



등록특허 10-2070464



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월29일
(11) 등록번호 10-2070464
(24) 등록일자 2020년01월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 403/06 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7033963
- (22) 출원일자(국제) 2012년05월24일
심사청구일자 2017년05월18일
- (85) 번역문제출일자 2013년12월20일
- (65) 공개번호 10-2014-0036252
- (43) 공개일자 2014년03월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/039312
- (87) 국제공개번호 WO 2012/162482
국제공개일자 2012년11월29일
- (30) 우선권주장
61/490,117 2011년05월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020100093578 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
브리스톨-마이어스 스큘 컴퍼니
미국 뉴저지 (우편번호 08540-4000) 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 피.오. 박스 4000
- (72) 발명자
장, 첸
미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521 브리스톨-마이어스 스큘 컴퍼니 내
개워, 샌지브
미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521 브리스톨-마이어스 스큘 컴퍼니 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 7 항

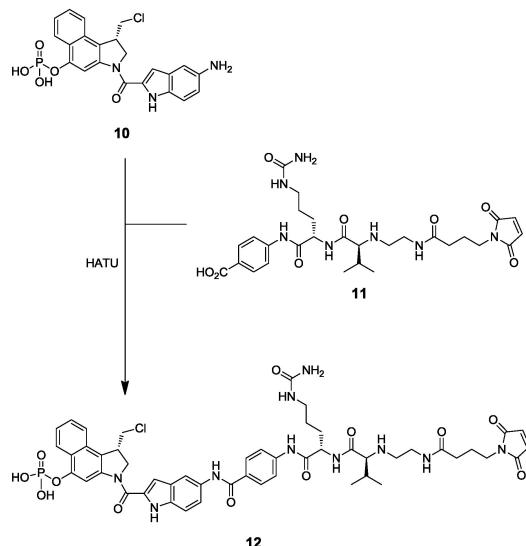
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 면역접합체, 그를 함유하는 조성물, 및 제조 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 화학식 I (여기서 X는 친핵성으로 대체가능한 이탈 기임)의 포스페이트-전구약물화 DNA 마이너 그루브 결합제가 항체 또는 항체의 항원 결합 단편에 접합된 면역접합체, 및 이러한 면역접합체를 제조하는 데에 사용될 수 있는 화합물, 및 상기 면역접합체의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1b



(72) 발명자

챈, 친

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라
이브 521 브리스톨-마이어스 스윕 컴퍼니 내

더원, 대니얼 더블유.

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라
이브 521 브리스톨-마이어스 스윕 컴퍼니 내

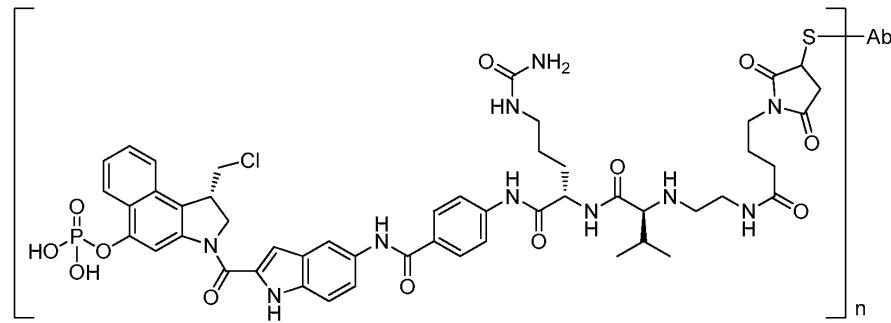
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 IIIa'에 따른 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 갖는 면역접합체:

<화학식 IIIa'>



상기 식에서,

n은 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

Ab는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 나타낸다.

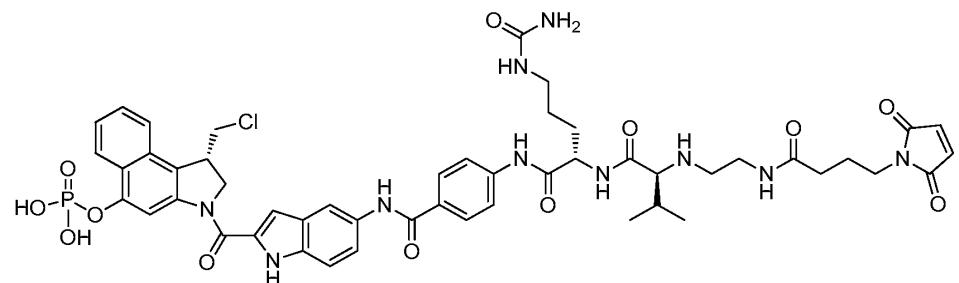
청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 CD70, 메소텔린, PSMA, CD19, 글리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 및 PTK7로 이루어진 군에서 선택된 인간 항원을 인식하는 인간 모노클로날 항체인 면역접합체.

청구항 3

하기 화학식 IIa에 따른 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:

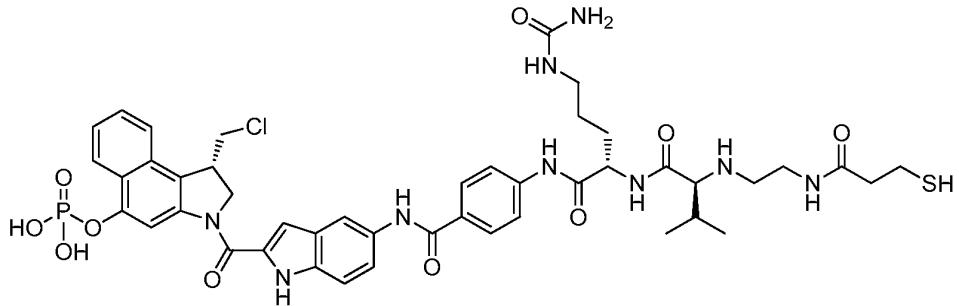
<화학식 IIa>



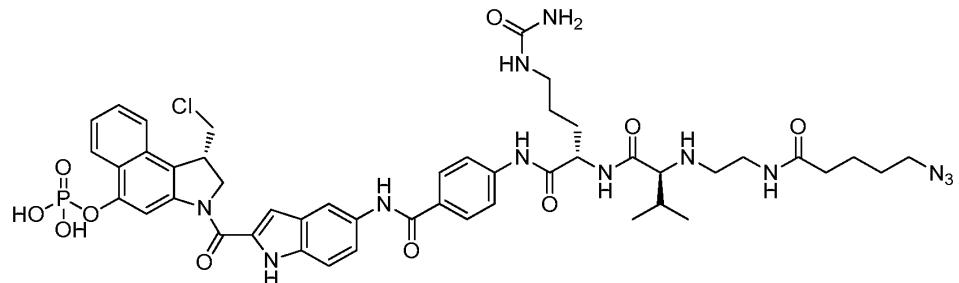
청구항 4

하기 화학식 IIb-IIg로 이루어진 군에서 선택된 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:

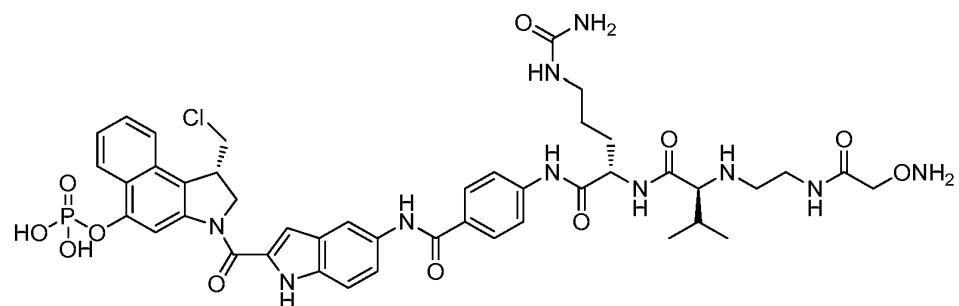
<화학식 IIb>



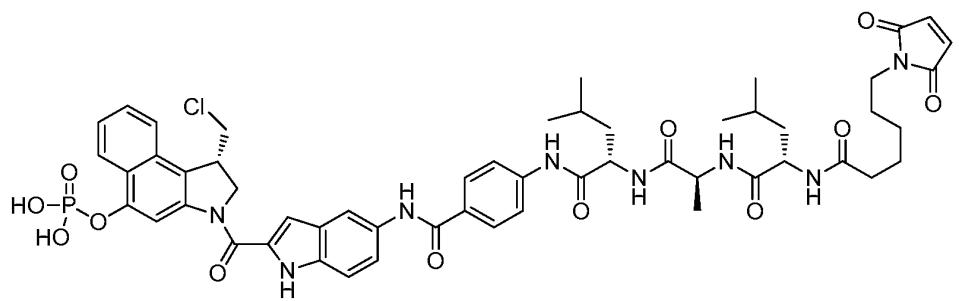
<화학식 IIc>



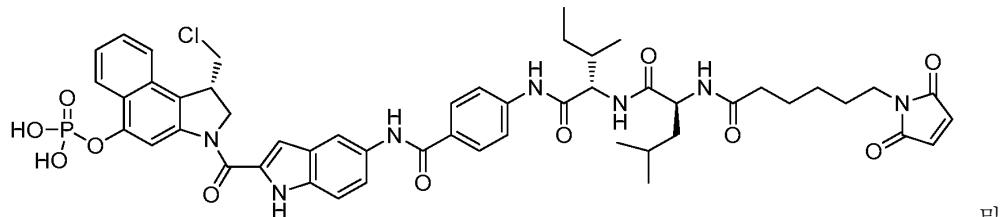
<화학식 IID>



<화학식 IIe>

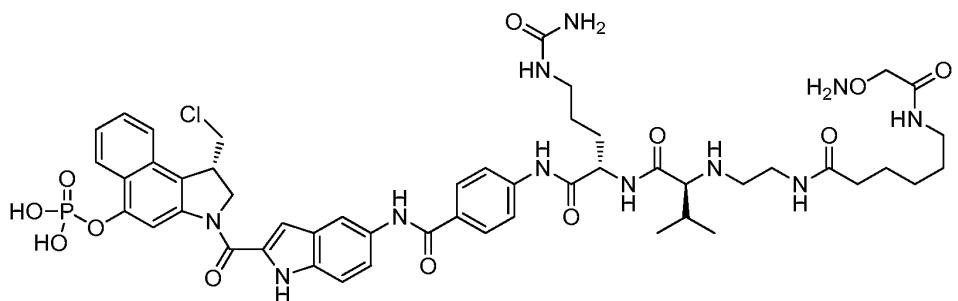


<화학식 IIIf>



및

<화학식 IIg>



청구항 5

치료 유효량의 제1항에 따른 구조를 갖는 면역접합체를 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 암이 신장암, 췌장암, 난소암, 림프종, 결장암, 중피종, 위암, 폐암, 전립선암, 선암종, 간암 또는 유방암인 제약 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 암이 인간 CD70, 폐소텔린, PSMA, CD19, 글리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 또는 PTK7을 발현하는 암 세포를 특징으로 하는 것인 제약 조성물.

청구항 8

작제

첨구항 9

작제

청구항 10

살제

11

살계

청구항 12

사제

첨구학 13

살계

청구항 14

사제

첨구학 15

사진

박명의 석명

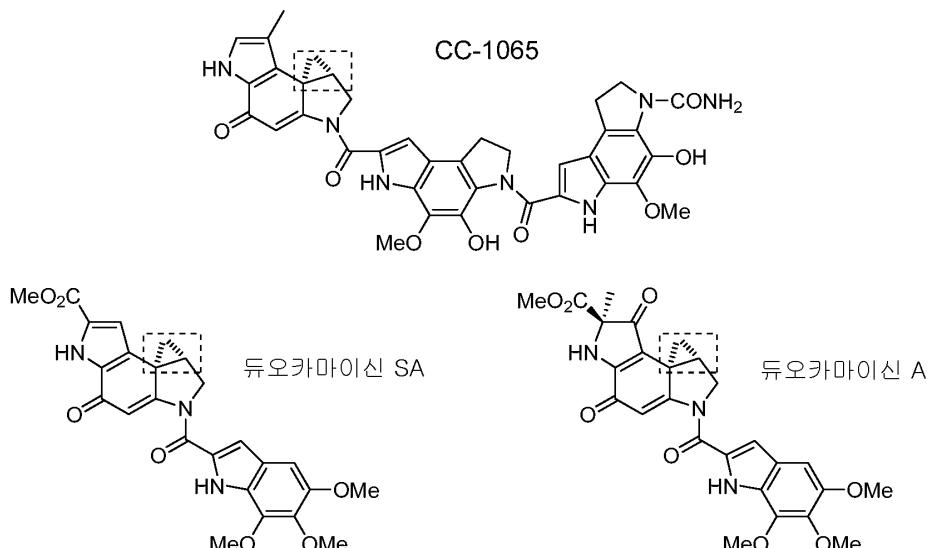
기술분야

본 발명은 치료용 면역조절제를 제조하는 데에 이용될 수 있는 조성물 및 이러한 조성물 및 면역조절제의

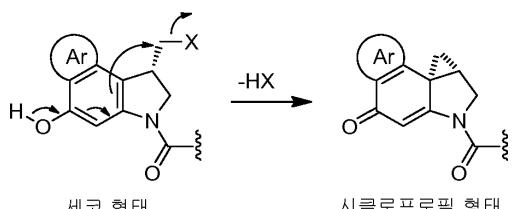
제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연 생성물인 CC-1065 및 듀오카마이신(duocarmycin)은 DNA의 마이너 그루브(minor groove)에 결합하는 강력한 세포독성 작용제이다. 이들은 결합시 마이너 그루브 내에서 유도되는 입체형태 변화에 의해 불안정화되어 개환 알킬화 반응으로 DNA 아데닌 염기와 반응하는 융합된 시클로프로필 고리 (하기 구조의 점선 박스)를 특징으로 한다. DNA의 손상은 세포 사멸로 이어지는 회복불가능한 것일 수 있다.



[0003] [0004] 이들 자연 생성물의 효능은 항암 약물로서 유용한 유사체의 개발을 목표로 하는 연구를 자극하였다. 예를 들면, 문헌 [Cacciari *et al.* 2000] 및 [Suckling 2004]을 참조하라 (최초 저자 또는 발명자 및 년도에 따른 본원에서 인용되는 문헌의 상세한 인용문은 본 명세서의 말미에 목록화되어 있음. 목록화되어 있는 해당 문헌들은 본원에 참조로써 개재됨). 하기 구조에 나타낸 바와 같이, 유사체들은 융합된 시클로프로필 약리단 (pharmacophore) 또는 그의 개환 (세코(seco)) 등가물 중 어느 하나를 가진다 (여기서 Ar은 통상적으로 페닐 또는 피롤인 방향족 고리를 나타내며, X는 Cl 또는 Br과 같은 이탈 기를 나타냄). 세코 형태는 시험관내 또는 생체내 중 어느 하나에서 이루어질 수 있는 과정인 HX의 제거에 의해 시클로프로필 형태로 전환가능하다.



