 검정에서 HEK293T-Claudin 18.2 세포(도 9A 및 도 9B), HEK293T-Claudin 18.1 세포(도 9C 및 도 9D) 및 NUGC4-Claudin 18.2 세포(도 9E)에 대한 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC 약물의 사멸 효과를 나타낸다.

도 10은 NUGC-4 CDX 모델에서 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC 약물의 종양 억제 효능을 나타낸다.

도 11은 마우스의 체중에 대한 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC 약물의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 정의

[0019] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 목적을 위하여 하기 용어를 다음과 같이 정의한다.

[0020] 상표명이 본원에서 사용되는 경우, 문맥에서 달리 명확하게 정의되지 않는 한, 상표명은 제품의 화학식, 제네릭 약물 및 상표명을 갖는 제품의 활성 약학적 성분을 포함한다.

[0021] 수치와 조합하여 사용되는 용어 "약"은 명시된 수치 미만의 하한 5% 내지 명시된 수치 초과 상한 5% 범위의 수치를 포함하는 것으로 의도된다.

[0022] 용어 "및/또는"은 선택사항 중 임의의 하나 또는 선택사항 중 임의의 둘 이상의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0023] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함(comprise/include)"은 요소, 정수 또는 단계를 포함하나 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계를 배제하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 용어 "포함(comprise/include)"은 달리 명시하지 않는 한, 기재된 요소, 정수 또는 단계가 전체를 구성하는 상황을 또한 망라한다. 예를 들어, 특정 서열을 "포함하는(comprising)" 항체 가변 영역을 언급할 경우, 특정 서열로 구성된 항체 가변 영역도 망라하는 것으로 의도된다.

[0024] 용어 "Claudin18" 및 "CLDN18"은 밀착 연결 단백질의 Claudin 패밀리의 CLDN18 구성원을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용 가능하다. CLDN18은 막을 4회 가로지르는 막관통 단백질이고, N-말단과 C-말단이 모두

세포질에 위치하며, 세포의 루프 1 및 세포의 루프 2를 갖고, 여기서 N-말단 근처에 있는 제1 세포의 루프(즉, 세포의 루프 1)는 평균 약 53개의 아미노산으로 구성되며, 제2 세포의 루프(즉, 세포의 루프 2)는 약 30개의 아미노산으로 구성된다. CLDN18은 세포의 루프 1에서 8개의 아미노산이 상이한 두 가지 스플라이스 변이체인 CLDN18.1 및 CLDN18.2를 포함한다. 정상 조직에서, CLDN1의 발현은 폐에 제한되며, CLDN2의 발현은 위 점막에 제한된다.

[0025] 본원에서, 용어 "CLDN18.1"은 바람직하게는 인간 CLDN18.1, 예를 들어, NCBI_057453.1의 아미노산 서열을 갖는 인간 CLDN18.1에 관한 것이다. 해당 용어는 또한 시노물구스 원숭이, 마우스 및 래트와 같은 다른 종으로부터 유래한 Claudin18.1을 망라하나, 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 해당 용어는 인간 CLDN18.1을 지칭한다.

[0026] 본원에서, 용어 "CLDN18.2"는 바람직하게는 인간 CLDN18.2, 예를 들어, NCBI_001002026.1의 아미노산 서열을 갖는 인간 CLDN18.2에 관한 것이다. 해당 용어는 다른 종, 예를 들어, 시노물구스 원숭이 Claudin18.2(예를 들어, XP_015300615.1의 아미노산 서열), 마우스 Claudin18.2(예를 들어, NP_001181850.1의 아미노산 서열) 및 래트 Claudin18.2(예를 들어, NP_001014118.1의 아미노산 서열)로부터 유래한 Claudin18.2를 또한 망라한다. 본원에서, 달리 명시하지 않는 한, 해당 용어는 인간 CLDN18.2를 지칭한다.

[0027] 본원에서, 용어 "CLDN18", "CLDN18.1" 및 "CLDN18.2"는 번역 후 변형된 변이체 및 형태적 변이체뿐만 아니라 돌연변이체, 특히, 자연 발생 변이체, 대립 유전자 변이체 및 종 상동체도 또한 망라한다.

[0028] 본원에서, 용어 "CLDN18.2 양성" 세포는 CLDN18.2 세포 표면 발현에 대해 양성인 세포, 예컨대, 암 세포, 조작된 암 세포 또는 조작된 비종양 세포를 지칭한다. 세포 표면상의 CLDN18.2의 발현 수준은 세포 표면 항원의 발현 수준을 결정하기 위한 당업계에서 공지된 임의의 통상적인 방법, 예를 들어, FACS 검출 방법 또는 면역형광 염색 방법에 의해 결정될 수 있으며; 선택적으로, CLDN18.2 세포 표면 발현에 대해 양성을 나타내는 세포는 미리 결정된 기준 값과 비교하여 식별된다. 바람직하게는, 양성 세포상의 CLDN18.2의 발현 수준에 대한 측정 값은 미리 결정된 기준 값보다 적어도 2배 더 높다. 미리 결정된 기준 값은 당업자가 통상적인 방법으로 결정할 수 있다. 일 실시양태에서, 미리 결정된 기준 값은 동일한 검출 방법을 사용하여 위 점막을 제외한 정상 세포상에서 결정된 CLDN18.2의 발현 수준에 대한 값일 수 있다. 다른 실시양태에서, 미리 결정된 기준 값은 본 출원의 실시예 I-1에 기재된 바와 같은 FACS 방법을 사용하여 아이소타입 대조 항체와 특정 CLDN18.2 항체에 의해 세포 상에서 생성된 형광 염색의 강도를 비교함으로써 결정될 수 있는데 예를 들어, 미리 결정된 기준 값은 아이소타입 대조 항체의 평균 형광 염색 강도보다 적어도 10배 더 높게 설정될 수 있다.

[0029] 일부 실시양태에서, 바람직하게는, CLDN18.2 양성 세포는 세포 표면상에서 충분히 높은 수준의 CLDN18.2를 발현하여, 면역형광 염색 또는 FACS와 같은 검출 방법에서, 이들은 CLDN18.2 특이적 항체에 의해 결합될 수 있고, 미리 결정된 기준 값보다 더 높은 검출 신호를 생성할 수 있고/있거나 위 점막 이외의 비암성 정상 세포의 신호와 유의하게 차별화되는 신호(예를 들어, 적어도 2배 더 높거나, 바람직하게는 적어도 10배 또는 100배 더 높거나 또는 그 이상)를 생성할 수 있다.

[0030] 본원에서, 용어 "항체"는 항원을 특이적으로 식별하고 결합하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역을 적어도 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 해당 용어는 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단쇄 또는 다쇄 항체, 단일특이적 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 키메라 또는 인간화 항체, 전체 길이 항체 및 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 망라한다.

[0031] 본원에서, "전체 항체"(본원에서 "전체 길이 항체", "완전 항체" 및 "온전한 항체"와 상호교환적으로 사용 가능함)는 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 가변 영역은 항체와 이의 항원의 결합에 참여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인이다. 불변 영역은 항체와 항원의 결합과 직접적인 관련은 없지만 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체의 경쇄는 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 두 가지 부류(카파(κ) 및 람다(λ))로 알려짐) 중 하나로 범주화될 수 있다. 항체의 중쇄는 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5가지 주요 구분된 부류로 나뉠 수 있으며, 여러 이러한 부류는 하위 부류, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나뉠 수 있다.

[0032] 본원에서, 용어 항체의 "항체 단편" 및 "항원 결합 단편"은 온전한 항체가 아닌 분자를 지칭하기 위해 상호교환

적으로 사용 가능하며, 이는 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하기 위한 온전한 항체의 부분을 포함한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 항원 결합 목적을 위해, 항체 단편은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터 유래한 아미노산 잔기를 포함한다. 항체 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다. 항체 단편의 예는 Fab, scFab, 이황화 결합 scFab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, scFv, 이황화 결합 scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 미니바디를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 일부 실시양태에서, 항체 단편은 설프히드릴 접합 화학에 유용한 아미노산 잔기 부위를 제공하기 위해 경쇄와 중쇄 사이에 쇠간 이황화 결합을 형성하기 위한 시스테인 잔기 부분, 예를 들어, IgG1 항체의 Fab 영역 및/또는 힌지 영역의 시스테인 잔기를 포함한다. 본 발명에 따른 일부 다른 실시양태에서, 항체 단편은 설프히드릴 접합 화학에 유용한 아미노산 잔기 부위를 제공하기 위해 Fc 영역에 도입된 시스테인 잔기를 포함한다.

[0033] 본원에서, 용어 "면역글로불린"은 자연 발생 항체의 구조를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, IgG 부류의 면역글로불린은 이황화 결합된 2개의 경쇄와 2개의 중쇄로 구성되는 약 150,000달톤의 이종사량체 단백질이다. N-말단에서 C-말단까지, 각 면역글로불린 중쇄는 중쇄 가변 도메인으로 알려진 1개의 중쇄 가변 영역(VH)과 이후 3개의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. N-말단에서 C-말단까지, 각 면역글로불린 경쇄는 경쇄 가변 도메인으로 알려진 1개의 경쇄 가변 영역(VL)과 이후 1개의 경쇄 불변 도메인(CL)을 갖는다. 따라서, 본원에서 IgG 항체인 항체에 대한 언급은 해당 항체가 IgG 면역글로불린 구조를 갖는 이종사량체 단백질을 의미한다. IgG 항체에서, 중쇄의 VH-CH1은 일반적으로 경쇄의 VL-CL과 쌍을 이루어 항원에 특이적으로 결합하는 Fab 단편을 형성한다. 따라서, IgG 항체는 면역글로불린 힌지 영역에 의해 연결된 2개의 Fab 분자 및 2개의 이량체화된 Fc 영역으로 본질적으로 구성된다. IgG 면역글로불린은 중쇄 불변 영역의 서열을 기준으로 하위 부류, 예를 들어 $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3) 및 $\gamma 4$ (IgG4)로 나눌 수 있다. IgG 면역글로불린의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 κ 및 λ 로 알려진 두 가지 부류 중 하나로 또한 나눌 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG 항체, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다. 일부 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG κ 또는 IgG λ 항체, 예를 들어, IgG1 κ 또는 IgG1 λ 항체이다.

[0034] 본원에서, 용어 "상보성 결정 영역", "CDR" 및 "초가변 영역"은 서열 내에서 매우 가변적이고, 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하고/하거나 항원 접촉 잔기("항원 접촉 부위")를 함유하는 항체 가변 도메인에 있는 영역을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용 가능하다. CDR은 주로 항원 에피토프에 대한 결합을 담당한다. 본원에서, 항체의 중쇄 및 경쇄의 CDR은 N-말단으로부터 순차적으로 넘버링되어 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 칭한다. 항체의 중쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3이라고 칭하고, 반면에 항체의 경쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3이라고 칭한다. 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 주어진 아미노산 서열에서, CDR 서열은 당업계에서 널리 공지된 다양한 방식을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 주어진 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 있는 CDR의 주석은 Kabat, AbM, Chothia, Contact 및 IMGT를 기준으로 정의된 CDR 서열을 포함하는 <http://www.abysis.org/abysis/>에서 얻을 수 있다. 또한, CDR은 참조 CDR 서열과 동일한 Kabat 넘버링 위치를 갖는 것을 기준으로 결정될 수도 있다. 달리 명시되지 않는 한, (중쇄 가변 영역 잔기 및 경쇄 가변 영역 잔기를 포함하는) 항체 가변 영역의 잔기 위치는 Kabat 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0035] 본원에서, "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체와 이의 항원의 결합에 참여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 있는 도메인이다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 더 보존된 영역(즉, 프레임워크 영역(FR))이 그 사이에 삽입된 초가변 영역(HVR, 상보성 결정 영역(CDR)이라고도 칭함)으로 추가로 세분화될 수 있다. 각 VH 또는 VL은 N-말단에서 C-말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 일부 양태에서, 2개의 가변 영역(즉, VH 및/또는 VL) 중 하나 또는 둘 모두에 있는 하나 이상의 잔기는 변형될 수 있고, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역은 변형 전 항체 분자의 적어도 하나의 생물학적 특성(예를 들어, 항원 결합 능력)을 여전히 실질적으로 보유하는 항체 변이체를 얻기 위해 잔기 변형, 특히 보존적 잔기 치환을 겪는다. 이외의 다른 양태에서, 항체의 가변 영역은 CDR 이식에 의해 변형될 수 있다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하고 있기 때문에, 공지된 항체의 특성을 시뮬레이션하는 재조합 항체 변이체가 구축될 수 있다. 이러한 항체 변이체에서, 공지된 항체로부터 유래한 CDR 서열은 상이한 특성을 갖는 상이한 항체의 프레임워크 영역에 이식된다. 돌연변이 및/또는 변형된 항체 또는 이를 포함하는 ADC의 특성, 예컨대 ADC의 표적 항원 결합 특성, 또는 세포내이입, 약동학 및 체내 중양 사멸 활성과 같은 다른 원하는 기능적 특성은 체외 또는 체내 검정에서 평가될 수 있다.

- [0036] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 다른 종으로부터 유래한 항체를 지칭한다.
- [0037] 본원에서, 용어 "인간화 항체"는 다른 포유동물 중, 예를 들어 마우스 생식계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 지칭한다. 추가 프레임워크 영역 변형이 인간 프레임워크 서열 내에서 이루어질 수 있고, 및/또는 추가 아미노산 변형이 CDR 서열에서 이루어질 수 있어서, 예를 들어, 항체의 친화성 성숙을 수행한다. 본원에서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 특정 인간 생식계열 서열 "로부터 유래한" 프레임워크 영역 서열을 갖는 인간화 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "로부터 유래한"은 항체의 프레임워크 영역의 아미노산 서열이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 상응하는 프레임워크 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 가지며, 해당 항체는 항원 결합 활성을 보유하고, 예를 들어, 25C7A5-HZ1 또는 -HZ2, 혹은 2D3A11-HZ1 또는 -HZ2에 대해 동등한(예를 들어, $\pm 10\%$) CLDN18 결합 친화성을 갖음을 의미한다.
- [0038] 본원에서, 용어 "단리된" 항체는 해당 항체의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항체는 95% 또는 99%를 초과하는 순도로 정제되며, 이는 예를 들어, 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전 집속(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정될 수 있다.
- [0039] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 영역을 지칭한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 본 발명에서, 바람직하게는 본 발명에 따른 항체는 인간 Claudin18.2의 천연 에피토프에, 보다 바람직하게는, 세포 표면에 발현된 인간 Claudin18.2의 천연 에피토프에 결합한다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체와 인간 Claudin18.2의 천연 에피토프와의 결합은 세포 기반 검정에 의해 검출된다.
- [0040] 본원에서, 용어 "친화성" 또는 "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원 사이의 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화성을 지칭한다. 친화성은 당업계에서 공지된 일반적인 방법으로 측정할 수 있다. 친화성을 측정하기 위한 하나의 구체적인 방법은 본원의 실시예에 기재된 세포 기반 ELISA 검정이며, 다른 구체적인 방법은 본원의 실시예에 기재된 FACS 검정이다. 일 실시양태에서, 실시예 I에 기재된 바와 같이 수행되는 검정과 같은 세포 기반 검정에서, 항체가 참조 항체 IMAB362에 비해 필적하거나(즉, $\pm 10\%$) 더 작은 EC50 값 및/또는 필적하거나(즉, $\pm 10\%$) 더 높은 최대 결합 신호 값을 갖는 경우, 해당 항체는 Claudin18.2에 대해 높은 친화성을 갖는 것으로 간주된다.
- [0041] 용어 "특이적으로 결합"은 항체가 비표적 항원에 비해 선택적으로 또는 우선적으로 표적 항원에 결합함을 의미한다. 본원에서, 항원 결합 검정, 예컨대 실시예에 기재된 바와 같은 FACS 검정 또는 세포 기반 ELISA에서, 항체가 세포 표면에 발현된 인간 Claudin18.2에 결합(특히 높은 친화성으로 결합)하나 세포 표면에 발현된 인간 Claudin18.1에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 경우, 해당 항체가 "인간 Claudin18.2에 특이적으로 결합"하는 것으로 간주된다. 항체와 세포 표면에 발현된 인간 Claudin18.2 또는 인간 Claudin18.1의 결합은 Claudin18.2에 대한 항체의 결합 특이성을 결정하기 위해 세포 기반 ELISA 또는 FACS 검정으로 측정될 수 있다.
- [0042] 본원에서, 세포 기반 검정에서, 항체가 인간 Claudin18.1에 대해 유의한 친화성을 갖지 않고 인간 Claudin18.1에 유의하게 결합하지 않는 경우, 특히 배경과 유의하게 상이한 검출 가능한 신호를 생성하지 않는 경우, 이러한 항체의 특성화는 인간 Claudin18.1에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 것이라고 칭한다(본원에서 이는 인간 Claudin18.1에 대해 "비특이적 결합이 없다"라고 칭함). 바람직하게는, 본 발명에서, 본 발명에 따른 항체와 Claudin18.1 발현 세포의 비특이적 결합은, 예를 들어, 실시예 I에 기재된 바와 같이, 95% 초과 또는 98% 초과인 Claudin18.1 발현 양성물을 갖는 재조합 세포주(예컨대, 재조합 HEK293T 안정 세포주)를 사용한 FACS 검정에 의해 결정된다. 선택된 특정 검정에 따라, 당업자는 적절한 음성 및/또는 양성 대조를 선택할 수 있다. 예를 들어, 항체와 세포의 비특이적 결합으로 인해, 아이소타입 대조를 사용하여 배경 염색을 제거할 수 있다.
- [0043] 그러나, 당업자가 이해하는 바와 같이, 인간 Claudin18.2에 특이적으로 결합하고 인간 Claudin18.1에 대한 비특이적 결합이 없는 항체는 다른 종으로부터 유래한 Claudin18.2 단백질과 교차 반응성을 가질 수 있다. 본원에서, 용어 "교차 반응성"은 항체가 상이한 종으로부터 유래한 Claudin18.2에 결합하는 능력을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 인간 Claudin18.2에 특이적인 본 발명에 따른 항체는 또한 다른 종(예를 들어,

시노물구스 원숭이, 마우스 및/또는 래트 Claudin18.2)으로부터 유래한 Claudin18.2에도 결합할 수 있다. 교차 반응성을 결정하기 위한 방법은 실시예에 기재된 방법과 당업계에서 공지된 표준 검정, 예를 들어 유세포 분석법 또는 세포 기반 ELISA 기법을 포함한다. 항체의 종 교차 반응성이 일부 경우 유리하다. 예를 들어, 표적 항체가 임상전 실험 동물, 예를 들어, 마우스, 래트 또는 영장류와 종 교차 반응성을 갖는 경우, 이는 인간에서 치료 또는 진단에 사용하기 전 표적 항체 및 이의 ADC의 임상전 안전성 및 효능 평가를 촉진하게 될 것이다.

[0044] 본원에서, 용어 "아이소타입"은 항체의 중쇄 불변 영역에 따라 결정되는 항체의 부류를 지칭한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항체는 IgA(예를 들어, IgA1 또는 IgA2), IgG1, IgG2(예를 들어, IgG2a 또는 IgG2b), IgG3, IgG4, IgE, IgM, 및 IgD 항체일 수 있으며 면역글로불린 부류의 중쇄 불변 영역을 가질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 인간 IgG1의 불변 영역을 갖는 IgG1 항체일 수도 있다. 또한, 본 발명은 천연 서열 불변 영역을 갖는 항체뿐만 아니라 변이체 서열 불변 영역을 포함하는 항체도 고려한다.

[0045] 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 본원에서 사용된다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다.

[0046] 본원에서, 용어 "천연 서열 Fc 영역"은 다양한 면역글로불린의 천연 발생 Fc 영역 서열, 예컨대, 다양한 Ig 하위 부류와 이의 알로타입의 Fc 영역 서열을 망라한다(Gestur Vidarsson 등, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 2014년 10월 20일, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.). 일부 실시양태에서, 인간 IgG의 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226 또는 Pro230에서 카르복실 말단까지 연장되는 아미노산 서열을 갖는다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신(Lys447)은 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 이외의 다른 실시양태에서, 인간 IgG의 중쇄 Fc 영역은, N-말단에서 천연 면역글로불린의 힌지 서열 또는 그 힌지 서열의 일부, 예를 들어, EU 넘버링에 따라, E216 내지 T225의 서열 또는 D221 내지 T225의 서열을 보유한다.

[0047] 본원에서, 용어 "변이체 서열 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 폴리펩티드에 대한 변형을 포함하는 Fc 영역 폴리펩티드를 지칭한다. 변형은 아미노산 잔기의 첨가, 결실 또는 치환일 수 있다. 치환은 자연 발생 아미노산 및 비자연 발생 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 변형의 목적은 Fc 영역과 이의 수용체의 결합 및 결과적인 이펙터 기능을 변경하는 것일 수 있다.

[0048] 본원에서, 용어 "이펙터 기능"은 면역글로불린 아이소타입에 따라 달라지는, 면역글로불린 Fc 영역에 영향을 주는 생물학적 활동을 지칭한다. 면역글로불린 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 포식세포작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에서의 면역 복합체 매개 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예컨대, B-세포 수용체)의 하향 조절 및 B-세포 활성화를 포함한다. 항체 분자의 의도된 용도에 따라, 표적 항체의 이펙터 기능은 야생형 Fc 영역을 갖는 항체 분자에 비해, 예컨대 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 감소시키거나 제거함으로써 변경될 수 있다.

[0049] 본원에서, 용어 "ADCC"는 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 지칭한다. ADCC는 인간에서 주로 자연 살해 세포(NK 세포)에 의해 매개된다. ADCC에서, 항체가 표적 세포 표면에 표시된 항원에 결합하고 NK 세포 표면에 있는 FcγRIIIA가 항체의 Fc 영역을 식별하여 NK 세포가 활성화되어 퍼포린 및 그랜자임을 방출하여 표적 세포의 용해 및 아포토시스를 초래한다. 항체의 ADCC 활성은 예를 들어 실시예 I에 기재된 플루오레세인 리포터 시스템을 사용하여 평가할 수 있다. 일부 경우, 항체의 ADCC 이펙터 활성을 원하지 않는 경우, 항체의 Fc 영역을 변형함으로써 항체의 ADCC 활성을 제거할 수 있다.

[0050] 본원에서, 용어 "CDC"는 보체 의존성 세포독성을 지칭한다. CDC에서, 항체의 Fc 영역이 보체 분자 C1q에 결합하여 막 공격 복합체를 형성하여 표적 세포의 제거를 초래한다. IgM은 보체 활성화를 위한 가장 강력한 아이소타입이다. 또한, IgG1 및 IgG3 모두가 전형적인 보체 활성화 경로를 통해 CDC를 지시하는 데 매우 효과적이다. 항체의 CDC 활성은 예를 들어, 실시예 I에 기재된 기니 피그 혈청 사멸 실험을 이용하여 검출할 수 있다. 일부 경우, 항체의 CDC 이펙터 활성을 원하지 않는 경우, 항체의 Fc 영역을 변형함으로써 항체의 CDC 활성을 제거할 수 있다.

[0051] 본원에서, 용어 "수용체 매개 세포내이입"은 리간드가 세포 표면에 있는 상응하는 수용체에 결합함으로써 촉발되는, 리간드/수용체 복합체가 내재화되어 세포질로 전달되거나 적합한 세포내 구획으로 옮기는 과정을 지칭한다. 항체의 수용체 매개 세포내이입 활성은 예를 들어 실시예 I에 기재된 방법으로 세포내이입율을 측정함으로써 특성화될 수 있다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항체는 세포 표면에 발현된 Claudin18.2에 결합한 후 Claudin18.2 수용체 매개 세포내이입을 유도할 수 있으며, 이러한 세포내이입 특성을 갖는 본 발명의 항체는 약물(예를 들어, 소분자 독성 약물 분자)과 접합되어 ADC를 형성한 후, 항종양 약물을 암 세포로 전달하

는 수단으로서 효과적으로 사용될 수 있다.

- [0052] 본원에서, "서열 동일성"은 서열이 비교 창(comparison window)에 걸쳐 뉴클레오타이드 단위 또는 아미노산 단위 기준으로 동일한 정도를 지칭한다. "퍼센트 서열 동일성"은 비교 창에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 개의 서열을 비교하는 단계; 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G 및 I) 또는 아미노산 잔기(예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 두 개의 서열에서 동일한 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 얻는 단계; 매칭된 위치의 수를 비교 창에 걸쳐 위치의 총 수(즉, 범위 크기)로 나누는 단계; 및 그 결과에 100을 곱하여 퍼센트 서열 동일성을 얻는 단계를 통해 계산될 수 있다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위한 최적 정렬은 당업계에서 공지된 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는, 비교되는 전체-길이 서열 범위 또는 표적 서열 영역 내에서 최적 정렬을 생성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열의 정렬을 위한 적합한 파라미터를 결정할 수 있다.
- [0053] 본원에서, 항체 서열과 관련하여, 퍼센트 아미노산 서열 동일성은 주어진 항체 서열과 후보 항체 서열의 최적 정렬을 수행함으로써 결정되며, 바람직한 실시양태에서, 최적 정렬은 Kabat 넘버링 방식에 따라 수행된다. 본원에서, 비교 창(즉, 비교되는 표적 항체 영역)을 지정하지 않고, 주어진 항체 서열의 전체 길이에 걸쳐 정렬하는데 적합할 것이다. 일부 실시양태에서, 항체와 관련하여, 서열 동일성은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 통해 달성될 수 있거나, 또는 퍼센트 서열 동일성은 프레임워크 영역으로만 제한될 수 있는 반면, 상응하는 CDR의 서열은 100% 동일하게 유지된다.
- [0054] 본원에서, "참조 항체 IMAB362"는 특허 CN 101312989 B에 개시된 175D10 모노클로날 항체로부터 유래한 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 사용하여 구축된 항-Claudin18.2 항체를 지칭한다. 기준 항체 IMAB362와의 비교에 대한 언급의 경우, 기준 항체 IMAB362는 가변 영역 이외의 부분에서 비교되는 항체와 동일한 항체 구조를 가질 것이고, 예를 들어 둘 모두 중쇄 및 경쇄 불변 영역 구조를 갖는 경우 동일한 중쇄 및 경쇄 불변 영역 서열을 가질 것이다.
- [0055] 본 출원에서, 용어 "할로젠"은 일반적으로 불소, 염소, 브로민 또는 아이오딘을 지칭하며, 이는, 예를 들어, 불소 또는 염소일 수 있다.
- [0056] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알킬"은 탄소 원자 및 수소 원자로 구성되는 선형 또는 분지형 포화 히드로카빌 기를 지칭한다. 구체적으로, 알킬 기는 1~10개의 탄소 원자, 예를 들어, 1~8개, 1~6개, 1~5개, 1~4개, 1~3개 또는 1~2개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_1 - C_6 알킬"은 1~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 포화 히드로카빌 기를 지칭하며, 이의 예는 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필(*n*-프로필 및 이소프로필 포함), 부틸(*n*-부틸, 이소부틸, *sec*-부틸 또는 *tert*-부틸 포함), 펜틸(*n*-펜틸, 이소펜틸 및 네오펜틸 포함), 헥실(*n*-헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 3,3-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸 및 2-에틸부틸) 등을 포함한다.
- [0057] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 탄소 원자 및 수소 원자로 구성되는 선형 또는 분지형 불포화 히드로카빌 기를 지칭한다. 구체적으로, 알케닐 기는 2~8개, 예를 들어, 2~6개, 2~5개, 2~4개 또는 2~3개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_2 - C_6 알케닐"은 2~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알케닐 기, 예를 들어, 비닐, 프로페닐, 알릴, 1-부테닐, 2-부테닐, 1,3-부타디에닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-펜테닐, 1,3-펜타디에닐, 1,4-펜타아이에닐, 1-헥세닐, 2-헥세닐, 3-헥세닐, 1,4-헥사디에닐 등을 지칭한다.
- [0058] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 탄소 원자 및 수소 원자로 구성되는 선형 또는 분지형 불포화 히드로카빌 기를 지칭한다. 구체적으로, 알키닐 기는 2~8개, 예를 들어, 2~6개, 2~5개, 2~4개 또는 2~3개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_2 - C_6 알키닐"은 2~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알키닐 기, 예를 들어, 에티닐, 프로피닐, 프로파길, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 4-메틸-1-펜티닐, 1-헥시닐, 2-헥시닐, 3-헥시닐, 5-메틸-2-헥시닐 등을 지칭한다.
- [0059] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알킬렌"은 동일한 탄소 원자 또는 두 개의 상이한 탄소 원자에서 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 선형 또는 분지형 포화 알케인으로 부터 유래한 2가 기를 지칭한다. 구체적으로, 알킬렌 기는 1~10개의 탄소 원자, 예를 들어, 1~6개, 1~5개, 1~4개, 1~3개 또는 1~2개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어

어, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_1-C_6 알킬렌"은 1~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬렌 기를 지칭하며, 이는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알케닐렌"은 동일한 탄소 원자 또는 두 개의 상이한 탄소 원자에서 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는 선형 또는 분지형 불포화 올레핀으로부터 유래한 2가 기를 지칭한다. 구체적으로, 알케닐렌 기는 2~8개, 예를 들어, 2~6개, 2~5개, 2~4개 또는 2~3개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_2-C_6 알케닐렌"은 2~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알케닐렌 기, 예를 들어, 에테닐렌, 프로페닐렌, 알릴렌, 부테닐렌, 펜테닐렌 및 헥세닐렌을 지칭한다.

[0061] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알키닐렌"은 동일한 탄소 원자 또는 두 개의 상이한 탄소 원자에서 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 적어도 하나의 삼중 결합을 포함하는 선형 또는 분지형 불포화 알키닐로부터 유래한 2가 기를 지칭한다. 구체적으로, 알키닐렌 기는 2~8개, 예를 들어, 2~6개, 2~5개, 2~4개 또는 2~3개의 탄소 원자를 갖는다. 예를 들어 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " C_2-C_6 알키닐렌"은 2~6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알키닐렌 기, 예를 들어, 에티닐렌, 프로피닐렌, 프로파길렌, 부티닐렌, 펜티닐렌 및 헥시닐렌을 지칭한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "시클로알킬"은 특정 수의 고리 원자를 갖는 모노시클릭, 축합 폴리시클릭, 가교 폴리시클릭 또는 스피로시클릭 비방향족 1가 탄화수소 고리 구조를 지칭하며, 이는 포화되거나 불포화될 수 있으며, 예를 들어 1개 이상의 이중 결합을 포함한다. 시클로알킬 기는 고리에 3개 이상, 예를 들어, 3~18개, 3~10개 또는 3~8개의 탄소 원자를 포함할 수 있으며, 예를 들어, C_{3-10} 시클로알킬, C_{3-8} 시클로알킬, C_{3-6} 시클로알킬 또는 C_{5-6} 시클로알킬일 수 있다. 시클로알킬 기의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로시클" 또는 "헤테로시클릭"은 N, O 또는 S로부터 독립적으로 선택되는 1~4개의 헤테로원자 고리 구성원을 갖는 5원 내지 20원(예를 들어, 5원 내지 14원, 5원 내지 8원 또는 5원 내지 6원) 방향족 또는 비방향족 모노시클릭, 비시클릭 또는 폴리시클릭 고리 시스템을 지칭한다. 헤테로시클에 있는 하나 이상의 N, C 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 바람직하게는, 헤테로시클은 모노시클릭 또는 축합 비시클릭의 5원 내지 10원 고리 시스템이다. 대표적인 예는 피롤리딘, 아제티딘, 피페리딘, 모폴린, 테트라히드로푸란, 테트라히드로피란, 벤조푸란, 벤조티오펜, 인돌, 벤조피라졸, 피롤, 티오펜, 푸란, 티아졸, 이미다졸, 피라졸, 피리미딘, 피리딘, 피라진, 피리다진, 이소티아졸 및 이속사졸을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 해당 용어는 본원에 정의된 바와 같은 헤테로아릴을 망라하는 것으로 이해되어야 한다.

[0064] 용어 "아릴"은 고리 모이어티에 6~20개, 예를 들어, 6~12개의 탄소 원자를 갖는 모노시클릭 또는 폴리시클릭 방향족 히드로카빌 기를 지칭한다. 바람직하게는, 아릴 기는 (C_6-C_{10}) 아릴이다. 비제한적 예는 페닐, 비페닐, 나프틸 또는 테트라히드로나프틸을 포함하며, 이 중 각각은 1~4개의 치환기, 예를 들어, 알킬, 트리플루오로메틸, 시클로알킬, 할로젠, 히드록시, 알콕시, 아실, 알킬-C(O)-O-, 아릴-O-, 헤테로아릴-O-, 아미노, 설프히드릴, 알킬-S-, 아릴-S-, 니트로, 시아노, 카르복실, 알킬-O-C(O)-, 카르바모일, 알킬-S(O)-, 설포닐, 설포아미도, 헤테로시클릭 등에 의해 선택적으로 치환될 수 있다.

[0065] 용어 "헤테로아릴"은 치환되거나 비치환될 수 있는, N, O 또는 S로부터 선택되는 1~4개의 헤테로원자를 함유하는 5원 내지 20원(예를 들어, 5원 내지 14원, 5원 내지 8원, 5원 내지 6원) 방향족 모노시클릭 또는 폴리시클릭 고리 시스템을 지칭한다. 바람직하게는, 헤테로아릴 기는 모노시클릭 또는 축합 비시클릭의 5원 내지 10원 고리 시스템이다. 대표적인 헤테로아릴 기는 2- 또는 3-티에닐, 2- 또는 3-푸라닐, 2- 또는 3-피롤릴, 2-, 4- 또는 5-이미다졸릴, 3-, 4- 또는 5-피라졸릴, 2-, 4- 또는 5-티아졸릴, 3-, 4- 또는 5-이소티아졸릴, 2-, 4- 또는 5-옥사졸릴, 3-, 4- 또는 5-이소옥사졸릴, 3- 또는 5-1,2,4-트리아졸릴, 4- 또는 5-1,2,3-트리아졸릴, 테트라졸릴, 2-, 3- 또는 4-피리딜, 3- 또는 4-피리다지닐, 3-, 4- 또는 5-피라지닐, 2-피라지닐 및 2-, 4- 또는 5-피리미디닐을 포함한다.

[0066] 용어 "헤테로알킬"은 완전히 포화되거나 1~3개 유닛의 불포화가 함유되는, 특정 수의 탄소 원자 및 O, N, Si, 및 S로부터 선택되는 1개 내지 10개, 바람직하게는 1개 내지 3개의 헤테로원자로 구성되는 안정 선형 또는 분지형 탄화수소를 지칭하며, 여기서 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고 질소 헤테로원자는 선택적으로 4차화될 수 있다. 헤테로원자 O, N, Si 및 S는 헤테로알킬 기의 임의의 내부 위치 또는 헤테로알킬 기가 분자의

나머지 부분에 연결된 위치에 위치할 수 있다. 헤테로아릴 기의 대표적인 예는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_3$ 및 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 을 포함한다. 최대 두 개의 헤테로원자가 연속적일 수 있다(예를 들어, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 및 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). 일반적으로, C1-C4 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌 기는 1~4개의 탄소 원자 및 1 또는 2개의 헤테로원자를 가지며, C1-C3 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌 기는 1~3개의 탄소 원자 및 1개 또는 2개의 헤테로원자를 갖는다. 일부 양태에서, 헤테로알킬 및 헤테로알킬렌 기는 포화된다.

[0067]

달리 명시하지 않는 한, 각 기의 정의에서 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치환"은 상응하는 기가 예를 들어 다음의 기(단 이에 제한되지 않음)에 의해 치환될 수 있음을 의미한다: 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클릴, 할로젠, 시아노, 니트로, 아지도, 카르복실, 히드록시, 설프히드릴, 아미노, 모노알킬아미노 또는 디알킬아미노, 모노시클로알킬아미노 또는 디시클로알킬아미노, 모노아릴아미노 또는 디아릴아미노, 모노헤테로일아미노 또는 디헤테로일아미노, 모노헤테로아릴아미노 또는 디헤테로아릴아미노, 알킬-옥시 또는 시클로알킬-옥시 또는 헤테로시클릴-옥시 또는 헤테로아릴-옥시 또는 아릴-옥시, 알킬-티오 또는 시클로알킬-티오 또는 헤테로시클릴-티오 또는 헤테로아릴-티오 또는 아릴-티오, 알킬-아실 또는 시클로알킬-아실 또는 헤테로시클릴-아실 또는 헤테로아릴-아실 또는 아릴-아실, 알킬-아실아미노 또는 시클로알킬-아실아미노 또는 헤테로시클릴-아실아미노 또는 헤테로아릴-아실아미노 또는 아릴-아실아미노, 알킬-아실옥시 또는 시클로알킬-아실옥시 또는 헤테로시클릴-아실옥시 또는 헤테로아릴-아실옥시 또는 아릴-아실옥시, 알킬-설포닐 또는 시클로알킬-설포닐 또는 헤테로시클릴-설포닐 또는 헤테로아릴-설포닐 또는 아릴-설포닐, 알킬-설포닐옥시 또는 시클로알킬-설포닐옥시 또는 헤테로시클릴-설포닐옥시 또는 헤테로아릴-설포닐옥시 또는 아릴-설포닐옥시, 알킬-설포닐아미노 또는 시클로알킬-설포닐아미노 또는 헤테로시클릴-설포닐아미노 또는 헤테로아릴-설포닐아미노 또는 아릴-설포닐아미노, 또는 위에 기재된 바와 같이 선택적으로 치환되는 아미노-포밀기, 및 나머지 선택적인 치환기에 의해 추가로 치환되는 이의 대응하는 기, 여기서 대응하는 기는 본원에 정의된 바와 같다. 치환기의 예는 할로젠, OH, SH, CN, NH_2 , NHCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, NO_2 , N_3 , $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, COOH , $\text{C}(\text{O})$ -아미노, OCOCH_3 , 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, *sec*-부틸, *tert*-부틸, 시클로프로필, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 옥소, 트리플루오로메틸, 디플루오로메틸, 설포닐아미노, 메틸설포닐아미노, SO, SO_2 , 페닐, 피페리디닐, 피페라지닐 및 피리미디닐로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 기를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0068]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치환" 또는 "치환된"은 특정 원자상에 있는 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 4개)의 수소가 지정된 기에 의해 대체됨을 의미하며, 단, 본 상황에서 특정 원자의 정상 원자수를 초과하지 않고, 안정한 화합물을 형성하면, 치환기와 변수의 조합은 이러한 조합이 안정한 화합물을 형성하는 경우에만 허용된다.

[0069]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 약물-항체 접합체에서 약물을 항체에 연결하는 이중 기능성 모이어티를 지칭한다. 본 발명의 링커는 여러 가지 성분(예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체에 대한 커플링을 담당하는 연결 기, 분해 가능한 펩티드 유닛 및 선택적으로 스페이서 기)을 가질 수 있다.

[0070]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "PEG 유닛"은 다분산, 단분산 또는 별개일 수 있는(즉, 별개의 수의 에틸렌-옥시 서브유닛을 갖고 있음), 반복되는 에틸렌-옥시 서브유닛(PEG 또는 PEG 서브유닛)을 포함하는 유기 모이어티를 지칭한다. 다분산 PEG는 다양한 크기와 분자량의 이중 혼합물인 반면, 단분산 PEG는 일반적으로 이중 혼합물로부터 정제되어 고유한 사슬 길이와 분자량을 갖는다. PEG 유닛은 별개의 PEG를 포함하며, 이는 중합체화 과정을 거치지 않고 단계적인 방식으로 합성되는 화합물이다. 개별 PEG는 정의되고 지정된 사슬 길이를 갖는 단일 분자를 제공한다.

[0071]

용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 발명의 ADC의 생물학적 효과 및 특성을 보유하고 생물학적으로 또는 다른 측면에서 원하지 않은 것이 아닌 염을 지칭한다. 본 발명의 ADC는 약학적으로 허용 가능한 염 형태로 존재할 수 있고 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 본 발명에서 약학적으로 허용 가능한 무독성 산 부가 염은 염산, 황산, 히드로브롬산, 히드로아이오딕산, 인산, 질산, 과염소산, 아세트산, 옥살산, 말레산, 푸마르산, 타타르산, 벤젠설포산, 메탄설포산, 살리실산, 숙신산, 시트르산, 락트산, 프로피온산, 벤조산, *p*-톨루엔설포산, 말산 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 유기산 또는 무기산이 본 발명의 ADC와 반응하여 형성되는 염을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 무독성 염기 부가 염은 알칼리 금속 염, 예를 들어 리튬, 소듐 또는 포타슘 염; 알칼리 토금속 염, 예를 들어 칼슘 또는 마그네슘 염; 유기 염기 염, 예를 들어 암모늄 염을 포함하나 이에 제한되지 않는 유기 또는 무기 염기(N 기 함유 유기 염기)와 본 발명의 ADC에 의해 형성되는 염을 지칭한다.

- [0072] 용어 "용매화물"은 하나 이상의 용매 분자와 본 발명의 ADC에 의해 형성되는 회합 화합물(association compound)을 지칭한다. 용매화물을 형성하기 위한 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 아세테이트, 테트라히드로푸란, *N,N*-디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0073] "약학적으로 허용 가능한" 및 "약학적"은 문맥에 따라 모순이 없는 한 본원에서 상호교환적으로 사용 가능하다.
- [0074] 용어 "약물-대-항체 비율" 또는 "DAR"은 본원에 기재된 Ab 모이어티에 접합된 약물 부분(D) 대 ADC에서의 Ab 모이어티의 비율을 지칭한다. 본원에 기재된 일부 실시양태에서, DAR은 화학식 I의 q에 의해 결정될 수 으며, 예를 들어, DAR은 1~20, 예를 들어, 2~18, 4~16, 5~12, 6~10, 2~8, 3~8, 2~6, 4~6, 6~10, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 수 있다. DAR은 또한 생성물에 있는 분자군의 평균 DAR로서 계산될 수 있는데, 즉, 검출 방법에 의해(예를 들어, 질량 분석, ELISA 검정, 전기영동 및/또는 HPLC와 같은 통상적인 방법에 의해) 측정되는 바와 같이 본원에 기재된 Ab 모이어티에 접합된 소분자 약물 모이어티(D) 대 생성물 내의 Ab 모이어티의 전체 비율로서 계산될 수 있으며, 이러한 DAR은 본원에서 평균 DAR이라고 칭한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 평균 DAR 값은 1~20, 예를 들어, 2~18, 4~16, 5~12, 6~10, 2~8, 3~8, 2~6, 4~6 또는 6~10, 예를 들어, 1.0~8.0 또는 2.0~6.0, 예를 들어, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8.0, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 10.0 및 이러한 값 중 임의의 둘을 중점으로 삼는 범위이다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약물"은 종양, 예를 들어, 암을 예방 또는 치료하는 데 효과적인 임의의 물질을 망라하며, 화학요법제, 사이토카인, 혈관형성 억제제, 세포독성제, 다른 항체, 소분자 약물, 또는 면역조절제(예를 들어, 면역억제제)를 포함한다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 예방하고/하거나 세포 사멸 또는 파괴를 초래하는 물질을 지칭한다. 세포독성제의 예는 캄프토테신 약물, 아우리스타틴, 아우레오마이신, 마이탄시노이드, 리신, 리신 A 사슬, 콤프레스타틴, 듀오카마이신, 아플리시아톡신, 독소루비신, 다우노마이신, 탁솔, 시스플라틴, cc1065, 브로민화 에티듐, 마이토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신, 디프테린, 슈도모나스 외독소(PE) A, PE40, 아브린, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, α -사르신, 겔로닌, 마이토겔린, 레티스트리토신, 페노마이신, 에노마이신, 큐리신, 크로틴, 칼리케아마이신, 사파오나리아 오피칼리스 억제제 및 글루코코르티코이드 및 다른 치료제 그리고 방사성 동위원소, 예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212 또는 213, P32, 및 Lu177을 포함하는 Lu의 방사성 동위원소를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 용어 "소분자 약물"은 생물학적 과정을 조절할 수 있는 저분자량 유기 화합물을 지칭한다. "소분자"는 분자량이 10kD 미만, 일반적으로 2kD 미만, 바람직하게는 1kD 미만인 분자로 정의한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를 함유하는 분자, 합성 분자, 펩티드 모방체 및 항체 모방체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 치료제로서, 대분자에 비해 소분자는 세포에 보다 잘 침투하고 분해에 덜 민감하며 면역 반응을 유도할 가능성이 더 낫다.
- [0078] 용어 "약학적 조성물"은 함유되는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적으로 발휘되게 하는 형태로 존재하고, 조성물이 투여되는 대상체에 허용 불가능한 독성을 갖는 추가 성분을 함유하지 않는 조성물을 지칭한다.
- [0079] 용어 "약학적 보조 물질"은 활성 물질과 함께 투여하는 희석제, 보조제(예를 들어, 프로인트 보조제(완전 및 불완전)), 부형제, 담체, 안정화제 등을 지칭한다.
- [0080] 용어 "약학적 조합" 또는 "조합 생성물"은 키트 및 약학적 조성물을 포함하나 이에 제한되지 않는 비고정 조합 생성물 또는 고정 조합 생성물을 지칭한다. 용어 "비고정 조합"은 활성 성분(i) 예를 들어, (i) 본 발명의 ADC 분자 또는 본 발명의 항체 및 (ii) 추가 치료제) 환자에게 동시에 또는 순차적으로(특정 시간 제한 없이 또는 동일하거나 상이한 시간 간격으로) 별도의 실체로서 투여되는 것을 의미하며, 여기서 이러한 투여는 환자에게 두 가지 이상의 예방적 또는 치료적 유효 활성제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 약학적 조합에 사용된 본 발명의 ADC 분자 또는 본 발명의 항체 및 추가 치료제는 이들이 단독으로 사용될 때의 수준을 초과하지 않는 수준으로 투여된다. 용어 "고정 조합"은 두 가지 이상의 활성제가 단일 실체로서 환자에게 동시에 투여되는 것을 의미한다. 두 가지 이상의 활성제의 용량 및/또는 시간 간격은 바람직하게는 성분의 조합 사용이 어느 한 성분의

단독 사용에 의해 달성되는 것보다 더 큰 질환 또는 장애에 대한 치료 효과를 초래할 수 있도록 선택된다. 성분은 각각 별도의 제제 형태를 취할 수 있고 이러한 별도의 제제 형태는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0081] 용어 "조합 요법"은 본원에 기재된 질환을 치료하기 위한 두 가지 이상의 치료제 또는 치료 양식(예를 들어, 방사선 요법 또는 수술)의 투여를 지칭한다. 이와 같은 투여는 이러한 치료제를 실질적으로 동시적인 방식으로, 예를 들어 고정된 비율의 활성 성분을 갖는 단일 캡슐의 형태로, 투여하는 공동 투여를 포함한다. 대안적으로, 이와 같은 투여는 다양한 또는 별개의 용기(예컨대, 정제, 캡슐, 분말 및 액체)에 있는 활성 성분의 공동 투여를 포함한다. 분말 및/또는 액체는 투여 전에 재구성되거나 원하는 용량으로 희석될 수 있다. 또한 이와 같은 투여는 또한 대략 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 순차적 방식으로 각 유형의 치료제를 사용하는 것을 포함한다. 임의의 경우, 치료 요법은 본원에 기재된 장애 또는 증상의 치료에 있어서 약학적 조합의 유익한 효과를 제공할 것이다.

[0082] 본원에서, 용어 "개체" 및 "대상체"는 상호교환적으로 사용 가능하고 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 가축화된 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼류 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특히, 대상체는 인간이다.

[0083] 용어 "종양" 및 "암"은 일반적으로 비조절 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 질환을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용 가능하다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체를 이용한 치료에 적합한 암은 이와 같은 암의 전이성 형태를 포함하는 위암, 췌장암 또는 식도위 접합부 선암종을 포함한다. 해당 용어는 악성 또는 양성 여부에 상관없이 모든 종양 세포 성장 및 증식, 모든 전암성 및 암성 세포와 조직을 또한 망라한다.

[0084] 용어 "항종양 효과"는 다양한 수단으로 입증할 수 있는 생물학적 효과를 지칭하며, 예를 들어, 종양 부피 감소, 종양 세포 수 감소, 종양 세포 증식 감소 또는 종양 세포 생존력 감소를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")는 기존의 증상, 장애, 병태 또는 질환의 진행 또는 중증도를 지연, 저해, 저지, 완화, 중단, 감소 또는 역전시키는 것을 지칭한다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방"(또는 "예방하다" 또는 "예방하는")은 질환 또는 장애 또는 특정 질환 또는 장애의 증상의 발전 또는 진행을 억제하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 가족력이 있는 대상체는 예방 요법의 후보자이다. 일반적으로 암의 경우, 용어 "예방"(또는 "예방하다" 또는 "예방하는")은 암의 징후 또는 증상 개시 전, 특히, 암 위험에 처 있는 대상체에게 약물을 투여하는 것을 지칭한다.

[0087] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량"은 단일 용량 또는 다중 용량으로 환자에게 투여된 후 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 예상되는 효과를 생성하는 본 발명의 항체-약물 접합체 또는 이의 조성물 또는 조합의 양 또는 용량을 지칭한다.

[0088] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료적 유효량"은 필요한 투여량 및 필요한 기간 동안 원하는 치료 결과를 달성하는 데 효과적인 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 또한 본 발명의 항체-약물 접합체 또는 이의 조성물 또는 조합의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적으로 유익한 효과보다 못한 양이다. "치료적 유효량"은 바람직하게는 치료받지 않은 개체에 비해 적어도 약 30%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 심지어 100%의 측정 가능한 파라미터(예를 들어, 종양 부피)에 대한 억제를 달성한다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방적 유효량"은 필요한 투여량 및 필요한 기간 동안 원하는 예방 결과를 달성하는 데 효과적인 양을 지칭한다. 일반적으로 예방적 용량은 질환의 초기 단계 이전에 또는 초기 단계 당시에 대상체에게 투여되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 더 적을 것이다.

[0090] 본 발명에서, 용어 "CLDN18.2 양성" 종양은 종양 기관 또는 조직 내 암 세포 중 적어도 일부가 CLDN18.2 세포 표면 발현에 대해 양성인 종양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암 조직 또는 암 세포군에서 CLDN18.2 양성 암 세포의 비율은 적어도 10% 또는 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% 또는 80%이다. 이외의 다른 실시양태에서, 종양 조직 또는 기관 내 암세포의 적어도 40% 또는 적어도 50%, 바람직하게는 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CLDN18.2 표면 발현에 대해 양성이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 치료받은 암 대상체는 건강한 대상체의 상응하는 조직 또는 기관에 비해 질환이 있는 조직 또는 기관에서 예를 들어, 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200% 또는 그 이상 증가한 수준의 CLDN18.2 세포 표면 발현을 갖는다. 일 실시양태에서, CLDN18.2 양성 종양은 위암, 식도암, 췌장암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암(NSCLC)), 난소암, 결장암, 간암, 두경부암, 및 담낭암, 및 이들의 전이, 특히, 위암의 전이로부터 선택된다.

일 실시양태에서, 암은 선암종, 특히 진행성 선암종이다. 특히 바람직한 암 질환은 위, 식도, 췌장관, 담관, 폐 및 난소의 선암종이다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료받는 암은 HER 음성 암이다. 또 다른 실시양태에서, CLDN18.2 양성 종양은 소화기계 암 또는 이의 암 전이이다. 일 실시양태에서, 암은 위암, 식도암(특히, 하부 식도암), 식도위 접합부 선암종 및 위식도암으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 암은 예를 들어, CLAUDIN 18.2 양성 및 HER2 음성 위암이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 암은 위식도암, 예컨대 전이성, 난치성 또는 재발성 진행성 위식도암이며, 또 다른 실시양태에서, 암은 전이성 위암 또는 식도위 접합부 선암종(EGJA)이다.

[0091] 본 발명의 양태는 다음의 하위 섹션에서 보다 상세히 설명될 것이다.

[0092] 본 발명의 ADC 모이어티

[0093] I. 항체-약물 접합체

[0094] 일 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 (I)을 갖는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공한다:

[0095] $Ab-[L-D]_q$ (I),

[0096] 여기서

[0097] Ab는 항-Claudin18.2 항체를 나타내며,

[0098] L은 링커를 나타내며,

[0099] D는 세포독성 또는 세포증식억제 약물, 예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제를 나타내며, 및

[0100] q는 1~20의 정수 또는 소수를 나타내며, 예를 들어, q=1~10, 1~8, 2~8, 4~8 또는 6~8이다.

[0101] 본 발명의 ADC의 성분과 해당 성분으로 구성되는 본 발명의 ADC에 대해 아래에서 별도로 상세하게 기재된다. 달리 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 당업자는 이러한 성분의 임의의 기술적 특징의 임의의 조합이 본 발명의 고려 내에 있음을 이해할 것이다. 또한, 달리 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 당업자는 본 발명의 ADC가 임의의 이러한 특징의 조합을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.

[0102] 항체의 Ab 유닛

[0103] 본 발명자들은 우수한 특성을 갖는 인간화 항-Claudin18.2 모노클로날 항체를 개발하고 제공하기 위해 집중적인 연구를 수행해 왔다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항체는 표면상에서 인간 Claudin18.2를 발현하는 세포(특히, 표면 발현 존재비가 낮은 세포)에 대해 높은 결합 친화성 및 높은 특이성을 나타낼 뿐만 아니라, Claudin18.2 항원 매개 세포내이입 활성화, 안정성 및/또는 약동학적 특성과 같은 유리한 특성을 가지므로, 세포 독성 약물과 접합되어 항체-약물 접합체를 형성하는 분자 성분으로서 적합하다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항체로부터 형성된 ADC는 우수한 약물 내약성을 가지면서 강력한 체내 종양 사멸 효과를 나타낸다.

[0104] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 화학식 (I)의 접합체의 Ab 유닛로서 Claudin18.2에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 서열 번호: 1 또는 3의 중쇄 가변 영역(VH) 서열의 3개의 CDR 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역(VL) 서열의 3개의 CDR을 포함하며, 여기서 바람직하게는 CDR은 Kabat 또는 IMGT 또는 이들의 조합에 따라 정의된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하며, 여기서

[0107] (i) IMGT 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

[0108] (ii) Kabat 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하거나

이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

- [0109] 일 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 본 발명의 예시적인 항체 25C7A5-HZ1과 -HZ2 중 임의의 하나의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 또는 이의 변이체를 포함하며, 예를 들어, 이는 예시적인 항체 중 하나와 동일한 CDR 서열을 가지며, 동일하거나 상이한 프레임워크 영역 서열을 갖는 항체이다.
- [0110] 일 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 다음을 포함한다:
- [0111] - 서열 번호: 1에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0112] - 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.
- [0113] 일 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 다음을 포함한다:
- [0114] - 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.
- [0115] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체의 서열은 인간화된다. 보다 바람직하게는, 항체의 중쇄 가변 영역은 인간 생식계열로부터 유래한 프레임워크 영역 서열을 가지며, 바람직하게는 중쇄 가변 영역에서 Kabat 방식에 따라 넘버링된 위치 H6에서 아미노산 Q 또는 E, 바람직하게는 아미노산 Q를 갖는다.
- [0116] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 서열 번호: 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0117] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 서열 번호: 3의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 바람직하게는 항체의 중쇄 불변 영역 및/또는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래한 중쇄 불변 영역이다. 바람직하게는, 경쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래한 경쇄 불변 영역이다. 일부 양태에서, Ab에 함유된 중쇄 불변 영역은 임의의 아이소타입 또는 서브타입, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아이소타입의 중쇄 불변 영역, 바람직하게는 IgG1, IgG2 또는 IgG4 중쇄 불변 영역, 특히 인간 IgG1 중쇄 불변 영역일 수 있다. 이외의 다른 양태에서, Ab에 함유된 경쇄 불변 영역은 κ 경쇄 불변 영역 또는 λ 경쇄 불변 영역, 특히 인간 κ 경쇄 불변 영역일 수 있다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 4의 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열에 비해 적어도 1개, 2개 또는 3개, 그러나 20개, 10개 또는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열과 적어도 95%~99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 경쇄 불변 영역은 서열 번호: 5의 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 5의 아미노산 서열에 비해 적어도 1개, 2개 또는 3개, 그러나 20개, 10개 또는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 5의 아미노산 서열과 적어도 95%~99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 전체 길이 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄에 의해 형성된 사량체 구조를 갖는다. 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 IgG 항체, 특히, IgG1 항체이다. 기타

실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 인간화 항체이다.

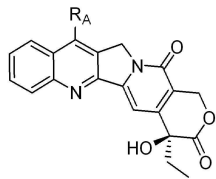
- [0122] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 중쇄는 서열 번호: 18 또는 19에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 경쇄는 서열 번호: 20에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0123] 일부 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Ab는 다음으로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄를 포함한다:
- [0124] (a) 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및
- [0125] (b) 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.
- [0126] 위의 항체의 임의의 변이체가 또한 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명의 항체 변이체는 바람직하게는 변경 전 항체의 생물학적 활성(예를 들어, 항원 결합 능력)의 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%를 보유한다. 보다 바람직하게는, 변경은 항원에 대한 항체 변이체의 결합 능력의 손실을 초래하지 않으나, 선택적으로 항원에 대한 증가한 친화성 및 상이한 이펙터 기능과 같은 특성을 부여한다. 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR은 독립적으로 또는 조합으로 변경될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 항체의 Fc 영역도 변경될 수 있다. Fc 영역의 변경은 단독으로 또는 위에 기재된 프레임워크 영역 및/또는 CDR에 대한 변경과 조합하여 이루어질 수 있다. Fc 영역은, 예를 들어, 항체의 하나 이상의 기능, 예컨대, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포독성을 변경하도록 변경될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형(예를 들어, PEG에 결합)될 수 있거나, 또는 이의 글리코실화 패턴이 변경될 수 있다.
- [0127] ADC를 형성하기 위해, 본 발명에 따른 항체는 항체상에 있는 일부 천연 접합 부위를 이용하여 독소-링커에 접합될 수 있다. 이와 같은 천연 접합 부위는 시스테인의 설프히드릴 기 및 라이신의 아미노 기를 포함한다. 전형적으로, 더 명확히 정의된 약물 항체 비율(DAR)은 항체의 중쇄와 경쇄 사이에 이황화 가교를 사용함으로써 달성할 수 있다. 따라서, 일 실시양태에서, 항체의 쇠간 이황화 결합의 환원 후, 독소는 설프히드릴 화학에 의해 본 발명의 항체에 접합되어 화학식 (I)의 ADC를 형성한다. 또한, 보다 부위 지향적인 접합을 달성하기 위해 항체에 인공 접합 부위를 도입하는 것도 고려된다.
- [0128] **약물 D 유닛**
- [0129] 항체-약물 접합체의 약물 D 유닛은 본원에서 ADC 약물의 페이로드라고도 칭한다. 본 발명의 ADC에 사용될 수 있는 약물 D는 특별히 제한되지 않으며, 세포에 독성 또는 억제성을 갖는 약물 또는 이의 전구약물이면 모두 가능하다. 당업자는 원하는 ADC 약물 작용 메커니즘 및 세포 사멸 효과를 기준으로 ADC의 페이로드로서 적합한 약물 분자를 선택할 수 있다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 약물 D는 세포독성제이다. 상이한 메커니즘을 갖는 페이로드로 사용하기에 적합한 다양한 세포독성제가 이미 당업계에서 보고되었으며, 이는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다:
- [0131] (1) 미세소관 억제제/교란제: 예를 들어(단 이에 제한되지 않음), 아우리스타틴(예를 들어, MMAE 또는 MMAF), 메이탄신 유도체(예를 들어, DM2, DM4), 튜불리신, 크립토마이신 및 항유사분열 EG5 억제제(예를 들어, 키네신 스핀들 단백질(KSP) 억제제);
- [0132] (2) DNA 손상제: 예를 들어(단 이에 제한되지 않음), 피롤로벤조디아제핀(예를 들어, 피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀(PBD)), 듀오카마이신, 인돌리노벤조디아제핀, 듀오카마이신 및 칼리케아마이신;
- [0133] (3) 토포이소머라제 억제제: 예를 들어(단 이에 제한되지 않음), 캄프토테신(예를 들어, 엑사테칸 및 이의 유도체 Dxd); 및
- [0134] (4) 다른 세포독성제: 아포토시스 유도제(Bcl-xL 억제제), 타이란스타틴 및 이의 유사체, 아마톡신, 니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼레이스(NAMPT) 억제제 및 카마피신.
- [0135] 본 발명의 화학식 (I)의 약물 D는 위로부터 선택되는 임의의 화합물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물 D는 메이탄신 유도체, 칼리케아마이신 유도체 및 아우리스타틴 유도체로부터 선택되는 항종양 성장 억제제이다. 일 실시양태에서, 약물 D는 빈카 알칼로이드, 빈크리스틴, 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 튜블린 억제제/안정성 교란제이다. 일 실시양태에서, 약물 D는 메토타렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 챔피타빈, 머캄토피린,

펜토스타틴, 플루다라빈 및 클라드리빈과 같은 DNA 합성 억제제이다. 일 실시양태에서, 약물 D는 DNA 토포이소머라제 억제제, 예컨대 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 캄프토테신) 및 토포이소머라제 II 억제제(예를 들어, 악티노마이신 D, 아드리아마이신, 미톡산트론)이다.

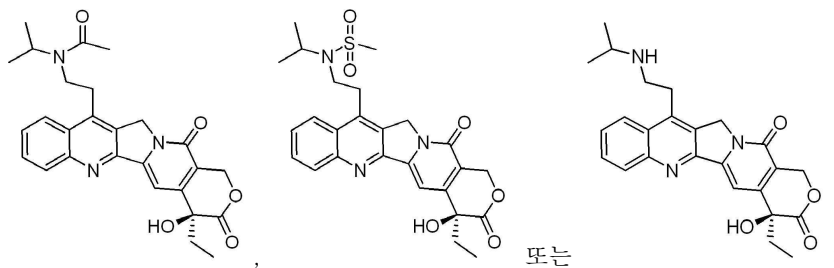
[0136] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 ADC의 약물 D는 토포이소머라제 I 억제제이다. 토포이소머라제 I 억제제의 전형적인 예는 캄프토테신 약물, 예를 들어(단 이에 제한되지 않음), 캄프토테신(CPT), 히드록시캄프토테신, 9-아미노캄프토테신, 엑사테칸, 토포테칸, 벨로테칸, 이리노테칸, SN-38 및 FL118 및 이들의 유도체이다. 예를 들어, Vesela Kostova 등, The Chemistry Behind ADCs, Pharmaceuticals 2021, 14, 442. <https://doi.org/10.3390/ph14050442>; 및 전체 내용이 인용방식으로 본원에 포함되는 W02019/195665 참조.

[0137] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명의 ADC의 약물 D는 다음으로부터 선택되는 캄프토테신 약물이다:

[0138] - 캄프토테신 및 그의 유도체, 예를 들어,

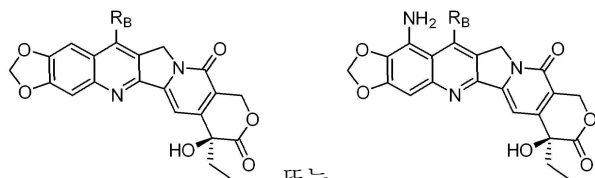


[0139] , 여기서 R_A 는 수소 및 치환기에 의해 선택적으로 치환된 알킬로부터 선택되며, 여기서 치환기는 히드록시 및 아미노를 포함하나 이에 제한되지 않고, 여기서 아미노 모이어티 또는 히드록시 모이어티는 비치환될 수 있거나 예를 들어, 알킬, 알킬아실 또는 알킬설포닐에 의해 치환될 수 있으며; 일 실시양태에서, 약물 D는 다음과 같다

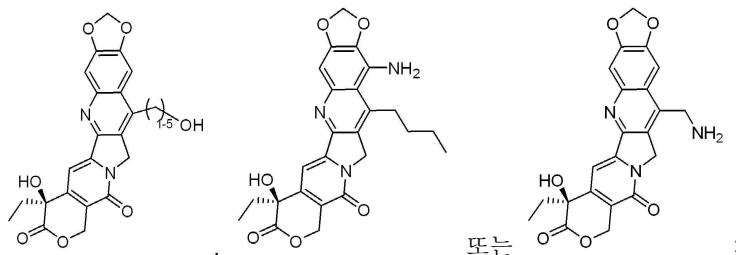


[0140] , 또는 ;

[0141] - 10,11-메틸렌디옥시 CPT(MDCPT 또는 FL118로도 약칭됨) 및 그의 유도체, 예를 들어,

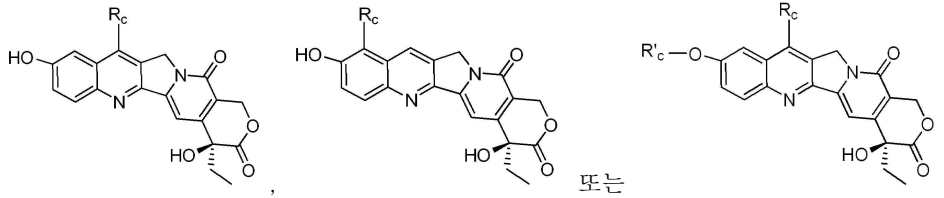


[0142] 또는 , 여기서 R_B 는 수소, 시클로알킬, 페닐 및 치환기에 의해 선택적으로 치환된 알킬로부터 선택되며, 여기서 치환기는 할로젠, 히드록시, 선택적으로 치환된 알콕시, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 아미노를 포함하나 이에 제한되지 않고, 여기서 아미노 모이어티는 선택적으로 치환될 수 있으며; 일 실시양태에서, 약물 D는 다음과 같다



[0143] , 또는 ;

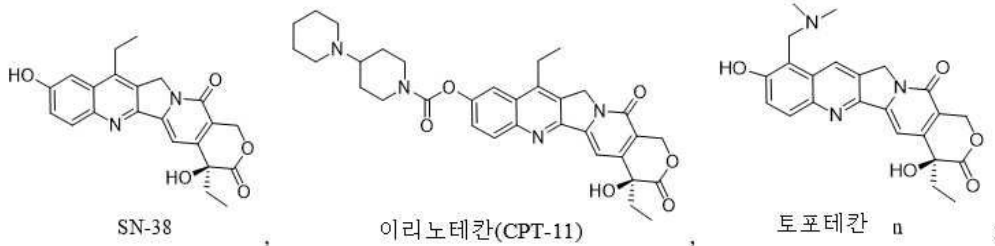
[0144] - 10-히드록시 CPT(HCPT로도 약칭됨) 및 그의 유도체, 예를 들어,



[0145]

[0146]

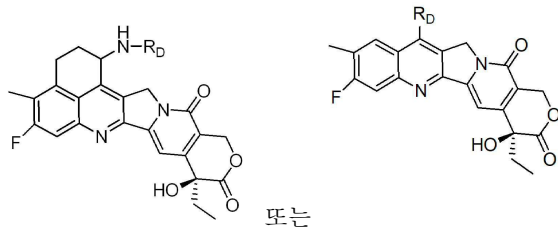
여기서 R_c 는 예를 들어, 선택적으로 치환된 알킬 및 시클로알킬로부터 선택되며; R'_c 는 예를 들어, H, 알킬아실 및 선택적으로 치환된 헤테로시클로알킬아실로부터 선택되며; 일 실시양태에서, 약물 D는 7-에틸-10-히드록시 CPT(SN-38) 또는 이의 전구약물 이리노테칸(CPT-11)이거나, 또는 약물 D는 토포테칸이다:



[0147]

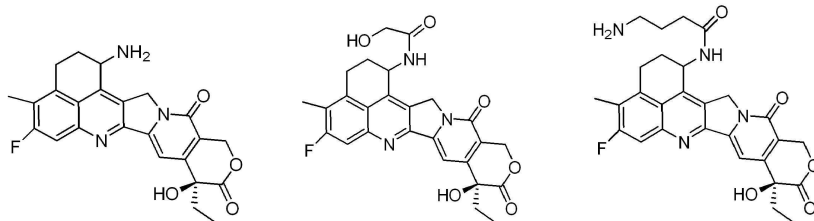
[0148]

- 엑사테칸 및 이의 유도체, 예를 들어,



[0149]

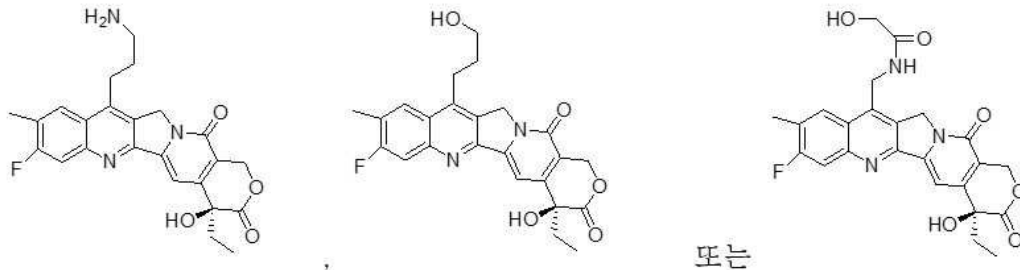
여기서 R_D 는 예를 들어, H, 치환기에 의해 선택적으로 치환된 알킬 및 치환기에 의해 선택적으로 치환된 알킬-C(=O)-로부터 선택되며, 여기서 치환기는 예를 들어, -OH 또는 치환 또는 비치환된 아미노이며; 일 실시양태에서, 약물 D는 다음과 같다:



[0150]

[0151]

엑사테칸 Dxd(1) 또는 Dxd(2); 다른 실시양태에서, 약물 D는 다음과 같다:



[0152]

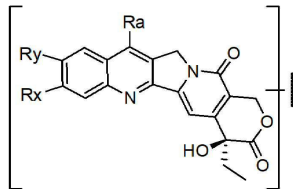
[0153]

FL18((20S)-10,11-메틸렌디옥시 캄프토테신)을 화합물 라이브러리의 고처리량 스크리닝을 통해 얻었다. FL18은 다른 캄프토테신 유도체에 비해 많은 상이한 암 유형에서 체내 및 체외 항암 활성이 유의하게 높은 것으로 입증되었다. 토포이소머라제 I의 억제에 더하여, FL18은 유전자 프로모터 활성화와 서바이빈, XIAP, cIAP2, Mcl-1과 같은 항세포사멸 단백질의 내인성 발현을 선택적으로 억제할 수 있다. 참조: Xiang Ling 등, A Novel Small

Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity, PLoS ONE 7(9): e45571. doi:10.1371/journal.pone.0045571. FL118의 단독 사용은 극도로 불량한 수용해도와 독성 부작용으로 인해 심각한 제한을 받으나, 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물을 항체 및 링커와 조합함으로써 형성된 접합체는 화합물의 종양 사멸 효과를 효과적으로 발휘할 뿐만 아니라, 화합물의 단점을 극복하며, 형성된 접합체는 응집도가 낮고 동물에 대한 내약성이 양호하다.

[0154] 따라서, 본 발명의 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 ADC의 약물 D는 FL118 유도체, 특히 위치 7-치환된 FL118이다.