[0005] [0006] 다른 유형의 DNA 마이너 그루브 결합 화합물들이 알려져 있는 하지만, 이하, "마이너 그루브 결합제" 또는 "MGBA"라는 용어는 융합된 시클로프로필 고리 또는 그의 세코 형태를 갖는 CC-1065/듀오카마이신 유형의 화합물을 지칭하는 데에 사용될 것이다.

[0007] 면역접합체는 항암 요법에서 현재 높은 관심을 끌고 있는 분야를 대표한다. 해당 항원이 암 세포에 의해 고유하게 발현되거나 과발현되는 ("종양 관련 항원") 항체에 약물 모이어티가 접합 (공유 결합)된다. 해당 항원에의 결합시, 상기 항체는 고도의 특이성으로 암 세포에 약물 모이어티를 전달하기 위한 표적 작용제로서 기능한다. 상기 항원은 암 세포 표면상의 단백질일 수 있다. 항원에 항체가 결합하게 되면, 항원-면역접합체 복합체는 내재화되어 궁극적으로 리소좀과 같은 소포체(vesicular body) 내부로 들어가며, 거기에서 약물 모이어티와 항체 사이의 공유 링커(linker)가 절단되어 약물 모이어티가 방출됨으로써, 그의 세포독성 효과를 발휘하게 된다. 다르게는, 종양 관련 항원은 종양 세포에 의해 근처의 세포와 공간으로 분비되는 것일 수 있다.

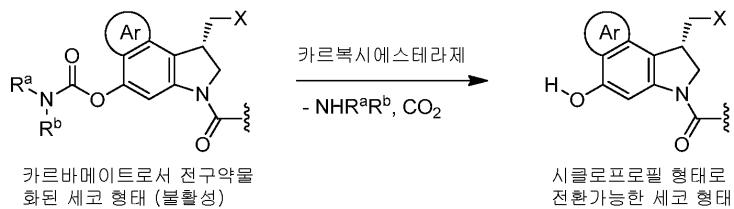
[0008] 유리하게도, 상기 공유 링커는 리소좀 내부에서는 일반적지만 원형질에서는 그렇지 않은 인자에 의해 절단이 수

행되도록 설계된다. 그와 같은 한 가지 인자는 더 낮은 리소좀 pH로써, 그에 따라 공유 링커는 히드라존과 같은 산-민감성 기일 수 있다. 그와 같은 또 다른 인자는 일반적으로 더 높은 세포내 글루타치온 농도이며, 디솔피드 교환 기작에 의한 디솔피드 공유 링커의 절단을 가능케 한다. 그와 같은 또 다른 인자는 카텝신 B와 같은 리소좀 효소의 존재로써, 바람직한 기질이 되도록 설계된 웨티딜 링커를 절단할 수 있다 (문헌 [Dubowchik *et al.* 2002]).

[0009] 그의 효능은 MGBA를 매력적인 면역접합체의 약물 모이어티 후보로 만들었다. MGBA 및 면역접합체에서의 그의 사용과 관련한 예시적인 개시에는 하기가 포함된다: 문헌 [Boyd *et al.* 2008 and 2010]; [Chen *et al.* 2010]; [Gangwar *et al.* 2008]; [Ng *et al.* 2002, 2006a, 2006b, 2009a, 2009b, and 2010]; 및 [Sufi *et al.* 2010].

[0010] 면역접합체가 여전히 전신 순환 중이어서 표적 암 세포에 아직 전달되지 않은 동안에 공유 링커가 우연하게 절단됨으로써, 약물 모이어티의 미성숙한 방출을 초래하여 전신 독성의 위험성에 처할 가능성이 존재한다. 이와 같은 위험성은 약물 모이어티가 MGBA와 같은 매우 강력한 세포독소인 경우에 특히 중요하다. 그러나, 면역접합체가 세코-MGBA를 사용하는 경우, 상기 위험성은 시클로프로필 형태로의 전환을 차단하도록 폐쇄계 히드록실 기를 유도체화하는 것에 의해 감소될 수 있다. 이 경우, 우연한 절단시 방출되는 것은 불활성인 유도체화 세코-MGBA이다. 리소좀 내부에서 절단되는 유도체를 선택하게 되면, 유도체가 전구약물화 기로 기능함으로써 안전 인자를 제공한다: 활성인 세포독소가 방출되기까지 링커 및 전구약물화 기의 두 번의 절단이 이루어져야 함.

[0011] 한 가지 그와 같은 전구약물화 기는 카르바메이트로써, 하기에 나타낸 바와 같이 리소좀 및/또는 세포질 카르복시에스테라제에 의해 절단될 수 있다 (R^a 및 R^b 는 일반적인 라디칼 기를 나타냄). 카르바메이트 기를 사용하여 전구약물화되는 세코-MGBA 면역접합체와 관련한 예시적인 개시에 대해서는 문헌 [Aristoff *et al.* 1991]; [Boger *et al.* 1999]; [Boyd *et al.* 2008 and 2010]; [Chen *et al.* 2010]; [Gangwar *et al.* 2008]; [Kobayashi 1994]; [Ng *et al.* 2002, 2006a, 2006b, 2009a, 2009b, and 2010]; [Sufi *et al.* 2010]; 및 [Zhao *et al.* 2010]을 참조하라.

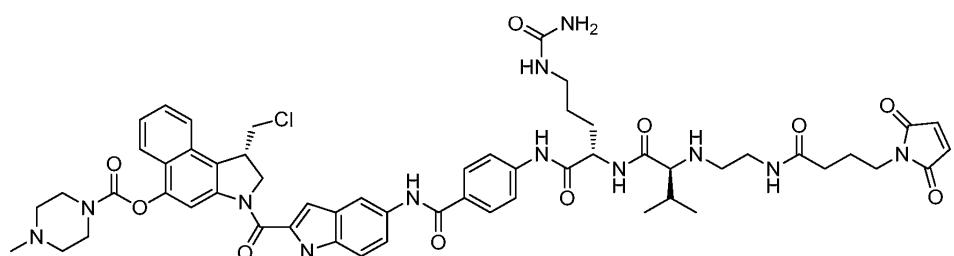


[0012]

[0013] 세코-MGBA와 함께 사용될 수 있는 또 다른 전구약물화 기는 포스페이트이며, 이 경우 절단 효소는 리소좀 내부 및/또는 세포질에서 발견되는 포스파타제이다. 세코-MGBA에서의 포스페이트 전구약물화 기와 관련한 예시적인 개시로는 문헌 [Boyd *et al.* 2010], [Chen *et al.* 2009], [Glazier 2003], [King *et al.* 2011], [Kutyavin *et al.* 1997], [Ng *et al.* 2002], [Zhao *et al.* 2002a and 2002b] 및 [Zhao *et al.* 2010]이 포함된다.

[0014] 광범위하게 연구되어 온 MGBA 화합물은 하기 화학식 A의 구조를 가지고 있다 (문헌 [Boyd *et al.* 2008] 및 [Sufi *et al.* 2010]). 그것은 카르바메이트 전구약물화 기; 카텝신 B에 의해 절단되도록 설계된 발린-시트룰린 (N에서 C로의 방향, 즉 아미노 (NH_2) 말단으로부터 카르복실 (CO_2H) 말단 쪽으로 옮겨할 때, Val-Cit) 디펩티드 링커 (문헌 [Dubowchik *et al.* 2002]); 및 항체 술프히드릴 기의 마이클 첨가(Michael addition)에 의한 면역접합을 위한 말레이이미드 기를 가진다. 화합물 A와 항-CD70 항체의 면역접합체는 임상 시험을 받고 있는 중이다.

[0015] <화학식 A>



[0016]

발명의 내용

[0017]

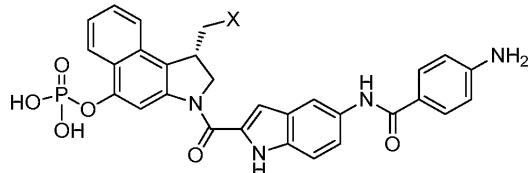
일부 경우에는, 화합물 A로부터 유래하는 것과 같은 카르바메이트-전구약물화 세코-MGBA 면역접합체가 예상할 수 있을 만큼의 강력한 항암제가 아니라는 것이 관찰되었다. 더 낮은 효능은 소정 유형의 암 세포 내부에서의 불충분한 카르복시에스테라제 활성, 및 결과적으로 불충분한 탈카르바모일화에 기인하는 것으로 가설화되었다. 따라서, 그의 활성에 대해 카르복시에스테라제에 의존하지 않는 전구약물화 세코-MGBA 면역접합체를 개발하는 것이 바람직하다.

[0018]

한 측면에서, 본 발명은 항체 (또는 그의 항원 결합 단편) 및 포스페이트-전구약물화 세코-MGBA 화합물을 포함하는 면역접합체를 제공한다. 포스페이트 전구약물화 기의 제거는 표적 세포 내에서의 카르복시에스테라제 활성과 무관해서, 상기에서 언급된 결점을 방지한다. 오히려, 본 발명의 화합물은 실험상 일련의 인간 종양 세포들에 걸쳐 충분한 농도로 존재하는 것으로 보이는 포스파타제에 의존한다. 한 실시양태는 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 그의 $-\text{NH}_2$ 기에서 펩티딜 링커를 통하여 항체 또는 이러한 항체의 항원 결합 단편에 접합된 면역접합체이다:

[0019]

<화학식 I>



[0020]

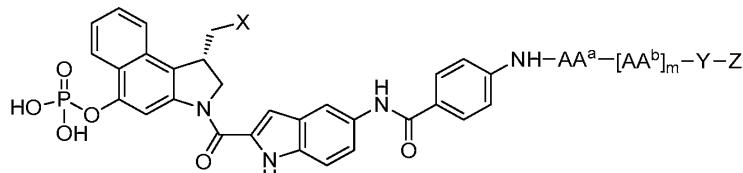
상기 식에서, X는 친핵성으로 대체가능한 이탈 기이다. 바람직하게는, 상기 항체는 CD70, 메소텔린, PSMA, CD19, 클리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 및 PTK7로 이루어진 군에서 선택된 인간 항원을 인식하는 인간 모노클로날 항체이다.

[0022]

또 다른 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편에의 접합에 적합한 포스페이트-전구약물화 세코-MGBA 화합물이 제공된다. 일반적으로, 이와 같은 화합물은 포스페이트-전구약물화된 세코-MGBA 모이어티, 효소적으로 절단 가능한 펩티딜 링커, 스페이서(spacer) 모이어티, 및 항체 또는 그의 항원-결합 단편에의 결합을 위한 반응성 관능기를 포함한다. 한 실시양태는 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 대표된다:

[0023]

<화학식 II>



[0024]

상기 식에서,

[0026]

X는 친핵성으로 대체가능한 이탈 기이고;

[0027]

AA^a 및 각 AA^b는 독립적으로 알라닌, β -알라닌, γ -아미노부티르산, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, γ -카르복시글루탐산, 시트룰린, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 노르류신, 노르발린, 오르니틴, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군에서 선택되고;

[0028]

 m 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0029]

Y는 스페이서 모이어티이고;

[0030]

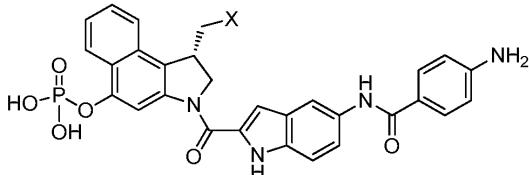
Z는 항체에 접합할 수 있는 반응성 관능기이다.

[0031]

또 다른 측면에서, 하기 화학식 I의 화합물로 구현되는, 면역접합체를 제조하는 데에 사용될 수 있는 포스페이트 전구약물화 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:

[0032]

<화학식 I>



[0033]

상기 식에서, X는 친핵성으로 대체가능한 이탈 기이다. 화합물 I은 상기한 바와 같은 펩티딜 링커, 스페이서 및 반응성 관능기와 조합된 다음, 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 접합될 수 있다.

[0035]

또 다른 측면에서, 치료 유효량의 본 발명 면역접합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체, 바람직하게는 인간에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 암은 암 세포가 CD70, 메소텔린, PSMA, CD19, 글리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 및 PTK7로 이루어진 군에서 선택된 항원을 발현하는 것인 암일 수 있다. 그렇게 치료될 수 있는 암의 예에는 신장암, 췌장암, 난소암, 럼프종, 결장암, 중피종, 위암, 폐암, 전립선암, 선암종, 간암 및 유방암이 포함된다.

[0036]

또 다른 측면에서, 암 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 면역접합체의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0037]

도 1a 및 1b는 합쳐서 말레이미드 반응성 관능기를 갖는 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 2는 또 다른 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 3a 내지 3d는 합쳐서 또 다른 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 4a 내지 4r은 ^3H 티미딘 도입 중식 검정을 사용하여, 카르바메이트 전구약물화된 면역접합체의 것에 대비하여 본 발명의 포스페이트 전구약물화 면역접합체의 세포 중식 억제 특성을 비교한다. 시험 세포주에는 하기의 인간 암 세포주들이 포함되었다: 786-0 (신장 암종), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), HPAC (췌장암), OVCAR3 (난소암), 라모스(Ramos) (버킷 럼프종), H226 (중피종), N87 (위암), H292 (점막표피양 폐 암종), H1650 (선암종), Hep 3b (간세포 암종), Hep G2 (간세포 암종), HCC-1954 (유방암), MDA-MB-468 (유방암), HCT116 (결장암) 및 H520 (폐암). 또한, 메소텔린-발현 형질감염 CHO (중국 햄스터 난소) 세포주가 사용되었다.

도 5는 인간 간 마이크로솜 효소에 의한 본 발명의 포스페이트 전구약물화 화합물의 탈인산화를 나타내는 크로마토그래피 추적을 도시한다.

도 6은 1시간의 기간 동안의 마이크로솜 농도의 함수로서의 생성된 탈인산화 생성물의 양의 플롯이다.

도 7은 항체에의 접합을 위한 아지드 반응성 관능기를 갖는 또 다른 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 8은 항체에의 접합을 위한 히드록실아민 반응성 관능기를 갖는 또 다른 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 9a 및 9b는 합쳐서 Leu-Ala-Leu 트리펩티드를 갖는 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 10a 및 10b는 합쳐서 Leu-Ile 디펩티드를 갖는 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 11a 및 11b는 합쳐서 또 다른 본 발명 화합물의 합성을 나타낸다.