[0155] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 약물 D는 아래의 화학식 D의 구조를 포함하는 캄프토테신 약물이다:



[0156] (D),

[0157] 여기서

[0158] R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, -OH 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되거나; 또는 R_x 및 R_y 는 이들이 연결된 탄소 원자와 함께, N, S 및 O로부터 선택되는 1개 또는 2개의 원자를 갖는 5원 내지 6원 헤테로시클을 형성하며;

[0159] R_a 는 H, 할로젠, -OH, 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬 또는 C_3-C_8 알킬닐 또는 C_3-C_8 알케닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알콕시, 선택적으로 치환된 C_3-C_8 시클로알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 선택적으로 치환된 헤테로시클로알킬 및 선택적으로 치환된 헤테로아릴로부터 선택되며,

[0160] 여기서 바람직하게는, R_a 는 다음으로부터 선택된다:

[0161] 수소;

[0162] C_3-C_8 시클로알킬;

[0163] 페닐; 및

[0164] 할로젠, 히드록시, NH_2 , $NH(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $N(C_1-C_4 \text{ 알킬})_2$ 에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_4 알콕시, C_3-C_8 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 NR^1R^2 로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬 또는 C_3-C_8 알킬닐 또는 C_3-C_8 알케닐,

[0165] 여기서 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음으로부터 선택된다:

[0166] 수소;

[0167] 히드록시, 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 알킬에 의해 치환된 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 히드록시알킬에 의해 치환된 아미노 및 $(C_1-C_4 \text{ 히드록시알킬})$ 및 $(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 에 의해 치환된 아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬;

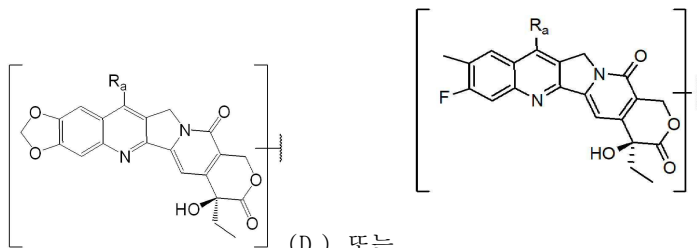
[0168] 1개 또는 2개의 C_3-C_{10} 시클로알킬, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬, 페닐 또는 헤테로아릴에 의해 치환된 C_1-C_4 알킬;

[0169] C_3-C_{10} 시클로알킬;

[0170] C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬;

[0171] C_2-C_6 헤테로알킬;

- [0172] 헤테로아릴;
- [0173] 선택적으로 할로겐화된 페닐; 및
- [0174] 히드록시 또는 아미노에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬- $C(=O)-$;
- [0175] 또는 R^1 및 R^2 는 이들이 연결된 질소 원자와 조합하여, 할로젠, C_1-C_4 알킬, OH, C_1-C_4 알콕시, NH_2 , $NH(C_1-C_4$ 알킬) 및 $N(C_1-C_4$ 알킬) $_2$ 로부터 선택되는 0~3개의 치환기를 갖는 5원, 6원 또는 7원 헤테로시클을 형성하며,
- [0176] 여기서 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 헤테로아릴은 매번 나타날 경우, 각각 독립적으로 OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시, NH_2 , $NH(C_1-C_4$ 알킬) 및 $N(C_1-C_4$ 알킬) $_2$ 로부터 선택되는 0~3개의 치환기에 의해 선택적으로 치환된다.
- [0177] 일부 바람직한 실시양태에서, R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 H이다. 다른 바람직한 실시양태에서, R_x 는 F이며, R_y 는 메틸이다. 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, R_x 및 R_y 는 이들이 연결된 탄소 원자와 함께, 두 개의 O 원자를 함유하는 5원 헤테로시클을 형성한다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 약물 D는 아래의 화학식 D_a 또는 화학식 D_b 의 구조를 포함하는 캄프토테신 약물이다:

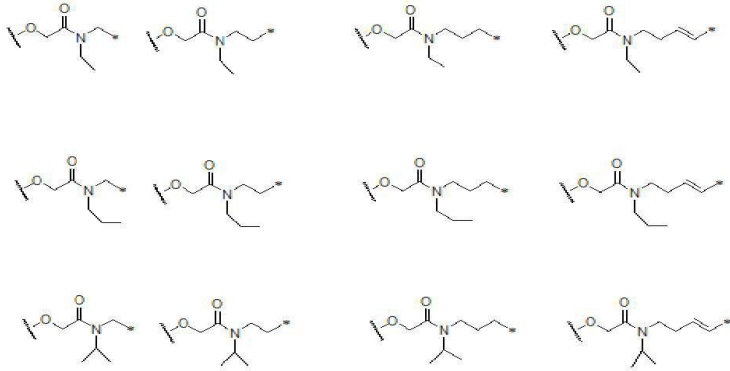


- [0179] (D_a) 또는 (D_b), 특히, 화학식 (D_a)의 캄프토테신 약물이며,

- [0180] 여기서 R_a 는 다음으로부터 선택된다:

- [0181] 수소;
- [0182] C_3-C_8 시클로알킬;
- [0183] 페닐; 및
- [0184] 할로젠, 히드록시, NH_2 , $NH(C_1-C_4$ 알킬) 및 $N(C_1-C_4$ 알킬) $_2$ 에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_4 알콕시, C_3-C_8 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 NR^1R^2 로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 알키닐 또는 C_3-C_8 알케닐,
- [0185] 여기서 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음으로부터 선택된다:
- [0186] 수소;
- [0187] 히드록시, 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 알킬에 의해 치환된 아미노, 1개 또는 2개의 C_1-C_4 히드록시알킬에 의해 치환된 아미노 및 (C_1-C_4 히드록시알킬) 및 (C_1-C_4 알킬)에 의해 치환된 아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 선택적으로 치환된 C_1-C_8 알킬;
- [0188] 1개 또는 2개의 C_3-C_{10} 시클로알킬, C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬, 페닐 또는 헤테로아릴에 의해 치환된 C_1-C_4 알킬;
- [0189] C_3-C_{10} 시클로알킬;
- [0190] C_3-C_{10} 헤테로시클로알킬;

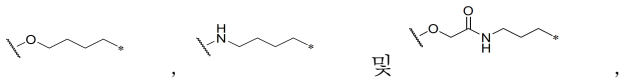
- [0191] C₂-C₆ 헤테로알킬;
- [0192] 헤테로아릴;
- [0193] 선택적으로 할로젠화된 페닐; 및
- [0194] 히드록시 또는 아미노에 의해 선택적으로 치환된 C₁-C₈ 알킬-C(=O)-;
- [0195] 또는 R¹ 및 R²는 이들이 연결된 질소 원자와 조합하여, 할로젠, C₁-C₄ 알킬, OH, C₁-C₄ 알콕시, NH₂, NH(C₁-C₄ 알킬) 및 N(C₁-C₄ 알킬)₂로부터 선택되는 0~3개의 치환기를 갖는 5원, 6원 또는 7원 헤테로시클을 형성하며,
- [0196] 여기서 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 페닐 및 헤테로아릴은 매번 나타날 경우, 각각 독립적으로 OH, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, NH₂, NH(C₁-C₄ 알킬) 및 N(C₁-C₄ 알킬)₂로부터 선택되는 0~3개의 치환기에 의해 선택적으로 치환된다.
- [0197] 일부 실시양태에서, R_a는 수소이다.
- [0198] 일부 실시양태에서, R_a는 C₃-C₈ 시클로알킬(예를 들어, 시클로프로필, 시클로헥실 및 시클로펜틸)이다.
- [0199] 일부 실시양태에서, R_a는 페닐이다. 다른 실시양태에서, R_a는 NH₂ 또는 NH(C₁-C₄ 알킬)에 의해 치환된 페닐이다.
- [0200] 일부 실시양태에서, R_a는 C₁-C₆ 알킬, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 2-메틸프로필, 부틸, 이소부틸, 2,2-디메틸-프로필, 2,2-디메틸-부틸, *n*-헥실, *n*-펜틸 및 3-에틸-펜틸이다.
- [0201] 일부 실시양태에서, R_a는 히드록시 또는 C₁-C₄ 알콕시에 의해 선택적으로 치환된 C₁-C₄ 알킬이며, 여기서 알콕시는 -NH₂, -NH(C₁-C₄ 알킬) 및 -N(C₁-C₄ 알킬)₂에 의해 선택적으로 추가로 치환된다.
- [0202] 일부 실시양태에서, R_a는 히드록시 또는 아미노에 의해 선택적으로 치환된 C₂-C₄ 알케닐 또는 C₂-C₄ 알키닐이다.
- [0203] 일부 실시양태에서, R_a는 N, S, 및 O로부터 선택되는 1개 또는 2개의 원자를 갖는 5원 내지 6원 헤테로시클로알킬에 의해 치환된 C₁-C₄ 알킬이며, 여기서 헤테로시클로알킬 모이어티는 C₁-C₄ 알킬에 의해 선택적으로 추가로 치환되며, 바람직하게는, 헤테로시클로알킬은 피페라지닐 또는 모르폴리닐이다.
- [0204] 일부 실시양태에서, R_a는 -NR¹R²에 의해 치환된 C₁-C₄ 알킬, 특히, -메틸렌-NR¹R²이며, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 다음으로부터 선택된다:
- [0205] 수소;
- [0206] -C₁-C₄ 알킬;
- [0207] 다음으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환된 -C₁-C₄ 알킬:
- [0208] -OH, -NH₂, -NH(C₁-C₄ 알킬), -N(C₁-C₄ 알킬)₂, -페닐, -페닐렌-NH₂, -페닐렌-C₁-C₄ 알콕시, -디페닐, -C₃-C₁₀ 시클로알킬, -C₃-C₁₀ 시클로알킬렌-C₁-C₄ 알킬 및 -C₃-C₁₀ 헤테로시클로알킬, 여기서 헤테로시클로알킬은 N, S 및 O로부터 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자를 가지며, 바람직하게는, 헤테로시클로알킬은 피페리디닐이며;
- [0209] 페닐; 할로젠화된 페닐;
- [0210] C₃-C₁₀ 시클로알킬;
- [0211] -C(=O)-C₁-C₄ 알킬-OH; 및 -C(=O)-C₁-C₄ 알킬-NH₂.
- [0212] 일부 실시양태에서, R_a는 -NR¹R²에 의해 치환된 C₁-C₄ 알킬, 특히, -메틸렌-NR¹R²이며, 여기서 R¹ 및 R²는 이들이 연결된 질소 원자와 조합하여, 5원, 6원 또는 7원 헤테로시클로알킬 고리를 형성한다. 일부 양태에서, R¹ 및 R²는 이들이 연결된 질소 원자와 조합하여, 6원 고리를 형성한다. 일부 양태에서, 6원 고리는 모르폴리닐 또는 피



[0224]

[0225] 또한 보다 바람직하게는, 링커에 연결된 후, R_6 는 다음으로부터 선택되는 구조를 갖는다:

[0226]

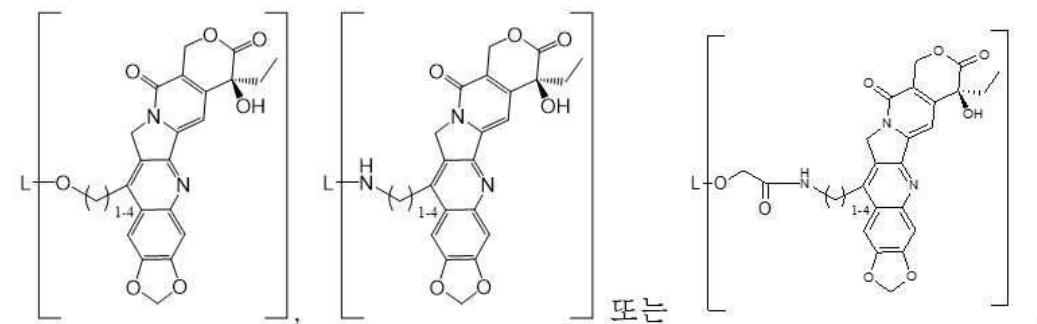


[0227]

왼쪽 물결선은 링커 L에 대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 별표는 캄프토테신 핵에 대한 연결의 위치를 나타낸다.

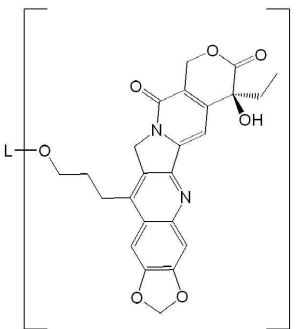
[0228]

일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 L-D 유닛은 하기 구조를 포함한다:



[0229]

[0230] 보다 바람직하게는, 화학식 (I)의 L-D 유닛은 하기 구조를 갖는다:



[0231]

[0232] **링커 L 유닛**

[0233]

본 발명에 적용 가능한 링커 L은 본 발명의 항체와 약물의 접합을 달성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 적합하게는, 링커의 첨가는 순환계에서 본 발명의 ADC의 충분한 안정성을 보장하는 동시에 표적 부위(예를 들어, 종양 세포 또는 종양 환경)에서 독성 약물의 활성 형태의 신속하고 효과적인 방출을 제공해야 한다.

[0234]

일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 링커는 분해 불가능한 링커이다. 분해 불가능한 링커의 예는 *N*-숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)시클로헥세인-1-카복실레이트(SMCC)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 이와 같은 링커를 포함하는 ADC는 세포에 의해 내재화되어야 하며, ADC의 항체 모이어티는 세포내 리소좀

단백질 분해효소에 의해 분해되어 약물의 활성 분자를 방출한다.

[0235] 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 링커는 분해 가능한 링커이다. 이와 같은 링커를 포함하는 ADC로부터의 약물 방출은 링커의 절단 부위 특성에 의해 촉발된다. 따라서, 이와 같은 링커의 절단 부위는 표적 치료 부위(예를 들어, 종양 세포 리소좀 및/또는 종양 환경)의 특성을 기준으로 설계될 수 있다. 대부분의 경우, 분해 가능한 링커는 접합 모이어티, 분해 가능한 모이어티 및 선택적으로 스페이서 기 모이어티로 구성될 수 있다. 접합 모이어티는 항체를 링커-약물에 연결하는 것을 담당하고 있으며, 사용할 원하는 항체 접합 화학을 기준으로 선택될 수 있다. 효소 기반 방출 메커니즘 하에서, 분해 가능한 모이어티는 효소에 의해 식별될 수 있는 펩티드 또는 펩티드 유사체, 예를 들어, 올리고펩티드 또는 올리고펩티드 유사체, 예컨대, 프로테이나제에 의해 분해될 수 있는 Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Gly-Phe-Gly, 시클로부틸-Ala 및 시클로부틸-Cit를 포함할 것이다. 일부 경우, ADC의 특성, 예를 들어 혈액 순환에서의 ADC의 안정성 및/또는 표적 부위에서의 ADC의 효능은 링커의 효소 절단 부위에 인접한 펩티드 잔기 위치에 변형을 도입함으로써 개선될 수 있다. 일부 경우, 원하는 경우, 접합체의 나머지 부분으로부터 약물의 활성 분자의 방출(특히 무추적 방출)을 촉진하기 위해 스페이서 기는 또한 링커의 분해 가능한 모이어티와 약물 D 사이에 도입될 수 있고, 예를 들어, 산성 매질에서 자발적으로 제거될 수 있는 파라-아미노벤질 카르바메이트(PABA) 또는 아미노메틸(-NHCH₂-) 스페이서 기가 도입될 수 있다. 또한, 약물이 고도로 소수적인 경우, 일부 경우, ADC의 특성을 개선하기 위해, 예를 들어, 침전 및 응집을 감소시키기 위해, 예를 들어, PEG 유닛을 첨가하는 것이 고려될 수 있다(단 필수적이지는 않음). 본 발명에 적용 가능한 링커는 W02022/170971(이는 인용방식으로 본원에 포함됨)에 개시된 링커를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0236] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 링커는 아래의 화학식(II)의 구조를 갖는다:

[0237] -Z-Y-M- (II),

[0238] 여기서

[0239] Z는 Ab에 연결된 연결 기이며,

[0240] Y는 2~5개의 아미노산의 펩티드, 바람직하게는 디펩티드, 트리펩티드 또는 테트라펩티드이며, 및

[0241] M은 부재하거나 약물 D에 연결하기 위한 스페이서 기이다.

[0242] Z 연결 기

[0243] 전형적으로, 항체의 시스테인의 설폰닐 기는 이황화 결합 형태로 존재한다. 항체의 이황화 결합이 개방되며 접합 부위로서 유리 설폰히드릴 기가 제공된다. 항체의 설폰히드릴 기에 접합함으로써 ADC를 형성하는 하나의 접근법은 항체상에 있는 유리 설폰히드릴 기가 헤테로시클릭(예를 들어, 말레이미드) 링커와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 거치게 하는 것이다. 다른 접근법은 이탈기 치환 헤테로방향족 고리를 포함하는 링커가 항체 분자에 있는 유리 설폰히드릴 기와 친핵성 치환 반응을 거치게 하여 항체-약물 접합체를 얻는 것이다. 두 접근법 모두 본 발명의 ADC에 적용 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 링커는 일부 양태에서 헤테로시클릭(예를 들어, 말레이미드) 또는 헤테로방향족(예를 들어, 피리미딘) Z 연결 기를 포함할 수 있으며, 일부 경우, 혈액 순환에서 안정성이 더 높은 접합체를 제공하기 위해 바람직하게는 헤테로방향족(예를 들어, 피리미딘) 연결 기를 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, 화학식 (II)의 Z는 하기 구조를 갖는다:

[0245] -Z₁-Z₂-Z₃-Z₄-,

[0246] 여기서 Z₁은 Ab의 항 원자이며;

[0247] Z₂는 5원 내지 10원 헤테로시클릭이며, 바람직하게는 N, S 및 O로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자를 함유하며;

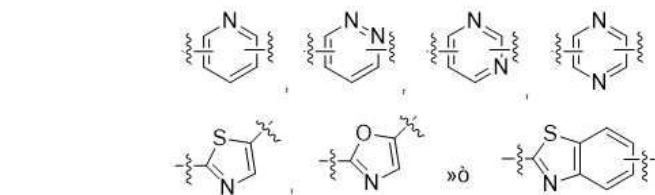
[0248] Z₃은 결합, -C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₁₀ 알킬닐렌-C(=O)-, -C₃-C₁₀ 알케닐렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 헤테로알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈ 시클로알킬렌-C(=O)-, -O-C₁-C₈ 알킬렌-C(=O)-, -아릴렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-아릴렌-C(=O)-, -아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C₃-C₈ 시클로알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈ 시클로알킬렌-C₁-C₁₀-알킬렌-C(=O)-, -C₃-C₈-헤테로시클릭렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C₃-C₈-헤테로시클릭렌-C(=O)- 및 -C₃-C₈ 헤테

로시클릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-로부터 선택되며; 및

[0249] Z₄는 결합 또는 하기 화학식으로 표시되는 PEG 유닛인 것으로:

[0250]
$$R_5 \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \right)_m \text{---} R_6$$
, 여기서 R₅는 C₁₋₄ 알킬렌, -NH- 및 -NH-C₁₋₄ 알킬렌-헤테로아릴-로부터 선택되며, 여기서 헤테로아릴은 5원 또는 6원 질소 함유 헤테로아릴, 바람직하게는 트리아졸릴이며; R₆은 -C(=O)-, -C₁₋₄ 알킬렌, -C₁₋₄ 알킬렌-C(=O)-, -NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)- 또는 -C₁₋₄ 알킬렌-NH-C(=O)-(CH₂OCH₂)-C(=O)-이며, 여기서 m은 2~12의 정수이고, 예를 들어, m은 2, 4, 6 또는 8이다.

[0251] 일 실시양태에서, Z₂는 5원 내지 10원 헤테로아릴이다. 일 실시양태에서, Z₂는 수소, 할로젠, 니트로, C₁₋₆ 알킬 및 C₁₋₆ 할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기에 의해 선택적으로 치환된 피리미딘, 티아졸, 벤조티아졸, 옥사졸, 퀴나졸린 및 피롤로[2,3d]피리미딘으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, Z₂는 다음으로부터 선택되는 헤테로아릴 기이다:



[0252]

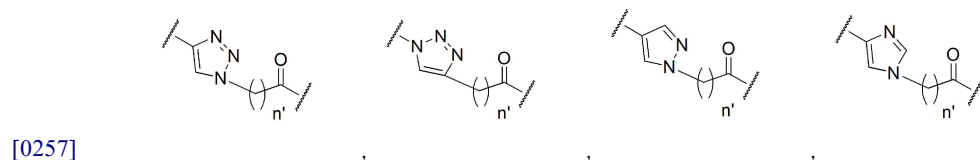
[0253] 여기서 Z₂는 헤테로원자에 인접한 탄소 원자를 통해 Z₁에 연결된다. 바람직한 실시양태에서, Z₂는 피리미디닐렌,

바람직하게는 이고, 보다 바람직하게는 이며, 여기서 왼쪽 물결선은 Z₁에 대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Z₃에 대한 연결의 위치를 나타낸다.

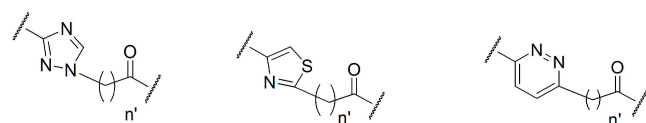
[0254] 일부 실시양태에서, Z₂는 말레이미도, 이며, 여기서 왼쪽 물결선은 Z₁에 대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Z₃에 대한 연결의 위치를 나타낸다.

[0255] 일부 실시양태에서, Z₃는 -C₃-C₈ 헤테로시클릴렌-C(=O)-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-C₃-C₈ 헤테로시클릴렌-C(=O)- 및 -C₃-C₈ 헤테로시클릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-이며, 여기서 바람직하게는, 헤테로시클릴렌에 있는 헤테로시클은 헤테로방향족 고리, 예컨대, 트리아졸, 피라졸, 티아졸, 옥사졸, 이소옥사졸, 또는 피리다진이다.

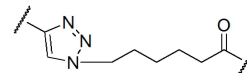
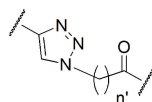
[0256] 일부 실시양태에서, Z₃는 -C₃-C₈-헤테로아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-C(=O)-이고, 특히,



[0257]



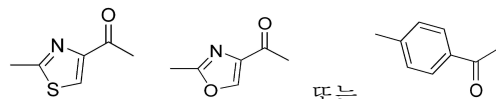
[0258] , 및 ,



[0259] 여기서 n' 는 1~6이며, 바람직하게는, Z_3 은 , 보다 바람직하게는
이며,

[0260] 여기서 왼쪽 물결선은 Z_2 에 대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Z_4 에 대한 연결의 위치를 나타내며,
바람직하게는 Z_2 는 피리미디닐렌이다.

[0261] 일부 실시양태에서, Z_3 은 아릴렌- 또는 헤테로아릴렌- $C(=O)$ -이고, 특히,



[0262] , 또는 이며, 여기서 Z_3 은 $-C(=O)-$ 를 통해 Z_4 에 연결되며, 바람직하게는,
 Z_2 는 피리미디닐렌이다.

[0263] 다른 실시양태에서, Z_3 은 $-(C\equiv C)-C_{1-5}$ 알킬렌- $C(=O)-$, $-(CH=CH)-C_{1-5}$ 알킬렌- $C(=O)-$, $-C_{1-6}$ 알킬렌- $C(=O)-$ 또는
 $-C_{3-8}$ 시클로알킬렌- $C(=O)-$ 이며, 여기서 Z_3 은 $-C(=O)-$ 를 통해 Z_4 에 연결된다.

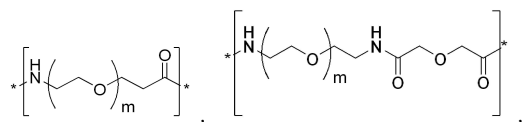
[0264] 일부 바람직한 실시양태에서, Z_2 는 피리미디닐렌이며, Z_3 은 $-C(=O)-$ 이다.

[0265] 일부 바람직한 실시양태에서, Z_2 는 피리미디닐렌이며, Z_3 은 $-(C\equiv C)-C_{1-5}$ 알킬렌- $C(=O)-$ 또는 $-(CH=CH)-C_{1-5}$ 알킬
렌- $C(=O)-$ 이고, 특히, $-(C\equiv C)-C_{1-5}$ 알킬렌- $C(=O)-$ 이다.

[0266] 일부 바람직한 실시양태에서, Z_2 는 말레이미도이며, Z_3 은 $-C_{1-6}$ 알킬렌- $C(=O)-$ 또는 $-C_{3-8}$ 시클로알킬렌- $C(=O)-$ 이
다.

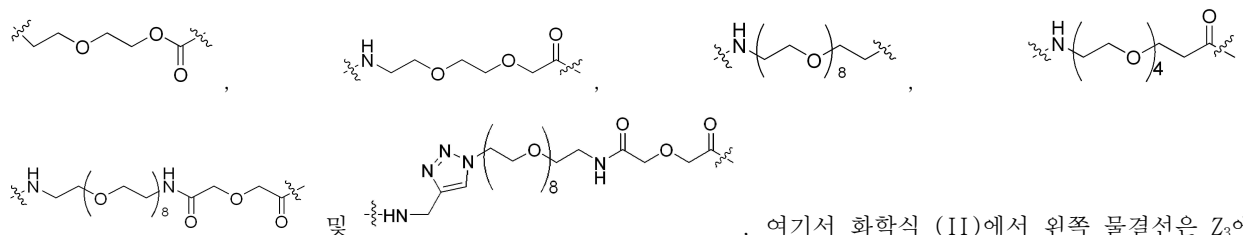
[0267] 일부 실시양태에서, Z_4 는 결합이며, Z_3 은 화학식 (II)의 Y에 직접 연결된다.

[0268] 일부 실시양태에서, Z_4 는 2~12개의 PEG를 포함하는 유닛이다. 일부 실시양태에서, Z_4 는



[0269] ,
[0270] 또는 이며, 여기서 m 은 1~8, 예를 들어, 2, 3, 4, 5,
6, 7 또는 8이다.

[0271] 일부 실시양태에서, Z_4 는 다음으로부터 선택된다:



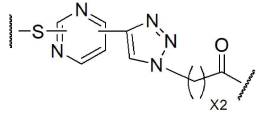
[0272] , 여기서 화학식 (II)에서 왼쪽 물결선은 Z_3 에
대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Y에 대한 연결의 위치를 나타낸다.

[0273] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Z는 하기 구조를 갖는다:



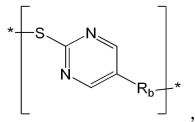
[0274] 또는 , 여기서 $x_1=1\sim 8$, 예를 들어, $x_1=3$ 이다.

[0275] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Z는 하기 구조를 갖는다:



[0276] , 여기서 $x_2=1\sim 6$ 이다.

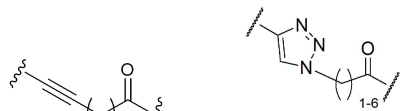
[0277] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Z는 하기 구조를 갖는다:



[0278] ,

[0279] 여기서 S는 Ab의 황 원자이며, R_b 는 비치환 또는 치환된 $-C_{3-10}$ 알킬닐- $C(=O)-$ 또는 $-C_{3-10}$ 알케닐- $C(=O)-$ 이며,

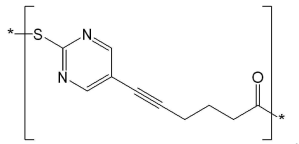
[0280] 바람직하게는, R_b 는:



[0281] 또는 이고,

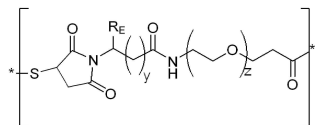
[0282] 여기서 왼쪽 물결선은 피리미디닐에 대한 연결의 위치를 나타내며, 오른쪽 물결선은 Y에 대한 연결의 위치를 나타내며;

[0283] 보다 바람직하게는 Z는 하기 구조를 갖는다:



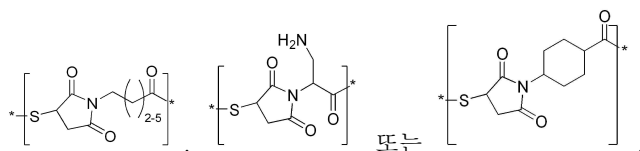
[0284] .

[0285] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Z는 하기 구조를 갖는다:



[0286] , 여기서 R_E 는 수소, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 아미노알킬, C_{1-6} 할로알킬 또는 C_{1-6} 히드록시알킬이며, $y=0\sim 4$, 예를 들어, 0, 2 또는 5이며, 여기서 알킬, 아미노 및 히드록시 모이어티는 선택적으로 치환되며; 일부 실시양태에서, R_E 는 선택적으로 치환된 아미노알킬이고, 예를 들어, $-C_{1-4}$ 알킬렌- NH_2 , $-C_{1-4}$ 알킬렌 NHR_F 및 $-C_{1-4}$ 알킬렌 $N(R_F)_2$ 에 의해 치환되며, 여기서 각 R_F 는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로부터 독립적으로 선택되거나; 또는 두 개의 R_F 기는 이들이 부착된 질소와 조합하여, 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다.

[0287] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 Z는 하기 구조를 갖는다:



[0288] , 또는 .

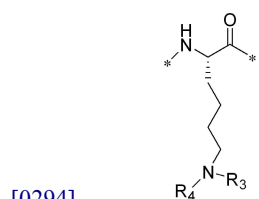
[0289] **펩티드 함유 Y 유닛**

[0290] 일부 양태에서, 표적 종양 부위에서 독소 분자의 방출을 보장하면서 ADC의 비표적 독성을 제한하거나 최소화하려는 목적을 위해, 항체-약물 접합체가 높은 선택성으로 종양 세포를 표적화하면서 종양 세포 또는 종양 환경(특히, 혈액에 비해 종양 세포 및/또는 종양 환경에서 유의하게 더 높은 활성을 갖는 효소)에서 프로테아제에 의해 분해될 수 있도록 설계하는 것이 유리하다. 이러한 목적을 위해, 이와 같은 프로테아제에 의해 식별되고 절단될 수 있는 올리고펩티드 또는 올리고펩티드 유사체가 이와 같은 ADC의 링커에 함유될 수 있다.

[0291] 따라서, 일 실시양태에서, 본 발명의 링커의 일부인 Y 유닛은 펩티드 함유 분해 가능한 모이어티, 예컨대, 두 개 이상(예를 들어, 2~12, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6)의 인접 또는 비인접 아미노산을 함유하는 분해 가능한 펩티드 링커이다. 펩티드 함유 유닛에 있는 각 아미노산은 각각 독립적으로 천연 아미노산 및 비천연 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글라이신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 라이신, 치환된 라이신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판, 발린, 시스테인, 메티오닌, 셀레노시스테인, 오르니틴, α -알라닌, 시트룰린 및 이들의 유도체로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 독립적으로 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글라이신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 라이신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판, 발린, 시스테인, 메티오닌 및 이들의 유도체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 독립적으로 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글라이신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 라이신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판, 발린, N-메틸글라이신, β -알라닌 및 이들의 유도체로부터 선택된다. 일부 양태에서, ADC가 종양 세포 내로 내재화되면, Y 유닛의 아마이드 결합이 종양 세포의 리소솜에 있는 효소에 의해 식별되고 분해되어 약물 모이어티 D를 방출할 것이다. 다른 양태에서, Y 유닛의 아마이드 결합이 종양 환경에 있는 효소에 의해 식별되고 분해되어 약물 모이어티 D를 방출할 수 있다. 이와 같은 펩티드 함유 Y 유닛을 갖는 링커는 종양 편향 분포를 갖는 항체-약물 접합체를 설계함으로써 종양 세포 및 종양 환경에서 독소 분자의 방출을 촉진할 것이다.

[0292] 일부 실시양태에서, Y는 Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala, Val-Lys-Gly, Ala-Ala-Ala, Val-Ala, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Gly-Phe-Gly, 시클로부틸-Ala 및 시클로부틸-Cit로부터 선택되는 것을 포함하는 유닛이다. 일부 실시양태에서, Y는 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg 및 Ala-Ala-Asn으로부터 선택되는 것을 포함하는 유닛이다.

[0293] 일부 바람직한 실시양태에서, Y는 치환된 라이신을 포함하는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드이다. 일 실시양태에서, 치환된 라이신은 다음과 같다:



[0295] 여기서 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, -CO-NH₂, -CONH(C₁₋₆ 알킬), 및 -CONH(C₁₋₆ 알킬)₂로부터 선택되며, 여기서 알킬은 할로젠, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬, C₃₋₆ 시클로알킬, 6원 내지 10원 아릴 및 5원 내지 14원 헤테로아릴에 의해 선택적으로 치환된다.

[0296] 일부 바람직한 실시양태에서, Y는 N-말단에서 C-말단까지 하기 화학식의 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다:

[0297] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅,

[0298] 여기서 Xaa₁은 부재하거나 발린, 글라이신, 알라닌 및 글루탐산으로부터 선택되는 아미노산이며;

[0299] Xaa₂는 페닐알라닌, 류신, 알라닌 및 발린으로부터 선택되는 아미노산, 바람직하게는, 발린이며;

[0300] Xaa₃은 비치환 또는 치환된 라이신이며;

[0301] Xaa₄는 류신, 글라이신 및 알라닌으로부터 선택되는 아미노산이며;

[0302] Xaa₅는 부채하거나 글라이신 및 알라닌으로부터 선택되는 아미노산이며; 및

[0303] 여기서 아미노산 서열의 N-말단은 링커의 Z 유닛에 연결되며 C-말단은 M 유닛에 연결되거나 약물 D에 직접 연결되며,

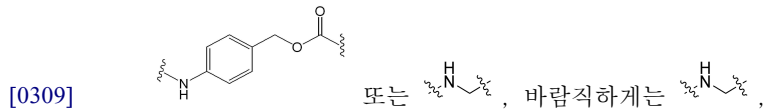
[0304] 바람직하게는, Xaa₃은 ε-아미노기가 C₁-C₃ 알킬에 의해 단일치환되거나 이치환되는 라이신이며,

[0305] 보다 바람직하게는, Y는 Phe-Lys-Gly, Leu-lys-Gly, Gly-Val-Lys-Gly, Val-Lys-Gly-Gly, Val-Lys-Gly, Val-Lys-Ala 및 Val-Lys-Leu로부터 선택되는 펩티드이며, 여기서 Lys 잔기는 비치환된 라이신 또는 C₁-C₃ 알킬에 의해 단일치환되거나 이치환되는 라이신이다.

[0306] M 스페이서 기

[0307] 일부 실시양태에서, 본 발명의 ADC는 방출 가능한 펩티드 함유 유닛(Y)과 약물(D) 사이에 스페이서 기(M)를 갖는다. 스페이서 기는 펩티드 함유 유닛(Y)과 약물 D의 연결을 촉진하는 작용기일 수 있거나, 또는 접합체의 나머지 부분(예를 들어, p-아미노벤질(PAB) 성분과 같은 자가-희생 기)으로부터 약물 D의 방출을 추가로 촉진하는 추가 구조적 성분을 제공할 수 있다.

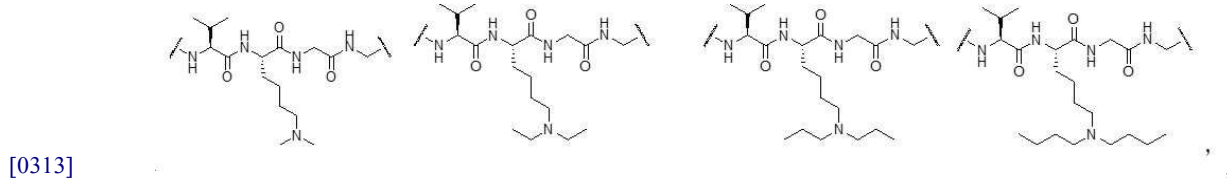
[0308] 일부 실시양태에서, Y 유닛을 약물 D 유닛에 연결하는 M 스페이서 기는 다음으로부터 선택될 수 있다:



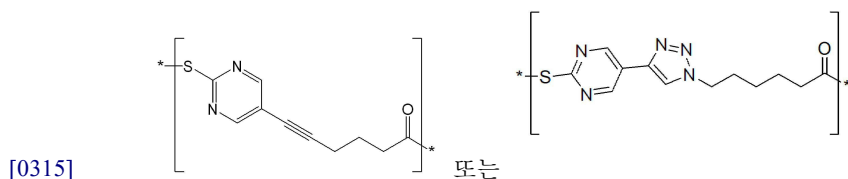
[0310] 여기서 왼쪽 물결선은 Y에 대한 연결을 나타내며, 오른쪽 물결선은 약물 D 유닛에 대한 연결을 나타낸다.

[0311] 다른 실시양태에서, M은 공유 결합이며, Y는 아마이드 결합 등을 통해 화학식 (I)의 약물 D에 직접 연결된다.

[0312] 바람직한 실시양태에서, 링커 L의 Y-M 유닛은 하기 구조를 포함한다:

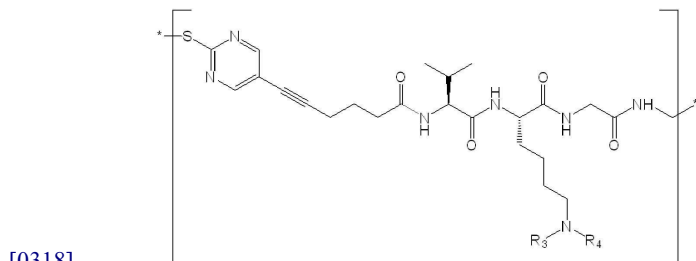


[0314] 바람직하게는, Y-M 유닛은 하기 Z 유닛에 연결된다:



[0316] 예시적인 링커 L

[0317] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 L은 하기 구조를 포함하는 링커이다:



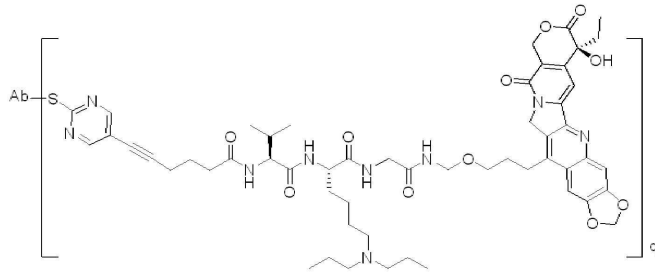
[0319] 여기서 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 메틸, 에틸 및 프로필로부터 선택된다. 일부 보다 바람직한 실시양태에서,

R_3 및 R_4 는 모두 메틸이거나; 또는 R_3 및 R_4 는 모두 에틸이거나; 또는 R_3 및 R_4 는 모두 프로필이다.

[0320] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화학식 (I)의 L-D 유닛은 Ab의 경쇄 및/또는 중쇄의 유리 시스테인의 설프히드릴기와 티오에터 결합을 형성함으로써 항체에 연결하게 된다.

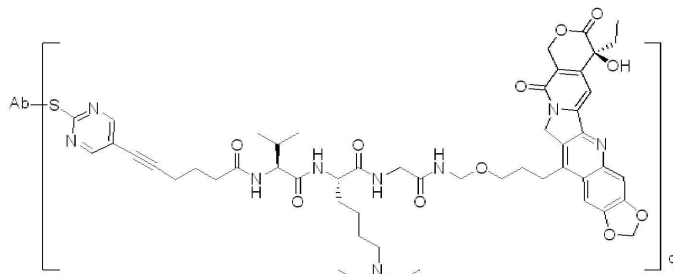
[0321] **예시적인 ADC**

[0322] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조를 갖는 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공한다:



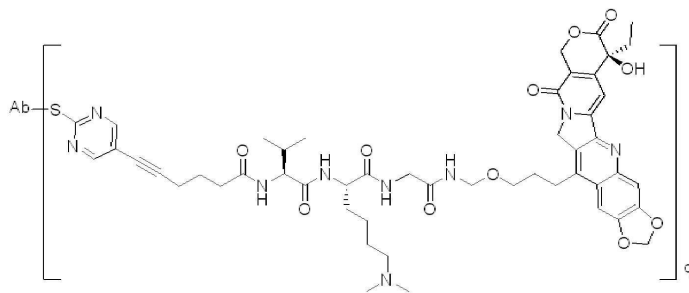
[0323]

[0324] 또는



[0325]

[0326] 또는



[0327]

[0328] 여기서 q는 1~20의 평균 DAR 값, 예컨대, 약 2, 4, 6 또는 8의 평균 DAR 값을 나타낸다.

[0329] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 ADC는 하기 이점 중 적어도 하나 이상을 갖는다:

- [0330] - 혈액 순환에서 ADC의 분포에 비해 종양 환경 내로의 ADC의 분포 및 풍부도를 유의하게 촉진함;
- [0331] - 혈장에 있는 페이로드의 조기 방출을 효과적으로 제한하고 높은 혈액 순환 안정성을 가지고 있음;
- [0332] - 종양 환경에서 독성 약물의 활성 형태의 효과적인 방출을 제공함;
- [0333] - 동물에 대한 효율적인 체내 종양 사멸 효과를 부여함; 및
- [0334] - 동물에 대한 양호한 내약성.

[0335] 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 ADC는 하기 이점 중 적어도 하나 이상을 추가로 가질 수 있다:

- [0336] - 응집을 유도하지 않고 최대 8의 DAR 값으로 높은 약물 로딩을 달성할 수 있는 독소 링커의 첨가; 및
- [0337] - 허용 가능한 PK 특성.

[0338] **II. 항체-약물 접합체의 제조**

- [0339] 항체-약물 접합체의 생성은 당업자에게 공지된 임의의 기법에 의해 달성될 수 있다. 일부 양태에서, 항체의 아미노산 잔기와 반응함으로써 약물-링커는 항체에 접합하게 된다. 일부 실시양태에서, 약물 D는 이탈기를 갖는 헥테로아릴 링커 L을 사용하여 항체의 시스테인 잔기에 접합되어 본 발명의 화학식 (I)의 접합체를 제조한다. 일부 실시양태에서, 항체의 쇠간 이황화 결합은 항체가 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)과 같은 환원제로 처리되는 조건을 제어함으로써 헥테로아릴 링커 약물에 대한 접합을 위한 유리 설피히드릴 기를 노출시키도록 파괴될 수 있다. IgG1 항체의 경우, 최대 네 개의 연결 이황화 결합이 감소하여, 접합을 위한 최대 8개의 반응성 설피히드릴기가 생성될 수 있다. 이러한 방법에 의해 제조되는 접합체는 각 항체 분자에 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 약물을 포함할 수 있다.
- [0340] 제조된 접합체가 상이한 약물 접합 부위 및/또는 개수를 갖는 접합체 조성물인 경우, 접합체의 약물 로딩량은 항체 당 평균 약물 분자 수인 평균 DAR로 나타낸다. 생성된 항체 약물-접합체 조성물에 대한 항체당 약물의 평균 수는 질량 분석법, ELISA 검정 및 HPLC와 같은 통상적인 수단에 의해 특성화될 수 있다. 다른 실시양태에서, q로 표시되는 항체-약물 접합체의 정량적 분포도 결정될 수 있다. 다른 약물 로딩량을 갖는 항체-약물 접합체로부터, q가 특정 값인 균질 항체-약물 접합체를 분리, 정제 및 특성화하는 것은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단을 통해 달성될 수 있다.
- [0341] 따라서, 본 발명의 일 양태에서, q는 하나의 단일 항체(Ab)에 접합된 약물-링커(L-D) 모이어티의 수를 나타내며, 바람직하게는 1 내지 16, 1 내지 12, 1 내지 10 또는 1 내지 8의 정수이다. 이러한 경우, 개별 ADC는 ADC 화합물이라고도 칭할 수 있다. 본 발명의 임의의 실시양태에서, 본 발명에 따른 ADC 화합물 상에 있는 하나의 단일 항체에 접합된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 16개의 약물-링커 모이어티가 존재할 수 있다.
- [0342] 본 발명의 다른 양태에서, q는 제조된 접합체 조성물의 평균 DAR을 나타낸다. 이러한 경우, q는 1 내지 약 16, 1 내지 약 12, 1 내지 약 10 또는 1 내지 약 8, 2 내지 약 16, 2 내지 약 12, 2 내지 약 10 또는 2 내지 약 8 범위의 정수 또는 소수일 수 있다. 일부 양태에서, q는 약 6의 평균 DAR 값을 나타낸다. 일부 양태에서, q는 약 8의 평균 DAR 값을 나타낸다.
- [0343] **III. 약학적 조성물**
- [0344] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 바람직하게는, 조성물은 약학적 조성물 또는 약학적 제제이다. 일 실시양태에서, 조성물은 약학적 보조 물질을 추가로 포함한다. 일 실시양태에서, 조성물, 예를 들어 약학적 조성물은 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물과 하나 이상의 추가 치료제의 조합을 포함한다.
- [0345] 본 발명은 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물(약학적 조성물 포함)을 추가로 포함한다. 이와 같은 조성물은 완충제를 포함하여 당업계에 공지된 약학적 담체 및 약학적 부형제와 같은 적합한 약학적 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0346] 본원에서 사용된 바와 같이, "약학적 담체"는 생리학적으로 양립 가능한 임의의, 또한 모든 용매, 분산 매개체, 등장제, 흡수지연제 등을 포함한다.
- [0347] 약학적 보조 물질의 사용 및 응용에 관해서는, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 제8판., R. C. Rowe, P. J. Seskey and S. C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago를 참조한다.
- [0348] 본 발명의 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이와 같은 형태는, 예를 들어 액체, 반고체, 고체 제형, 예컨대 용액(예를 들어, 주사 가능한 용액 및 주입 가능한 용액), 분말 또는 현탁액, 리포솜 및 좌약을 포함한다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 모드 및 치료적 사용에 따라 달라진다.
- [0349] 본원에 기재된 ADC를 포함하는, 바람직하게는 동결건조 제제 또는 수용액 형태의 약물은 원하는 순도의 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 하나 이상의 선택적인 약학적 보조 제제와 혼합함으로써 제조될 수 있다.
- [0350] 본 발명의 약학적 조성물 또는 제제는 치료 대상인 특정 적응증에 필요한 하나를 초과한 활성 성분, 바람직하게는 서로에게 악영향을 미치지 않으면서 상보성 활성을 갖는 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학요법제, 혈관신생 억제제, 사이토카인, 세포독성제, 다른 항체, 소분자 약물, 면역조절제(예를 들어, 면역 관문 억제제 또는 작용제) 등을 포함하는 추가 치료제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 활성 성분은 의도하는

목적에 효과적인 양으로 적합하게 조합된다.

[0351] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 매트릭스는 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형품의 형태이다.

[0352] IV. 약학적 조합 및 키트

[0353] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 및 하나 이상의 추가의 치료제(예를 들어, 화학요법제, 혈관형성 억제제, 사이토카인, 세포독성제, 다른 항체, 소분자 약물, 면역 조절제(예를 들어, 면역 관문 억제제 또는 작용제) 등을 포함하는 치료제)를 포함하는 약학적 조합 또는 약학적 조합 생성물을 추가로 제공한다.

[0354] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 약학적 조합을 포함하는 부품 키트를 제공하는 것이며; 바람직하게는, 키트는 약학적 용량 유닛의 형태이다. 따라서 용량 유닛은 투여 요법 또는 약물 투여 사이의 간격에 따라 제공될 수 있다.

[0355] 일 실시양태에서, 본 발명의 부품 키트는 동일한 패키지에 하기를 포함한다:

[0356] - 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 제 1 용기;

[0357] - 추가 치료제를 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 제2 용기.

[0358] V. 용도 및 방법

[0359] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본 발명의 ADC 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 약학적 조성물, 약학적 조합, 또는 키트를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 종양(예를 들어, 암)을 예방 또는 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0360] CLDN18.2는 다양한 기원으로부터 유래한 암 조직 세포 표면상에서 선택적으로 발현되므로 암 면역요법 개발에 적합한 표적이 된다. CLDN18.2는 췌장암, 식도암, 위암 등과 같은 소화기계 암에서 고도로 선택적으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체-약물 접합체를 예방적 및/또는 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 CLAUDIN 18.2 양성 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서, 본 발명의 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체-약물 접합체는 단독 활성제로서 투여될 수 있거나, 추가 요법 또는 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 추가 치료법 및 치료제는 예를 들어, 종양 세포 표면에 있는 항원을 표적으로 하여 이러한 분자를 결합하고/하거나 차단함으로써 종양을 파괴하게 되는 약물; 및 종양을 자발적으로 파괴하기 위해 대상체의 면역계를 활성화하는 약물을 포함한다.

[0361] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료받은 종양은 초기, 중기 또는 진행성 단계의 암일 수 있거나 전이성 암일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료받은 종양은 이전에 치료를 받았지만 면역 회피가 발생한 종양이다.

[0362] 본 발명의 방법에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 투여는: 1) 진단된 병리학적 병태 또는 질환의 증상을 치료, 지연, 완화하고/하거나 진단된 병리학적 병태 또는 질환의 진행을 중단시키는 치료적 조치; 또는 2) 병리학적 병태 또는 질환의 진행을 방지 및/또는 지연시키는 예방적 또는 방지적 조치를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에서, 개체는 치료적 조치 또는 예방적 조치로부터 이익을 얻을 것이며, 치료를 받지 않는 개체에 비해 질환, 장애, 병태 및/또는 증상의 발생, 재발 또는 진행에서 완화 또는 호전을 나타낼 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 본 발명의 방법에 따른 요법을 받기 전 화학 요법 및/또는 방사선 요법 또는 다른 면역요법과 같은 추가 요법을 받고 있거나 받은 적이 있다.

[0363] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체-약물 접합체는 CLDN18.2 양성 종양 세포를 사멸시키고/시키거나 CLDN18.2 양성 종양 세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0364] 본 발명의 항체-약물 접합체는 비경구 투여, 종양내 투여 및 비강내 투여를 포함하는 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 부분적으로 약물이 단기용인지 또는 장기용인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 본원은 단일 투여 또는 여러 시점에서의 다중 투여, 볼루스 주사 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 투여 방식을 망라한다.

- [0365] 질환을 예방 또는 치료하기 위해, (단독으로 또는 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용되는 경우) 본 발명의 항체-약물 접합체의 적절한 용량은 치료할 질환의 유형, 항체-약물 접합체의 특정 유형, 질환의 중증도 및 진행, 치료의 목적, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 항체-약물 접합체에 대한 반응 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 단일 치료 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여될 수 있다.
- [0366] 일부 실시양태에서, 본 발명은 위의 치료적 및 예방적 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 항체-약물 접합체의 용도를 추가로 제공한다.
- [0367] **본 발명의 항체 모이어티**
- [0368] 본 발명은 다양한 우수한 특성을 갖는 인간화 항-Claudin18.2 모노클로날 항체, 항체를 코딩하는 핵산, 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 항체를 포함하는 면역접합체, 다중특이성 항체, 약학적 조성물 및 용도를 추가로 제공한다. 본 발명의 항체는 표면상에서 인간 Claudin18.2를 발현하는 세포(특히, 표면 발현 존재비가 낮은 세포)에 대해 높은 결합 친화성 및 높은 특이성을 나타낼 뿐만 아니라, ADCC 및/또는 CDC 활성화, Claudin18.2 항원 매개 세포내이입 활성화, 안정성 및/또는 약동학적 특성과 같은 유리한 특성을 가지므로, 단독으로 또는 다른 항암 약물과 함께 조합하여 암 요법에 사용하기에 적합하고, 또한 암 조직을 표적으로 하는 신규 항암 분자의 형성을 위한 분자 성분으로서 적합하며, 예를 들어, 세포독성 약물과의 결합에 적합하여 항체-약물 접합체를 형성한다.
- [0369] **I. 본 발명의 항체**
- [0370] 본 발명은 Claudin18.2, 바람직하게는 인간 Claudin18.2 단백질(예를 들어, NM_001002026의 인간 Claudin18.2 서열)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 특히 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0371] (i) 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 2에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0372] (ii) 서열 번호: 21에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 22에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0373] (iii) 서열 번호: 23에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 24에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0374] (iv) 서열 번호: 38 또는 40에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 39에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0375] (v) 서열 번호: 44에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 45에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0376] (vi) 서열 번호: 46에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 47에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0377] (vii) 서열 번호: 48에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 49에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0378] (viii) 서열 번호: 50에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 51에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열; 또는
- [0379] (ix) 서열 번호: 52에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, 2 및 3 서열, 및 서열 번호: 53에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, 2 및 3 서열. 바람직하게는, CDR은 Kabat 또는 IMGT 또는 이의 조합에 따라 정의된다.
- [0380] 일부 실시양태에서, 본 발명은 Claudin18.2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(HCDR) 및 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하고, 여기서
- [0381] (i) Kabat 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 13 또는 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열

번호: 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

- [0382] (ii) IMGT 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0383] (iii) Kabat 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 27 또는 37의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나; 또는
- [0384] (iv) Kabat 방식에 따르면, HCDR1은 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR2는 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, HCDR3은 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR1은 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR2는 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, LCDR3은 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0385] (i)~(iv)의 CDR 서열 조합 중 하나의 변이체를 포함하는 항체가 또한 본 발명에 의해 고려된다. 바람직하게는, 변이체는 전체 6개 CDR 중 적어도 하나, 그러나, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산 변경(바람직하게는 아미노산 치환, 바람직하게는 보존적 치환)을 포함하며, 바람직하게는 중쇄 CDR3은 변하지 않은 채로 유지된다.
- [0386] 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 이는 다음으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0387] (i) 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 2에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0388] (ii) 서열 번호: 21에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 22에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0389] (iii) 서열 번호: 23에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 24에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0390] (iv) 서열 번호: 38 또는 40에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 39에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0391] (v) 서열 번호: 44에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 45에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0392] (vi) 서열 번호: 46에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 47에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0393] (vii) 서열 번호: 48에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 49에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0394] (viii) 서열 번호: 50에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는

99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 51에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는

- [0395] (ix) 서열 번호: 52에 제시된 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호: 53에 제시된 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열.
- [0396] 일 실시양태에서, 바람직하게는, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 발명의 예시적인 항체 25C7A5와 이의 인간화 항체(HZ1 및 HZ2) 및 2D3A11과 이의 인간화 항체(HZ1 및 HZ2) 중 임의의 하나의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 또는 이의 변이체를 포함하며, 예를 들어, 이는 예시적인 항체 중 하나와 동일한 CDR 서열을 가지며, 동일하거나 상이한 프레임워크 영역 서열을 갖는 항체이다.
- [0397] 일부 바람직한 실시양태에서, 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 21에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 22에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 21의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 22의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0398] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 1 또는 3에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체는 인간화 항체이다. 보다 바람직하게는, 항체의 중쇄 가변 영역은 인간 생식계열로부터 유래한 프레임워크 영역 서열을 가지며, 바람직하게는 중쇄 가변 영역에서 Kabat 방식에 따라 넘버링된 위치 H6에서 아미노산 Q 또는 E, 바람직하게는 아미노산 Q를 갖는다.
- [0399] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0400] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 3의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0401] 일부 바람직한 실시양태에서, 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 23에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 24에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 23의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 24의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0402] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 38 또는 40에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 39에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체는 인간화 항체이다. 보다 바람직하게는, 항체의 중쇄 가변 영역은 인간 생식계열로부터 유래한 프레임워크 영역 서열을 가지며, 바람직하게는 중쇄 가변 영역에서 Kabat 방식에 따라 넘버링된 위치 H6에서 아미노산 Q 또는 E, 바람직하게는 아미노산 Q를 갖는다.
- [0403] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 38의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 39의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0404] 이외의 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 40의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 39의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0405] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 불변 영역 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래한 중쇄 불변 영역이다. 바람직하게는, 경쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래한 경쇄 불변 영역이다.

- [0406] 본 발명의 항체에 함유된 중쇄 불변 영역은 임의의 아이소타입 또는 서브타입, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아이소타입의 중쇄 불변 영역일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄 불변 영역, 바람직하게는, IgG1 중쇄 불변 영역, 특히, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하는 항-Claudin18.2 항체를 제공한다.
- [0407] 본 발명의 항체에 함유된 경쇄 불변 영역은 κ 경쇄 불변 영역 또는 λ 경쇄 불변 영역일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 κ 경쇄 불변 영역 또는 λ 경쇄 불변 영역을 포함하는 항-Claudin18.2 항체를 제공하며, 바람직하게는 본 발명의 항체는 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0408] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG1 항체, 특히 IgG1 κ 또는 IgG1 λ 아이소타입이다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체는 인간 IgG1 κ 항체이다.
- [0409] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 4의 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열에 비해 적어도 1개, 2개 또는 3개, 그러나 20개, 10개 또는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열과 적어도 95%~99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0410] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체는 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 경쇄 불변 영역은 서열 번호: 5의 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 5의 아미노산 서열에 비해 적어도 1개, 2개 또는 3개, 그러나 20개, 10개 또는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 5의 아미노산 서열과 적어도 95%~99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0411] 일부 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 다음으로부터 선택되는 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함한다:
- [0412] (a) 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열;
- [0413] (b) 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열;
- [0414] (c) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열; 및
- [0415] (d) 서열 번호: 42로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열. 본 발명은 위의 (a)~(d) 중 임의의 하나를 포함하는 항체의 변이체를 추가로 제공하며, 여기서 변이체는 중쇄 서열 및/또는 경쇄 서열에서 아미노산 변경을 갖는다. 바람직하게는, 변이체는 중쇄 서열 또는 경쇄 서열 또는 둘 모두에서, 적어도 1개, 2개, 또는 3개, 그러나 20개, 10개, 또는 5개 이하의 아미노산 변경을 포함하는 아미노산 서열, 또는 상응하는 항체와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 아미노산 변경은 CDR에서 발생하지 않고, 보다 바람직하게는 아미노산 변경은 가변 영역에서 발생하지 않는다.
- [0416] 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항체의 변이체, 특히 본 발명의 예시적인 항체 25C7A5와 이의 인간화 항체(HZ1 및 HZ2) 및 2D3A11과 이의 인간화 항체(HZ1 및 HZ2) 중 임의의 하나의 변이체를 추가로 제공한다. 본 발명의 항체 변이체는 바람직하게는 변경 전 항체의 생물학적 활성(예를 들어, 항원 결합 능력)의 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%를 보유한다. 보다 바람직하게는, 변경은 항원에 대한 항체 변이체의 결합 능력의 손실을 초래하지 않으나, 선택적으로 항원에 대한 증가한 친화성 및 상이한 이펙터 기능과 같은 특성을 부여한다. 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR은 독립적으로 또는 조합으로 변경될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 항체의 Fc 영역도 변경될 수 있다. Fc 영역의 변경은 단독으로 또는 위에 기재된 프레임워크 영역 및/또는 CDR에 대한 변경과 조합하여 이루어질 수 있다. Fc 영역은, 예를 들어, 항체의 하나 이상의 기능, 예컨대, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포독성을 변경하도록 변경될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형(예를 들어, PEG에 결합)될 수 있거나, 또는 이의 글리코실화 패턴이 변경될 수 있다.
- [0417] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 바람직하게는 단일특이성 항체이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 또한 Claudin18.2에 대한 제1 결합 특이성 및 다른 항원에 대한 결합 특이성, 예를 들어, 종양 세포의 표면상에서 발현되는 다른 항원에 대한 제2 및/또는 제3 결합 특이성을 포함하는 다중특이성 항체일 수 있다.
- [0418] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 특성 중 하나 이상을 갖

는다:

- [0419] (i) 세포 표면상에서 발현되는 인간 Claudin18.2에 높은 친화성으로 결합하나, 인간 Claudin18.1에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않음;
- [0420] (ii) 시노물구스 원숭이, 마우스 또는 래트 Claudin18.2와 교차 반응성을 갖고 있음;
- [0421] (iii) 표면상에서 Claudin18.2를 발현하는 세포, 특히 위암 세포와 같은 종양 세포를 사멸시킴;
- [0422] (iv) ADCC 활성을 갖고 있음;
- [0423] (v) CDC 활성을 갖고 있음; 및
- [0424] (vi) Claudin18.2 수용체 매개 세포내이입 활성을 갖고 있음.
- [0425] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Claudin18.2에 대해 높은 결합 친화성 및 높은 결합 특이성을 갖는다. 본원에서, 바람직하게는, Claudin18.2에 대한 및/또는 Claudin18.1에 대한 본 발명의 항체의 결합 친화성 및 결합 특이성은 FACS 검정 또는 세포 기반 ELISA 검정(예를 들어, 실시예 I-7에 기재된 검정)에 의해 결정된다. 일 실시양태에서, 세포 기반 검정에서, Claudin18.1에 대한 본 발명의 항체의 결합 친화성은 Claudin 18.2에 대한 항체의 결합 친화성에 비해 적어도 10배, 100배, 10^3 배, 10^4 배, 10^5 배 또는 10^6 배 더 낮다. 일 실시양태에서, 바람직하게는, 본 발명의 항체는 Claudin18.1 발현 세포에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0426] 일 실시양태에서, 세포 기반 검정에서, 예를 들어, 95% 초과 또는 98% 초과인 인간 Claudin18.2 발현 양성물을 갖는 재조합 세포주를 사용하여 수행되는 세포 기반 ELISA 검정에서, 본 발명의 항체는 인간 Claudin 18.2에 대해 높은 결합 친화성을 나타내고, 300ng/mL 미만, 특히 약 100ng/mL 미만, 예를 들어, 약 1ng/mL 내지 50ng/mL, 바람직하게는 약 20ng/mL 미만의 EC_{50} 값을 갖는다. 바람직하게는, 검정은 실시예 I-7에 기재된 세포 기반 ELISA 검정에 따라 수행된다. 바람직하게는, 검정은 인간 Claudin18.2를 안정적으로 발현하는 재조합 HEK-293T 세포주를 사용하여 수행된다.
- [0427] 또 다른 실시양태에서, 세포 기반 검정에서, 본 발명의 항체는 참조 항체 IMAB362에 비해 인간 Claudin 18.2에 대해 필적하거나 더 큰 결합 친화성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 참조 항체 IMAB362에 비해, 본 발명의 항체는 표면상에서 높은 인간 Claudin 18.2 발현 양성물(예를 들어, 95% 초과인 양성물)을 갖는 세포에 대해 필적하는 세포 결합 친화성을 나타내며; 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 표면상에서 중간 내지 낮은(예를 들어, 50% 미만, 예컨대 약 2%~30%) 인간 Claudin 18.2 발현 양성물을 갖는 세포에 대해 더 강한 세포 결합 친화성을 나타낸다. 검정에서, HEK29 또는 L929 또는 NUGC4 세포와 같이 인간 Claudin18.2를 재조합적으로 발현하는 포유 동물 세포주, 또는 NUGC4 세포와 같이 인간 Claudin18.2를 내인성으로 발현하는 종양 세포주도 사용될 수 있다. 바람직하게는, 검정은 실시예 I-7에 기재된 바와 같은 세포 기반 ELISA 검정을 사용하거나 실시예 I-8에 기재된 바와 같은 FACS 검정을 사용하여 수행된다. 바람직하게는, 참조 항체 IMAB362에 비해, 본 발명의 항체는 Claudin18.2 세포 표면 발현의 평균 수준이 더 낮은 세포, 예컨대 인간 Claudin18.2를 내인성으로 발현하는 NUGC4 세포에 대해 더 강한 세포 결합 활성을 나타낸다.
- [0428] 일 실시양태에서, 세포 기반 검정에서, 본 발명의 항체는 Claudin 18.1에 대한 특이적 결합을 나타내지 않는다. Claudin18.1 발현 세포에 대한 항체의 이러한 결합 특성은 선택적으로 음성 및/또는 양성 대조에 비해 FACS 검정으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 검정에서, 항체의 양성 세포 염색 백분율 및/또는 세포의 형광 염색 강도 값이 결정된다. 일 실시양태에서, 95% 초과 또는 98% 초과인 인간 Claudin18.1 발현 양성물을 갖는 재조합 세포주를 사용하여, 본 발명의 항체의 양성 세포율은 3% 미만(보다 바람직하게는 2% 미만, 보다 더 바람직하게는 1% 미만, 심지어 보다 바람직하게는 0.7% 미만)이고, 바람직하게는, 본 발명의 항체에 의해 생성된 중간 및/또는 평균 형광 신호 강도는 아이소타입 대조 항체에 의해 생성된 중간/평균 신호에 필적하다(예를 들어, $\pm 20\%$, 또는 바람직하게는, $\pm 10\%$). 바람직하게는, 검정은 실시예 I-10에 기재된 FACS 검정에 따라 수행된다. 바람직하게는, 검정은 인간 Claudin18.1을 안정적으로 발현하는 재조합 HEK-293T 세포주를 사용하여 수행된다.
- [0429] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체는 ADCC 활성을 갖는다. 본 발명의 항체의 ADCC 활성은 실시예 I-11에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다. 바람직하게는, 검정에서, 본 발명의 항체는 약 100ng/mL 미만, 예를 들어, 80~50ng/mL, 또는 보다 바람직하게는 약 50ng/mL 미만의 EC_{50} 값을 나타낸다.
- [0430] 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CDC 활성을 갖는다. 본 발명의 항체의 CDC 활성은 실시예 I-12에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다. 바람직하게는, 검정에서, 본 발명의 항체는 약 5 μ g/mL 미만, 예를 들어, 약

1~4 $\mu\text{g/mL}$ 의 CDC 활성을 나타낸다.

[0431] 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 세포막 표면상에 있는 수용체 Claudin18.2에 결합한 후 세포내이입 활성을 갖는다. 본 발명의 항체의 세포내이입 활성은 실시예 I-13에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다. 바람직하게는, 세포내이입 활성 평가 검정에서, 본 발명의 항체는 37°C에서 4시간 후, 예를 들어 적어도 10%, 예를 들어 10%~25%, 바람직하게는 적어도 20%의 세포내이입율을 갖는다.

[0432] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 특성 중 하나 이상을 추가로 갖는다: (vii) 양호한 안정성; 및 (viii) 유리한 약동학적 특성.

[0433] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체의 안정성은 실시예 I-14에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다. 바람직하게는, 가속 안정성 검정에서, 항체는 3일~14일 동안 37°C에서 방치한 후, 95% 이상, 바람직하게는, 97% 이상의 SEC-HPLC 순도, 및/또는 90% 이상, 바람직하게는, 93% 이상의 비환원 CE-SDS 순도, 및/또는 90% 이상, 바람직하게는, 95% 이상의 환원 CE-SDS 순도를 갖는다. 보다 바람직하게는, 반복 동결-해동 검정에서 항체는 -80°C에서 4회 또는 8회 반복 동결-해동 주기 후 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상의 SEC-HPLC 순도를 갖는다.

[0434] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체의 약동학적 특성은 실시예 I-15에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다.

[0435] II. 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 숙주

[0436] 또 다른 양태에서, 본 발명은 위의 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 단편 중 임의의 하나를 코딩하는 핵산을 제공한다. 핵산을 포함하는 벡터, 및 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다.

[0437] 일 실시양태에서, 본 발명은, 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 포함하여, 본 발명의 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터를 제공한다. 일 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터, 예컨대, 진핵 발현 벡터이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, λ 파지 또는 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0438] 일 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 항체를 코딩하는 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는, 특히 글라이코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 박테리아에서 생성할 수 있다. 박테리아, 예컨대, 대장균(*E.coli*)에서 발현 후, 항체를 가용성 분획의 박테리아 세포 페이스트로부터 분리하고 추가로 정제할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 효모 세포, 포유동물 세포 및 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기에 적합한 다른 세포로부터 선택된다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(293HEK 또는 293 세포); DHFR⁻ CHO 세포를 포함하는 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 Y0, NS0 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다.

[0439] III. 항체의 제조

[0440] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-Claudin18.2 항체를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 방법은 항체를 발현하기에 적합한 조건 하에서 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 항-Claudin18.2 항체의 재조합 생성을 위해, 항체(예를 들어, 위에 기재된 항체)를 코딩하는 분리된 또는 인공적으로 합성된 또는 재조합적으로 합성된 핵산이 숙주 세포에서의 추가의 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입될 수 있다. 통상적인 절차를 사용하여, 이와 같은 핵산은 예를 들어 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써 하이브리도마 세포로부터 용이하게 분리되고 시퀀싱될 수 있다.

[0441] IV. 면역접합체

[0442] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 이중 분자에 접합함으로써 생성된 면역접합체를 제공한다. 일 실시양태에서, 면역접합체에서, 본 발명의 항체(또는 이의 항원 결합 단편)는 치료제 또는 진단제 또는 검출 가능한 제제에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 전체 길이 항체 또는 항체 단편의 형태로 이중 분자에 접합될 수 있다. 접합체에서, 링커는 접합체의 상이한 실체에 공유적으로 연결하는 데 사용될 수 있다. 적합한 링커는 화학적 링커 또는 펩티드 링커를 포함한다. 유리하게는, 링커는 표적 부위로 전달된 후 폴리펩티드의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"이다. 예를 들어, 산 불안정 링커, 펩티다제 민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드 함유 링커가 사용될 수 있다.

[0443] 치료제에 대한 접합의 실시양태에서, 접합체에 적합한 치료제는 세포독소(예를 들어, 세포증식억제제 또는 세포 독성제), 약물 또는 방사성 동위원소를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 진단제 또는 검출제에 대한 접합의 실시양태에서, 이와 같은 접합체는 질환 또는 장애의 발병, 발달, 진행 및/또는 중증도를 모니터링 또는 예측하기 위한 임상 시험 방법(예를 들어, 특정 요법의 효능을 결정하기 위함)의 일부로서 사용될 수 있다. 이와 같은 진단 및 검출은 항체를 서양고추냉이 과산화효소와 같은 다양한 효소; 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴과 같은 보결분자기; 형광 물질; 발광 물질; 방사성 물질; 및 다양한 양전자 방출 단층 촬영 기법에 사용되는 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하나 이에 제한되지 않는 검출 가능한 물질에 접합함으로써 달성할 수 있다.

[0444] **V. 약학적 조성물 및 약학적 제제**

[0445] 본 발명은 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 면역접합체를 포함하는 조성물(약학적 조성물 또는 약학적 제제를 포함함) 및 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 면역접합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다. 이와 같은 조성물은 완충제를 포함하여 당업계에서 공지된 약학적 담체 및 약학적 부형제와 같은 적합한 약학적 보조 물질을 추가로 선택적으로 포함할 수 있다. 부형제의 사용 및 응용에 관해서는, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 제5판, R. C. Rowe, P. J. Seskey and S. C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago를 참조한다. 일부 실시양태에서, 본 발명을 포함하는 약학적 제제는 원하는 순도의 본 발명의 항-Claudin18.2 항체 또는 면역접합체를 하나 이상의 선택적인 약학적 보조 물질과 혼합함으로써 제조될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 제16판, Osol, A. eds. (1980)).

[0446] 본 발명의 약학적 조성물 및 약학적 제제에서, 본 발명의 항체는 단독 활성제일 수 있거나, 추가 치료제와 조합될 수 있다. 본 발명의 항체와 조합될 수 있는 치료제는 치료할 질환 및/또는 장애에 유익한 치료 효능을 갖는 치료제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 활성 성분은 치료할 특정 적응증에 필요한 활성 성분, 바람직하게는, 서로 약영향을 미치지 않는 상보적인 활성을 갖는 활성 성분일 수 있다. 예를 들어, 항암 활성을 제공하는 추가적인 약학적 성분이 제공될 수 있다. 본 발명의 항체는 약학적 조성물 및 약학적 제제에 대해 의도하는 목적을 위해 효과적인 양으로 활성 성분과 조합되어 적합하게 존재한다.

[0447] **VI. 결합 생성물**

[0448] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 다중특이성 항체 또는 면역접합체, 및 하나 이상의 추가 치료제(예를 들어, 화학요법제, 다른 항체, 세포독성제, 항종양제 등)를 포함하는 조합 생성물을 추가로 제공한다. 본 발명의 항체 및 추가 치료제와 같은 조합 생성물을 구성하는 성분은 상이한 제제로 별도로 제제화될 수 있고 바람직하게는 상이한 용기에 함유될 수 있다. 조합 생성물의 성분의 투여 모드 및 순서는 치료할 질환, 개체의 상태 등과 같은 요인을 기준으로 당업자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 조합 생성물은 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 조합 생성물을 제공하며, 여기서 추가 치료제는 예를 들어, 대상체의 면역 반응을 자극하고 이로써 면역 반응을 추가로 향상, 자극 또는 상향조절하는 데 효과적인 항체와 같은 치료제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조합 생성물은 Claudin18.2 양성 종양을 예방 또는 치료하기 위해 사용된다.

[0449] **VII. 방법 및 용도**

[0450] 일 양태에서, 본 발명은 다음을 위해, 예를 들어, 체내와 체외에서 본 발명의 Claudin18.2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 사용하기 위한 방법 및 이의 용도를 제공한다:

- [0451] (1) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포에 대한 표적화 및 결합; 및/또는
- [0452] (2) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포에 대한 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성을 유도함; 및
- [0453] (3) 표면상에서 CLAUDIN 18.2를 발현하는 종양 세포를 억제 및/또는 사멸시킴.

[0454] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 용도는 개체 또는 대상체의 질환에 대한 치료에 관한 것이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 용도는 예를 들어, 대상체로부터 유래한 샘플에서 Claudin18.2의 존재를 검출하는 단계에 관한 것이다. 이외의 다른 실시양태에서, 본 발명은 위에 언급한 용도를 위한 생성물(예를 들어, 약학적 조성물 또는 약학적 생성물 또는 조합 생성물 또는 시험 생성물)의 제조에 있어서, 본 발명의 항-Claudin18.2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 추가로 제공한다.