도 12a-12i는 다양한 이종이식 연구의 결과들을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

발명의 수행 양식

[0039]

정의

[0040]

"항체"는 전체 항체, 및 그의 소정의 항원 결합 단편 (즉 "항원-결합 부분") 또는 단일 사슬을 의미한다. 전체 항체는 디슬피드 결합에 의해 상호-연결된 2개 이상의 중쇄 (H) 및 2개 이상의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (V_H), 및 $\text{C}_{\text{H}1}$, $\text{C}_{\text{H}2}$ 및 $\text{C}_{\text{H}3}$ 의 3개 도메인을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (V_L 또는 V_k), 및 하나의 단일 도메인 C_L 을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. V_H

및 V_L 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되며 더 보존되어 있는 프레임워크 영역 (FR)이 산재되어 있는 초가변성 영역들로 추가 하위분할될 수 있다. 각 V_H 및 V_L 은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열되어 있는 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포들 (예컨대 효과인자 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 포함한 숙주 조직 또는 인자들에 대한 항체의 결합을 매개할 수 있다. 항체가 5×10^{-8} M 이하, 더욱 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 더욱 바람직하게는 6×10^{-9} M 이하, 더욱 바람직하게는 3×10^{-9} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 2×10^{-9} M 이하의 K_D 로 항원 X에 결합하는 경우, 항체는 항원 X에 "특이적으로 결합하는" 것으로 지칭된다. 항체는 키메라, 인간화 또는 바람직하게는 인간의 것일 수 있다. 중쇄 불변 영역은 글리코실화 유형 또는 정도에 영향을 주기 위하여, 항체 반감기를 연장하기 위하여, 효과인자 세포 또는 보체 시스템과의 상호작용을 향상 또는 감소시키기 위하여, 또는 소정의 다른 특성을 조정하기 위하여 조작될 수 있다. 조작은 하나 이상 아미노산의 치환, 첨가 또는 결실, 또는 또 다른 이뮤노글로불린 유형으로부터의 도메인을 사용한 도메인의 치환, 또는 전기의 조합에 의해 이루어질 수 있다.

[0041]

항체의 "항체 단편" 및 "항원-결합 부분" (또는 단순히 "항체 일부")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 1종 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 1가의 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 디슬피드 가교에 의해 연결되어 있는 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가의 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) 헌지 영역의 일부를 갖는 본질적으로 Fab인 Fab' 단편 (예를 들면 문헌 [Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007]을 참조하라); (iv) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (v) 항체 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (vi) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌 [Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546]); (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및 (viii) 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 함유하는 중쇄 가변 영역인 나노체(nanobody)와 같은 전체-길이 항체의 단편들에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 또한, Fv 단편의 2개 도메인인 V_L 및 V_H 가 별도의 유전자에 의해 코딩되어 있기는 하지만, 그들은 그들을 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가의 문자를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만드는 것을 가능케 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 결합될 수 있다 (단일 사슬 Fv 또는 scFv로 알려져 있음); 예를 들면 문헌 [Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426]; 및 [Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]을 참조하라. 이와 같은 단일 사슬 항체들 역시 항체의 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편"이라는 용어 내로 포괄된다.

[0042]

"단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 의미한다 (예컨대 항원 X에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 항원 X가 아닌 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, 항원 X에 특이적으로 결합하는 단리된 항체가 다른 종으로부터의 항원 X 분자와 같은 다른 항원에 대하여 교차-반응성을 가질 수는 있다. 소정 실시양태에서, 단리된 항체는 인간 항원 X에 특이적으로 결합하며, 다른 (비-인간) 항원 X 항원들과는 교차-반응하지 않는다. 또한, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/ 또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0043]

"모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 특정 항원결정인자에 대하여 단일의 결합 특이성 및 친화성을 나타내는, 단일 분자 조성을 갖는 항체 분자들의 조제물을 의미한다.

[0044]

"인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 (그리고 존재할 경우, 불변 영역) 모두가 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에서 유래하는 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체는 자연 또는 합성 변형을 포함한 차후 변형을 포함할 수 있다. 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예컨대 시험관 내에서의 랜덤 또는 부위-특이적 돌연변이생성, 또는 생체 내에서의 체세포 돌연변이에 의해 유도되는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식계열에서 유래하는 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식되어 있는 항체는 "인간 항체"에 포함되지 않는다.

[0045]

"인간 모노클로날 항체"는 단일의 결합 특이성을 나타내며, 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에서 유래하는 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 무한증식 세포(imortalized cell)에 융합된 인간 중쇄 이전유전자 및 경쇄 이전유전자를 포함하는 계놈을 갖는 유전자이전 비인간 동물, 예를 들면 유전자이전 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 제조된다.

특정 입체이성질체가 (예컨대 구조 화학식의 관련 입체중심에서 진하거나 파선인 결합으로, 구조 화학식에서의 E 또는 Z 배열구조를 갖는 것으로서의 이중 결합의 묘사에 의해, 또는 입체화학-지정 명명법의 사용에 의해) 구체적으로 표시되지 않는 한, 모든 입체이성질체는 순수한 화합물로서는 물론 그의 혼합물로서 본 발명의 영역 내에 포함된다. 다르게 표시되지 않는 한, 개별 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 기하 이성질체, 및 이들의 조합 또는 혼합물 모두가 본 발명에 의해 포함된다.

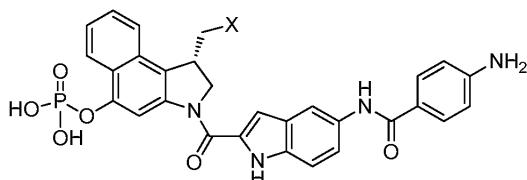
업계 숙련자라면, 화합물이 본원에서 사용되는 구조 화학식에 도시되어 있는 것들과 등가인 호변이성질체 형태 (예컨대 케토 및 에놀 형태), 공명 형태 및 양쪽성이온 형태를 가질 수 있다는 것, 및 구조 화학식이 그와 같은 호변이성질체, 공명 또는 양쪽성이온 형태를 포함한다는 것을 알고 있을 것이다.

"제약상 허용되는 염"은 제약 제제화에 적합한 화합물의 염을 의미한다. 화합물이 하나 이상의 염기성 기를 갖는 경우, 염은 산 첨가염, 예컨대 술페이트, 히드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 말레이트, 시트레이트, 포스페이트, 아세테이트, 파모에이트 (엠보네이트), 히드로아이오다이드, 니트레이트, 히드로클로라이드, 락테이트, 메틸술페이트, 푸마레이트, 벤조에이트, 숙시네이트, 락토바이오네이트, 수베레이트, 토실레이트 등 일 수 있다. 화합물이 하나 이상의 산성 기를 갖는 경우, 염은 칼슘염, 칼륨염, 마그네슘염, 메글루민염, 암모늄염, 아연염, 피페라진염, 트로메타민염, 리튬염, 콜린염, 디에틸아민염, 4-페닐시클로헥실아민염, 벤자린염, 나트륨염, 테트라메틸암모늄염 등과 같은 염일 수 있다. 다형 결정질 형태 및 용매화물 역시 본 발명의 영역 내에 포함된다. 포스페이트 기와 관련하여, 제약상 허용되는 염의 구체적인 예에는 나트륨, 칼륨 및 암모늄 염이 포함된다.

조성물

한 측면에서, 본 발명의 조성물은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 펩티딜 링커를 통하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 접합된 면역접합체이다:

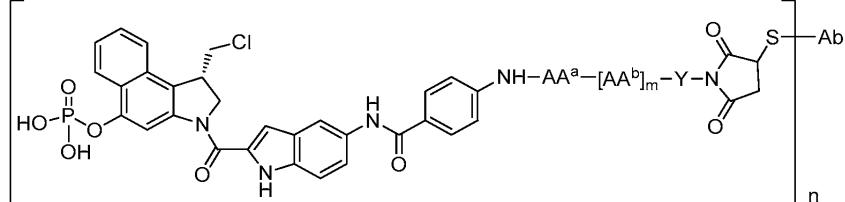
〈화학식 I〉



펩티딜 링커는 바람직하게는 Val-Cit, Phe-Cit, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Glu, Val-Asp, Val-Ser 및 Val-Gly에서 선택되는 디펩티드이며, 상기 각 디펩티드는 N에서 C로의 방향으로 기재되어 있다.

한 실시양태에서, 면역접합체는 하기 화학식 IIIa으로 표시되는 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

〈화학식 IIIa〉

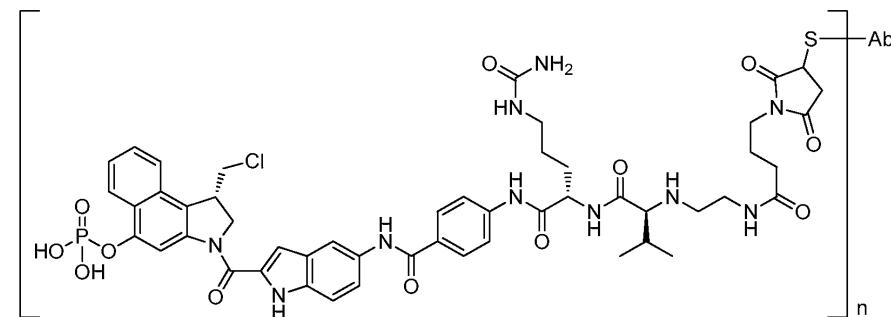


상기 식에서, AA^a , AA^b , m 및 Y 는 화학식 II와 관련하여 상기에서 정의된 바와 같고, Ab 는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 나타내고, n 은 1, 2, 3, 4 또는 5이다. AA^a , AA^b , m , Y , Ab 및 n 의 바람직한 실시양태 및/또는 조합은 하기에서 기술된다.

화학식 IIIa에 따른 바람직한 면역접합체는 하기 화학식 IIIa'에 따른 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0059]

<화학식 IIIa'>



[0060]

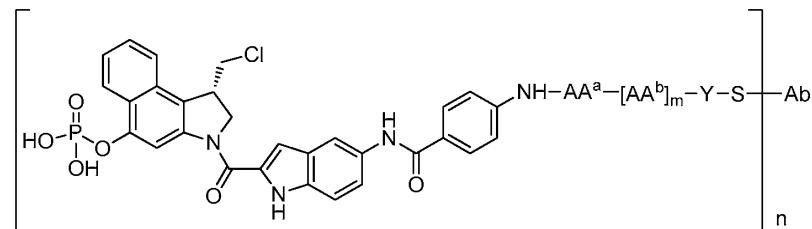
상기 식에서, Ab 및 n은 상기 정의된 바와 같다. 따라서, 구조 화학식 IIIa'에서 디펩티드가 좌측에서 우측 방향으로 읽어 C에서 N으로의 방향으로 작성되었음을 업계 숙련자가 이해한다고 볼 때, 이와 같은 실시양태는 Val-Cit 디펩티드 링커를 가진다.

[0062]

또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하기 화학식 IIb로 표시되는 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0063]

<화학식 IIIb>



[0064]

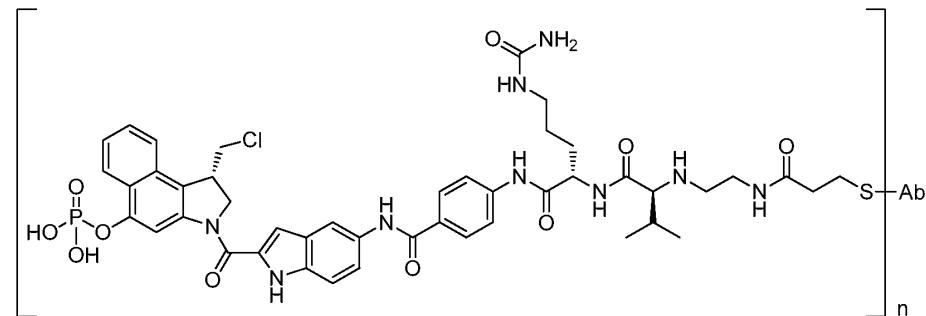
상기 식에서, AA^a, AA^b, m 및 Y는 화학식 II와 관련하여 전기에서 정의된 바와 같고, Ab는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 나타내고, n은 1, 2, 3, 4 또는 5이다. AA^a, AA^b, m, Y, Ab 및 n의 바람직한 실시양태 및/또는 조합은 하기에서 기술된다.

[0065]

화학식 IIIb에 따른 바람직한 면역접합체는 하기 화학식 IIIb'에 따른 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0066]

<화학식 IIIb'>



[0067]

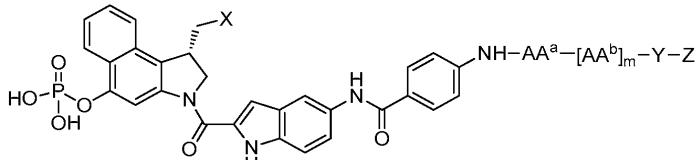
상기 식에서, Ab 및 n은 상기 정의된 바와 같다.

[0068]

화학식 IIIa, IIIa', IIIb 및 IIIb'에서 아래첨자 n에 반영되어 있는 바와 같이, 각 항체는 항체가 가지고 있는 접합에 가용한 부위의 수 및 사용되는 실험 조건에 따라 1개를 초과하는 전구약물화 세코-MGBA 모이어티와 접합될 수 있다. 업계 숙련자라면, 각 개별 항체가 정수 개수의 전구약물화 모이어티에 접합되기는 하지만, 면역접합체 제제는 통계 평균을 반영하여 비-정수인 항체 당 전구약물화 세코-MGBA 모이어티의 비 ("치환 비" 또는 "SR")로 검정될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. SR은 바람직하게는 1 내지 5 사이, 더욱 바람직하게는 2.5 내지 3.5 사이이다.

[0071] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식 II로 표시되는, 항체에의 접합에 적합한 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염이다:

[0072] <화학식 II>

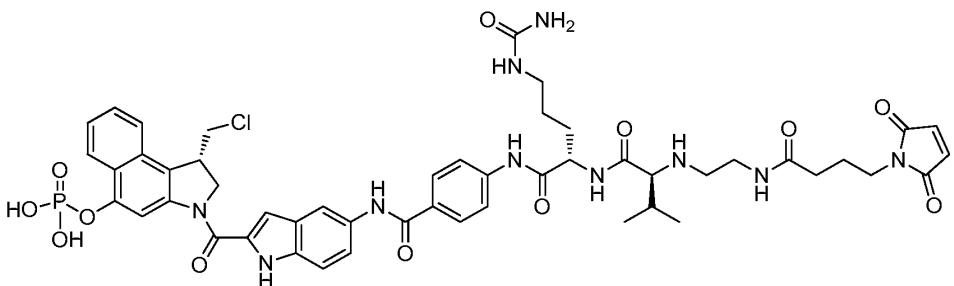


[0073]

[0074] 상기 식에서, AA^a, AA^b, m, Y 및 Z는 전기에서 정의된 바와 같다. AA^a, AA^b, m, Y 및 Z의 바람직한 실시양태 및 /또는 조합은 하기에서 기술된다.