[0455] 치료 방법 및 용도

- [0456] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 예방적 및/또는 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 CLAUDIN 18.2 양성 종양의 예방 및/또는 치료에 있어서, 본 발명의 항체의 용도를 제공한다.
- [0457] 본 발명의 방법에서, 본 발명의 항체의 투여는: 1) 진단된 병리학적 병태 또는 질환의 증상을 치료, 지연, 완화하고/하거나 진단된 병리학적 병태 또는 질환의 진행을 중단시키는 치료적 조치; 또는 2) 병리학적 병태 또는 질환의 진행을 방지 및/또는 지연시키는 예방적 또는 방지적 조치를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에서 대상체는 이미 질환을 앓고 있는 개체, 질환에 취약한 개체 또는 질환을 예방해야 하는 개체일 수 있다. 개체는 치료적 조치 또는 예방적 조치로부터 이익을 얻을 것이며, 치료를 받지 않는 개체에 비해 질환, 장애, 병태 및/또는 증상의 발생, 재발 또는 진행에서 완화 또는 호전을 나타낼 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애의 치료에 관한 것이다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애의 예방에 관한 것이다.
- [0458] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 본 발명의 항체는 면역 이펙터 기능을 유도하고, 또한 표면상에서 CLDN18.2를 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포)에 결합하면, ADCC 및/또는 CDC 활성화와 같은 면역 효과를 유도하는 Fc 영역을 포함한다. 따라서, 본 발명의 치료 방법의 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 융합체, 접합체 또는 조성물은 CDC 매개 세포 용해 또는 ADCC 매개 세포 용해 또는 둘 모두를 유도함으로써 암 세포 사멸을 매개하게 된다.
- [0459] 본 발명의 항체(및 이를 포함하는 약학적 조성물 또는 면역접합체 및 임의의 추가 치료제)는 비경구 투여, 종양내 투여 및 비강내 투여를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 부분적으로 약물이 단기용인지 또는 장기용인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 본원은 단일 투여 또는 여러 시점에서의 다중 투여, 볼루스 주사 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 투여 방식을 망라한다.
- [0460] 검출 응용
- [0461] 본 발명은 샘플에서 Claudin18.2를 검출하기 위한 방법 및 키트를 추가로 제공하며, 여기서 방법은: (a) 샘플을 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 면역접합체와 접촉하게 하는 단계; 및 (b) 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 면역접합체 및 Claudin18.2 단백질에 의한 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 암 환자, 예를 들어, 위암, 췌장암 또는 식도암과 같은 소화기계 암이 있는 환자로부터 유래한다. 검출은 체외 또는 체내 검출일 수 있다.
- [0462] 본원에서 사용되는 용어 "검출" 또는 "검출하다"는 정량적 및 정성적 검출을 포함하며, 예시적 검출은 면역조직화학 기법, 면역세포화학 기법, 유세포 분석법(예를 들어, FACS), 항체 분자와 복합체화된 자기 비드, ELISA 검정, PCR(예를 들어, RT-PCR)를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 또는 생물학적 기원의 다른 액체 샘플이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 과증식성 또는 암성 병변이다. 특정 실시양태에서, 검출할 Claudin18.2는 인간 Claudin18.2이다.
- [0463] 일 실시양태에서, 항-Claudin18.2 항체는 항-Claudin18.2 항체로 치료하기에 적합한 대상체를 선택하기 위해 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 암 또는 종양을 진단하는데, 예를 들어 본원에 기재된 대상체의 질환(예를 들어, 과증식성 또는 암성 질환)의 치료 또는 진행, 진단 및/또는 병기를 평가(예를 들어, 모니터링)하는 데 사용될 수 있다.
- [0464] 특정 실시양태에서, 표지된 항-Claudin18.2 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티(예를 들어, 형광 표지, 발색단 표지, 전자밀도 표지, 화학발광 표지 및 방사성 표지)는 물론, 효소 또는 리간드와 같이, 예를 들어 효소 반응 또는 분자 상호작용에 의해 간접적으로 검출되는 모이어티를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0465] 본 발명의 이러한 양태와 다른 양태 및 실시양태는 도면(바로 하기 도면의 간단한 설명) 및 본 발명의 하기 상세한 설명에 기재되고 하기 실시예에 예시된다. 본 출원의 전문에 걸쳐 위에 기재된 임의의 또는 전체 특징이 본 발명의 다양한 실시양태에서 조합될 수 있다. 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 추가로 예시될 것이다. 그러나, 실시예는 예시적 목적을 위한 것이며 어떠한 제한을 구성하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 점을 이해해야 한다.
- [0466] 실시예

- [0467] 실시예 I. 항-Claudin18.2의 제조 및 특성화
- [0468] 실시예 1. Claudin18.2- 및 Claudin18.1-발현 세포주의 구축 및 식별
- [0469] 인간 Claudin18.2의 아미노산 서열은 NCBI의 단백질 데이터베이스의 NP_001002026.1에서 참조되었다. 인간 Claudin18.1의 아미노산 서열은 NCBI의 단백질 데이터베이스의 NP_057453.1에서 참조되었다. 시노물구스 원숭이 Claudin18.2의 아미노산 서열은 NCBI의 단백질 데이터베이스의 XP_015300615.1에서 참조되었다. 마우스 Claudin18.2의 아미노산 서열은 NCBI의 단백질 데이터베이스의 NP_001181850.1에서 참조되었다. 래트 Claudin18.2의 아미노산 서열은 NCBI의 단백질 데이터베이스의 NP_001014118.1에서 참조되었다. 위의 아미노산 서열은 GenScript Biotech Corporation에 의해 코돈 최적화되었으며 렌티바이러스 벡터 pLVX 또는 pCDNA3.4 벡터에서 합성되었다.
- [0470] 렌티바이러스 패키징 시스템을 통해 바이러스를 제조하며, 얻어진 바이러스를 사용하여 각각 HEK293T, L929 및 CHO 세포를 감염시켰다. 이후 푸로마이신 스크리닝을 수행하여 CHO-Claudin18.2(인간), HEK293T-Claudin18.1(인간), HEK293T-Claudin18.2(인간), L929-Claudin18.2(인간), HEK293T-Claudin18.2(시노물구스 원숭이), HEK293T-Claudin18.2(래트) 및 HEK293T-Claudin18.2(마우스)의 안정적인 세포주를 얻었다.
- [0471] NUGC4는 Claudin18.2를 내인성으로 발현하는 위암 종양 세포주이며, NUGC4(Nanjing Cobioer로부터 구입, CBP60493)를 후속 실험을 위해 선택하였다. 인간 Claudin18.2를 재조합적으로 과발현하는 안정 세포주 NUGC4-Claudin18.2(인간)도 후속 실험을 위해 구입하였다(Kyino Biotechnology Co., Ltd., Beijing로부터 유래, KC-1471).
- [0472] Claudin18.2의 양성률은 유세포 분석법(FACS)에 의해 결정되었다. 실험 과정은 하기와 같았다: 부착된 배양 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시키고 96웰 침단(pointed) 하부 플레이트에 웰 당 50 μ L의 부피로 3×10^5 개 세포/웰로 첨가하였다. IMAB362 항체(특히 CN 101312989 B로부터의 서열을 갖고, General Biosystems(Anhui) Co., Ltd.에 의해 합성된 항체 175D10의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 서열 번호: 135 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 서열 번호: 142를 사용하여 293E 세포로 발현 및 정제하여 얻어짐)를 1% BSA(PBS에서)로 40 μ g/mL로 희석하며 50 μ L/웰로 세포에 첨가하여 20 μ g/mL의 최종 항체 농도를 달성하였다. 혼합물을 잘 혼합하고 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하며 50 μ L의 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시켰다. 이후, 1 μ L의 항-인간 형광 2차 항체(APC: Biolegend-410712 또는 PE: BioLegend-410708)를 각 웰에 첨가하며, 혼합물을 잘 혼합하고 4°C에서 0.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하며, 200 μ L의 PBS에 재현탁시키고, 기계(유세포 분석기 모델: Sony-LE-SA3800GA 또는 Beckman-Cytoflex)상에서 검정하여 APC 형광 신호 값 및 양성으로 염색된 세포의 백분율(양성률(%))을 얻었다.
- [0473] Claudin18.1 세포의 양성률은 면역화된 마우스의 혈청을 사용하여 동일한 방법으로 결정하였다.
- [0474] 유세포 분석의 양성률 결과는 도 1A 내지 도 1I에 나타나 있으며, 이는 위의 안정 세포주가 모두 높은(>95%) 양성률을 나타낸 반면, NUGC4 세포는 23.8%의 Claudin18.2 발현 양성률을 나타냄을 나타낸다.
- [0475] 실시예 2. 항-인간 Claudin18.2 듀린 모노클로날 항체의 제조
- [0476] 5주령~6주령 및 3개의 균주: Balb/C, KM 및 CD01로부터 24마리의 야생형 마우스를 선택하고 pCDNA3.4-Claudin18.2 플라스미드, CHO-Claudin18.2(인간) 세포 및 L929-Claudin18.2(인간) 세포를 사용하여 면역화시켰다. 3회~4회 면역화 후, 혈청 역가를 유세포 분석법을 사용하여 검출하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: 부착 배양된 HEK293T-Claudin18.1(인간) 및 HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집한 후, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하고, PBS(1% BSA 함유)에 재현탁시키며, 3×10^5 개 세포/웰로 96-웰 침단 하부 플레이트에 첨가하였다. 구배 희석을 거친 혈청을 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 항 마우스 IgG 형광 2차 항체 1 μ L를 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 0.5시간 동안 인큐베이션하고, 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 재현탁시키고, 유세포 분석기에서 검정하였다. HEK293T-Claudin18.2(인간)에 대한 친화성이 높고 HEK293T-Claudin18.1(인간)에 대한 친화성이 낮은 마우스를 융합용 후보로서 선택하며, 후보 마우스는 각각 61, 64, 79, 89 및 91로 넘버링되었다.
- [0477] 세포 현탁액은 마우스의 비장과 림프절로부터 제조되며 SP2/0 마우스 골수종 세포와 1:1 비율로 혼합되었다. 세포를 세포 전기융합 완충제에 재현탁시키며 BTX-ECM2001 세포 전기융합 장치를 사용하여 전기융합 반응을 거치

게 하였다. 전기융합 반응 후, 세포를 완전 융합 배지(RPMI1640 + 20% FBS + 1× HAT)에 재현탁시키고 96-웰 세포 배양 플레이트에 20000-25000개 세포/웰로 첨가하며 37℃에서 5% CO₂로 배양하였다. 배양 후, 인간 Claudin18.2에 대해 더 높은 친화성을 갖는 하이브리도마 모 클론을 L929-Claudin18.2(인간) 세포를 사용한 세포 기반 ELISA에 의해 선택하고, Claudin18.1에 결합할 수 있는 클론을 유세포 분석법(FACS)에 의해 배제하고 서브클로닝에 사용하였다. 2회의 융합 스크리닝 후, 총 52개의 모 클론이 서브클로닝을 위해 선택되었다. 각 모 클론의 75개 세포를 하나의 96웰 세포 배양 플레이트에 첨가하며, 스크리닝 배지(RPMI1640 + 20% FBS + 1× HAT)를 서브클로닝 배양을 위해 채택하였다. 서브클론 상청액을 취하여 세포 기반 ELISA 및 유세포 분석법을 사용하여 Claudin18.1에 대한 결합이 없고 친화성이 더 높은 모노클로날 항체를 스크리닝한 후 증폭 배양을 거치게 하였다. 하이브리도마 세포를 무혈청 배지에서 배양하고, 수집된 모노클로날 상청액을 항체 정제 배지 ProA(GE, Mabselect XL)의 패키징을 사용하여 정제하여 뮤린 항체를 얻었다.

[0478] **실시예 3. 항-인간 Claudin18.2 뮤린 항체의 평가**

[0479] 항-인간 Claudin18.2 뮤린 모노클로날 항체의 친화성을 세포 기반 ELISA에 의해 평가하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: 실험 전날, HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^4 개 세포/웰로 플레이팅하였다. 실험 당일, 상청액을 제거하고 각 웰에 있는 세포를 300 μ L의 PBS로 1회 세척한 후, 100 μ L의 4% 파라포름알데히드를 각 웰에 첨가하여 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 이후, 파라포름알데히드를 제거하며, 각 웰에 있는 세포를 300 μ L의 PBS로 2회 세척하였다. 100 μ L의 2% BSA(PBS에서)를 각 웰에 첨가하며, 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 차단하였다. 차단 용액을 제거한 후, 구배 희석(10 μ g/mL로부터 시작하여 3배 구배로 총 11개의 농도점에, 2% BSA(PBS에서)로 희석됨)을 거친 각 항체를 100 μ L/웰로 플레이트에 첨가하며, 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 제거하며, 각 웰에 있는 세포를 300 μ L의 PBST로 3회 세척하였다. 2% BSA 중 100 μ L의 항-마우스 IgG HRP 2차 항체(Jackson, 카탈로그 번호 115-035-003)를 각 웰에 첨가하며, 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 2차 항체를 제거하고, 각 웰에 있는 세포를 300 μ L의 PBST로 5회 세척한 후, 5분~20분 동안 발색을 위해 웰 당 100 μ L의 TMB 기질(Huzhou InnoReagents Co., Ltd.)을 첨가하였다. 각 웰에 50 μ L의 2N HCl을 첨가하여 반응을 중단시키며, OD_{450nm} 값을 마이크로플레이트 리더(제조업체: MD, 모델: SpectraMax)상에서 판독하였다. 얻어진 값을 GraphPad Prism으로 플롯팅하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.

[0480] 항-인간 Claudin18.2 뮤린 모노클로날 항체의 특이성을 유세포 분석법(FACS)에 의해 평가하였다. 실험 과정은 하기와 같았다: 부착된 배양 HEK293T-Claudin18.1(인간) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시키고 96웰 침단(pointed) 하부 플레이트에 웰 당 50 μ L의 부피로 3×10^5 개 세포/웰로 첨가하였다. 각 시험 항체를 1% BSA(PBS에서)로 100 μ g/mL로 희석하며 50 μ L/웰로 세포에 첨가하여 50 μ g/mL의 최종 항체 농도를 달성하였다. 혼합물을 잘 혼합하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하며 50 μ L의 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시켰다. 1 μ L의 형광 2차 항체(Biolegend, 카탈로그 번호 405308)를 각 웰에 첨가하며, 혼합물을 잘 혼합하고 4℃에서 0.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하며, 200 μ L의 PBS에 재현탁시키고, 기계(유세포 분석기 모델: Sony-LE-SA3800GA)상에서 검정하였다. APC 형광 신호 값을 얻고, 아이소타입 대조 항체를 음성 대조으로 사용하여 게이트를 설정하여 양성으로 염색된 세포의 백분율(양성률(%))을 얻었다.

[0481] 실험 결과는 표 1에 나타나 있다. HEK293T-Claudin18.2에 대한 친화성이 더 높고 HEK293T-Claudin18.1에 대한 비특이적 결합이 없는 클론을 시퀀싱을 위해 선택하며, 클론은 각각 1A6G10, 2D3A11, 25C7A5, 40G11H2, 8H11A10, 23F2F2 및 32F7A6으로 넘버링되었다.

표 1

표 1. 유린 항체 평가 결과 요약

클론 번호	친화성	특이성	
	HEK293T-18.2 EC50(ng/mL)	HEK293T-18.1 평균 APC 형광 신호 값	HEK293T-18.1 양성률(%)
1A6G10	5.024	111	0.16
15G1B2	7.145	112	0.11
2D3A11	8.143	134	0.25
27C12F3	9.947	140	0.59
27H3A8	24.71	151	0.6
25C7A5	10.49	123	0.87
40G11H2	7.376	160	0.98
24B3B3	25.42	169	1.02
8H11A10	12.32	175	1.21
15C12A11	20.43	230	1.21
34G7B8	67.87	149	1.6
25B1A11	11.74	146	1.84
23F2F2	6.015	222	2.16
6C10G7	37.59	170	2.3
3G12F5	67.42	170	3.26
15C12A2	8.933	639	10.6
13A6D2	5.183	532	18.3
25F11B8	76.49	538	19
20G11G2	41.15	1709	21.1
9B8G6	77.46	553	23.2
43D2A6	2.69	1017	25.6
20G1C2	20.27	850	27.2
40B9B7	66.75	778	45.9
3G12F7	6.149	1443	51.5
33A9A4	7.272	904	2.87
34G7E5	10.96	968	5.32
32F7A6	2.399	411	0
9B8D5	229	미검출	미검출
10D1G9	14.86	551	2.73
30B11A5	22.45	502	1.72
3E9B11	23.18	472	0.38
39H1G2	11.79	379	0.49
25H8A7	19.94	543	2.45
24B1F2	13.48	미검출	미검출

[0482]

[0483] 실시예 4. 항-인간 Claudin18.2 유린 모노클로날 항체의 시퀀싱

[0484] 약 1×10^5 개의 위의 하이브리도마 세포를 수집하였다. RNA를 Trizol(Invitrogen, 15596026)로 추출한 후, PrimeScript RT 시약(TAKARA, RR047A) 키트를 사용하여 PolyA를 통해 역전사하여 cDNA를 얻었다. 정방향 프라이머는 중쇄 및 경쇄의 업스트림에 설계되었으며, 역방향 프라이머는 중쇄 CH1 영역과 및 경쇄 CL 영역에 설계되었다. 생성물을 PCR(GoldenStar® T6 Super PCR Mix, Tsingke Biotech, TSE101)로 증폭하고, 단편을 아가로스 겔 추출 키트를 사용하여 회수하며, 시퀀싱을 위해 Beijing Tsingke Biotech Co., Ltd.로 전달하고, IMGT 웹사이트에서 분석하여 유린 항체 서열을 얻었다. 후보 유린 항체의 서열은 표 2에 나타나 있다.

표 2

표 2. 후보 무린 항체의 서열 목록

클론 번호	중쇄 가변 영역 (VH) 서열	경쇄 가변 영역 (VL) 서열
25C7A5	서열 번호: 21	서열 번호: 22
2D3A11	서열 번호: 23	서열 번호: 24
8H11A10	서열 번호: 44	서열 번호: 45
1A6G10	서열 번호: 46	서열 번호: 47
23F2F2	서열 번호: 48	서열 번호: 49
40G11H	서열 번호: 50	서열 번호: 51
32F7A6	서열 번호: 52	서열 번호: 53

[0485]

[0486]

25C7A5 및 2D3A11이 특허 분석 및 얻어진 서열의 검색을 통해 고유한 서열을 갖는 후보 항체로 확인되었으며, 이를 추후 인간화 설계를 거치게 하였다.

[0487]

실시예 5. 항-인간 Claudin18.2 무린 항체의 인간화

[0488]

CDR 이식 방법이 사용되었다. 우선, 원래의 무린 서열과 가장 상동성이 높은 인간 생식계열 서열을 통상적인 BLAST 방법에 의해 찾아내서 템플릿으로 하고; 무린 항체의 CDR을 인간 템플릿에 이식시켜 키메라를 구축하고; 무린 항체 원래의 형태를 유지할 수 있는 FR 아미노산을 구조에 따라 분석하고, 키메라에 있는 상응하는 아미노산을 무린 아미노산으로 역돌연변이시켜 원래의 친화성을 유지하며; 구축된 인간화 항체를 계산 및 면역원성 분석을 거치게 하여 낮은 면역원성 단편을 대체하기 위해 사용된 높은 면역원성 단편을 찾았다. 인간화 항체 25C7A5-HZ1, 25C7A5-HZ2, 2D3A11-HZ1 및 2D3A11-HZ2를 얻었으며, 이의 인간화 서열은 표 3에 나타나 있다.

표 3

표 3. 후보 인간화 항체의 서열 목록

25C7A5-HZ1의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTNYWLHWVRQAPGQG LEWMGMMHPI SGSSNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLLSAMDYWGQGLVTVSS (서열 번호: 27)
25C7A5-HZ1/25C7A5-HZ2의 경쇄 가변 영역(VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVKTYVSWYQQKPGQSP RLLIYEASNRYTGVPARFSGSGSATDFTLTISSELEDFAVYFC GQTYSFPPTFGQGTKVEIK (서열 번호: 28)
25C7A5-HZ2의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTNYWLHWVRQAPGQG LEWMGMMHPI SGSSNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLLSAMDYWGQGLVTVSS (서열 번호: 29)
2D3A11-HZ1의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNADSKYSQEFQGRATLTSKDSASTAYMELSSLRS EDMAVYYCSRSYGNSFVWGQGLVTVSS (서열 번호: 30)
2D3A11-HZ1/2D3A11-HZ2의 경쇄 가변 영역(VL)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQSPKLLFFWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDYFPPTFGQGTKVEIK (서열 번호: 31)
2D3A11-HZ2의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVESGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNADSKYSQEFQGRATLTSKDSASTAYMELSSLRS EDMAVYYCSRSYGNSFVWGQGLVTVSS (서열 번호: 32)

[0489]

[0490]

실시예 6. 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 제조

[0491]

인간화 항체 25C7A5-HZ1(서열 번호: 1의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역 서열을 갖고 있음) 및 25C7A5-HZ2(서열 번호: 3의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역 서열을 갖고 있음) 및 참조 항체 IMAB362의 가변 영역 아미노산 서열(특히 CN 101312989 B로부터 유래한 서열, 항체 175D10의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 서열 번호: 135 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 서열 번호: 142)을 코돈 최적화한 후 (General Biosystems (Anhui) Co., Ltd.에 의해) 유전자 합성을 거치게 하며 PTT5 벡터상에서 구축하였다. 합성 후, 플라스미드를 직접적인 세균 진탕으로 추출하고, PEImax(Polysciences, 24765-1)로 HEK293E 세포에 형질감염시키며, 약 7일 동안 발현시켰다. 상청액을 원심분리에 의해 수집한 후, MabSelectSure 단백질 A 친화성 패키징(GE)을 사용하여 정제하였다. 발현된 참조 항체는 인간화 항체와 동일한 인간 IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 4) 및 인간 Kappa 경쇄 불변 영역(서열 번호: 5)을 갖는다. 정제된 항체를 한외여과에 의해 PBS 완충제로 모두 교환하며, 농도를 결정하고, -20℃에서 보관하였다.

[0492]

실시예 7. 세포 기반 ELISA에 의한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 검출

[0493]

항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 친화성을 세포 기반 ELISA에 의해 결정하였다. 세포 기반 ELISA는 실시예 I-3에 기재된 바와 같이 수행되었다. 선택된 세포는 형질감염 후 인간 Claudin18.2를 안정적으로 발현하는 L929-Claudin18.2(인간) 세포, HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포 및 NUGC4-Claudin18.2(인간) 세포, 또한 인간 Claudin18.2를 내생적으로 발현하는 NUGC4 세포였다.

[0494]

1) L929-Claudin18.2 세포 및 HEK293T-Claudin18.2 세포 양자의 경우, 실험 결과는 표 4에 나타나 있으며, 이

는 2D3A11-HZ1, 2D3A11-HZ2, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 모두 세포주에 대해 다 높은 친화성을 가짐을 나타낸다.

표 4

표 4. 세포 기반 ELISA에 의한 항-Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 결과

샘플 이름	세포 기반 ELISA에 의해 검출된 친화성(EC ₅₀ , ng/mL)	
	L929-Claudin18.2	HEK293T-Claudin18.2
2D3A11-HZ1	17.12±0.85(N=2)	12.67±2.1(N=2)
2D3A11-HZ2	25.62	14.01±2.29(N=2)
25C7A5-HZ1	13.41	11.15
25C7A5-HZ2	14.80±3.1(N=2)	11.17±2.19(N=2)

비고: N=2는 2개의 독립적인 중복 실험을 나타냄.

[0495]

[0496]

2) NUGC4-Claudin18.2 세포의 경우, 결과는 표 5 및 도 2A에 나타나 있다. NUGC4-Claudin18.2에 대한 결합의 경우, 25C7A5-HZ1의 EC₅₀ 값은 107.6ng/mL이고 IMAB362의 EC₅₀ 값은 109.1ng/mL이며; 25C7A5-HZ1은 IMAB362의 0.591인 최대 신호 값보다 유의하게 높은 1.284인 최대 신호 값으로 NUGC4-Claudin18.2에 결합되고, 이는 25C7A5-HZ1이 IMAB362에 비해 NUGC4-Claudin18.2에 대해 더 우수한 친화성을 가짐을 나타낸다.

[0497]

3) NUGC4 세포의 경우, 실험 결과는 표 5 및 도 2B에 나타나 있다. 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2는 NUGC4에 대해 더 높은 친화성을 갖는 반면, IMAB362는 NUGC4 세포에 대해 더 약한 친화성을 가지며(최대 신호 값에 달하지 않음), 이는 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 IMAB362에 비해 NUGC4에 대해 더 우수한 친화성을 가짐을 나타낸다.

표 5

표 5. 세포 기반 ELISA에 의한 항-Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 결과

세포 이름	NUGC4-Claudin18.2		NUGC4	
항체 이름	EC ₅₀ ng/mL	최대 신호 값	EC ₅₀ ng/mL	최대 신호 값
25C7A5-HZ1	107.6	1.284	101.2	0.304
25C7A5-HZ2	미검출	미검출	122.5	0.313
2D3A11-HZ1	미검출	미검출	95.18	0.316
IMAB362	109.1	0.591	미검출	미도달

[0498]

[0499]

실시예 8. 세포 기반 FACS에 의한 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 검출

[0500]

항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 친화성은 유세포 측정법에 의해 검출되었다. 실험 과정은 하기와 같았다: 부착된 배양 HEK293T-Claudin18.2(인간), NUGC4-Claudin18.2(인간) 및 NUGC4 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시키고 96웰 침단(pointed) 하부 플레이트에 웰 당 50 µL의 부피로 3×10⁵개 세포/웰로 첨가하였다. 각 시험 항체를 1% BSA(PBS에서)로 희석하였다(100 µg/mL로부터 시작하여 10개 농도점에 3배 구배로 희석). 구배 희석을 거친 시험 항체를

50 μ L/웰로 세포에 첨가하며, 혼합물을 잘 혼합하고, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하여, 50 μ L의 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시켰다. 1 μ L의 형광 2차 항체(Biolegend-410712)를 각 웰에 첨가하며, 혼합물을 잘 혼합하고 4℃에서 0.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하며, 200 μ L의 PBS에 재현탁시키고, 기계상에서 검정하였다.

[0501] 실험 결과는 도 3A 내지 도 3C 및 표 6에 나타나 있다. 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2 모두는 HEK293T-Claudin18.2 세포에 대해 높은 친화성을 가지고(도 3A); NUGC4-Claudin18.2 세포의 경우(도 3B), 25C7A5-HZ1은 3192ng/mL의 친화성 EC₅₀ 값을 갖는 반면, IMAB362는 6668ng/mL의 친화성 EC₅₀ 값을 가지며, 25C7A5-HZ1의 최대 신호 값은 IMAB362의 최대 신호 값보다 유의하게 높고, 이는 25C7A5-HZ1이 IMAB362에 비해 더 우수한 친화성을 가짐을 나타내고; NUGC4 세포(도 3C)의 경우, 25C7A5-HZ1은 NUGC4에 대해 유의한 결합을 나타내는 반면, IMAB362는 NUGC4에 대해 매우 약한 결합을 나타내고, 이는 또한 25C7A5-HZ1이 IMAB362에 비해 더 우수한 친화성을 가짐을 나타낸다.

표 6

표 6. 세포 기반 FACS에 의한 항-Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 결과

세포 이름	HEK293T-Claudin18.2		NUGC4- Claudin18.2	
항체 이름	EC50 ng/mL	최대 신호 값	EC50 ng/mL	최대 신호 값
25C7A5-HZ1	292	113572	3192	871132
25C7A5-HZ2	292.8	119070	미검출	미검출
2D3A11-HZ1	368.7	132603	미검출	미검출
IMAB362	미검출	미검출	6668	373157

[0502]

실시예 9. 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 중 친화성 평가

[0503]

[0504] 상이한 종의 Claudin18.2에 대한 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 친화성을 유세포 분석법(FACS)에 의해 결정하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: HEK293T-Claudin18.2(시노물구스 원숭이) 세포, HEK293T-Claudin18.2(마우스) 세포 및 HEK293T-Claudin18.2(랫트) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시키며, 3×10^5 개 세포/웰로 96-웰 차단 하부 플레이트에 첨가하였다. 구매 회석을 거친 각 항체를 첨가하고, 혼합물을 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 1 μ L의 형광 2차 항체(APC: Biolegend-410712)를 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 4℃에서 0.5시간 동안 인큐베이션하고, 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 재현탁시키고, 유세포 분석기에서 검정하였다.

[0505]

실험 결과는 도 4A 내지 도 4C 및 표 7에 나타나 있으며, 이는 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1, 25C7A5-HZ2 및 IMAB362 모두가 시노물구스 원숭이 Claudin18.2에 대해 높은 친화성을 가짐을 나타내며(도 4A); 25C7A5-HZ1 및 IMAB362는 또한 랫트 Claudin18.2(도 4B) 및 마우스 Claudin18.2(도 4C)에 대해 우수한 중 결합을 나타낸다.

표 7

표 7. 세포 기반 FACS에 의한 항-Claudin18.2 인간화 항체의 친화성 결과

세포 이름	HEK293T-Claudin18.2 (시노물구스 원숭이)	HEK293T-Claudin18.2 (마우스)	HEK293T-Claudin18.2 (랫트)
항체 이름	EC50 ng/mL	EC50 ng/mL	EC50 ng/mL
25C7A5-HZ1	239.8	940.7	1672
25C7A5-HZ2	213.3	미검출	미검출
2D3A11-HZ1	171.9	미검출	미검출
1MAB362	242.7	1217	1624

[0506]

[0507] 실시예 10. 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 친화성 평가

[0508] 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 특이성을 유세포 분석법(FACS)에 의해 결정하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: HEK293T-Claudin18.1(인간) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA(PBS에서)에 재현탁시키며, 3×10^5 개 세포/웰로 96-웰 침단 하부 플레이트에 첨가하였다. 최종 농도가 50 µg/mL인 각 시험 항체를 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 1 µL의 형광 2차 항체(APC: Biolegend-410712 또는 PE: BioLegend-410708)를 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 0.5시간 동안 인큐베이션하고, 세포를 사전 냉각된 PBS로 3회 세척한 후, 재현탁시키고, 유세포 분석기에서 검정하였다. 참고로 항-인간 Claudin18.1 양성 대조 항체(양성 대조 항체-1 및 양성 대조 항체-2)는 실험에 포함되었다. 실시예 I-3에서 HEK293T-Claudin18.1(인간) 세포에 대해 유의한 결합을 나타낸 항체를 양성 대조 항체로 선택하며, 항체 클론은 각각 13A6D2(양성 대조 항체-1) 및 15C12A2(양성 대조 항체-2)로 넘버링되었다.

[0509] 실험 결과는 표 8에 나타나 있으며, 이는 2D3A11-HZ1, 2D3A11-HZ2, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 인간 Claudin18.1을 비특이적으로 식별하지 않음을 나타낸다.

표 8

표 8. 항-Claudin18.2 인간화 항체의 비특이적 검출

항체 이름	중간 APC 형광 신호 값	평균 APC 형광 신호 값	양성률(%)
2D3A11-HZ1	233	281	0.69
2D3A11-HZ2	329	382	1
양성 대조 항체-1	726	979	16.2
항체 이름	중간 PE 형광 신호 값	평균 PE 형광 신호 값	양성률(%)
25C7A5-HZ1	504	583	0.54
25C7A5-HZ2	471	559	0.55
양성 대조 항체-2	1055	1231	6.78
음성 대조 항체(NC)	385	448	0.32

[0510]

- [0511] 실시예 11. 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성 평가
- [0512] 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 ADCC 활성을 플루오레세인 리포터 시스템에 의해 검출하였다. 실험은 Rhinogen® Bio-Glory One-Step Firefly Luciferase Assay 키트(Suzhou Rhino Bio, RA-GL04)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 수행되었다. 실험 절차는 하기와 같았다: HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, DMEM + 1% FBS에 재현탁시킨 후, 50000개 세포/웰로 플레이팅하였다. Jurkat-NFAT-CD16a 세포를 원심분리에 의해 수집하고 1640 + 1% FBS에 재현탁시킨 후 100000개 세포/웰로 플레이팅하였다. 구배 희석을 거친 각 시험 항체를 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 50 µL의 Bio-Glory One-Step 루시퍼레이스 기질을 각 웰에 첨가하며 판독 값을 마이크로플레이트 리더(MD, SpectraMax i3x)상에서 취득하였다.
- [0513] 실험 결과는 도 5에 나타나 있고, 이는 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 각각 47.91ng/mL, 46.49ng/mL 및 48.75ng/mL의 EC₅₀ 값으로 나타나 모두 강력한 ADCC 활성을 가짐을 나타낸다.
- [0514] 실시예 12. 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성 평가
- [0515] 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 CDC 활성을 기니 피그 혈청 사멸 실험에 의해 검출하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: HEK293T-Claudin18.2(인간) 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 50000개 세포/웰로 플레이팅하며, 밤새 인큐베이션하였다. 상청액을 제거하며 DMEM + 20% 기니 피그 혈청(Beijing Bersee, BM361Y)으로 각 100 µL의 시험 항체를 구배 희석을 거치게 하여 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 37℃에서 5시간 동안 인큐베이션한 후, 20 µL의 CCK8 시약(Suzhou Rhino Bio, QDY-003-D)을 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 1시간~4시간 동안 반응시키며, 판독 값을 마이크로플레이트 리더상에서 450nm에서 취득하였다.
- [0516] 실험 결과는 도 6에 나타나 있고, 이는 2D3A11-HZ1, 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 각각 1904ng/mL, 3137ng/mL 및 3283ng/mL의 EC₅₀ 값으로 나타나 모두 강력한 CDC 활성을 가짐을 나타낸다.
- [0517] 실시예 13. 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 세포내이입 활성 평가
- [0518] 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 세포내이입 활성을 유세포 분석법(FACS)에 의해 검출하였다. 실험 절차는 하기와 같았다: HEK293T-Claudin18.2 세포를 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 10 µg/mL 농도의 각 시험 항체와 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고, PBS로 3회 세척하며, DMEM + 10% FBS에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 4가지 부분으로 나누어서 37℃에서 각각 0시간, 1시간, 2시간, 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후 1 µL의 형광 2차 항체(Biolegend, 410712)를 첨가하였다. 혼합물을 4℃에서 0.5시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 재현탁시키며, 기계상에서 검정하였다. 세포내이입율을 하기 공식에 따라 계산하였다: 세포내이입율(%) = [1 - (그 시점에 시험 샘플의 평균 형광 값 - 그 시점에 음성 대조 샘플의 평균 형광 값) / (0시간에 시험 샘플의 평균 형광 값 - 0시간에 음성 대조 샘플의 평균 형광 값)] × 100. 음성 항체는 아이소타입 대조 항체였다.
- [0519] 실험 결과는 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2가 둘 모두 4시간에 12% 이상의 세포내이입율로 나타나 모두 세포내이입 활성을 가짐을 나타낸다.
- [0520] 실시예 14. 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 가속 안정성 검출
- [0521] 항-인간 Claudin18.2 인간화 모노클로날 항체의 가속 안정성을 하기 방법에 의해 검출하였다: 시험 항체를 4.7mg/mL 농도의 PBS(pH=7.4)로 한외여과에 의해 교환하고, 여과에 의해 멸균시키며, 37℃에서 0일, 3일, 7일 및 14일 동안 방치하거나 -80℃에서 4회 또는 8회 반복되는 냉동-해동 주기를 거치게 하였다. 이후, 샘플의 SEC-HPLC 순도 및 CE-SDS 순도를 검출하였다. 37℃에서 0일 동안 방치된 대조를 사용하여 가속 안정성 분석에서 항체의 안정성 변화를 검사하였다.
- [0522] SEC-HPLC 검출 방법은 하기와 같았다:
- [0523] 기기: Waters Alliance e2695 HPLC;
- [0524] 크로마토그래피 컬럼: Thermo MabPac SEC-1, 5 µm, 7.8×300mm;
- [0525] 이동상: 61mmol/L Na₂HPO₄, 39mmol/L NaH₂PO₄, 200mmol/L NaCl, 5% IPA;

[0526] 기기 파라미터: 샘플 챔버 온도: 8℃; 컬럼 온도: 30℃; 유속: 0.5mL/분; 샘플 주사 부피: 20 μg; 검출 파장: 280nm; 및 등용매 실행: 30분.