[0075] 화학식 II에 따른 바람직한 실시양태는 하기 화학식 IIa의 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

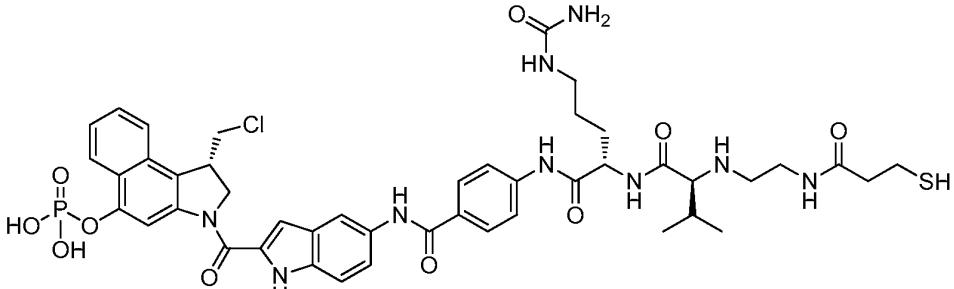
[0076] <화학식 IIa>



[0077]

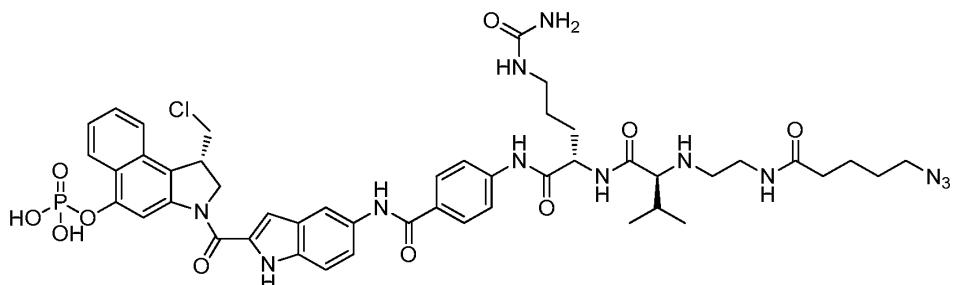
[0078] 화학식 II에 따른 다른 바람직한 실시양태는 하기 화학식 IIb-IIg의 구조 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0079] <화학식 IIb>



[0080]

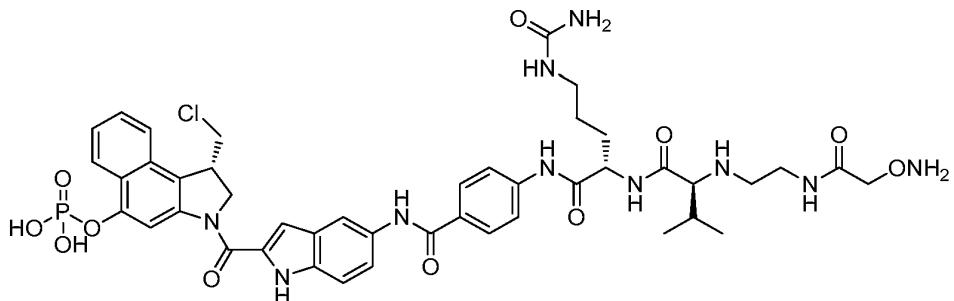
[0081] <화학식 IIc>



[0082]

[0083]

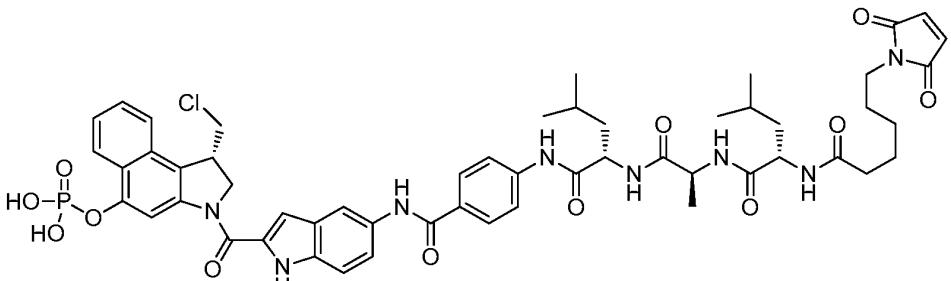
<화학식 IIId>



[0084]

[0085]

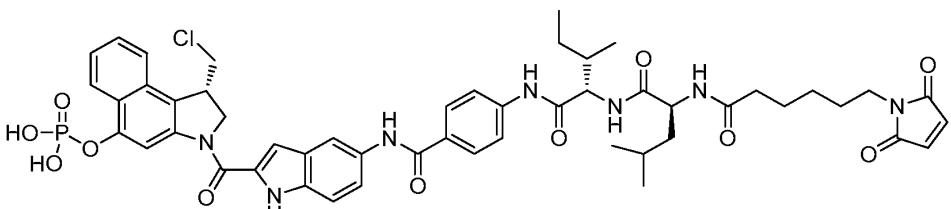
<화학식 IIe>



[0086]

[0087]

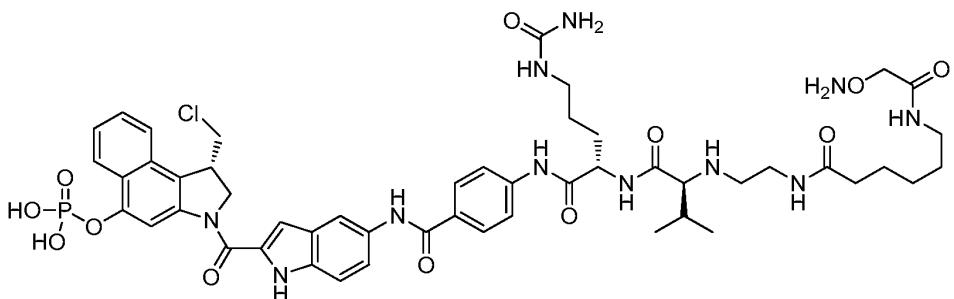
<화학식 II f>



[0088]

[0089]

〈화학식 IIg〉



[0090]

화학식 I 및 II에서, X는 친핵성으로 대체가능한 기, 바람직하게는 Cl, Br 또는 토실레이트, 더욱 바람직하게는 Cl이다.

[0092]

화학식 II, IIIa 및 IIIb에서, AA^a 및 각 AA^b는 독립적으로 알라닌, β -알라닌, γ -아미노부티르산, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, γ -카르복시글루탐산, 시트룰린 (Cit), 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 노르류신, 노르발린, 오르니틴, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직하게는, AA^a 및 AA^b는 아르기닌, 아스파르트산, 시트룰린, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 리신, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군에서 선택된다.

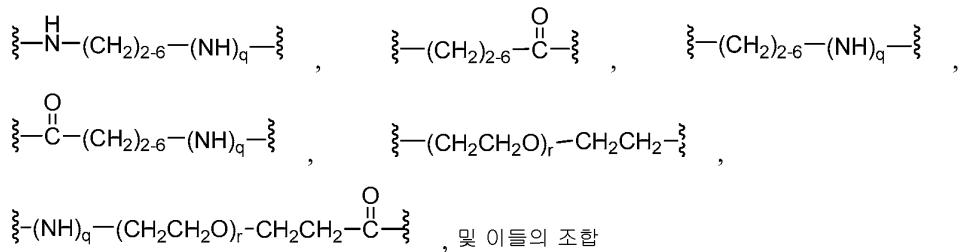
[0093]

화학식 II, IIIa 및 IIIb의 모이어티 $-AA^a - [AA^b]_m-$ 은 연속되는 아미노산이 펩티딜 결합에 의해 연결되어 있는 펩티딜

티딜 링커를 나타낸다. 그것은 바람직하게는 표적 세포와 연관되어 있는 세포내 또는 세포외 효소에 의해 절단 가능한 것이다. 상기 효소는 예를 들면 카텝신 B, 카텝신 E, 레구마인 또는 CD10일 수 있다. 웨티딜 링커는 바람직하게는 1 내지 6개, 더욱 바람직하게는 1 내지 3개, 가장 바람직하게는 1 내지 2개의 아미노산으로 이루어진다. AA^a는 바람직하게는 특히 m이 0, 1 또는 2인 것과 조합된, Cit, Lys, Glu, Ser, Ile, Leu 또는 Thr, 더욱 바람직하게는 Cit 또는 Lys이다.

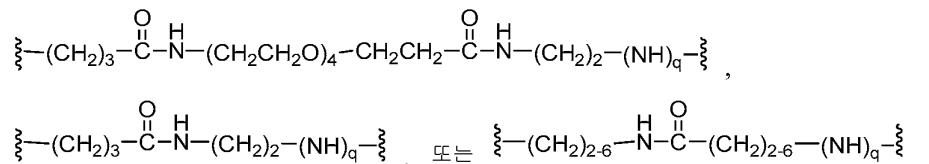
[0094] 화학식 II, IIIa 및 IIIb의 첨자 m은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 바람직하게는, m은 0, 1 또는 2, 더욱 바람직하게는 1이다. 따라서, -AA^a-[AA^b]_m-은 m 값에 따라 AA^a가 C-말단에 있고 AA^b가 N-말단에 있는 단일 아미노산 링커, 디펩티드 링커, 트리펩티드 링커 등을 나타낸다. m이 1이어서 AA^a와 AA^b가 합쳐서 디펩티드를 형성하는 경우, 바람직한 디펩티드는 Val-Cit, Phe-Cit, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Glu, Val-Asp, Val-Ser 및 Val-Gly (각 디펩티드는 통상적인 N에서 C로의 방향으로 기재됨)이다. Val-Cit 디펩티드 링커가 특히 바람직하다. 웨티딜 링커가 단일 아미노산으로 이루어진 경우 (즉 m이 0임), 그것은 바람직하게는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Chen et al. 2010]에 교시되어 있는 바와 같이 Cit, Glu, Lys 또는 Ser이다. 바람직하게도, 전기한 디펩티드 및 단일 웨티드 링커들은 카텝신 B에 의해 절단가능하다. 웨티딜 링커를 절단하는 데에 이용될 수 있는 또 다른 효소는 Ala-Ala-Asn에서 우선적으로 절단하는 리소좀 시스테인 프로테아제인 레구마인이다. 웨티드 Leu-Ala-Leu 및 Leu-Ile은 각각 CD10 및 카텝신 E에 의해 절단되도록 설계된다.

[0095] 화학식 II, IIIa 및 IIIb의 스페이서 Y는 전구약물화 세코-MGBA와 항체 (또는 그의 항원 결합 단편) 사이의 공간적 분리를 제공함으로써, 전자가 후자에 의한 항원 결합을 입체적으로 방해하거나 후자가 웨티딜 링커의 절단을 입체적으로 방해하지 않도록 한다. 또한, 스페이서 Y는 접합체에 증가된 용해성 또는 감소된 응집 특성을 부여하는 데에 사용될 수 있다. 스페이서 Y는 어떠한 수의 조합으로도 조립될 수 있는 하나 이상의 모듈형 분절을 포함할 수 있다. 스페이서 Y용의 적합한 분절의 예는 하기이다:



[0096]

상기 식에서, 아래첨자 q는 그의 각 출현시마다 독립적으로 0 또는 1이고, 아래첨자 r은 그의 각 출현시마다 독립적으로 1 내지 24, 바람직하게는 2 내지 4이다. 이들 분절은 하기에 나타낸 바와 같이 조합될 수 있다:



[0098]

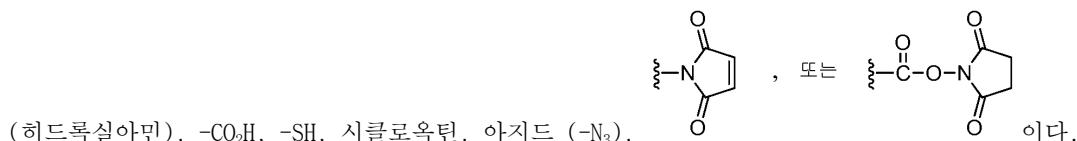
스페이서 Y는 바람직하게는 그것이 결합되는 아미노산 AA^a 또는 AA^b와 반응성 관능기 Z 사이에 5 내지 20개 원자, 더욱 바람직하게는 5 내지 15개 원자의 선형 분리를 제공한다.

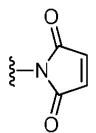
[0100]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 스페이서 Y는 경우에 따라 AA^a 또는 AA^b의 알파-아미노 기에 직접 결합되어 있는 카르복실 아실 기가 아닌 다른 것에 의해 AA^a 또는 AA^b에 연결된다. 바람직하게는, 스페이서 Y는 경우에 따라 스페이서 Y의 메틸렌 기를 통하여 AA^a 또는 AA^b의 알파-아미노 기에 연결된다.

[0101]

화학식 II에서, Z는 항체에 대한 접합을 할 수 있는 반응성 관능기이다. 바람직하게는, Z는 -NH₂, -OH, -ONH₂





[0102] 더욱 바람직하게는, -Z는 $-\text{ONH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{N}_3$, 또는

[0103] $-\text{OH}$ 기는 항체의 예를 들면 아스파르트산 또는 글루탐산 측쇄상의 카르복시 기와 에스테르화될 수 있다.

[0104] $-\text{CO}_2\text{H}$ 기는 항체상의 $-\text{OH}$ 기에 의해 에스테르화되거나, 또는 아미노 기 (예컨대 리신 측쇄상의 것)에 의해 아미드화될 수 있다.

[0105] 말레이이미드 기는 마이클 첨가 반응에서 항체상의 $-\text{SH}$ 기 (예컨대 시스테인 유래, 또는 술프히드릴 관능성을 도입하는 항체의 화학적 변형 유래)와 접합될 수 있다.

[0106] N-히드록시숙신이미드 기는 기능적으로 활성화된 카르복실 기로써, 아미노 기 (예컨대 리신 유래)와의 반응에 의해 편리하게 아미드화될 수 있다.

[0107] $-\text{SH}$ 기는 항체가 상기한 것의 "거울상"인 마이클 첨가 반응에서 거기에 말레이이미드 기를 도입하도록 변형된 경우에, 접합에 특히 유용하다. 항체는 N-숙신이미딜 4-(말레이이미도메틸)-시클로헥산카르복실레이트 (SMCC) 또는 그의 술폰화 변종인 술포-SMCC (양 시약은 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich) 사에서 구입가능함)를 사용하여 말레이이미드 기를 가지도록 변형될 수 있다.

[0108] 아지드 및 시클로옥틴은 아지드가 시클로옥틴의 변형된 알킨 결합에 첨가되어 1,2,3-트리아졸 고리를 형성하는 소위 "클릭 화학"을 통하여 접합을 수행할 수 있는 상보적인 관능기들이다. 아지드가 화학식 II 화합물의 Z-기이고 시클로옥틴이 항체 또는 그의 항원 결합 단편상에 위치될 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다. 시클로옥틴 기는 DIBO 시약 (오레곤 유진 소재 인비트로젠/몰클라 프로브스 (Invitrogen/Molecular Probes) 사로부터 구입가능)에 의해 제공될 수 있다.

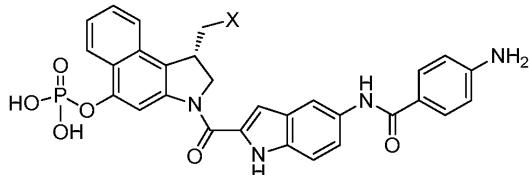
[0109] 비-자연 아미노산이 반응성 관능기와의 접합을 위한 관능성을 제공하는 경우, 항체에 비-자연 아미노산을 도입하는 기술이 이용될 수 있다. 예를 들면, 티안 (Tian) 등의 WO 2008/030612 A2호 (2008)에 교시되어 있는 바와 같이 비-자연 아미노산인 p-아세틸페닐알라닌이 항체에 도입될 수 있다. p-아세틸페닐알라닌의 케톤 기는 히드록실아미노 반응성 관능기와의 옥심의 형성에 의해 접합 부위가 될 수 있다. 암브르크스 (Ambrx), Inc. 사 (캘리포니아 라 졸라 소재)의 레코드 (ReCODE)™ 기술을 사용하여, 다른 비-자연 아미노산들이 도입될 수도 있다.

[0110] 전기한 면역접합체들에서, 항체는 바람직하게는 면역접합체가 선택적으로 또는 우선적으로 암 세포를 표적으로 하는 것을 가능케 하는 종양 관련 항원에 대한 항체이다. 그와 같은 항원의 예에는 하기가 포함된다: 메소텔린, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (08E로도 알려져 있음), 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7), 글리피칸-3, RG1, CTLA-4 및 CD44. 항체는 동물 (예컨대 뮤린), 키메라, 인간화, 또는 바람직하게는 인간의 것일 수 있다. 항체는 바람직하게는 모노클로날, 특히 모노클로날 인간 항체이다. 해당 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 코르만 (Korman) 등의 US 2009/0074660 A1호 (B7H4); 라오-네이크 (Rao-Naik) 등의 8,097,703 B2호 (CD19); 킹 (King) 등의 US 2010/0143368 A1호 (CD22); 켈러 (Keler) 등의 US 7,387,776 B2호 (2008) (CD30); 테레트 (Terrett) 등의 US 8,124,738 B2호 (CD70); 코르만 등의 US 6,984,720 B1호 (2006) (CTLA-4); 코르만 등의 US 2009/0217401 A1호 (PD-1); 황 (Huang) 등의 US 2009/0297438 A1호 및 카르다렐리 (Cardarelli) 등의 US 7,875,278 B2호 (PSMA); 루 (Lu) 등의 US 2010/0034826 A1호 (PTK7); 테레트 등의 US 2010/0209432 (A1)호 (글리피칸-3); 하킨스 (Harkins) 등의 US 7,335,748 B2호 (2008) (RG1); 테레트 등의 US 2011/0262448 A1호 (메소텔린); 및 수 (Xu) 등의 US 2010/0092484 A1호 (CD44)에, 상기언급된 항원들 중 일부에 대한 인간 모노클로날 항체의 제조에 대해 개시되어 있다. 바람직하게는, 항체는 CD70, 메소텔린, CD19, 글리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 또는 PTK7에 대한 인간 모노클로날 항체이다.

[0111] 본 발명의 또 다른 측면은 전구약물화된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다:

[0112]

〈화학식 I〉



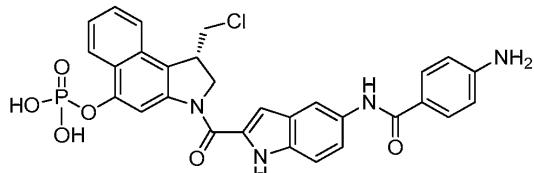
[0113]

[0114]

상기 식에서, X는 친핵성으로 대체가능한 이탈 기로써, 바람직하게는 Cl, Br 또는 토실레이트, 더욱 바람직하게는 Cl이다. 상기에서 논의된 바와 같이, 화학식 I의 화합물은 치료적으로 유용한 면역접합체를 제조하기 위하여 적절한 링커, 스페이서 및 반응성 관능기의 사용에 의해 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 접합될 수 있다. X가 Cl인 화학식 I의 바람직한 실시양태는 하기 화학식 Ia의 구조에 상응한다:

[0115]

〈화학식 Ia〉



[0116]

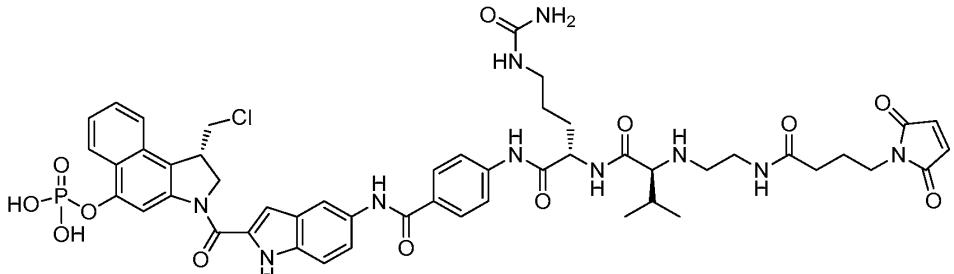
생물학적 활성

[0118]

화합물 IIa 및 선행 기술 화합물 A로부터 제조된 면역접합체의 능력을 비교하는 일련의 세포 증식 실험들을 수행하였다. 매 경우, 사용된 기술은 ^3H 티미딘 도입 검정으로써, 그의 절차 세부사항에 대해서는 하기하는 실시 예에 제공되어 있다.

[0119]

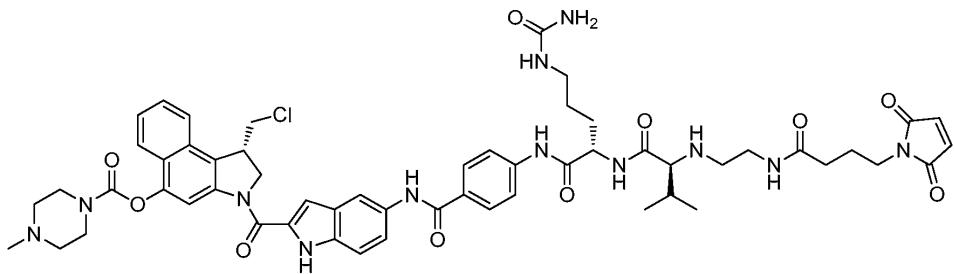
〈화학식 IIa〉



[0120]

[0121]

<화학식 A>

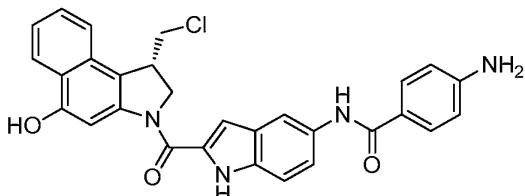


[0122]

전구약물화 기 - 포스페이트 대 카르바메이트 -를 제외하고는 면역접합체가 동일하며, 펩티딜 링커의 절단 및 전구약물화 기의 제거 후 동일한 화학식 IV의 약물이 방출되므로, 실험은 면역접합체 효능에 대한 전구약물화 기의 효과 비교를 제공한다. 매 경우 동일한 최종 활성 화합물 IV가 연관됨에도 불구하고, 이러한 병행 결과는 예상외로 화합물 IIa의 면역접합체가 화합물 A의 것에 비해 상당히 더 강력하다는 것을 보여준다.

[0124]

<화학식 IV>



[0125]

[0126]

도 4a는 CD70-발현 인간 신장암 세포인 786-0 세포의 증식에 대한 2종의 면역접합체의 억제 활성을 나타낸다. 각 경우에서, 접합된 항체는 항-CD70 인간 모노클로날 항체인 2H5이었다. 화합물 IIa 면역접합체는 더 낮은 EC₅₀을 가질 뿐만 아니라 (0.1000 nM 대 0.5725 nM), 그의 억제 곡선의 깊이로 나타나는 바와 같이, 더 높은 전체 억제 백분율도 가지고 있었다 (항체 2H5의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Coccia *et al.* 2010] 및 [Terret *et al.* 2012b]에 개시되어 있음. 항체 2H5의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5 및 서열 6에 제시함).

[0127]

도 4b는 유사하지만 메소텔린 발현 인간 췌장암 세포인 HPAC 세포를 사용한 연구이다. 각 경우에서, 접합된 항체는 항-메소텔린 인간 모노클로날 항체인 6A4이었다. 이 실험에서는, 1.25 및 3의 치환비를 사용하여 (X-축상의 세포독소 농도는 상기 치환비를 반영하여 조정됨), 2종의 상이한 화합물 IIa 접합체를 제조하였다. 도 4b는 화합물 A 면역접합체가 본질적으로 불활성인 반면, 화합물 IIa 면역접합체는 대략 나노몰급 EC₅₀을 가졌다는 것을 보여준다. 더 높은 치환비의 화합물 IIa 면역접합체가 더 높은 전체 억제 백분율 (더 깊은 곡선)을 나타내었다는 것 역시 주목할 만하다 (항체 6A4의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로써 개재되는 문헌 [Terrett *et al.* 2011b]에 개시되어 있음. 항체 6A4의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12에 제시함).

[0128]

도 4c는 또 다른 유사한 연구로써, 이번에는 메소텔린을 발현하도록 형질감염된 중국 햅스터 난소 세포인 CHO-메조(meso) 세포를 사용하였다. 접합된 항체는 역시 6A4이었다. 화합물 A 접합체는 본질적으로 불활성이었던 반면, 화합물 IIa 면역접합체는 약 2 nM의 EC₅₀을 가졌다.

[0129]

도 4d 역시 또 다른 유사한 연구로써, 이번에는 메소텔린-발현 인간 난소암 세포인 OVCAR3 세포를 사용하였다. 역시, 접합된 항체는 6A4이었다. 화합물 IIa 면역접합체의 EC₅₀은 화합물 A 면역접합체의 것에 비해 대략 1000 배 더 낮았다.

[0130]

도 4e 역시 또 다른 유사한 연구로써, 이번에는 CD19-발현 인간 버켓 림프종 세포인 라모스(Ramos) 세포를 사용하였다. 접합된 항체는 항-CD19 인간 모노클로날 항체인 21D4이었다. 역시 화합물 A와 IIa 면역접합체들 사이의 상위성을 표시하였는데, 전자가 본질적으로 불활성이었던 반면, 후자는 나노몰-이하급의 EC₅₀을 가졌다 (항체 21D4의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로써 개재되는 문헌 [King *et al.* 2010a] 및 [Rao-Naik *et al.* 2012]에 개시되어 있음. 항체 21D4의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 13, 서열 14, 서열 15, 서열 16, 서열 17 및 서열 18에 제시함).

[0131]

도 4f 역시 또 다른 유사한 연구로써, 이번에는 메소텔린-발현 인간 폐-유래 중피종 세포인 NCI-H226 (H226) 세포를 사용하였다. 접합된 항체는 역시 6A4 이었다. 추가적으로, 동형 대조로서, 화합물 IIa를 전립선 특이적 막 항원 ("PSMA")에 대한 인간 모노클로날 항체인 2A10에 접합시켰다. 예상대로, H226 세포는 PSMA를 발현하지 않기 때문에, PSMA 면역접합체는 활성이 매우 적거나 활성을 가지지 않았다. 화합물 A 면역접합체는 유사하게 낮은 활성을 가지거나 활성을 가지지 않았다. 반면, 2종의 화합물 IIa 면역접합체는 각각 나노몰-이하급의 EC₅₀을 가졌다. 이전의 예에서와 마찬가지로, 더 높은 치환비를 갖는 면역접합체가 더 높은 전체 증식 억제 백분율을 나타내었다 (항체 2A10의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로써 개재되는 문헌 [Huang *et al.* 2009] 및 [Cardarelli *et al.* 2011]에 개시되어 있음. 항체 2A10의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 19, 서열 20, 서열 21, 서열 22, 서열 23 및 서열 24에 제시함).

[0132]

도 4g는 메소텔린을 발현하는 N87 인간 위 암종 세포에 대한 항-메소텔린 항체 6A4와 화합물 IIa의 면역접합체의 활성을 나타낸다. 나노몰이하급의 EC₅₀이 관찰되었다.

[0133] 도 4h는 메소텔린 발현 인간 점막표피양 폐 암종 세포인 H292 세포에 대한 다양한 치환비 (SR)에서의 항체 6A4 와 화합물 IIa의 면역접합체의 활성을 나타낸다. 항-PSMA 항체 2A10과 화합물 IIa의 면역접합체가 대조로 사용되었다. 하기 표 I에, EC₅₀ 값들을 나타내었다. 그것은 SR이 약 2 이상으로 증가되는 경우, 상당한 효능 증가가 존재한다는 것을 보여준다.

[0134]

<표 I>

H292 세포에 대한 활성	
면역접합체	EC ₅₀ (nM)
PSMA – 화합물 IIa	44.8
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 1.17)	86.5
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 2.1)	8.36
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 3.6)	11.9

[0135]

[0136] 도 4i는 도 4h의 것과 유사하나 메소텔린 발현 인간 선암종 세포인 H1650 세포에 대한 것인 연구를 나타낸다. EC₅₀ 값들을 하기 표 II에 나타내었다. 역시, 약 2를 초과하는 SR에서 효능의 도약이 눈에 띄었다.