[0527] CE-SDS 검출 방법은 하기와 같았다: 각 샘플을 초순수로 4mg/mL로 희석하였다. 25 μL의 샘플 희석액을 원심분리 튜브에 첨가하고, 75 μL의 사전 혼합된 용액(SDS 샘플 완충제 + 아이오도아세트아미드)을 첨가하였다. 혼합물을 잘 혼합하고, 10000g에서 1분 동안 원심분리하며, 70℃에서 5분 동안 처리하였다. 샘플을 꺼내고, 실온에서 냉각하며, 10000g에서 1분 동안 원심분리하고, 잘 혼합하며, 샘플 주사 병에 옮겼다.

[0528] 분석은 SCIEX의 PA800 플러스 모세관 전기영동 기기를 사용하여 수행하며 기기 파라미터는 하기와 같이 설정되었다:

[0529] 모세관: 30.2cm×50 μm (베어 튜브), 유효 길이: 20cm;

[0530] 모세관 컬럼 온도: 25℃, 샘플 트레이 온도: 15℃;

[0531] 검출 파장: 220nm; 수집 주파수: 4Hz.

[0532] 실험 결과는 본 발명의 25C7A5 인간화 항체가 95% 이상의 SEC 순도, 90% 이상의 CE-SDS 비환원 순도, 및 95% 이상의 CE-SDS 환원 순도로, 가속 조건 및 반복된 동결-해동 주기하에서 양호한 안정성을 가짐을 나타낸다.

[0533] **실시예 15. 래트의 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체에 대한 체내 약동학적 검정**

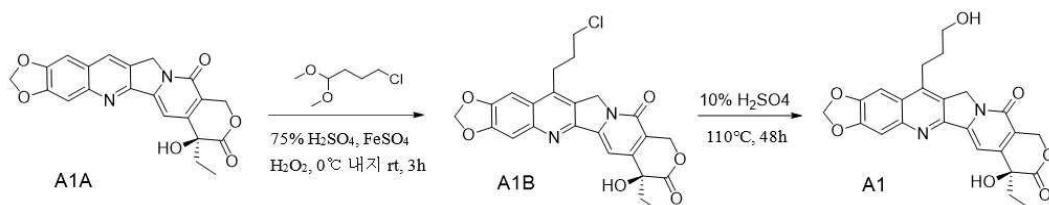
[0534] 체내 항-인간 Claudin18.2 인간화 항체의 대사를 아래와 같이 검사하였다. 시험 샘플인 인간화 항체와 IMAB362 항체를 각각 수컷 래트(Chengdu Dossy)에게 10mg/kg의 용량으로 미부 정맥 주사로 투여하며, 각 군에 3마리 래트가 있다. 혈청 샘플을 투여 후 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간에 수집하였다. 혈장 약물 농도는 L929-Claudin18.2 세포 기반 ELISA에 의해 결정되었다(실시에 3에 기재된 바와 같음). 결과는 본 발명의 25C7A5 인간화 항체가 참조 항체 IMAB362에 필적하는 래트에서의 체내 반감기를 가짐을 나타낸다.

[0535] **실시예 II. 항체-약물 접합체의 제조 및 특성화**

[0536] **실시예 1. 항체-약물 접합체(ADC)의 제조**

[0537] **실시예 1.1. "약물-링커 화합물" 합성에 사용되는 중간체의 합성**

[0538] 실시예 1.1.1: (S)-7-에틸-7-히드록시-14-(3-히드록시프로필)-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1)의 합성



[0539]

[0540] 단계 1: (S)-7-에틸-7-히드록시-14-(3-클로로프로필)-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1B)의 합성

[0541] 빙수욕에서 화합물 (S)-7-에틸-7-히드록시-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리노[1,2-b]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A1A, 카탈로그 번호 151636-76-9, 500mg)의 75% 황산(5mL) 용액에 황산 제일철 7수화물(물 1mL에 황산 제일철 7수화물 570mg이 용해됨) 및 4,4-디메톡시클로로부탄(3.89g)을 첨가하고, 반응 용액을 3분 동안 교반한 후, 과산화수소(29%, 2.5mL)를 드롭방식으로 첨가하였다. 반응 용액을 0℃에서 5분 동안 교반한 후, 실온으로 가열하고, 3시간 동안 더 교반하여 반응시켰다. 반응 용액을 물(50mL)로 희석하고 에틸 아세테이트(80mL×2)로 추출하였다. 유기상을 포화 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조한 후 농축하여 조생성물을 얻었다. 조생성물을 C18 컬럼(아세토니트릴/0.05% 포름산 수용액: 5%-60%)을 사용하여 추가로 정제하여 표적 화합물 A1B(황색 고체, 400mg, 수율: 67%)를 얻었다.

[0542] LCMS (ESI) [M+H]⁺: 468.9;

[0543] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.24(s, 1H), 6.50(s, 1H), 6.30(s, 2H), 5.42(s,

2H), 5.26(s, 2H), 3.81(d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.22(s, 2H), 1.98(d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 0.88(t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

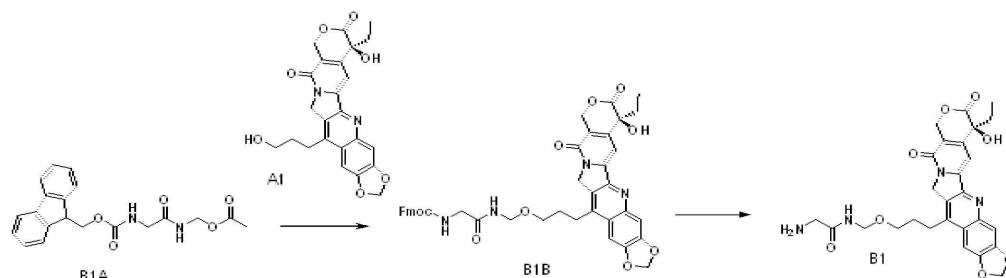
[0544] 단계 2: (S)-7-에틸-7-히드록시-14-(3-히드록시프로필)-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7H)-디온 (A1)의 합성

[0545] 화합물 (S)-7-에틸-7-히드록시-14-(3-클로로프로필)-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7H)-디온(100mg, 0.213mmol)을 10% 황산(5mL) 용액에 용해시키며, 반응 용액을 110℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응 용액에 포화 중탄산나트륨 용액(30mL)을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 디클로로메탄(10mL×5)으로 추출하여, 무수 황산나트륨으로 건조하고, 진공하에서 여과하며, 감압하에서 농축하여 조생성물을 얻었다. 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(0.05% 포름산을 함유하는 아세토니트릴/물)로 정제하여 (S)-7-에틸-7-히드록시-14-(3-히드록시프로필)-10,13-디히드로-11H-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7H)-디온(A1, 1.78mg)을 얻었다.

[0546] LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 451.0;

[0547] ^1H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.63(s, 1H), 7.50(s, 1H), 7.24(s, 1H), 6.48(s, 1H), 6.28(s, 2H), 5.47 - 5.37(m, 2H), 5.32 - 5.19(m, 2H), 3.51 - 3.46(m, 2H), 3.17 - 3.13(m, 2H), 1.92 - 1.76(m, 4H), 0.90 - 0.84(m, 3H).

[0548] 실시예 1.1.2: (S)-2-아미노-*N*-((3-(7-에틸-7-히드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라히드로-10H-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)프로폭시)메틸)아세트아미드 (B1)의 합성



[0549]

[0550] 단계 1: 화합물 (B1A)(카탈로그 번호 1599440-06-8, 368mg), 화합물 (A1)(440mg) 및 피리디늄 *p*-톨루엔설포네이트(PPTS)(25mg)를 디클로로메탄(20mL)에서 20시간 동안 환류시킨 후, 중탄산나트륨 수용액 및 염산 수용액으로 순차적으로 세척하였다. 혼합물을 감압 하에서 농축하여 유기 용매를 제거하여 조생성물을 얻었다. 조생성물을 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10/1)로 정제하여 표적 화합물 B1B(240mg)를 얻었다.

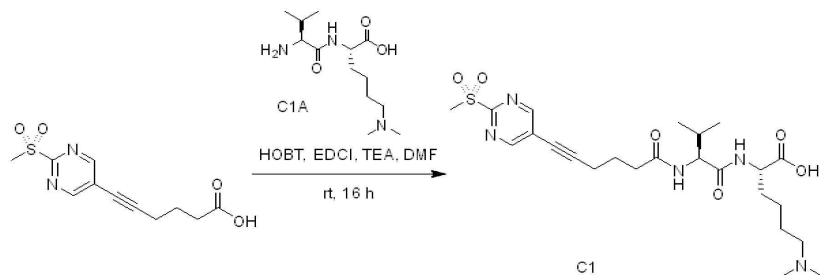
[0551] LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 759.5.

[0552] 단계 2: B1B(240mg)를 DMF(5mL)에 용해시키고, 피페리딘(1mL)을 첨가하고, 혼합물을 20분 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압 하에서 농축하여 끓는점이 낮은 성분을 제거하며, 잔류물은 바로 다음 단계에 사용하였다. 소량의 조생성물을 역상 크로마토그래피(아세토니트릴/0.05% FA 수용액: 5% 내지 50%)로 정제하여 표적 화합물 B1을 얻었다.

[0553] ESI-MS(*m/z*): 537.4 $[M+H]^+$;

[0554] ^1H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13(t, 1H), 8.04(br, 2H), 7.58(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.25(s, 1H), 6.29(s, 2H), 5.43(s, 2H), 5.21(s, 2H), 4.65(d, 2H), 3.63(m, 2H), 3.53(m, 2H), 3.11(m, 2H), 1.87(m, 4H), 0.88(t, 3H).

[0555] 실시예 1.1.3: N^6, N^6 -디메틸- N^2 -((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)- L -발릴)- L -라이신 (C1)



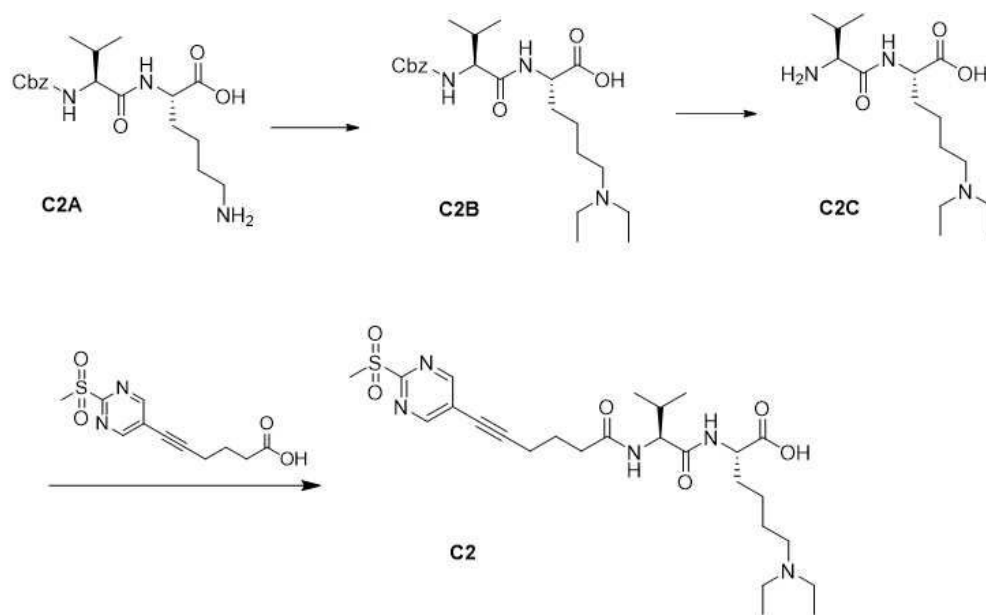
[0556]

[0557] 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노산(268mg, 카탈로그 번호 2356229-58-6), 화합물 C1A(328mg) 및 트리ethyl아민(322mg)을 N, N -디메틸포름아미드(5mL)에 용해시켰다. 이후, 1-히드록시벤조트리아졸(HOBT, 162mg) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(EDCI, 229mg)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, C18 역상 컬럼 크로마토그래피(아세토니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템)로 직접 정제하여 표적 화합물 N^6, N^6 -디메틸- N^2 -((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)- L -발릴)- L -라이신(C1, 백색 고체, 327mg)을 얻었다.

[0558] LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 524.4.

[0559] 1H NMR(400 MHz,) δ 9.13(s, 2H), 7.95(t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.21(dd, J = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 - 4.03(m, 1H), 3.41(s, 3H), 2.55(t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.42 - 2.32(m, 4H), 2.27(s, 6H), 1.98(dd, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 - 1.77(m, 2H), 1.74 - 1.55(m, 2H), 1.47 - 1.37(m, 2H), 1.31 - 1.23(m, 2H), 0.85(dd, J = 12.8, 6.8 Hz, 6H).

[0560] 실시예 1.1.4: N^6, N^6 -디에틸- N^2 -((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)- L -발릴)- L -라이신 (C2)



[0561]

[0562] 단계 1:

[0563] 화합물 C2A(5.0g, 12.05mmol, 카탈로그 번호 1872-06-8)를 디클로로메탄(100mL)에 용해시키며, 아세트알데히드(3.2g, 72.3mmol)를 반응 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 반응 용액에 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(12.8g, 60.25mmol)를 첨가하고, 얻어진 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하여 반응시켰다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응액에 포화 염화암모늄 수용액을 첨가하며, 얻어진 혼합물을 1시간 동안 교반하고, 회전 증발로 농축하여 여과하였다. 여액을 C18 역상 컬럼 크로마토그래피(아세토니트릴:0.05% 포름산 수용액: 5% 내지 55%)로 정제하여 표적 화합물 C2B(4.57g, 수율: 82.0%)를 백색 고체로서 얻었다.

[0564] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 436.4$;

[0565] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.70(d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.41(d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.38 - 7.26(m, 5H), 5.08 - 4.99(m, 2H), 4.00(dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, 1H), 3.86(dd, $J = 8.6, 6.8$ Hz, 1H), 2.74(dd, $J = 14.0, 6.9$ Hz, 4H), 2.64 - 2.54(m, 2H), 2.05 - 1.94(m, 1H), 1.72 - 1.52(m, 2H), 1.52 - 1.38(m, 2H), 1.38 - 1.18(m, 2H), 1.04(t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.87 - 0.81(m, 6H).

[0566] 단계 2:

[0567] 화합물 C2B(1.6g, 3.68mmol)를 실온에서 메탄올(80mL)에 용해시킨 후, Pd/C(0.16g)를 반응 용액에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 수소 분위기 하 실온에서 12시간 동안 교반하여 반응시켰다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 여과하고, 여액을 감압 하에서 농축하여 표적 화합물 C2C(900mg, 수율: 82%)를 크림같은 백색 고체로서 얻었다.

[0568] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.04(br s, 1H), 4.02 - 3.99(m, 1H), 3.10(d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 2.65(q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.55 - 2.51(m, 2H), 2.06 - 1.93(m, 1H), 1.73 - 1.54(m, 2H), 1.47 - 1.38(m, 2H), 1.30 - 1.21(m, 2H), 1.01(t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.89(d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79(d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

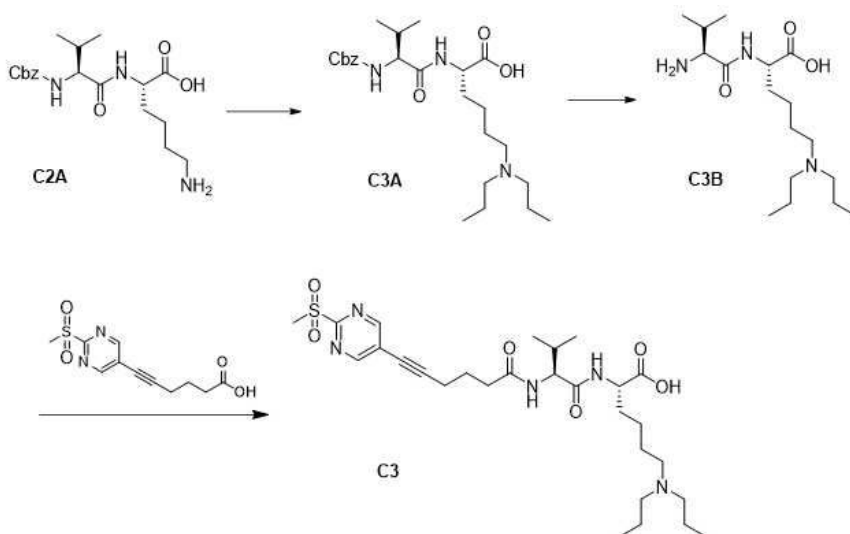
[0569] 단계 3:

[0570] 화합물 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노산(268mg, 1mmol)을 DMF(8mL)에 용해시키며, HATU(380mg, 1mmol) 및 triethylamine(322mg, 2.5mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반한 후, 화합물 C2C(301mg, 1mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 더 교반하였다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 C18 역상 컬럼 크로마토그래피(아세트니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템)로 직접 정제하여 표적 화합물 C2(280mg, 수율: 51%)를 백색 고체로서 얻었다.

[0571] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 552.3$;

[0572] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13(s, 2H), 7.95(d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.86(d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.18(dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 4.02(dd, $J = 12.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.41(s, 3H), 2.74 - 2.69(m, 4H), 2.62 - 2.52(m, 4H), 2.44 - 2.29(m, 2H), 2.04 - 1.94(m, 1H), 1.86 - 1.77(m, 2H), 1.72 - 1.54(m, 2H), 1.51 - 1.39(m, 2H), 1.33 - 1.23(m, 2H), 1.02(t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.87 - 0.82(m, 6H).

[0573] 실시예 1.1.5: N^6, N^6 -디-*n*-프로필- N^2 -((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)-*L*-발릴)-*L*-라이신 (C3)



[0574]

[0575] 단계 1:

[0576] 화합물 C2A(5.0g, 12mmol)를 디클로로메탄(100mL)에 용해시키며, *n*-프로피온알데히드(4.2g, 72.3mmol)를 반응 용액에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하여 반응시켰다. 이후, 반응 용액에 소듐 트리

세톡시보로히드라이드(12.8g, 60.25mmol)를 첨가하며, 얻어진 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하여 반응시켰다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응액에 포화 염화암모늄 수용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 1시간 동안 교반하고, 회전 증발로 농축하여 여과하였다. 여액을 C18 역상 컬럼 크로마토그래피(아세토니트릴:0.05% 포름산 수용액: 5% 내지 55%)로 정제하여 표적 화합물 C3A(4.57g, 수율: 82.0%)를 백색 고체로서 얻었다.

[0577] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 464.0$;

[0578] 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81(d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38 - 7.28(m, 5H), 5.04(d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 4.12 - 4.02(m, 1H), 3.94 - 3.82(m, 1H), 2.65 - 2.52(m, 6H), 2.06 - 1.94(m, 1H), 1.76 - 1.64(m, 1H), 1.64 - 1.53(m, 1H), 1.52 - 1.40(m, 6H), 1.34 - 1.18(m, 2H), 0.92 - 0.80(m, 12H).

[0579] 단계 2:

[0580] 화합물 C3A(2.0g, 4.32mmol)를 실온에서 메탄올(80mL)에 용해시킨 후, Pd/C(0.16g)를 반응 용액에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 수소 분위기 하 실온에서 12시간 동안 교반하여 반응시켰다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 여과하고, 여액을 감압 하에서 농축하여 표적 C3B(1.2g, 수율: 85.5%)를 크백색 고체로서 얻었다.

[0581] 단계 3:

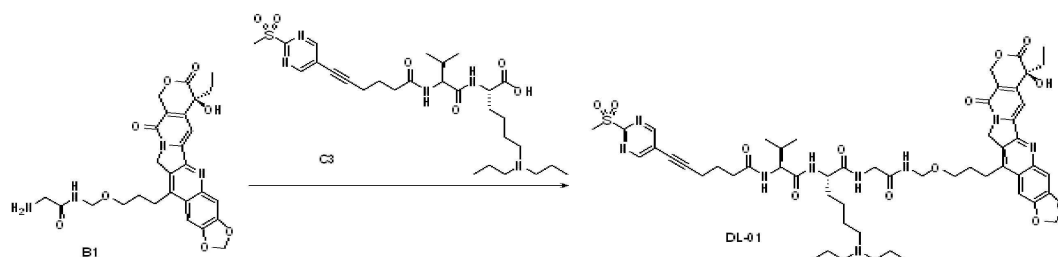
[0582] 화합물 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노산(100mg, 0.373mmol)을 *N,N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시킨 후, HATU(142mg, 0.373mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(120mg, 0.93mmol)을 첨가하였다. 시스템을 30분 동안 교반한 후, 화합물 C3B(122mg, 0.371mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 C18 역상 컬럼 크로마토그래피(아세토니트릴 및 0.05% 포름산 수용액 시스템)로 직접 정제하여 표적 화합물 N^6, N^6 -디-*n*-프로필- N^2 -((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)-*L*-발릴)-*L*-라이신(C3, 50mg, 수율: 28%)을 연황색 고체로서 얻었다.

[0583] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 580.0$;

[0584] 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24(s, 2H), 7.98 - 7.93(m, 2H), 4.24 - 4.16(m, 1H), 4.10(d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.41(s, 3H), 2.79 - 2.64(m, 6H), 2.55(t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.45 - 2.26(m, 2H), 2.06 - 1.91(m, 1H), 1.89 - 1.78(m, 2H), 1.76 - 1.66(m, 1H), 1.64 - 1.57(m, 1H), 1.57 - 1.42(m, 6H), 1.37 - 1.24(m, 2H), 0.93 - 0.78(m, 12H).

[0585] 실시예 1.2. 약물-링커 화합물의 합성

[0586] 실시예 1.2.1: *N*((11*S*, 14*S*)-11-(4-(디프로필아미노)부틸)-1-((*S*)-7-에틸-7-히드록시-8, 11-디옥소-7, 8, 11, 13-테트라히드로-10*H*[1, 3]디옥소[4, 5-*g*]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-*b*]퀴놀린-14-일)-15-메틸-7, 10, 13-트리옥소-4-옥사-6, 9, 12-트리아자헥사데칸-14-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미드 (DL-01)



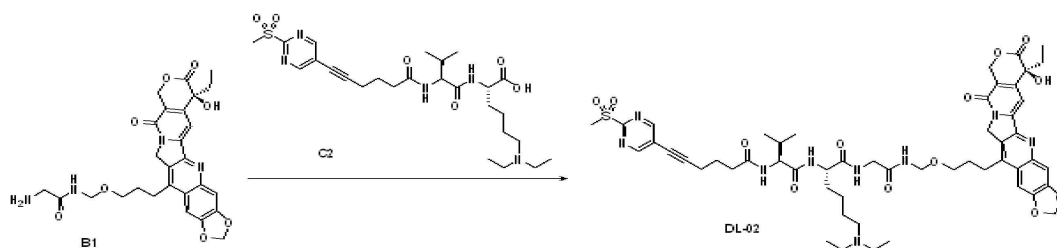
[0587]

[0588] 화합물 C3(43mg, 0.074mmol) 및 화합물 B1(40mg, 0.075mmol)을 *N,N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시킨 후, HBTU(28mg, 0.075mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(24mg, 0.187mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 분취용 크로마토그래피(0.01% 트리플루오로아세트산 수용액, 아세토니트릴)로 직접 정제하여 표적 화합물(DL-01, 8.5mg, 수율: 10%)를 황색 고체로서 얻었다.

[0589] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1098.6$;

[0590] 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10(s, 2H), 9.03(s, 1H), 8.64(t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19(t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.08(d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92(d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.24(s, 1H), 6.49(s, 1H), 6.29(s, 2H), 5.42(s, 2H), 5.24(s, 2H), 4.66 - 4.52(m, 2H), 4.31 - 4.21(m, 1H), 4.19 - 4.10(m, 1H), 3.74(d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.49 - 3.48(m, 2H), 3.40(s, 3H), 3.15 - 3.06(m, 2H), 3.02 - 2.95(m, 6H), 2.59 - 2.52(m, 3H), 2.41 - 2.29(m, 2H), 2.05 - 1.90(m, 2H), 1.91 - 1.77(m, 6H), 1.63 - 1.57(m, 6H), 1.31 - 1.29(m, 2H), 0.92 - 0.80(m, 15H).

[0591] 실시예 1.2.2: *N*-((11*S*,14*S*)-11-(4-(디에틸아미노)부틸)-1-((*S*)-7-에틸-7-히드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라히드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)-15-메틸-7,10,13-트리옥소-4-옥사-6,9,12-트리아자헥사데칸-14-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미드 (DL-02)



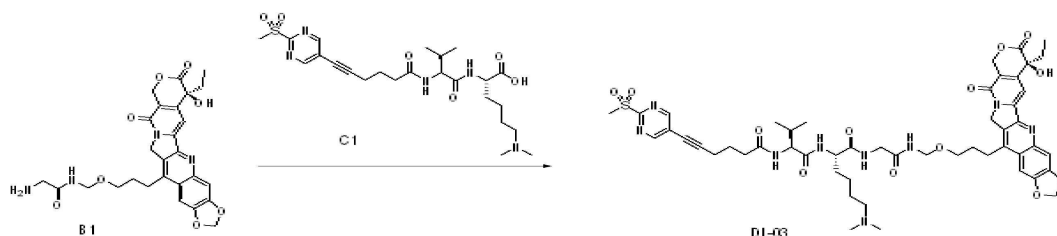
[0592]

[0593] 화합물 C2(40mg, 0.075mmol) 및 화합물 B1(41mg, 0.075mmol)을 DMF(1mL)에 용해시킨 후, HOBt(15.2mg, 0.113mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보다이미드 염산염(21.5mg, 0.113mmol)을 첨가한 후, 트리에틸아민(23mg, 0.225mmol)을 첨가하였다. 첨가 후, 반응 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 농축하여 조생성물을 얻었다. 조생성물을 분취용 크로마토그래피(0.01% TFA 수용액, 아세토니트릴)로 정제하여 표적 화합물(DL-02, 16mg, 수율: 20%)을 황색 고체로 수득하였다.

[0594] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1070.6$;

[0595] 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 - 9.08(m, 2H), 9.01(s, 1H), 8.64(t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.20(t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.09(d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.24(s, 1H), 6.50(s, 1H), 6.29(s, 2H), 5.43(s, 2H), 5.24(s, 2H), 4.65 - 4.53(m, 2H), 4.26(d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.20 - 4.10(m, 1H), 3.74(d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.50(t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.41(s, 3H), 3.14 - 3.07(m, 6H), 2.98(s, 2H), 2.55(d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 - 2.29(m, 2H), 2.03 - 1.89(m, 2H), 1.89 - 1.77(m, 7H), 1.61 - 1.56(m, 2H), 1.32(s, 2H), 1.16(t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.91 - 0.78(m, 9H).

[0596] 실시예 1.2.3: *N*-((11*S*,14*S*)-11-(4-(디메틸아미노)부틸)-1-((*S*)-7-에틸-7-히드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라히드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)-15-메틸-7,10,13-트리옥소-4-옥사-6,9,12-트리아자헥사데칸-14-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미드 (DL-03)



[0597]

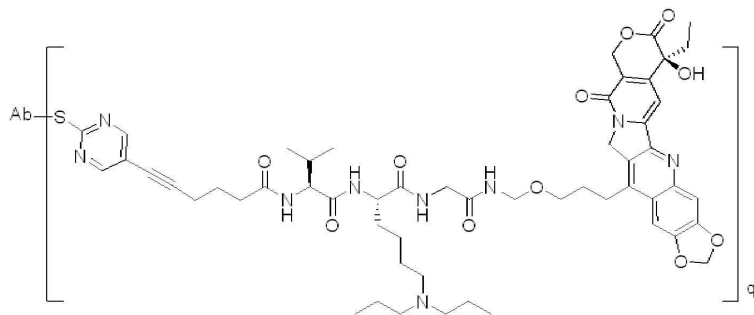
[0598] 화합물 B1(100mg, 0.186mmol) 및 화합물 *N*,*N*'-디메틸-*N*'-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이노일)-*L*-발릴)-*L*-라이신(C1, 100mg, 0.191mmol)을 DMF(2mL)에 용해시켰다. 1-히드록시벤조트리아졸(38mg, 0.280mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보다이미드 염산염(53mg, 0.280mmol)을 첨가한 후, 트리에틸아민(56mg, 0.559mmol)을 첨가하였다. 첨가 후, 반응 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS로 검출한 바와 같이 반응이 완료된 후, 반응 용액을 분취용 크로마토그래피(0.01% TFA 수용액, 아세토니트릴)로 직접 정제하여 표적

화합물(DL-03, 20mg, 수율: 10%)를 황색 고체로서 얻었다.

[0599] LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1042.5$;

[0600] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.28(s, 1H, TFA), 9.10(s, 2H), 8.64(br s, 1H), 8.19(br s, 1H), 8.09(d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.92(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.59(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.24(s, 1H), 6.50(s, 1H), 6.29(s, 2H), 5.43(s, 2H), 5.24(s, 2H), 4.67 - 4.52(m, 2H), 4.30 - 4.10(m, 2H), 3.74(br s, 2H), 3.50(br s, 2H), 3.41(s, 3H), 3.17 - 3.07(m, 2H), 3.04 - 2.91(m, 2H), 2.75(s, 6H), 2.46 - 2.24(m, 3H), 2.04 - 1.66(m, 9H), 1.63 - 1.46(m, 3H), 1.32 - 1.29(m, 2H), 0.87 - 0.82(m, 9H).

[0601] 실시예 1.3. 항-CLDN18.2 항체-약물 접합체의 제조



[0602] Ab는 항체이다.

[0603] 1.3.1. CLDN18.2-ADC(DAR8) 샘플의 제조

[0604] 30mg의 항-CLDN18.2 항체를 희석제(20 mM PB, pH 7.5)로 희석하고 최종 농도 5 mM의 소듐 에데테이트 용액을 첨가하며 얻어진 혼합물을 잘 혼합하였다. 항체의 6.0배 당량이었던 TCEP 용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 60분 동안 방치하였다. 항체의 12배 당량이었던 디메틸설폭사이드에 용해된 DL-01을 위의 용액 시스템에 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 1시간 동안 방치하여 접합체 샘플을 얻었다. 반응이 완료된 후, 샘플을 30KDa 한외여과 튜브를 사용하여 pH 5.5의 10mM 히스티딘 완충액으로 교환하여 저분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축하여 항-CLDN18.2 항체-ADC 조성물을 함유하는 용액 CLDN18.2-ADC(DAR8)를 얻었다. DAR 값은 실시예 3.4에 기재된 질량 분석법에 의해 8.0인 것으로 결정되었다.

[0605] 1.3.2. CLDN18.2-ADC(DAR2) 샘플의 제조

[0606] 30mg의 항-CLDN18.2 항체를 희석제(20mM PB, pH 7.5)로 희석하고 최종 농도 5mM의 소듐 에데테이트 용액을 첨가하며 얻어진 혼합물을 잘 혼합하였다. 항체의 6.0배 당량이었던 TCEP 용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 60분 동안 방치하였다. 항체의 2.5배 당량이었던 디메틸설폭사이드에 용해된 DL-01을 위의 용액 시스템에 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 1시간 동안 방치하여 접합체 샘플을 얻었다. 반응이 완료된 후, 샘플을 30KDa 한외여과 튜브를 사용하여 pH 5.5의 10mM 히스티딘 완충액으로 교환하여 저분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축하여 항-CLDN18.2 항체-ADC 조성물을 함유하는 용액 CLDN18.2-ADC(DAR2)를 얻었다. DAR 값은 질량 분석법에 의해 1.7인 것으로 결정되었다.

[0607] 1.3.3. CLDN18.2-ADC(DAR4) 샘플의 제조

[0608] 30mg의 항-CLDN18.2 항체를 희석제(20mM PB, pH 7.5)로 희석하고 최종 농도 5mM의 소듐 에데테이트 용액을 첨가하며 얻어진 혼합물을 잘 혼합하였다. 항체의 6.0배 당량이었던 TCEP 용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 60분 동안 방치하였다. 항체의 4.5배 당량이었던 디메틸설폭사이드에 용해된 DL-01을 위의 용액 시스템에 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 1시간 동안 방치하여 접합체 샘플을 얻었다. 반응이 완료된 후, 샘플을 30KDa 한외여과 튜브를 사용하여 pH 5.5의 10mM 히스티딘 완충액으로 교환하여 저분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축하여 항-CLDN18.2 항체-ADC 조성물을 함유하는 용액 CLDN18.2-ADC(DAR4)를 얻었다. DAR 값은 질량 분석법에 의해 4.0인 것으로 결정되었다.

[0609] 1.3.4. CLDN18.2-ADC(DAR6) 샘플의 제조

[0610] 30mg의 항-CLDN18.2 항체를 희석제(20mM PB, pH 7.5)로 희석하고 최종 농도 5mM의 소듐 에데테이트 용액을 첨가하며 얻어진 혼합물을 잘 혼합하였다. 항체의 6.0배 당량이었던 TCEP 용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼

합하며, 실온에서 60분 동안 방치하였다. 항체의 7.0배 당량이었던 디메틸설폭사이드에 용해된 DL-01을 위의 용액 시스템에 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하며, 실온에서 1시간 동안 방치하여 접합체 샘플을 얻었다. 반응이 완료된 후, 샘플을 30KDa 한외여과 튜브를 사용하여 pH 5.5의 10mM 히스티딘 완충액으로 교환하여 저분자량 물질을 제거하고, 최종적으로 샘플을 농축하여 항-CLDN18.2 항체-ADC 조성물을 함유하는 용액 CLDN18.2-ADC-07(DAR6)을 얻었다. DAR 값은 질량 분석법에 의해 5.6인 것으로 결정되었다.

실시에 1.4. 질량 분석법에 의한 접합체 샘플의 DAR 값 결정

LC-MS 분자량 및 DAR 값 분석은 하기 조건 하에서 CLDN18.2-ADC-07(DAR8)에 대해 수행되었다:

크로마토그래피 조건:

크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7 μ m, 4.6 $\times$ 150mm;

이동상 A: 0.1% FA/H₂O, 이동상 B: 0.1% FA/ACN;

컬럼 온도: 30℃;

샘플 챔버 온도: 8℃;

유속: 0.3mL/분; 및

샘플 주사 부피: 1 μ L.

시간(분)	1	5	7	7.1	10
이동상 A	90	40	10	90	90
이동상 B	10	80	80	10	10

샘플 처리: 50 μ g의 샘플을 취하고, 2 μ L의 1M DTT를 첨가하며, 초순수를 첨가하여 부피가 50 μ L로 되게 하여, 용액을 약 1.0mg/mL의 농도로 희석하였다. 용액을 잘 혼합하며 실온에서 30분 동안 환원시켰다.

LC/MS 모델: AB SCIEX X500 Q-TOF

질량 스펙트럼 조건: Gas1: 45; Gas2: 45; CUR: 30; TEM: 450; ISVF: 5000; DP: 120; CE: 12; 및 질량 수 범위: 600~4000.

결과는 아래의 표 9에 나타나 있다.

표 9

표 9. 이론 분자량 및 측정 분자량

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	이론 값	23426.6	24445	NA	NA
	측정 값	미검출	24444.4	미검출	미검출
HC	이론 값	50211.8	51229.2	52246.6	53264
	측정 값	미검출	미검출	미검출	53264.5

표 9에서 mAb는 비접합 모노클로날 항체를 나타내고; LC는 항체 경쇄를 나타내며; HC는 항체 중쇄를 나타내고; DAR1은 1개의 독소 분자에 접합된 경쇄 또는 중쇄를 포함하는 접합체를 나타내며; DAR2는 2개의 독소 분자에 접합된 경쇄 또는 중쇄를 포함하는 접합체를 나타내고; DAR3은 3개의 독소 분자에 접합된 경쇄 또는 중쇄를 포함하는 접합체를 나타내며; 여기서 모노클로날 항체의 이론 분자량은 GOF 글리코폼에 의해 계산된다. 하기 내용에

서, mAb, LC, HC, DAR1, DAR2 및 DAR3은 위에 기재된 바와 같다.