[0137]

<표 II>

H1650 세포에 대한 활성	
면역접합체	EC ₅₀ (nM)
PSMA – 화합물 IIa	95.3
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 1.17)	180
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 2.1)	16.6
메소텔린 – 화합물 IIa (SR 3.6)	12.1

[0138]

[0139] 도 4j 및 4k는 모두 글리피칸-3을 발현하는 2종의 인간 간세포 암종 세포주 Hep 3B 및 Hep G2에 대한 본 발명 면역접합체의 연구이다. 항-CD70 항체 2H5와 화합물 IIa의 대조 면역접합체와 함께, 단독 및 화합물 IIa에 접합되었을 때의 항-글리피칸-3 인간 모노클로날 항체 4A6의 효능을 비교하였다 (Hep 3B 및 Hep G2 세포 모두 CD70을 발현하지 않음). 결과는 4A6 면역접합체가 매우 강력해서, 대조 CD70 면역접합체에 비해 약 1000× 더 활성이라는 것을 보여준다. 항-글리피칸-3 항체 4A6 단독은 불활성이었다 (항체 4A6의 서열 정보는 그의 개시 내용이 참조로써 개재되는 문헌 [Terrett *et al.* 2010b]에 개시되어 있음. 항체 4A6의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_L CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 25, 서열 26, 서열 27, 서열 28, 서열 29 및 서열 30에 제시함).

[0140]

도 4l, 4m 및 4n은 MDA-MB-468, HCC-1954 및 OVCAR3 세포주에 대한 항-B7H4 인간 모노클로날 항체 2A7과 화합물 IIa의 면역접합체의 활성 연구이다. 처음 2종은 인간 유방암 세포주인 반면, 세 번째 것은 인간 난소암 세포주로써, 모두 B7H4는 발현하나 CD70은 발현하지 않는다. 항-PSMA 항체 2A10과 화합물 IIa의 면역접합체를 대조로 사용하였다. 도면으로부터, 유방암 세포주에 대해서는 약간의 특이적인 활성이 존재하나, OVCAR3 세포에 대해서는 적거나 없음을 볼 수 있다 (항체 2A7의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로써 개재되는 문헌 [Korman *et al.* 2009] 및 [Terrett *et al.* 2011a]에 개시되어 있음. 항체 2A7의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_L CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35 및 서열 36에 제시함).

[0141]

도 4o는 PSMA 및 RG-1 양자를 발현하는 LNCap 인간 전립선암 세포에 대한, 각각 화합물 IIa에 접합된 항-PSMA 인간 모노클로날 항체 2A10 및 항-RG-1 인간 모노클로날 항체 19G9의 면역접합체의 활성 연구이다. 대조로서, 항-메소텔린 항체 6A4와 화합물 IIa의 면역접합체에 대한 비교 데이터가 제공된다. PSMA 및 RG-1 접합체 모두가 각각 나노몰이하급의 EC₅₀으로써 효과적임을 알 수 있었다 (항체 19G9의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [King *et al.* 2011]에 개시되어 있음. 항체 19G9의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_L CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42에 제시함).

[0142]

도 4p는 CD19 및 CD22 양자를 발현하는 라모스 세포에 대한 각각 화합물 IIa에 접합된 항-CD19 인간 모노클로날 항체 21D4 및 항-CD22 인간 모노클로날 항체 12C5의 면역접합체의 활성 연구이다. 항-메소텔린 항체 6A4 및 항-CD70 항체 2H5 화합물 IIa의 면역접합체에 대한 대조 데이터가 제공된다. 항-CD19 및 항-CD22 면역접합체 모

두가 각각 나노몰이하급의 EC₅₀으로써 매우 강력하였다 (항체 12C5의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로 써 개재되는 문헌 [King *et al.* 2010b]에 개시되어 있음. 항체 12C5의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_L CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 43, 서열 44, 서열 45, 서열 46, 서열 47 및 서열 48에 제시함).

[0143] 도 4q는 인간 결장 암종 세포인 HCT116 세포에 대한 화합물 IIa와의 항-PTK7 인간 모노클로날 항체 4D5의 면역 접합체의 활성을 나타낸다. 상기 면역접합체는 1.87 nM의 EC₅₀을 가진 반면, 항-PSMA 항체 2A10의 대조 면역접합체는 951 nM의 EC₅₀으로써 훨씬 덜 강력하였다 (항체 4D5의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 참조로 써 개재되는 문헌 [Terrett *et al.* 2010a] 및 [Terrett *et al.* 2012a]에 개시되어 있음. 항체 4D5의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_L CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 49, 서열 50, 서열 51, 서열 52, 서열 53 및 서열 54에 제시함).

[0144] 도 4r은 인간 폐 편평 세포 암종 세포인 H520 세포에 대한 상기언급된 항-PTK7 항체 4D5의 면역접합체의 활성을 나타낸다. PTK7 면역접합체는 0.224 nM의 EC₅₀을 가진 반면, 대조 PSMA 면역접합체는 역시 61.6 nM의 EC₅₀으로써 훨씬 덜 강력하였다.

[0145] 전기한 결과들은 예상외로 전구약물화 기 - 포스페이트 대 카르바메이트 -의 특성이 다른 것은 동일한 면역접합체의 효능에 있어서 실질적인 역할을 한다는 것을 입증하고 있다. 이론에 의해 얹매이고자 하는 것은 아니라, 우리의 가설은 상이한 인간 세포들 (암 세포 포함)은 상이한 농도의 카르복시에스테라제를 함유한다는 것, 그리고 대부분은 아니라 할지라도 많은 것들이 효율적인 방식으로 카르바메이트 전구약물화 기를 절단하기에는 불충분한 카르복시에스테라제 농도를 함유한다는 것이다. 그러나, 포스페이트 기를 사용하여 전구약물화된 면역접합체는 그와 같은 문제에 부딪치지 않는데, 전체는 아니라 할지라도 대부분의 세포에서 포스파타제 활성의 수준이 포스페이트 기의 효율적인 절단에 충분하게 높기 때문인 것으로 보인다.

용도

[0147] 본 발명의 면역접합체는 비제한적으로 하기를 포함한 과증식성 질환들과 같은 질환을 치료하는 데에 사용된다: 두부, 경부, 비강, 부비동, 비인두, 구강, 구인두, 후두, 하인두, 침샘 및 부신경절종의 종양을 포함한 후두 및 경부의 암; 간 및 담도계의 암, 특히 간세포 암종; 창자 암, 특히 결장직장암; 난소암; 소세포 및 비-소세포 폐암 (SCLC 및 NSCLC); 유방암 육종, 예컨대 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 배아형 횡문근육종, 평활근육종, 신경섬유육종, 골육종, 윤활막 육종, 지질육종 및 폐포 연질부 육종; 백혈병 예컨대 급성 전골수구성 백혈병 (APL), 급성 끌수성 백혈병 (AML), 급성 림프모세포성 백혈병 (ALL) 및 만성 끌수성 백혈병 (CML); 중추 신경계의 신생물, 특히 뇌암; 다발성 끌수종 (MM), 림프종 예컨대 호지킨 림프종, 림프원형질세포양 림프종, 소포성 림프종, 점막-관련 림프양 조직 림프종, 맨틀 세포 림프종, B-직계성 대세포 림프종, 베킷 림프종 및 T-세포 역형성 대세포 림프종. 임상적으로, 본원에서 기술되는 방법의 실행 및 조성물의 사용은 암성 성장의 크기 또는 수 감소, 및/또는 관련 증상 (해당될 경우)의 감소를 초래하게 된다. 병리학적으로, 본원에서 기술되는 방법의 실행 및 조성물의 사용은 하기와 같은 병리학적 관련 반응을 산출하게 된다: 암 세포 증식의 억제, 암 또는 종양의 크기 감소, 추가적인 전이의 방지, 및 종양 혈관생성의 억제. 해당 질환의 치료 방법은 대상체에게 치료 유효량의 본 발명 조합을 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 필요에 따라 반복될 수 있다. 특히, 상기 암은 그의 세포가 CD70, 매소텔린, CD19, 글리피칸-3, B7H4, RG-1, CD22 또는 PTK7을 발현하는 암일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 치료되는 암은 신장암, 췌장암, 난소암, 림프종, 결장암, 중피종, 위암, 폐암, 전립선암, 선암종, 간암 또는 유방암이다.

[0148] 본 발명의 면역접합체는 항체, 알킬화제, 혈관생성 억제제, 항대사물질, DNA 절단제, DNA 가교결합제, DNA 개재제, DNA 마이너 그루브 바인더, 에네다인, 열 충격 단백질 90 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 면역조절제, 미세관 안정화제, 뉴클레오시드 (퓨린 또는 퍼리미딘) 유사체, 핵 외수송 억제제, 프로테아좀 억제제, 토포이소머라제 (I 또는 II) 억제제, 티로신 키나제 억제제 및 세린/트레오닌 키나제 억제제를 포함한 다른 치료제와의 조합으로써 투여될 수 있다. 구체적인 치료제에는 아달리무마브, 앤사미토신 P3, 아우리스타틴, 벤다무스틴, 베마시주마브, 비칼루타미드, 블레오마이신, 보르테조마브, 부술판, 칼리스타틴 A, 캄프토테신, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 세툭시마브, 시스플라틴, 클라드리빈, 시타라빈, 크립토피신, 다카르바진, 다사티니브, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 듀오카마이신, 다이네마이신 A, 에포탈론, 에토포시드, 플록수리딘, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 제피티니브, 켐시타빈, 이필리무마브, 히드록시우레아, 이마티니브, 인플릭시마브, 인터페론, 인터류킨, β -라파콘, 레날리도미드, 이리노테칸, 메이탄신, 메클로레타민, 멜팔란, 6-

메르캅토피린, 메토트렉세이트, 미토마이신 C, 널로티니브, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 프로카르바진, 수베로일 아닐리드 히드록삼산 (SAHA), 6-티오구아니딘, 티오텐파, 테니포시드, 토포테칸, 트라추주마브, 트리코스탄틴 A, 빈블라스틴, 빙크리스틴 및 빈테신이 포함된다.

[0149] 본 발명의 면역접합체는 생물학적 약물용으로 통상적인 기술을 사용하여 제제화 및 투여될 수 있다. 제제는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)]에 교시되어 있는 바와 같은 부형제들을 포함할 수 있다. 대표적인 부형제에는 비제한적으로 완충제 (예컨대 포스페이트, 아세테이트, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (트리스(Tris))), 가용화제 및 에멀션화제 (예컨대 폴리소르베이트), 보존제 (예컨대 티메로살, 벤질 알콜), 염 (예컨대 NaCl, KCl), 칼레이팅제 (예컨대 EDTA), 탄수화물 (예컨대 수크로스, 텍스트로스, 말토스, 트레할로스), 담체 (예컨대 알부민), 아미노산 및 그의 각 염산염, 시트레이트, 소르비톨, 텍스트란 등이 포함된다.

[0150] 면역접합체는 부형제와 함께 또는 그것 없이 동결건조된 분말로서 제공될 수 있으며, 그것은 이후 추가적인 부형제와 함께 또는 그것 없이 주사용 멸균수, 주사용 나트륨 클로라이드 용액 또는 주사용 텍스트로스 용액과 같은 매체 중에 용해될 수 있다.

[0151] 다르게는, 면역접합체는 임의로 부형제를 포함하는 농축 용액으로서 제공된 다음, 투여 전에 원하는 농도로 희석될 수 있다. 대안적인 형태에는 분산액, 미세에멀션 및 리포좀이 포함된다.

[0152] 바람직하게는, 제약 조성물은 정맥내 ("IV"), 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여에 적합하다 (예컨대 주사 또는 주입에 의함). "비경구 투여"라는 구는 보통 주사에 의한, 장내 및 국소 투여가 아닌 다른 투여 양식을 의미하며, 여기에는 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 포내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 피부하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척추내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다. 바람직한 투여 양식에는 피하 및 근육내의 IV 주입, IV 일시주사(bolus)가 포함된다.

[0153] "치료 유효량"은 바람직하게는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 기간 증가, 또는 질환의 고통으로 인한 손상 또는 무능력의 방지를 초래한다. 예를 들면, 종양-보유 대상체의 치료에 있어서, "치료 유효량"은 바람직하게는 종양 성장을 미치리 대상체 대비 약 20 % 이상, 더욱 바람직하게는 약 40 % 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 60 % 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 80 % 이상 억제한다. 치료 화합물의 치료 유효량은 통상적으로는 인간이지만 또 다른 포유동물일 수도 있는 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 또는 다르게는 증상을 개선할 수 있다.

[0154] 투여 요법은 치료 반응을 제공하도록 조정된다. 예를 들면, 단일 투여량이 투여될 수 있거나, 시간이 지나면서 몇 개의 분할된 투여량이 투여될 수 있거나, 또는 투여량이 상황의 위급성에 의해 표시되는 바에 따라 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해서는, 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. "투여 단위 형태"는 치료될 대상체에 대한 하나의 투여량으로 적합화된 물리적으로 별개인 단위를 지칭하는데; 각 단위는 필요한 제약 담체와 함께 원하는 치료 반응을 산출하도록 계산된 사전결정량의 활성 화합물을 함유한다. 사전충전된 주사기, 2-실 주사기 및 자동주사기와 같은 장치들이 사용될 수 있다.

[0155] 투여량은 치료되는 질환, 환자의 특질 예컨대 연령, 성 및 유전형, 그리고 치료 요법의 단계에 따라 달라지게 된다. 통상적으로, 투여량은 약 0.5 mg/kg 내지 약 300 mg/kg일 수 있다.

실시예

[0157] 예시를 위하여 제공되는 것으로써 제한하는 것이 아닌 하기의 실시예를 참조하게 되면, 본 발명의 실행이 추가적으로 이해될 수 있다.

실시예 1 - 화합물 IIa

[0159] 본 실시예는 본 발명 화합물 12 (본원에서는 화합물 IIa로도 지칭됨)의 합성에 대해 기술한다. 도 1a 및 1b는 합쳐서 그의 합성을 위한 반응식을 나타낸다.

[0160] 화합물 2. 무수 디클로로메탄 ("DCM", 시스마-알드리치 사, 5 mL) 중 화합물 1 (1 g, 2.36 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산 ("TFA", 피셔(Fisher) 사, 5 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온 ("RT", 약 25 °C)에서 30분 동안 교반하였다. 고압 액체 크로마토그래피 ("HPLC") 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼

합물을 고진공하에서 밤새 농축 및 건조하여 녹색을 띤 고체 (TFA 염)로서 1.15 g의 화합물 2를 산출하였다.

[0161] 화합물 4. 에틸 5-니트로인돌-2-카르복실레이트 (화합물 3, 아크로스(Acros) 사, 10 g, 42.7 mmol)의 혼탁액에 무수 메탄올 (아크로스 사, 100 mL) 중 디-*tert*-부틸 디카르보네이트 ("(Boc)₂O", 10.24 g, 46.97 mmol) 및 팔라듐 (알드리치 사, 활성탄상 10 %, 400 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂ (30 sp)하에서 8시간 동안 수소화하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 고진공하에서 농축 및 건조함으로써 황색의 고체로서 화합물 4를 산출하였다 (10.5 g, 81 %).

¹HNMR (DMSO) δ 11.68 (s, 1 H),

9.19 (s, 1 H), 7.76 (s, 1H), 7.26 (m, 2 H), 7.02 (d, 1 H), 4.30 (q, 2 H), 1.46 (s, 9 H) 1.33 (t, 3 H).

[0162] [0163] 화합물 5. 아세토니트릴 (150 mL) 중 화합물 4 (10.5 g, 34.5 mmol)의 용액에 수중 LiOH 1수화물 (시그마-알드리치 사) 용액 (150 mL, 0.57 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40 °C에서 밤새 가열한 후, HPLC 분석을 참조하여 가수분해를 완료하였다. 반응 혼합물을 물 (300 mL)로 희석하고, 진공하에서 농축하여 아세토니트릴을 제거하였다. 생성되는 용액을 EtOAc (2×150 mL)로 추출하고, 유기 층을 폐기하였다. 10 % KHSO₄ (알드리치 사) 용액을 첨가함으로써, 수성 층을 pH 4까지 산성화하였다. 생성되는 혼합물을 다시 EtOAc (3×150 mL)로 추출하였다. 나중의 3회 추출로부터의 유기 층을 합쳐, 무수 MgSO₄상에서 건조한 후, 진공하에서 농축하여, 갈색의 고체로서 화합물 5를 산출하였다 (9.7 g, 84 %).

¹HNMR (DMSO) δ 12.84 (s, 1 H), 11.65 (s, 1 H), 9.20 (s, 1 H), 7.73 (s, 1 H), 7.23 (m, 2 H), 6.92 (s, 1 H), 1.42 (s, 9 H); MS (ESI) *m/z* 299 (M+Na)⁺.

[0164] [0165] 화합물 6. 무수 N,N-디메틸포름아미드 ("DMF", 시그마-알드리치 사, 10 mL) 중 화합물 5 (779 mg, 2.83 mmol) 및 N,N,N',N'-테트라메틸-O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)우로늄 혼합물을 수중 풍선하에서 밤새 교반하였다. N,N-디이소프로필에틸아민 ("DIPEA")을 첨가하여, 반응 용액의 pH를 8 초과로 조정하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. 조 화합물 2 (1.15 g, 2.36 mmol로 추정)를 첨가한 후, 이어서 추가 DIPEA를 첨가하여, 반응 혼합물의 pH를 8 초과로 조정하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 거의 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 물로 세척한 다음, 염수로 세척하였다. 2 g의 실리카 젤을 사용하여 유기 상을 슬러리로 농축하였다. 상기 슬러리를 40 g의 콤비플래시(CombiFlash) 컬럼에서 헥산 중 0-50 %의 EtOAc 구배를 사용하여 정제함으로써, 황색의 고체로서 화합물 6을 산출하였다 (1.05 g, 76 %).

¹HNMR (DMSO-d₆): δ 11.61 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.22 (d, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.58 (m, 3H), 7.42 (m, 3H), 7.33 (m, 3H), 7.15 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.82 (t, 1H), 4.59 (d, 1H), 4.30 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 1.48 (s, 9H).

[0166] [0167] 화합물 7. 무수 DCM (시그마-알드리치 사, 10 mL) 중 화합물 6 (780 mg, 1.34 mmol) 및 Pd/C (시그마-알드리치 사, 10 %, 150 mg), 및 무수 메탄올 (5 mL)로 이루어진 반응 혼합물을 수중 풍선하에서 밤새 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 셀라이트(CELITE)TM를 통하여 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 농축하여, 약간 황색인 고체로서 화합물 7을 산출한 후 (562 mg, 86 %), 그것을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0168] 화합물 9. 테트라히드로푸란 ("THF", 시그마-알드리치 사, 무수, 25 mL) 중 화합물 7 (260 mg, 0.53 mmol), 디-*tert*-부틸 디에틸포스포르아마다이트 (시그마-알드리치 사, 0.58 mL, 2.1 mmol) 및 테트라졸 (시그마-알드리치 사, 아세토니트릴 중 0.45 M, 14 mL)의 용액을 RT에서 2시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 개시 물질 7이 완전히 화합물 8로 전환되었음을 나타내었다. 화합물 8의 단리 없이, DCM (무수, 시그마-알드리치 사, 10 mL) 중 *m*-클로로페벤조산 ("mCPBA", 시그마-알드리치 사, 365 mg, 2.12 mmol)의 용액을 첨가하였다. 생성되는 반응 혼합물을 RT에서 0.5시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 0.5 g의 실리카 젤을 사용하여 반응 혼합물을 농축함으로써, 슬러리를 형성시켰다. 상기 슬러리를 4 g의 콤비플래시 컬럼에서 헥산 중 10-50 %의 EtOAc 구배를 사용하여 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합치고, 고진공하에서 건조함으로써, 백색의 고체로서 화합물 9를 산출하였다 (212 mg, 59 %).

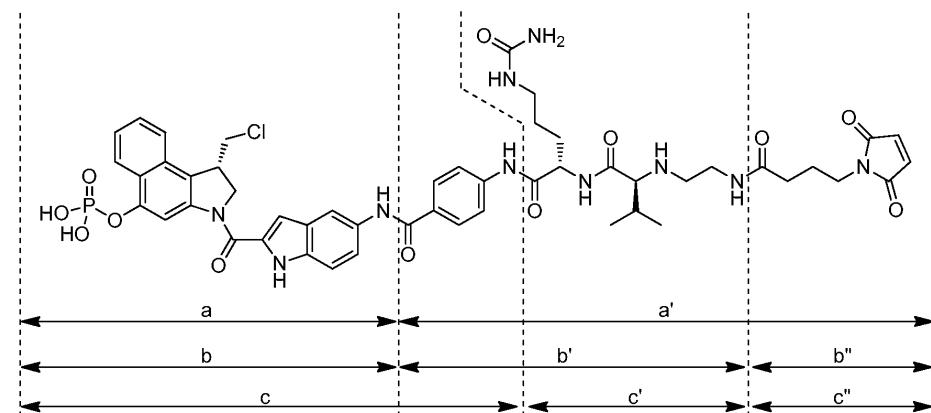
[0169] 화합물 10. 무수 DCM (시그마-알드리치 사, 3 mL) 중 화합물 9 (212 mg, 0.031 mmol)의 용액에 TFA (피셔 사,

3 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 고진공하에서 밤새 농축 및 건조함으로써, 녹색을 띤 고체로서 화합물 10을 산출하였다 (271 mg).

[0170] TFA 염의 ^1H NMR (DMSO- d^6): δ 11.81 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.12 (d, 1H), 7.94 (d, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.18 (s, 1H), 7.02 (d, 1H), 4.78 (t, 1H), 4.68 (d, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.90 (m, 1H).

[0171] 화합물 12. 무수 DMF (시그마-알드리치 사, 3 mL) 중 화합물 11 (179 mg, 모노-TFA 염을 가정하여 0.25 mmol, 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Sufi *et al.* 2010]에 따라 제조) 및 HATU (오크우드 사, 84.4 mg, 0.222 mmol)의 용액의 pH를 DIPEA의 첨가에 의해 8 초과로 조정하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. HPLC 분석이 대부분의 화합물 11이 활성화되었음을 나타내었다. 화합물 10 (130 mg, 모노-TFA 염을 가정하여 0.222 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하였다. DIPEA를 첨가함으로써, pH를 8 초과로 조정하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 정제용 HPLC에 주사하고, 용리액으로 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 동결건조함으로써, 백색의 고체로서 화합물 12를 산출하였다 (138 mg, 55 %). MS: [M+H] 1055.

[0172] 업계 숙련자라면, 상기 및 도 1a 및 1b에서 기술된 합성이 단편 a 및 a'의 전구체의 수렴성 조립을 포함하며, 예를 들면 하기에서 나타내는 바와 같이 단편 b, b' 및 b" 또는 단편 c, c' 및 c"로의 전구체의 조립을 통하여 대안적인 합성 전략이 사용될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 후자의 두 가지 전략은 그의 개시내용이 참조로써 개재되는 문헌 [Sufi *et al.* 2010]에 예시되어 있으며, 필요한 변경을 위하여 본 발명 화합물의 합성에 적합화될 수 있다.



[0173] [0174] 실시예 2 - 화합물 1a

[0175] 본 실시예는 본원에서 화합물 1a로도 지칭되는 화합물 14의 합성에 관한 것이다. 합성을 위한 반응식을 도 2에 나타내었다.

[0176] 화합물 13. 무수 DMF (아크로스 사, 1 mL) 중 화합물 10a (시그마-알드리치 사, 15.7 mg, 0.051 mmol) 및 HATU (오크우드 사, 19.4 mg, 0.051 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 17 μ L, 0.1 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH는 8을 초과하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. HPLC 분석이 개시 뒤 질이 완전히 활성화되었음을 나타내었다. 이 용액에 화합물 10 (30 mg, 모노-TFA 염을 가정하여 0.051 mmol)을 첨가하였다. 추가 DIPEA를 첨가하여 반응 혼합물의 pH를 8 초과로 조정하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 조 생성물을 용리액으로서 수중 (부피 기준 0.1 %의 TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하는 정제용 HPLC에 의해 정제함으로써 회백색(off-white)의 고체로서 화합물 13을 산출하였다 (25 mg, 71 %).

[0177] 화합물 14. 무수 DCM (아크로스 사, 1 mL) 중 화합물 13 (25 mg, 0.036 mmol)의 용액에 TFA (VWR 사, 1 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 농축한 후, 용리액으로서 수중 (부피 기준 0.1 %의 TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하는 정제용 HPLC에 의해 정제함으로써 회백색의 고체로서 화합물 14를 산출하였다 (21 mg, 모노-TFA 염을 가정

하여 82 %).

[0178] $^1\text{H}\text{NMR}$ (DMSO-d₆): δ 11.65 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.07 (d, 2H), 7.91 (m, 2H), 7.69 (d, 2H), 7.35-7.55 (m, 4H), 7.15 (s, 1H), 6.57 (d, 2H), 4.82 (t, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.03 (t, 1H), 3.954 (t, 1H). $^{31}\text{P}\text{NMR}$ (DMSO-d₆): δ -5.909 (s, 1P), MS: [M+H] 591.

[0180] 실시예 3 - 화합물 IIb

[0181] 도 3a-3d는 합쳐서 본원에서 화합물 IIb로도 지칭되는 화합물 28의 합성을 나타낸다. 업계 숙련자라면, 여기에서 사용되는 일반적인 전략이 상기 실시예 1에 기술되어 있는 b/b'/b" 양식에 해당한다는 것을 알고 있을 것이다.

[0182] 도 3a는 제1 중간체 화합물 18의 합성을 나타낸다.

[0183] 화합물 17. 메탄올 (무수, 아크로스 사, 65 mL) 중 (S)-메틸 2-아미노-3-메틸부타노에이트 (화합물 15, 바켐 (BaChem) 사, HCl 염, 5.26 g, 31.4 mmol), NaOAc (알드리치 사, 10.3 g, 82.06 mmol)의 용액에 메탄올 (무수, 아크로스 사, 15 mL) 중 *tert*-부틸 (2-옥소에틸)카르바메이트 (화합물 16, 알드리치 사, 5 g, 31.4 mmol)의 용액을 첨가하였다. 다음에, NaBH₃CN (알드리치 사, 3.95 g, 62.8 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22.5 °C에서 16시간 동안 교반하여, 슬러리로 농축하였다. 상기 슬러리를 물 (100 mL)에 용해시키고, 생성되는 용액을 EtOAc (3×100 mL)로 추출하였다. 유기 상을 합쳐, 염수 (1×100 mL)로 세척하고, 농축한 후, 진공하에서 건조하여 화합물 17을 산출하였다 (오일, 조물질 9.4 g). [M+H] 275.

[0184] 화합물 18. 메탄올 (40 mL) 중 조 화합물 17 (9.4 g)의 용액에 수중 (40 mL) LiOH 수화물 (알드리치 사, 2.88 g, 68.6 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하고, 물 (40 mL)로 희석하였다. 생성되는 용액을 DCM (40 mL)으로 추출하였다. 수성 층을 분리한 후, KHSO₄ 용액 (알드리치 사, 수중 20 %)을 사용하여 pH 5로 산성화하였다. 혼탁액을 여과한 후, 고진공하에서 고체를 건조하여 백색의 고체로서 화합물 18을 산출하였다 (4.85 g, 화합물 15로부터 60.2 %). MS: [M+H] 261.

$^1\text{H}\text{NMR}$ (DMSO-d₆) δ 6.82 (t, 1 H), 3.06 (m, 2 H), 2.83

[0185] (d, 1 H), 2.62 (m, 2 H), 2.31 (m 1 H), 1.88 (m, 1 H), 1.38 (s, 9 H), 0.86 (d, 6 H).

[0186] 도 3b는 제2 중간체화합물 22의 합성을 나타낸다.

[0187] 화합물 21. N_a-Fmoc-L-시트룰린 (화합물 20, 플루카(Fluka) 사, 15 g, 37.74 mmol)의 용액에 무수 DMF (아크로스 사, 150 mL) 중 *tert*-부틸 4-아미노벤조에이트 (화합물 19, 플루카 사, 8.75 g, 45.3 mmol), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드 ("EDC", 플루카 사, 8.68 g, 45.3 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸 (켐-임佩克斯(Chem-Impex) 사, 6.12 g, 45.3 mmol), 및 CuCl₂ (알드리치 사, 6.08 g, 45.3 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (600 mL)로 희석하고, 생성되는 용액을 Na₂CO₃ 용액 (5 %, 200 mL), 포화 NaHCO₃ 용액 (1×200 mL) 및 염수 (1×200 mL)로 세척하였다. 합쳐진 유기 층을 무수 MgSO₄ 상에서 건조하고 농축함으로써 황색의 고체로서 조 화합물 21을 산출하였다.

$^1\text{H}\text{NMR}$ (DMSO-d₆) δ 10.39 (s, 1 H), 7.82 (q, 4 H), 7.68 (m, 4 H), 7.28-7.40 (m, 5 H), 6.01 (t, 1 H), 5.42 (s, 2 H), 4.10-4.29 (m, 4 H), 2.90-3.05 (m, 2 H), 1.32-1.70 (m, 13 H); MS:

[0188] [M+H] 573.