[0628] 검출 결과는 CLDN18.2-ADC(DAR8)에서 항체 경쇄가 0~1개 독소 분자(LC와 DAR1의 비율은 각각 0%와 100%임)에 접합되고, 항체 중쇄는 0~3개 독소 분자에 접합됨을 나타낸다(mAb, DAR1, DAR2 및 DAR3의 비율은 각각 0%, 0%, 0% 및 100%임). 따라서, CLDN18.2-ADC(DAR8)의 약물-대-항체 비율(DAR 값)은 8.0으로 계산되었다.

[0629] 유사하게도, 질량 분석법을 사용하여 다른 접합체 샘플에 대한 약물-대-항체 비율(DAR 값)을 결정할 수 있다.

[0630] 실시예 2. 항-Claudin18.2 항체 ADC 접합 및 평가

[0631] 실시예 2.1. 항-Claudin18.2 항체 ADC 접합

[0632] 실시예 1에 기재된 ADC 제조 방법에 따라, 25C7A5-HZ1, 25C7A5-HZ2 및 아이소타입 대조 IgG 항체를 사용하여 ADC를 구축하였다.

[0633] 1) 항체 사전처리: 0.1M EDTA 스톱 용액을 항체 부피의 1%로 첨가한 후, 1M 인산수소이나트륨 스톱 용액을 이용하여 샘플의 pH를 7.7 ± 0.2 로 조정하였다.

[0634] 2) TCEP 스톱 용액의 제조: 일정량의 TCEP-HCL을 칭량하며 80% TCEP 용매를 첨가하였다. 이후, 0.5M 수산화나트륨을 이용하여 pH를 7.7 ± 0.2 로 조정하고, 마지막으로 용액을 TCEP 용매로 부피를 조정하여 TCEP 농도가 20mM에 달하였다.

[0635] 3) 환원: 각 사전처리된 항체를 TCEP 스톱 용액에 1:4.4의 비율(항체-대-TCEP 몰비)로 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하고, 실온에서 0.5시간 동안 반응시켰다.

[0636] 4) 접합: 환원된 항체에 독소 링커를 1:12 비율(항체-대-독소 몰비)로 첨가하고, 얻어진 혼합물을 잘 혼합하고, 실온에서 2시간 이상 반응시켰다.

[0637] 5) 한외여과: 반응 용액을 한외여과 튜브를 사용하여 한외여과 완충제(10mM HCl-His, pH 5.5)로 교환한 후(각 농도별로 4 부피 이상의 완충제를 첨가하고, 완충제 교환을 3회 이상 수행), 소량의 완충제로 한외여과 막을 헹구어 샘플을 회수하였다.

[0638] 농도, 순도 및 DAR에 대해 접합체 샘플을 검출하였다. 결과는 표 10에 나타나 있으며, 이는 항체와 ADC의 접합 후 유의한 응집이 관찰되지 않고, SEC-HPLC로 결정한 바와 같이 순도는 98% 초과임을 나타낸다.

표 10

표 10. 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC의 검출 결과

번호	샘플 이름	SEC(%)	DAR
1	25C7A5-HZ1-B82	98.85	6.82
2	25C7A5-HZ2-B82	99.34	7.10
3	IgG-B81	98.4	8.00
4	25C7A5-HZ1-B81	98.4	7.97

*: 샘플 1-2와 샘플 3-4는 별도로 제조된 두 배치의 제조물임.

[0640] 실시예 2.2. 항-Claudin18.2 인간화 항체 및 ADC의 친화성 검출

[0641] 실시예 2.2에 기재된 바와 유사한 방법에 따라 독소에 대한 접합 전후 항체의 세포 결합 친화성을 검출하였다. L929-claudin 18.2(인간) 또는 NUGC4 세포를 트립신으로 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, 사전 냉각된 PBS로 3회 세척하고, 재현탁시키며, 5×10^4 개 세포/웰로 96-웰 플레이트에 첨가하고, 밤새 인큐베이션하였다. 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 2% BSA(PBS에서)로 37℃에서 2시간 동안 차단하였다. 구배 희석을 거

친 각 ADC 약물 또는 항체를 첨가하며, 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. HRP 표지된 항-인간 2차 항체(Jackson, 109-035-088)를 첨가한 후, 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 발색을 위해 TMB 기질을 첨가하고 2M HCl로 반응을 정지시킨 후 마이크로플레이트 리더에서 OD_{450nm} 값을 판독하였다.

[0642] 실험 결과는 도 8A 및 도 8B에 나타나 있으며, 이는 접합 전후 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2의 세포에 대한 친화성에 유의한 변화가 없음을 나타낸다.

[0643] 실시예 2.3. ADC에 대한 체외 사멸 활성 분석

[0644] HEK293T-claudin 18.2(인간) 세포, HEK293T-claudin 18.1(인간) 세포 및 NUGC4-Claudin18.2 세포를 트립신으로 소화시키고, 원심분리에 의해 수집하며, DME + 2% FBS에 재현탁시키고, 10000개 세포/웰로 플레이팅하였다. 각 시험 항체 ADC 약물을 DME + 2% FBS로 구매 희석을 거치게 하여 플레이트에 첨가하며 혼합물을 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 완료된 후 CCK8 시약을 20 μL/웰로 첨가하여 2시간~4시간 동안 반응시켰다. 마이크로플레이트 리더에서 450nm에서 판독 값을 취득하고 곡선 피팅을 위해 Graphpad Prism으로 가져왔다.

[0645] 실험 결과는 도 9A 내지 도 9E에 나타나 있으며, 이는 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2의 접합에 의해 형성된 ADC가 HEK293T-claudin18.2 세포 및 NUGC-4-Claudin18.2 세포를 사멸시키는 데 모두 효과적인 한편, 접합된 25C7A5-HZ1 및 25C7A5-HZ2는 HEK293T-claudin18.1 세포를 실질적으로 사멸시키지 않음을 나타내고, 이는 접합된 ADC가 claudin18.1을 비특이적으로 식별하지 않고 양호한 안정성을 가짐을 나타낸다.

[0646] 실시예 2.4. ADC의 체내 효능

[0647] 항-Claudin18.2 인간화 ADC 약물의 체내 효능을 검증하고, 피하 이종이식된 인간 위암 세포 NUGC-4(Nanjing Cobioer)를 갖는 암컷 Balb/c 누드 마우스 모델에서 시험 약물의 항종양 효과를 평가하기 위해,

[0648] 5주령~6주령의 암컷 Balb/c 누드 마우스(Vital River)를 구입하였다. 대수 성장기에 처 있는 NUGC4 세포를 EDTA로 소화시키고 PBS에 재현탁시켜 각 마우스에 5×10^6 개 세포를 피하 접종하였다. 종양의 크기가 100~200mm³로 성장하였으면, ADC 약물을 10mg/kg으로 주 1회 정맥내 투여하였다. 구체적인 요법은 아래의 표 7에 나타나 있다. 실험의 주요 관찰 지표는 하기와 같다: 1) 상대 종양 증식률, T/C(%), 즉, 특정 시점에 치료군과 대조군의 상대 종양 부피 또는 종양 중량의 백분율 값: $T/C(\%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ (TRTV: 치료군의 평균 RTV; CRTV: 대조군의 평균 RTV; $RTV = V_t / V_0$, V_0 은 그룹화 시의 동물의 종양 부피이고, V_t 는 치료 후 동물의 종양 부피임); 또는 $T/C\% = TTW / CTW \times 100\%$ (TTW: 실험 종료 시 치료군의 평균 종양 중량; CTW: 실험 종료 시 대조군의 평균 종양 중량). 2) 상대 종양 억제, TGI(%), 다음과 같이 계산: $TGI(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$ (T 및 C는 특정 시점에 치료군 및 대조군 각각의 상대 종양 부피(RTV) 또는 종양 중량(TW)임). 3) 실험 종료 시 종양 부피 크기 및 종양 중량을 나타내는 사진. 4) 마우스의 체중에 대한 ADC 약물의 효과.

표 11

표 11. 항-Claudin18.2 인간화 항체 ADC의 체내 효능에 대한 실험 프로토콜

모델	군	수	샘플	용량(mg/kg)	투여 경로	투여 요법
NUGC-4	1	5	대조	/	i.v.	QW*3주
	2	5	IgG-B81	10	i.v.	QW*3주
	3	5	25C7A5-hz1-B81	10	i.v.	QW*3주
	4	5	25C7A5-hz1	10	i.v.	QW*3주

[0650] 실험 결과는 도 10 및 도 11에 나타나 있으며, 이는 25C7A5-hz1-B81이 NUGC-4 CDX 모델에서 유의한 효능을 나타내며(도 10); 또한, 약물이 부작용 없이 전체적으로 마우스에게 잘 받아들이는 것을 나타낸다(도 11).

서열 목록:

서열 번호:	설명	서열
1	25C7A5-H21의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVQSGAEVKFPGSSVKVSCKASGYTFTHNWLHWVRQAPGQGLEWMG MMHPISGSSNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAR GLLSAMDYWGQGITLVTVSS
2	25C7A5- H21/25C7A5-H22의 경쇄 가변 영역 (VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASEINVKTVSWYQQKPGQSPRLLIY EASINRYTGVPARFSGSGSATDFTLTITSSLEPEDFAVYFCQTYSPPTF GQGTEVEIK
3	25C7A5-H22의 중쇄 가변 영역(VH)	QVQLVESGAEVKFPGSSVKVSCKASGYTFTHNWLHWVRQAPGQGLEWMG MMHPISGSSNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAR GLLSAMDYWGQGITLVTVSS
4	인간 IgG1 중쇄 불 변 영역 서열	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVIDVFPFPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKEV EPKSCDKTHITCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPETCVVV DVSHEDPEVKFIVVVDGVEVHNAKTEPREEQVNSYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEINVKYTPPVLDSDGSEFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	인간 Kappa 경쇄 불변 영역 서열	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWIKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADVEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFIRGEC
6	25C7A5의 IMGT 중 쇄 CDR1	GYTFTHNW
7	25C7A5의 IMGT 중 쇄 CDR2	MHPISGSS

[0651]

8	25C7A5의 IMGT 중쇄 CDR3	ARGLLSAMDY
9	25C7A5의 IMGT 경쇄 CDR1	ENVKTY
10	25C7A5의 IMGT 경쇄 CDR2	EAS
11	25C7A5의 IMGT 경쇄 CDR3	GQTYSPFPPT
12	25C7A5의 Kabat 중쇄 CDR1	NYWLH
13	25C7A5-H21/2의 Kabat 중쇄 CDR2	MMHPISGSSNYAQKFQG
14	25C7A5의 Kabat 중쇄 CDR3	GLLSAMDY
15	25C7A5의 Kabat 경쇄 CDR1	KASENVKITYVS
16	25C7A5의 Kabat 경쇄 CDR2	EASNYRT
17	25C7A5의 Kabat 경쇄 CDR3	GQTYSPFPPT
18	25C7A5-H21의 중쇄 온전한 서열	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTINWLHWVRQAPGQGLEWMG MMHPISGSSNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GLLSAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVTFNWYVDGVEVHIAKTKFREE QVNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESNGQPENNYK

[0652]

		TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG/NFSCSVMEALH/HTQKSL SLSPGK
19	25C7A5-HZ2의 중쇄 온전한 서열	QVQLVESGAEVEKPGSSVKVSKASGYTFDNNWLHWVRQAPGQGLEWMGM MHPISGSSNVAQKFGGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGL LSAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NNVHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHIAIKTQFREEQYNTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSIKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYT LPFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG/NFSCSVMEALH/HTQKSLSLSPGK
20	25C7A5- HZ1/25C7A5-HZ2의 경쇄 온전한 서열	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASEINVKTVSWYQQKPGQSPRLLIY EASINRYTGVPARFSGSGSATDFTLTISSELEPEDFAVYFCGQTYSPPTF GQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
21	25C7A5의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	EVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYTFDNNWLHWVRQAPGQGLEWIG MHPISGSSNNERFKSKATLTVDKSTSTAYMQLSRITSEDAVYYCAR GLLSAMDYWGQGTSTVTVSS
22	25C7A5의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	CIVLTQSPKSMMSVGERVTLSCKASEINVKTVSWYQQRPQSPKLLIY EASINRYTGVPDRFTGSGSATVFTLTISSVQTEDLANFVCGQTYSPPTF GSGTKLEIK
23	2D3A11의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	EVQLQQSGPELVKPGASVRLMSCKASGYTFSTVYVHWVKQKPGQGLEWIG YINFPYNADSKYNERFKGKATLTSDKSSNYSAYMELSSLTSEDAVYYCSR SVYGHISFDVWGAGTTVTVSS
24	2D3A11의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	DIVMTQSPSSLTVTTGERVTMSCKSSQSLNLSGNIQKNTLWYQQKPGQSP KLLFFWASTRQSGVPDRFTGSGSGTYFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDIYF PFTFGTGKLEIK

[0653]

25	25C7A5의 Kabat 중 쇄 CDR2	MDHPISGSSNNERFKS
26	2D3A11의 Kabat 중 쇄 CDR1	SVVH
27	2D3A11의 Kabat 중 쇄 CDR2	YINPYNADSKYNERFKG
28	2D3A11의 Kabat 중 쇄 CDR3	SYYGNSFDV
29	2D3A11의 IMGT 중 쇄 CDR1	GYTFTSYV
30	2D3A11의 IMGT 중 쇄 CDR2	INPYNADS
31	2D3A11의 IMGT 중 쇄 CDR3	SRSYYGNSFDV
32	2D3A11의 Kabat 경 쇄 CDR1	KSSQSLNLSGNQKDYLT
33	2D3A11의 Kabat 경 쇄 CDR2	WASTRQS
34	2D3A11의 Kabat/IMGT 경쇄 CDR3	QNDYVFPPT
35	2D3A11의 IMGT 경 쇄 CDR1	QSLNLSGNQKDY
36	2D3A11의 IMGT 경 쇄 CDR2	WAS
37	2D3A11-HZ1/2의 Kabat 중쇄 CDR2	YINPYNADSKYSQEFQG

[0654]

38	2D3A11-HZ1의 중쇄 가변 영역 (VH)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMG YINPYNADSKYSQEFQGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSR SYYGISFDTWGQGLTVTVSS
39	2D3A11- HZ1/2D3A11-HZ2의 경쇄 가변 영역 (VL)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLINSGVQKINLTWYQQKPGQS PKLLFFWASTRQSGVDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYQIDY YFPFTFGQGTKVEIK
40	2D3A11-HZ2의 중쇄 가변 영역 (VH)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMG YINPYNADSKYSQEFQGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSR SYYGISFDTWGQGLTVTVSS
41	2D3A11-HZ1의 중쇄 온전한 서열	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMG YINPYNADSKYSQEFQGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSR SYYGISFDTWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKESCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHIAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
42	2D3A11-HZ2의 중쇄 온전한 서열	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMG YINPYNADSKYSQEFQGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSR SYYGISFDTWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKESCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHIAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

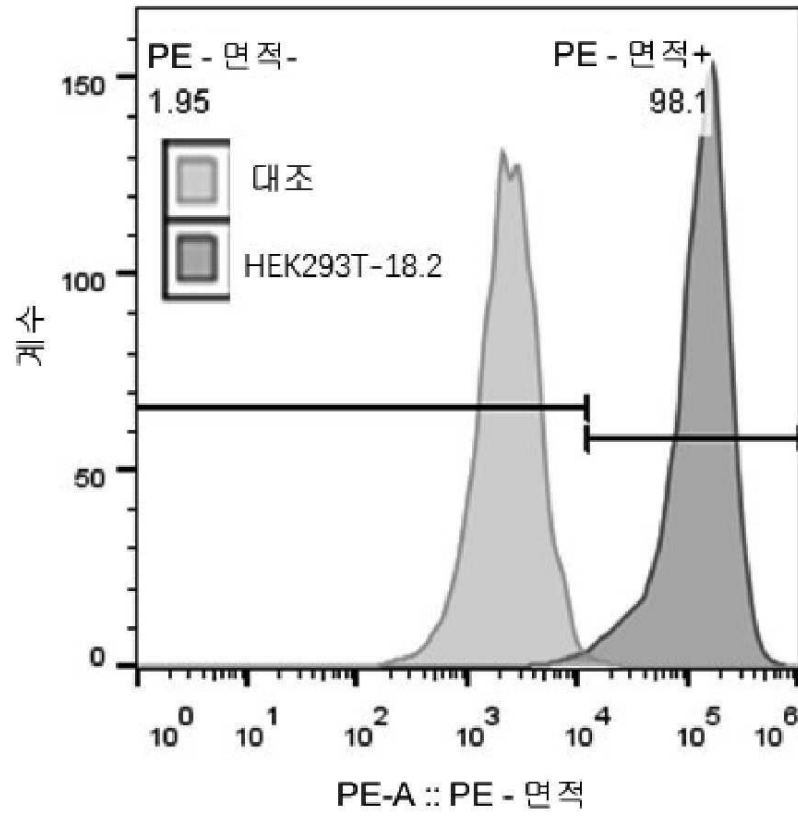
[0655]

		LSLSPGH
43	2D3A11-HZ1/2D3A11-HZ2의 경쇄 온전한 서열	DIVMTQSPFSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGIGNYLWYQQKPGQS PKLLFFWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDY VFPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWVNDNALQSGHNSQESVTEQDSKEDSTYSLSSLTTLKADYERHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
44	SH11A10의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	QVQLKESGPNLVAPSSQLSITCTVSGFSLTNGVHWVRQPPGKLEWLG VIWSGGRDYNNSALMSRLSISKDNSSKQVFLKMDISLQTDDTAMVYCAKR DGIYGDYWGQGTSTVTVSS
45	SH11A10의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	DIVETQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGIGNYLWYQQKPGQS PELLIYWASTRESGVDRFTGSGGTFDLTISVQAEDLAVYYCQNDY IYPLTFGAGTKLELK
46	1A6G10의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	QVQLKESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQTPKRLWVA AIHNSGGSTYNSDTMRDRFTISRDAHNLTLQMSSLSRSEDALVYCGR QSGFGLDIWGQGTSTVTVSS
47	1A6G10의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	DIQMTQSPFSLTVTAGEKVTLCSSQSLNSGIGNYLWYQQKPGQF PKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTFFTLTISVQAEDLAVYFCQNDY VYPTFGAGTQLELK
48	23F2F2의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	QVQLKESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMHWVRQSPKRLWVA EIRNKADYHATHYVESVTGRFTISRDDSKSSVYLQMRLRAEDTGIIYC TRNNGSRFDYWGQGTTLTVSS
49	23F2F2의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	DIVETQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGIGNYLWYQQKPGHFP KLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTVTSVQAEDLAVYYCQNDYFY PLAFGTGKLELK
50	40G11H의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	EVQLQQSGAELARFGASVELSCKASGYTFTSYGIRWVRQRTGQGLEWIG EIIYPRGGNTYYDEHFKGKATLTADKSSSTAYMGLRSLTSEDSAVYFCAR ADYGHISFAYWGQGTLLTVSA
51	40G11H의 경쇄 가	DIVMTQSPSSLTVTAREKVTMSCKSSQSLNSGIGNYLWYHQKPGQF

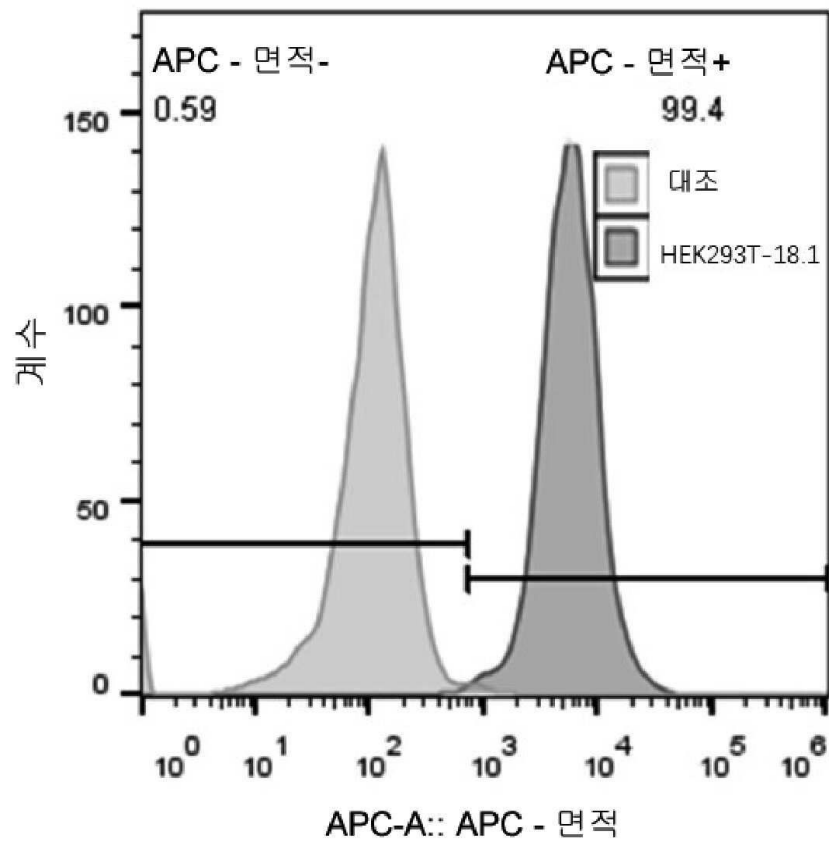
	변 영역(VL) 서열	PKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYFCQNAV FVPTFGTGKLEIK
52	32F7A6의 중쇄 가 변 영역(VH) 서열	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGYTFTAYTMGWVKQAPGKLEWMA WINDYSGVPTYAADFKGRFAFSLETSAAYLLINNLEKIEDATYFCAR GVRGHSMDYWGQGTSTVTVSS
53	32F7A6의 경쇄 가 변 영역(VL) 서열	DIVETQSPSSLTVTGERVTLSCSSQSLNSGIGNYLWYQQKPGQF PKLLIYWASTRESGVNRFTHGGGSGTYFTLTISVQVEDLAVYYCQNTY SFPFTFGTGKLEIK

도면

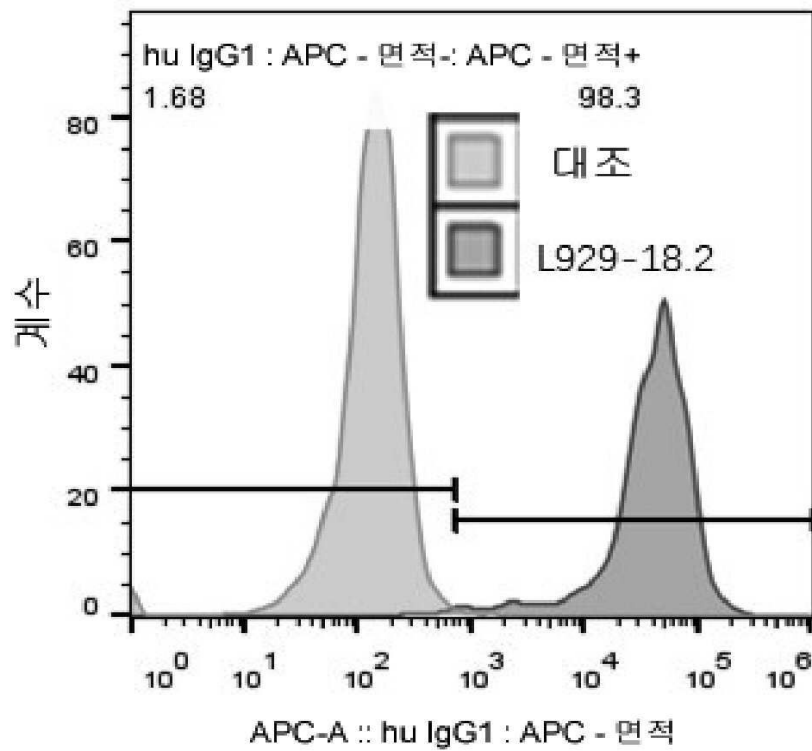
도면1a



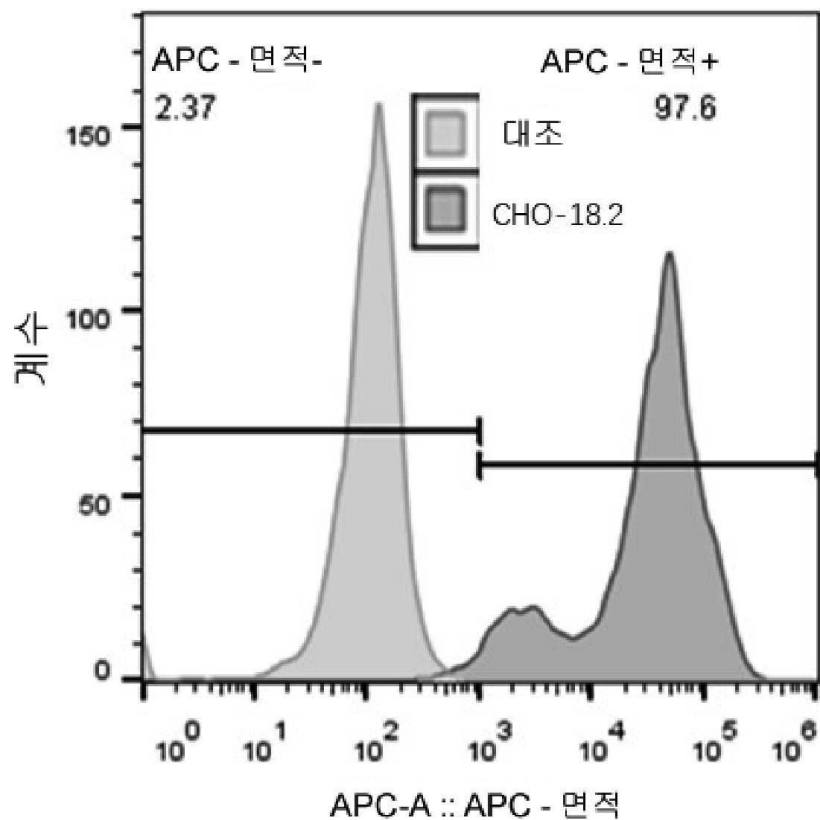
도면1b



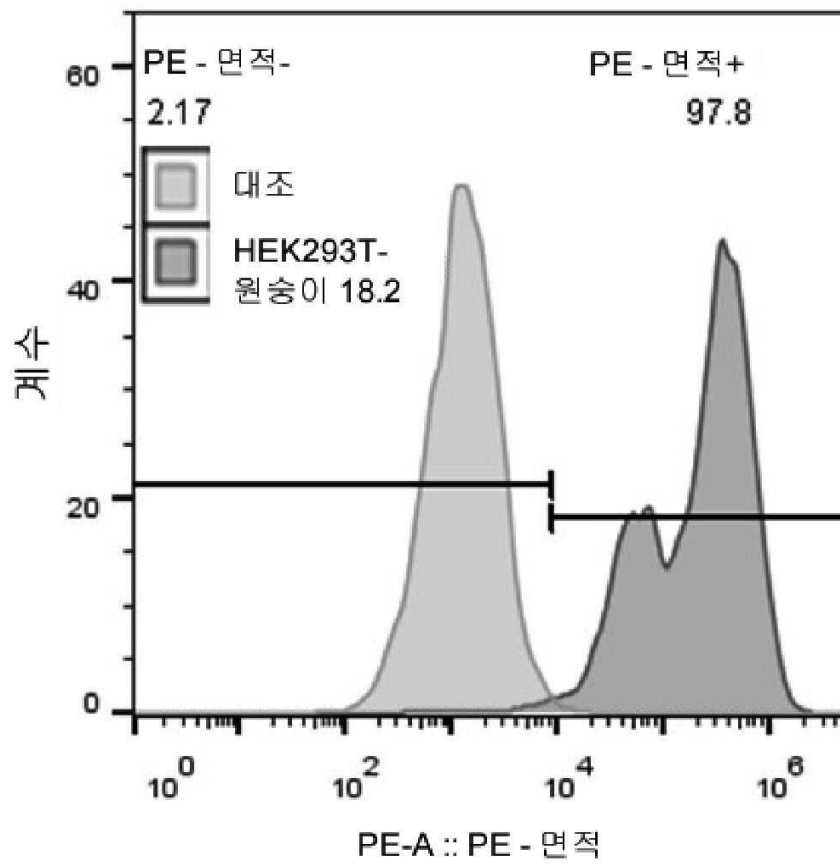
도면1c



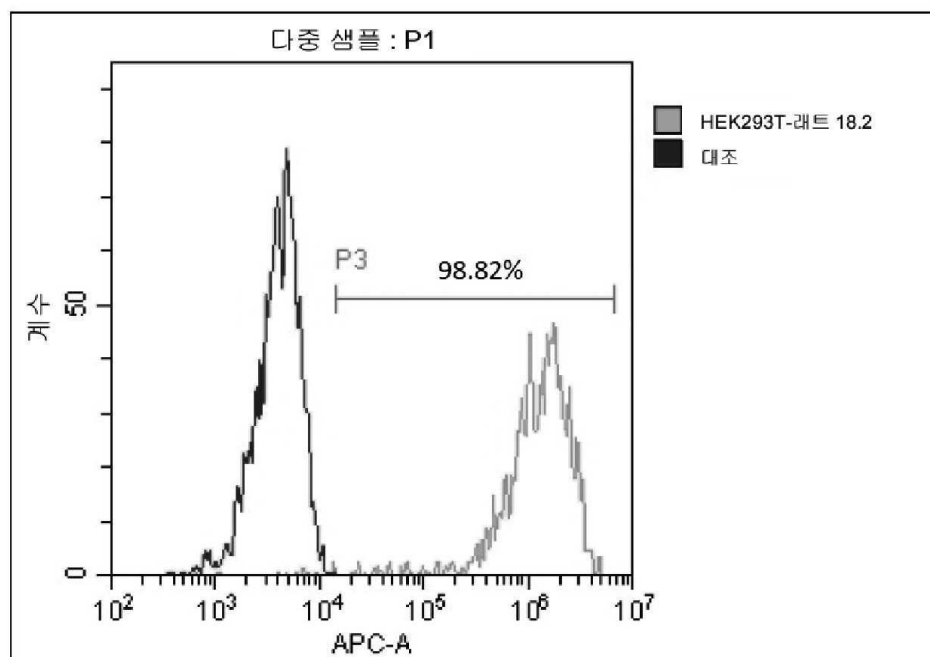
도면1d



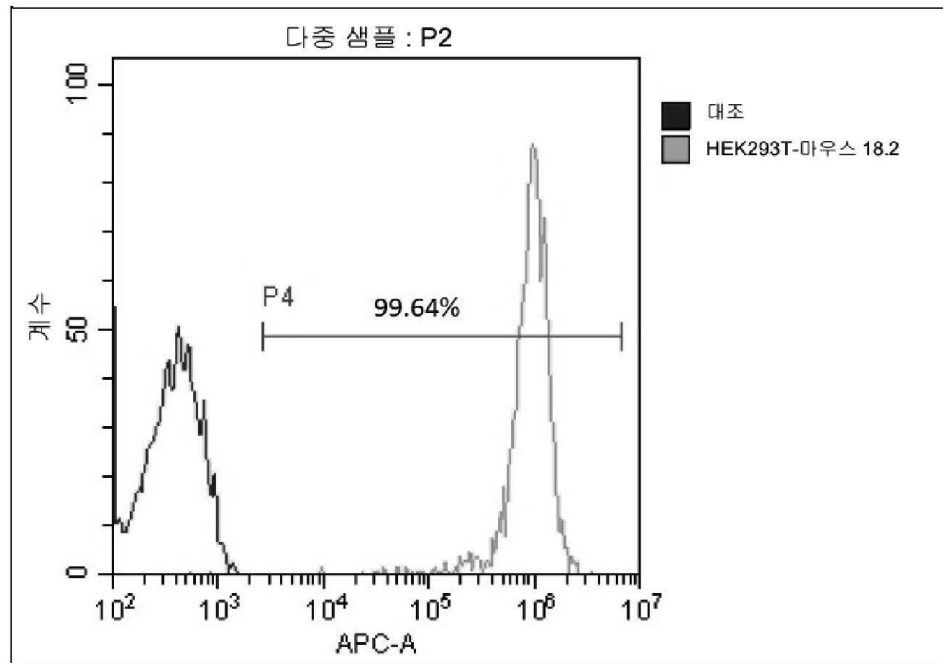
도면1e



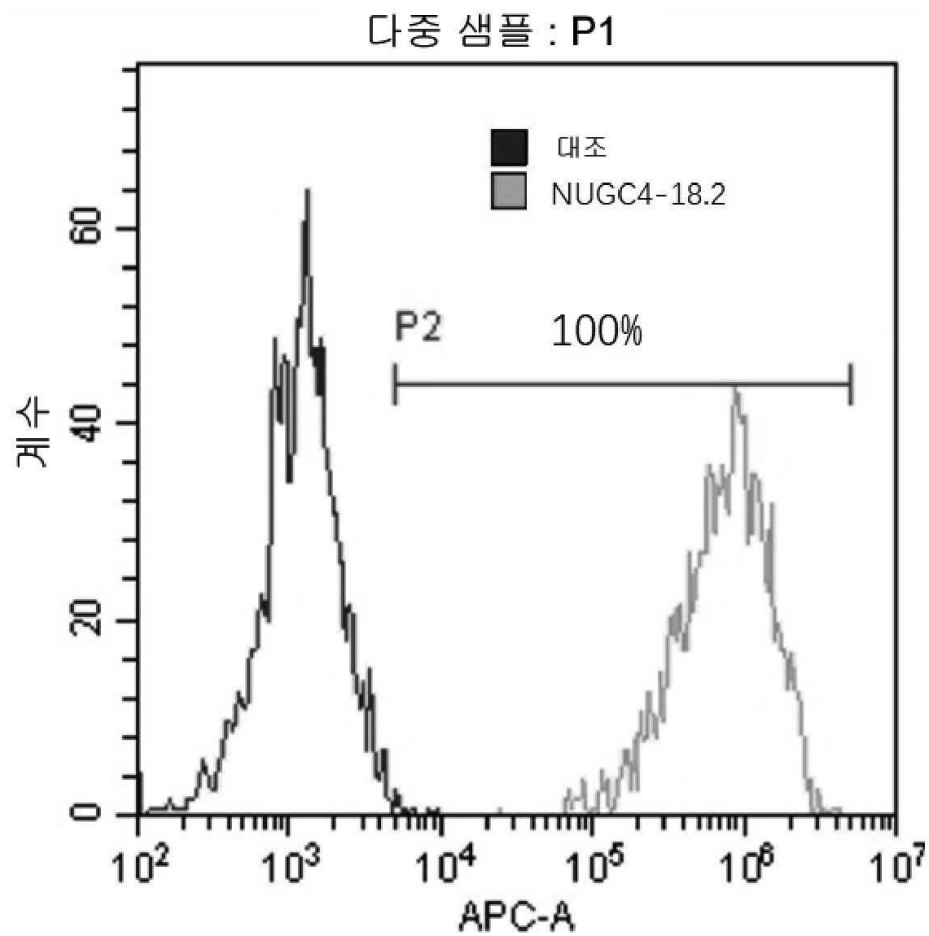
도면1f



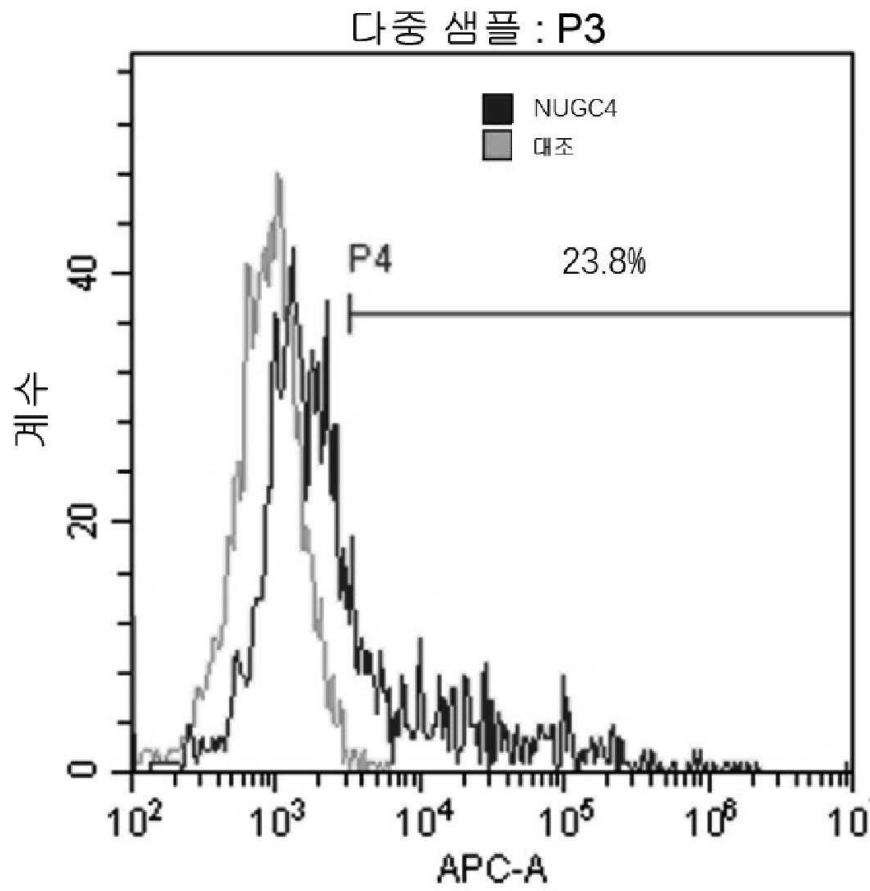
도면1g



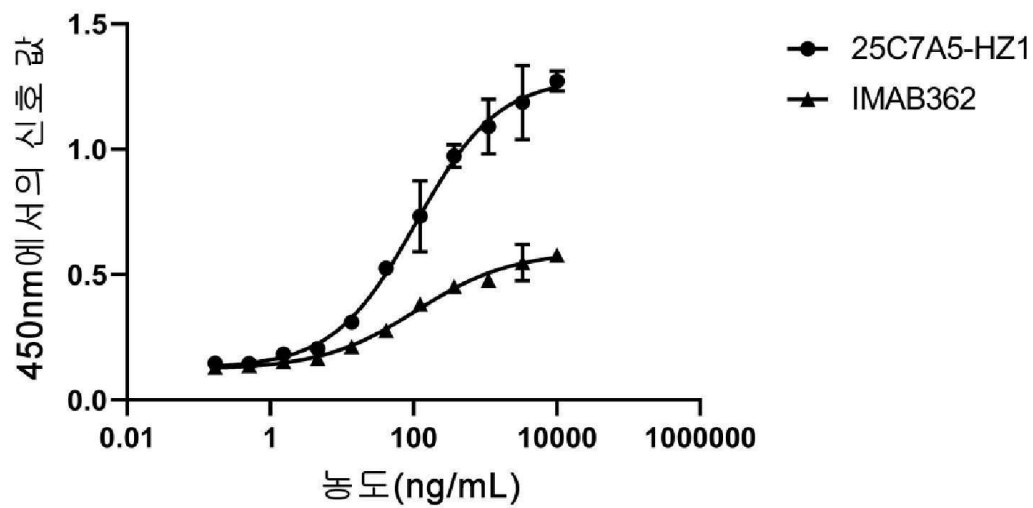
도면1h



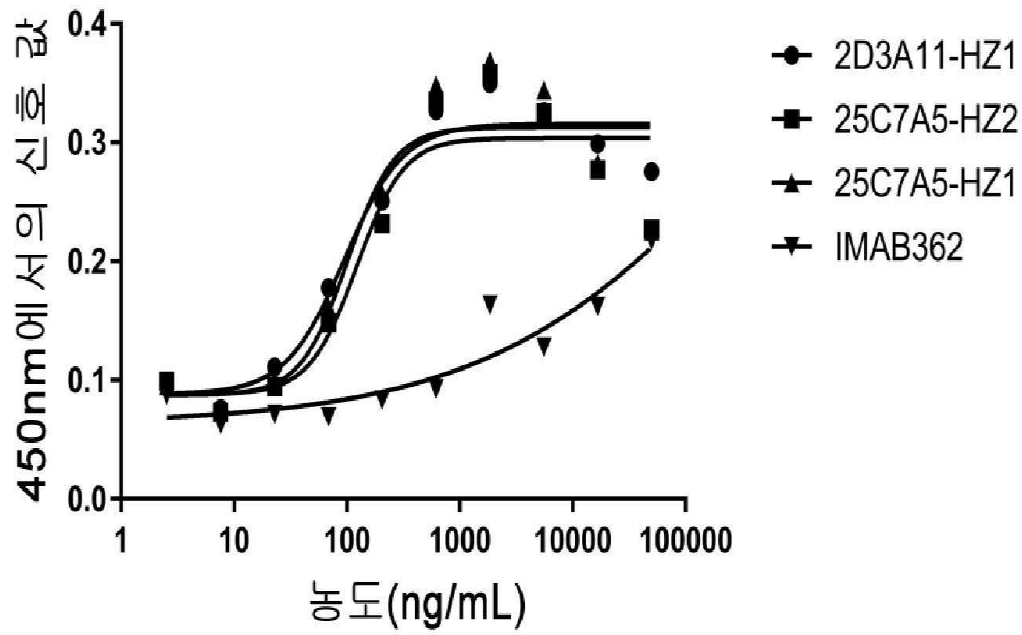
도면1i



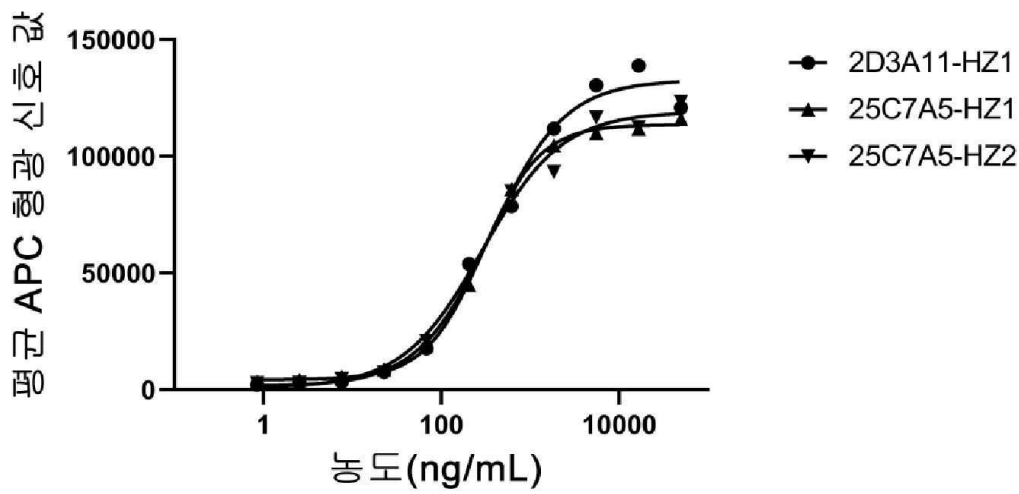
도면2a



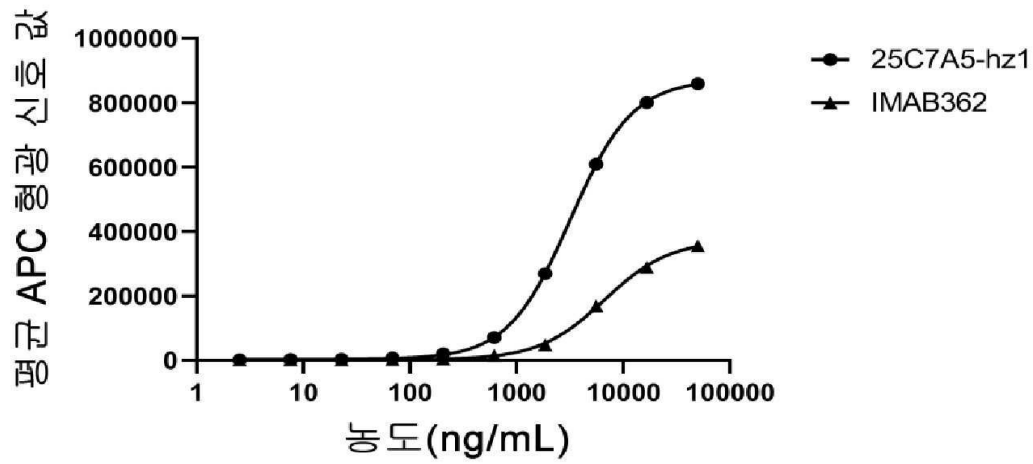
도면2b



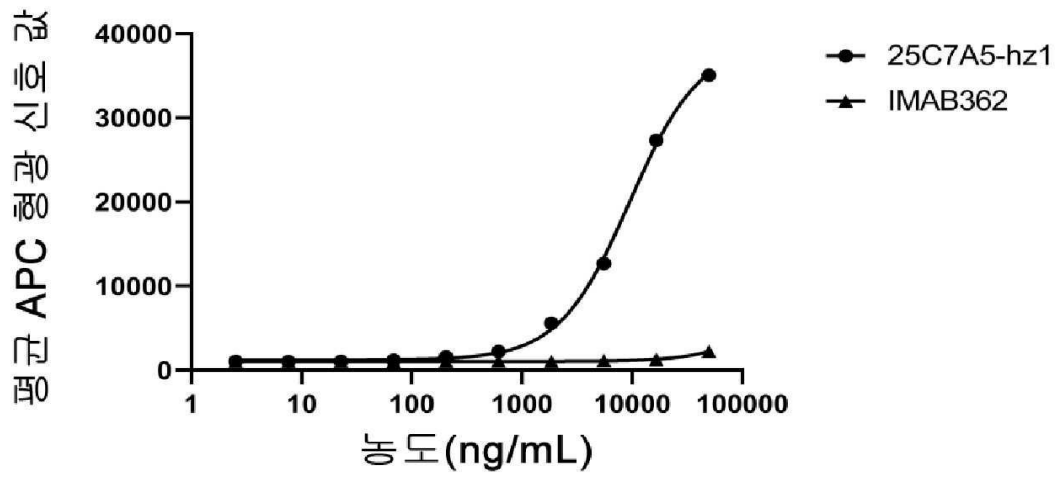
도면3a



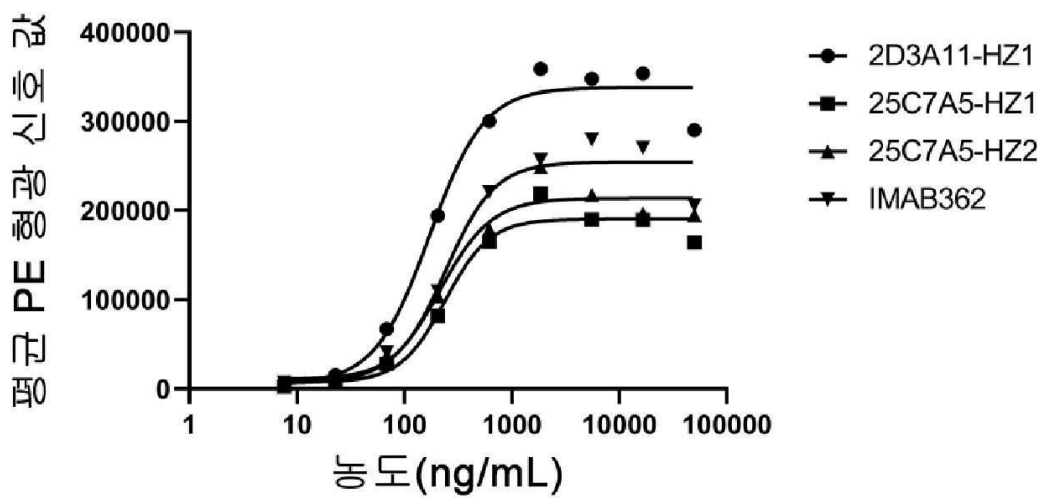
도면3b



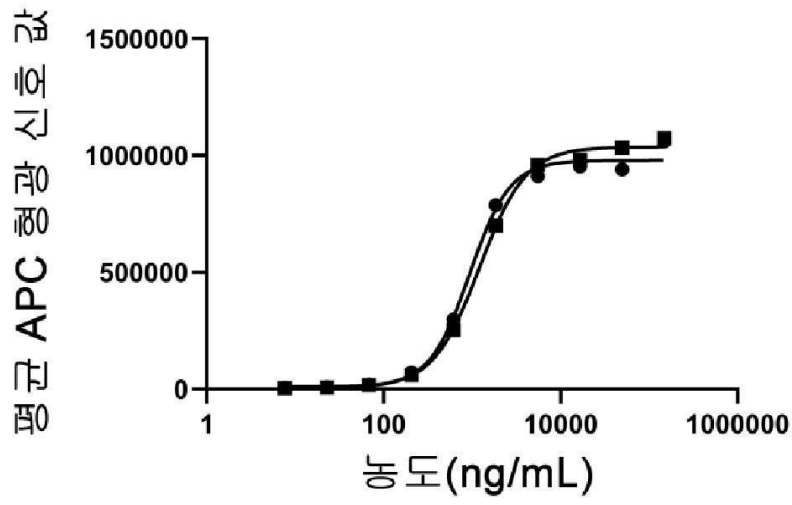
도면3c



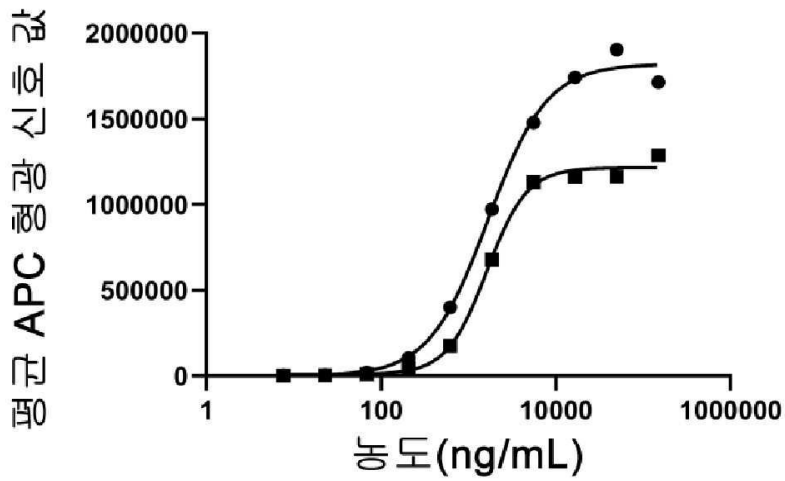
도면4a



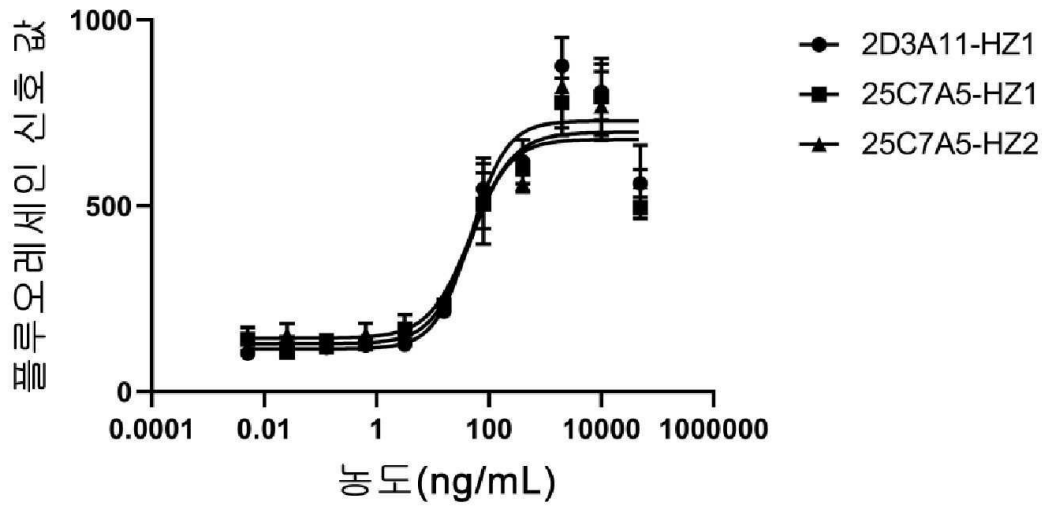
도면4b



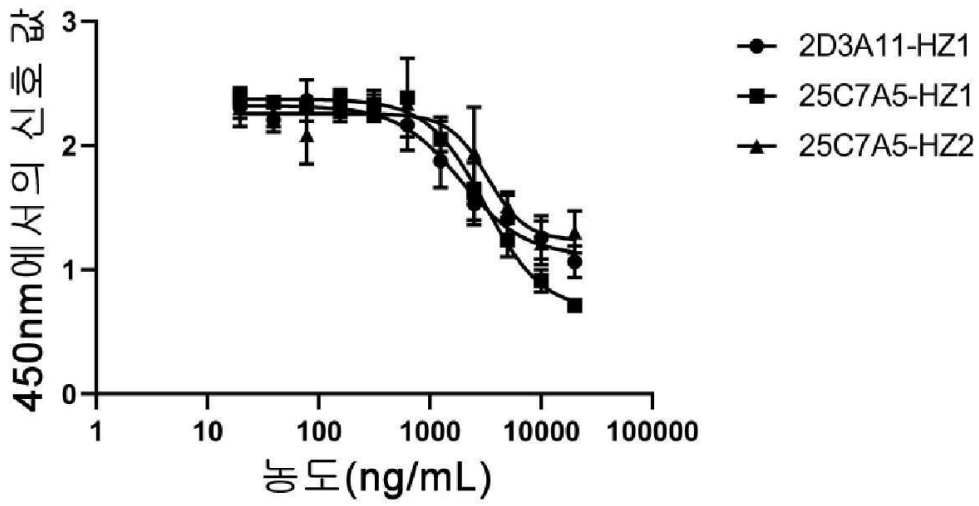
도면4c



도면5

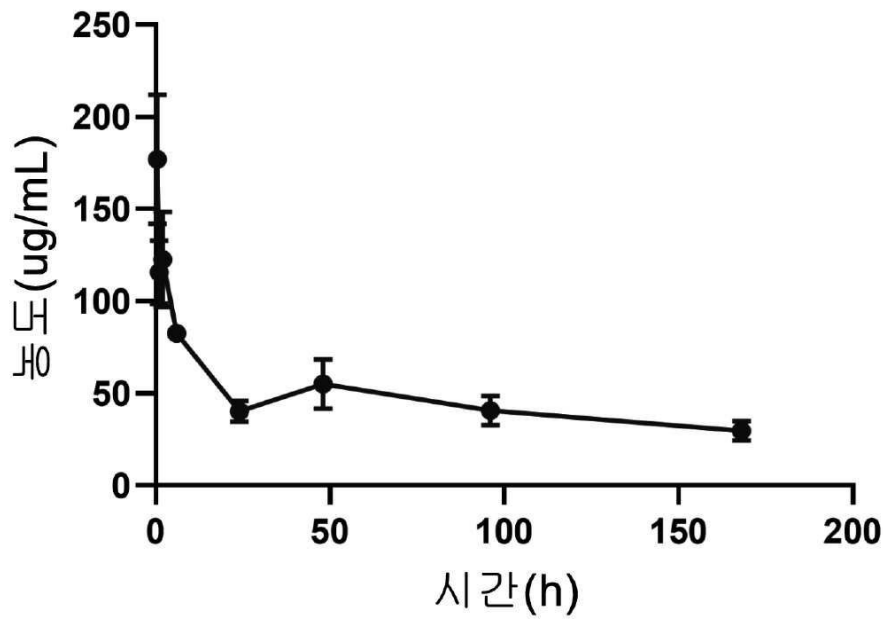


도면6



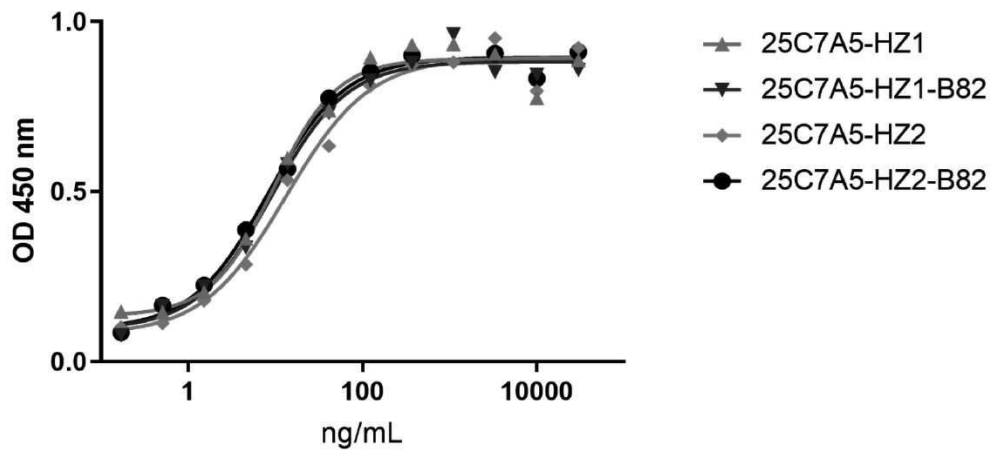
도면7

SBWB003 래트 PK-25C7A5-hz1



도면8a

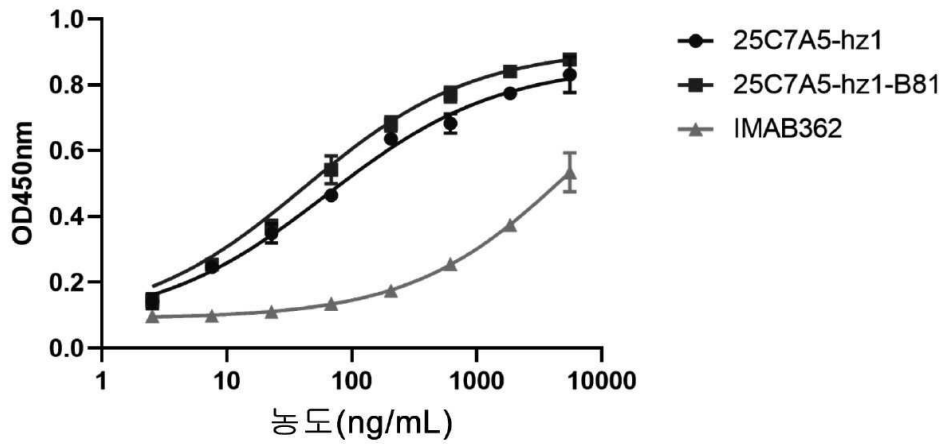
L929-18.2 세포에 대한 mAb 및 ADC 결합



	HillSlope	EC50
25C7A5-HZ1	1.204	9.608
25C7A5-HZ1-B82	1.012	9.107
25C7A5-HZ2	0.9072	13.31
25C7A5-HZ2-B82	0.9894	8.257

도면8b

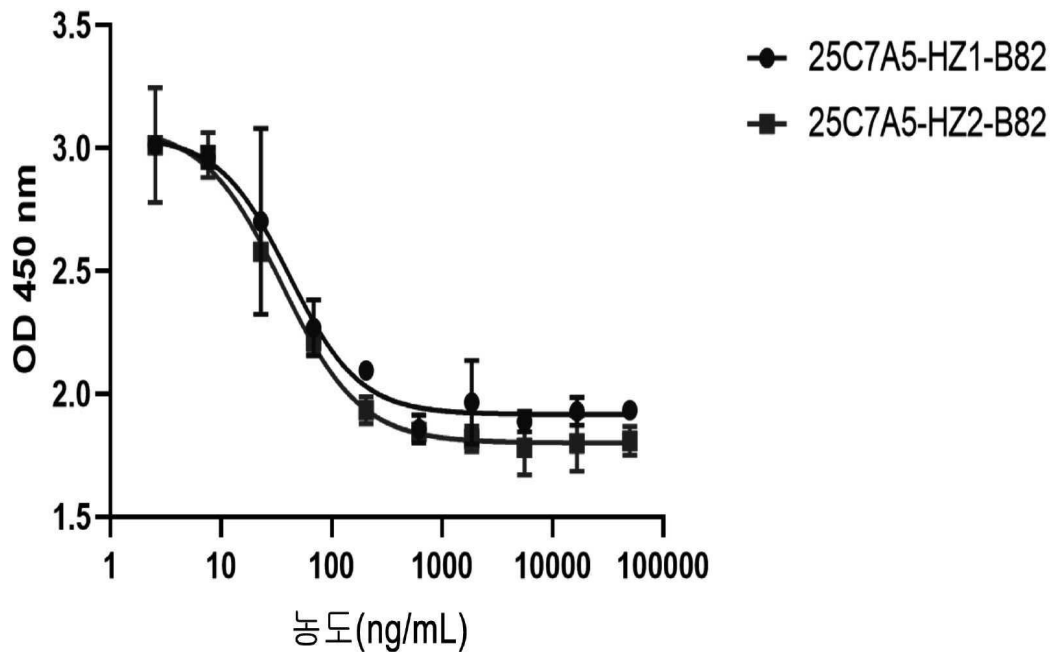
NUGC-4 세포에 대한 mAb 및 ADC 결합



	25C7A5-hz1	25C7A5-hz1-B81	IMAB362
HillSlope	0.6313	0.6471	0.6696
EC50	63.22	42.23	5978

도면9a

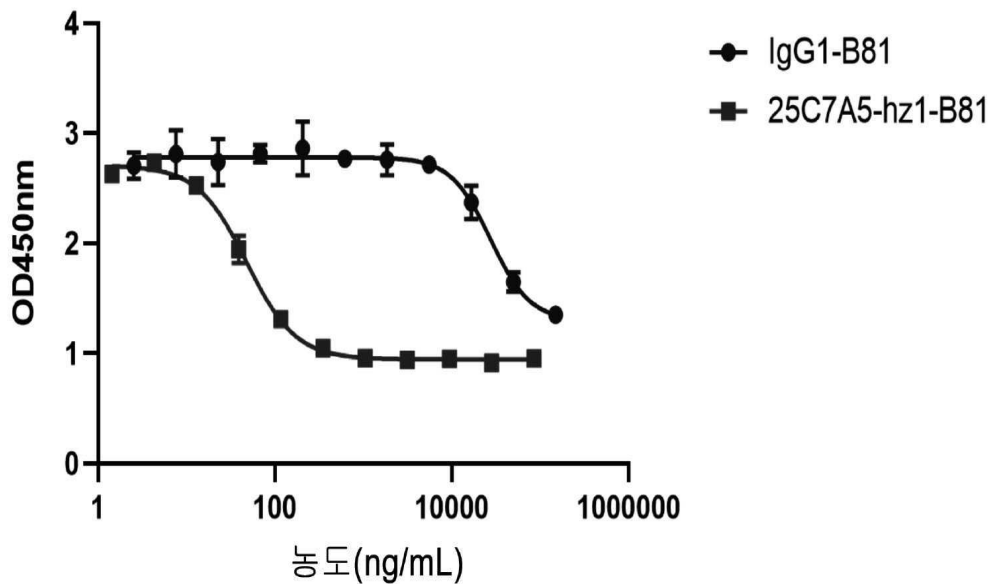
HEK293T-18.2 세포를 사멸시키는 ADC 후보



	25C7A5-HZ1-B82	25C7A5-HZ2-B82
EC50	41.26	35.53

도면9b

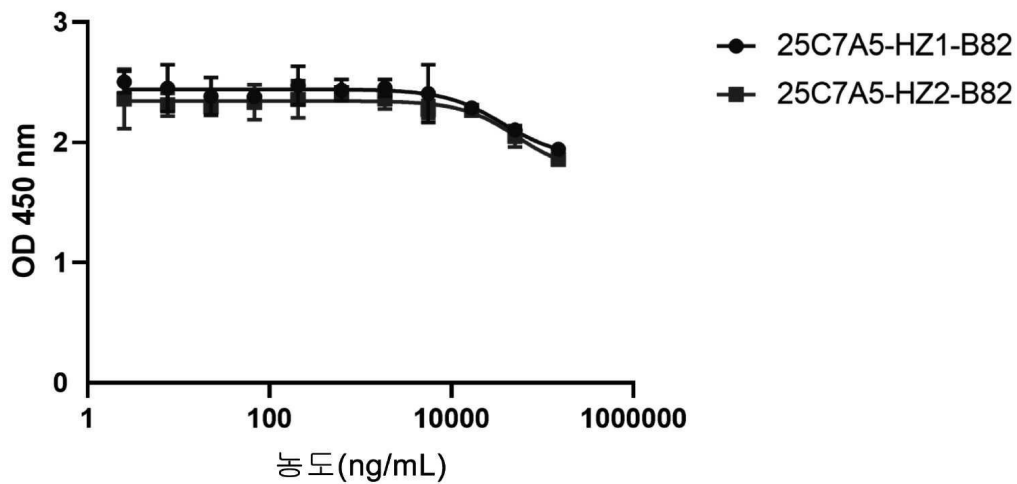
HEK293T-claudin18.2 세포를 사멸시키는 ADC 후보



	IgG1-B81	25C7A5-hz1-B81
HillSlope	-1.933	-1.560
EC50	27438	48.08

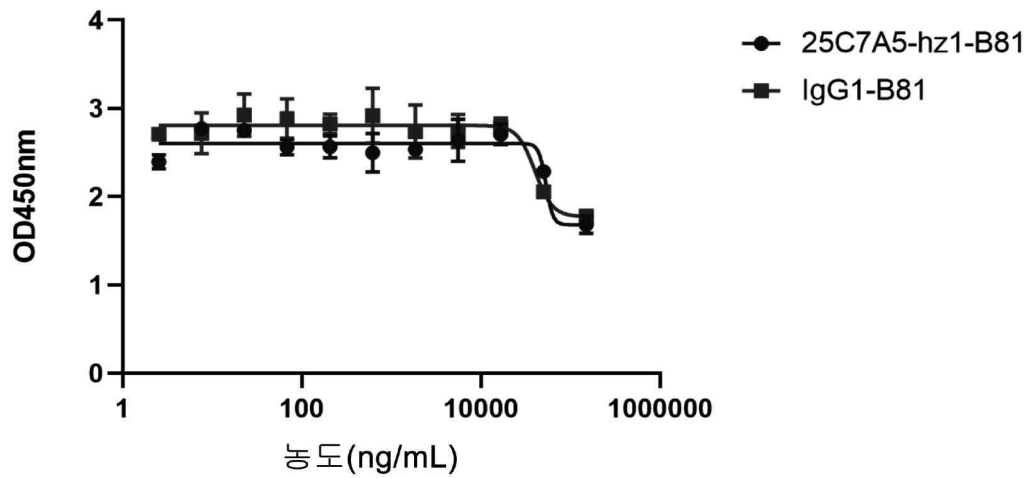
도면9c

HEK293T-18.1 세포를 사멸시키는 ADC 후보

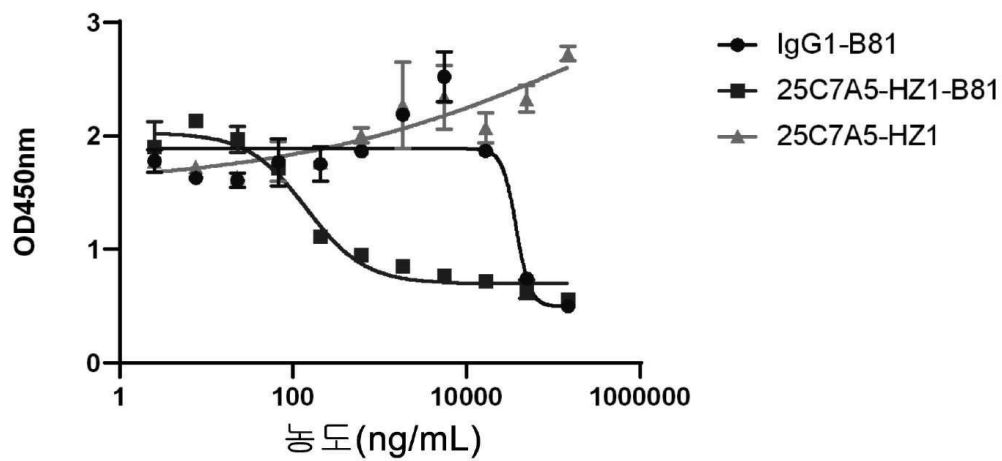


도면9d

HEK293T-claudin18.1 세포를 사멸시키는 ADC 후보

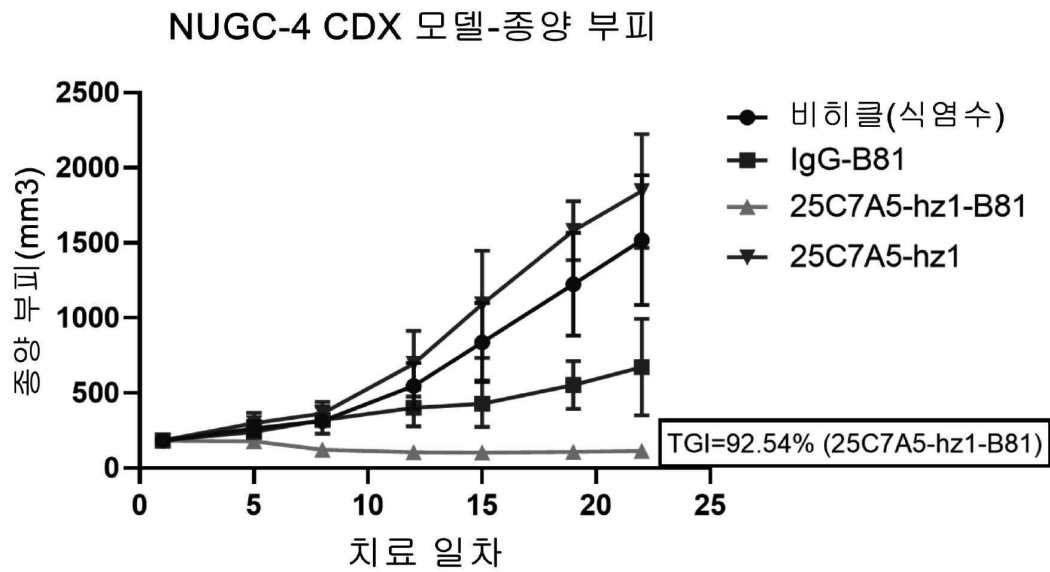


도면9e

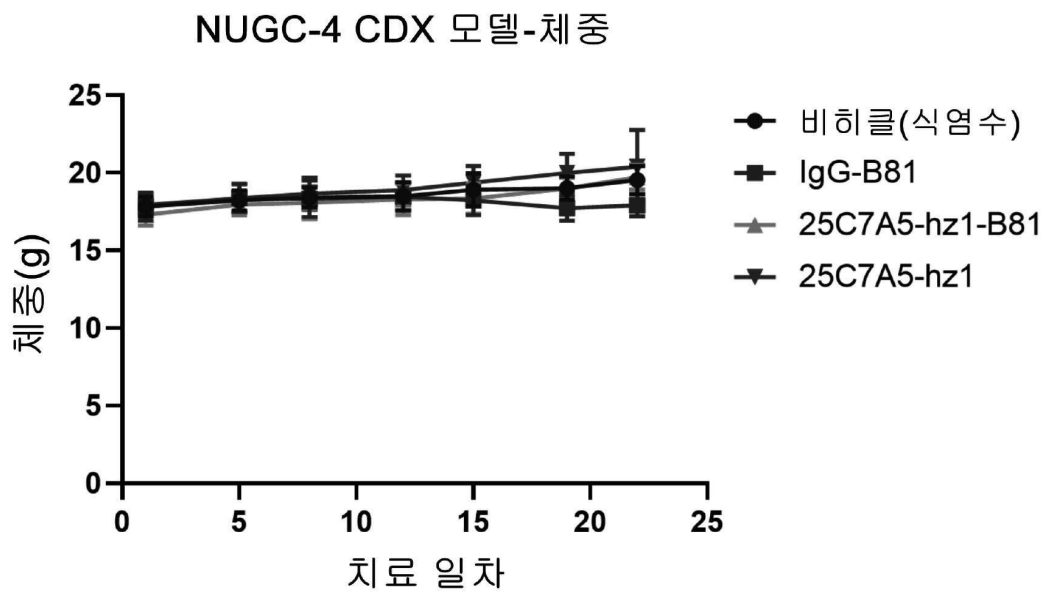


	IgG1-B81	25C7A5-HZ1-B81	25C7A5-HZ1
HillSlope	-5.407	-1.283	0.2402
EC50	37562	143.4	490530

도면10



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.