[0189] 화합물 22. 무수 DMF (아크로스 사, 140 mL) 중 조 화합물 21의 용액에 피페리딘 (알드리치 사, 14 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 농축하고, 잔류물을 EtOAc (600 mL)에 용해시켰다. 유기 상을 염수 (1×200 mL)로 세척하고, 무수 MgSO₄ 상에서 건조한 후, 실리카 젤을 사용하여 슬러리로 농축시켰다. 상기 슬러리를 용리액으로서 DCM 중 0-20 %의 메탄올 구배를 사용하는 플래시 크로마토그래피에 의해 정제함으로써 백색의 고체로서 화합물 22를 산출하였다 (9.5 g, 화합물 20으로부터 72 % 수율).

[0190] $^1\text{H}\text{NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.82 (d, 2 H), 7.72 (d, 2 H), 5.97 (t, 1 H), 5.38 (s, 2 H), 3.43 (m, 1 H), 2.98 (t, 2 H), 1.30-1.62 (m, 13 H); MS: [M+H] 351.

[0191] 도 3c는 제3 중간체 화합물 25의 합성을 나타낸다.

[0192] 화합물 23. DMF (아크로스 사, 무수, 15 mL) 중 화합물 18 (1.5 g, 5.77 mmol), 벤조트리아졸-1-일옥시-트리스(디메틸아미노)-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 ("BOP", 바肯 사, 2.87 g, 6.5 mmol) 및 화합물 22 (1.84 g, 5.26 mmol)의 용액에, 용액의 pH를 8 초과로 조정하기에 충분한 양으로 DIPEA (알드리치 사)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 3시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. DCM (100 mL) 및 포화 NaHCO_3 용액 (100 mL)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 수성 층을 DCM (2×25 mL)으로 추출하였다. 유기 상을 합친 후, 실리카 젤 (8 g)을 사용하여 슬러리로 농축하였다. 상기 슬러리를 용리액으로서 DCM 중 0-10 % 메탄올 구배를 사용하는 80 g의 콤비플래시 컬럼에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써 백색의 고체로서 화합물 23을 산출하였다 (2.1 g, 68 %). MS: [M+H] 593.

[0193] 화합물 24. 아세토니트릴 (HPLC 등급, 알드리치 사, 20 mL) 중 화합물 23 (1.8 g, 3.03 mmol)의 용액에 디옥산 중 HCl (알드리치 사, 4 N, 7 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 3시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 여과에 의해 생성물을 수집하고, 고진공하에서 밤새 건조함으로써 거의 백색인 고체로서 화합물 24를 산출하였다 (1.45 g, 94 %). MS: [M+H] 437.

[0194] 화합물 25. DMF (무수, 2 mL) 중 화합물 24 (200 mg, 이중 HCl 염을 가정하여 0.39 mmol) 및 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (94.2 mg, 0.43 mmol)의 용액에, 반응 혼합물의 pH를 8 초과로 조정하기에 충분한 양으로 DIPEA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반하였다. HPLC 분석이 반응이 완료되었음을 나타내었다. 디에틸 에테르 (20 mL)를 첨가하고, 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. 생성물을 반-고체로서 분리하였다. 용매를 따라내고, 생성물을 고진공하에서 밤새 건조하여 백색의 고체로서 화합물 25를 산출하였다 (178 mg, 85 %, HCl 염). MS: [M+H] 537.

$^1\text{H}\text{NMR}$ (DMSO- d_6) δ 10.51 (s, 1 H), 8.85 (b, 1 H), 7.88 (d, 2 H), 7.71 (d, 2 H), 7.03 (b, 1 H), 6.18 (d, 1 H), 5.42 (b, 2 H), 4.48 (s, 1 H), 2.75-3.10 (m, 7 H), 2.18 (b, 1 H), 1.42-1.78 (m, 4 H), 1.38 (s, 9 H), 0.92 (m, 6 H).

[0195] 도 3d는 본원에서 화합물 IIb로도 지칭되는 화합물 28 합성의 완료를 나타낸다.

[0196] 화합물 26. DMF (아크로스 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 25 (394 mg, 0.734 mmol) 및 HATU (오크우드 사, 186 mg, 0.489 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 0.142 mL, 0.816 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH는 8을 초과하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. 화합물 10 (실시예 1, 192 mg, 0.407 mmol)을 첨가하였다. 추가 DIPEA를 첨가하여 반응 혼합물의 pH를 8 초과로 유지하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 정제용 HPLC에 주사하고, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 % 아세토니트릴 구배를 사용한 용리에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 백색의 고체로서 화합물 26을 산출하였다 (205 mg, 51 %). MS: [M+H] 990.

[0197] 화합물 27. DCM (아크로스 사, 무수, 5 mL) 중 화합물 26 (205 mg, 0.207 mmol)의 용액에 TFA (VWR 사, 5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고 냉동-건조함으로써 그의 TFA 염으로서 화합물 27을 산출하였다 (210 mg, 100 %). MS: [M+H] 890.

[0198] 화합물 28. DMF (아크로스 사, 무수, 2 mL) 중 3-메르캅토프로판산 (알드리치 사, 59.6 mg, 0.562 mmol), 화합물 27 (100 mg, 0.112 mmol) 및 BOP (알드리치 사, 124 mg, 0.281 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 0.147 mL, 0.842 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH는 8을 초과하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 정제용 HPLC에 주사하고, 수중 (0.01 % TFA 포함) 10-65 % 아세토니트릴 구배를 사용한 용리에 의해 정제함으로써 화합물 28을 산출하였다 (45 mg, 45.5 %). MS: [M+H] 978.

[0199] 실시예 4 - 면역접합체의 제조

[0200] 하기는 리신 ϵ -아미노 기의 2-이미노티올란과의 반응 후 이어지는 화합물 IIa와 같은 말레이미드-함유 전구약 물화 모이어티와의 반응에 의한 항체에의 자유 티올 기의 도입을 바탕으로 한, 본 발명 면역접합체의 제조를 위한 예시적인 일반 절차이다. 먼저, 항체를 50 mM의 NaCl 및 2 mM의 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산 ("DTPA")을 함유하는 0.1 M 포스페이트 완충제 (pH 8.0)으로 완충제 교환하고, 5-10 mg/mL로 농축하였다. 항체에 대한

2-이미노티올란의 첨가를 통하여 티올화가 달성된다. 첨가될 2-이미노티올란의 양은 예비 실험에 의해 결정될 수 있는데, 항체마다 다르다. 예비 실험에서는, 적정 증가량의 2-이미노티올란을 항체에 첨가하고, 항체와의 RT 25 °C에서의 1시간 동안의 인큐베이션 후, 세파덱스(SEPHADEX)™ G-25 컬럼을 사용하여 50 mM의 pH 6.0 헤페스(HEPES) 완충제로 항체를 탈염하고, 디티오디피리딘("DTDP")과의 반응에 의해 신속하게 도입된 티올 기의 수를 측정한다. DTDP와의 티올 기의 반응은 티오피리딘의 유리를 초래하는데, 그것은 324 nm에서 분광학적으로 모니터링될 수 있다. 통상적으로, 단백질 농도 0.5-1.0 mg/mL의 샘플이 사용된다. 280 nm에서의 흡광도를 사용하여 샘플 중 단백질의 농도를 정밀하게 측정할 수 있으며, 다음에는 각 샘플의 분취량 (0.9 mL)을 0.1 mL의 DTDP (에탄올 중 5 mM의 모용액)와 함께 RT에서 10분 동안 인큐베이팅한다. 완충제 단독 더하기 DTDP의 바탕(blank) 샘플도 함께 인큐베이팅한다. 10분 후, 324 nm에서의 흡광도를 측정하고, $19,800 \text{ M}^{-1}$ 의 티오피리딘의 흡광 계수를 사용하여 티올 기의 수를 정량한다.

[0202] 통상적으로, 항체당 약 3개 티올 기의 티올화 수준이 바람직하다. 예를 들면, 일부 항체의 경우, 이는 15배 몰과량의 2-이미노티올란의 첨가 후 이어지는 RT에서의 1시간의 인큐베이션에 의해 달성될 수 있다. 다음에, 항체를 2-이미노티올란과 함께 원하는 몰 비로 인큐베이팅한 다음, 접합 완충제 (5 mM의 글리신 및 2 mM의 DTPA를 함유하는 50 mM의 pH 6.0 헤페스 완충제)로 탈염한다. 상기한 바와 같이 도입된 티올의 수를 정량하는 동안, 티올화된 물질은 얼음상에서 유지된다.

[0203] 도입된 티올 수의 확인 후, 티올 당 3-배 몰과량으로 약물-링커 모이아티를 첨가한다. 최종 농도 5 %의 디메틸суլ포시드(DMSO) 또는 유사한 대안적인 용매도 함유하는 접합 완충제 중에서 접합 반응이 진행되도록 한다. 일반적으로, 약물-링커 모 용액은 100 % DMSO에 용해시킨다. 상기 모 용액은 최종 농도가 10 %가 되도록 충분한 DMSO가 첨가된 티올화 항체에 직접 첨가되거나, 또는 최종 농도 10 %의 DMSO를 함유하는 접합 완충제에 사전-희석된 후 이어서 동일 부피의 티올화된 항체에 첨가된다.

[0204] 상기 접합 반응 혼합물을 RT에서 교반하면서 2시간 동안 인큐베이팅한다. 인큐베이션 후, 접합 반응 혼합물을 원심분리하고, 0.2 μm 필터를 통하여 여과한다. 접합체의 정제는 수많은 방법을 사용한 크로마토그래피를 통하여 달성될 수 있다. 한 가지 방법에서는, 5 mM의 글리신 및 50 mM의 NaCl을 함유하는 50 mM의 pH 7.2 헤페스 완충제로 사전-평형화된 세파크릴(SEPHACRYL)™ S200 컬럼상에서의 크기-배제 크로마토그래피를 사용하여 접합체를 정제한다. 크로마토그래피는 28 cm/시간의 선형 유량으로 수행된다. 접합체를 함유하는 분획을 수집한 후, 합쳐 농축한다. 대안적인 방법에서, 정제는 이온-교환 크로마토그래피를 통하여 달성될 수 있다. 조건은 항체마다 달라지며, 사례별로 최적화되어야 한다. 예를 들면, 항체-약물 접합체 반응 혼합물은 5 mM의 글리신을 함유하는 50 mM의 pH 5.5 헤페스 중에 사전-평형화된 SP-세파로스(SEPHAROSE)™ 컬럼에 적용된다. 항체 접합체는 pH 5.5의 평형화 완충제 중에서 0-1 M NaCl의 구배를 사용하여 용리된다. 면역접합체를 함유하는 관련 분획을 합치고, 제제화 완충제 (5 mM의 글리신 및 100 mM의 NaCl을 함유하는 50 mM의 pH 7.2 헤페스 완충제)에 대하여 투석한다.

[0205] 상기 절차 후, 항-PSMA 인간 모노클로날 항체 (2A10, 문헌 [Huang *et al.* 2009] 및 [Cardarelli *et al.* 2011]; 항-메소텔린 인간 모노클로날 항체 (6A4, 문헌 [Terrett *et al.* 2009b], 항-CD70 인간 모노클로날 항체 (2H5, 문헌 [Terrett *et al.* 2009a]) 및 항-CD19 인간 모노클로날 항체 (21D4, 문헌 [Rao-Naik *et al.* 2009])를 사용하여 화합물 IIa의 면역접합체를 제조하였다. 화합물 A를 사용한 비교용 면역접합체도 제조하였다.

[0206] 업계 숙련자라면, 상기한 조건 및 방법론이 예시적인 것으로써 비-제한적이라는 것, 및 접합을 위한 다른 접근법들이 업계에 알려져 있으며 본 발명에 사용가능하다는 것을 알고 있을 것이다.

[0207] 실시예 5 - ^3H -티미딘 도입 검정

[0208] 본 실시예는 본 발명 면역접합체의 항증식 활성을 검정하는 데에 사용되는 절차에 대해 일반적으로 기술한다. 미국 VA 20108, 마나嘶스, P.O. Box 1549 소재 미국 미생물 보존 센터(American Type Culture Collection) (ATCC)로부터 인간 종양 세포주를 입수하고, ATCC 지침에 따라 배양하였다. 인간 메소텔린 유전자를 함유하는 DNA를 사용하여 CHO 세포를 형질감염시킴으로써 CHO-메조 세포를 생성시키고, 인간 메소텔린을 발현하는 안정한 클론에 대하여 선택하였다. ^3H 티미딘 검정을 위하여, 96-웰 플레이트에 1.0×10^4 세포/웰로 3시간 동안 각각 세포를 접종하였다. 면역접합체의 연속 희석물 (1:3)을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 72시간 동안 인큐베이팅 시켰다. 웰 당 1.0 μCi 의 ^3H -티미딘을 사용하여 최종 24시간의 총 인큐베이션 기간 동안 플레이트를 펄싱하고 (pulsed), 수확한 후, 탑 카운트 신틸레이션 카운터(Top Count Scintillation Counter) (팩카드 인스트루먼츠

(Packard Instruments) 사, 코네티컷 메리덴 소재)에서 해독하였다. 프리즘(PRISM)TM 소프트웨어 버전 4.0 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software) 사, 미국 캘리포니아 라 졸라 소재)을 사용하여 EC₅₀ 값 - 작용제가 세포 증식을 최대 억제의 50 % 만큼 억제하거나 감소시키는 농도 -을 측정하였다.

[0209] 항증식 결과는 상기에서 논의된 도 4a-4f에 나타내었다.

[0210] 실시예 6 - 세포 용해물에 의한 탈인산화

[0211] 본 실시예는 본 발명에 따른 포스페이트 전구약물화 세코-MGBA 화합물이 인간 종양 세포 용해물에 의해 탈인산화될 수 있다는 것을 입증한다.

[0212] 보르텍싱(vortexing) 퓨브 당 10⁷ 세포의 추정량을 갖는 냉동 펠렛으로서의 786-0 세포를 500 μL의 용해 완충제 (25 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 0.25 M 수크로스, 0.1 % 트리톤(Triton) X-100, pH 5.5) 중에 재현탁하여 균질화하였다. 균질화는 30초 동안의 보르텍스 혼합 후 이어지는 얼음상에서의 1분 냉각을 포함하였다. 각 퓨브 당, 3회의 보르텍스 및 냉동 주기를 수행하였다. 다음에, 19 게이지 바늘에서 3회 전단시킴으로써, 세포 샘플을 추가 혼합하였다.

[0213] 균질화 후, 벤조나제(BENZONASE)TM DNase를 사용하여 세포 용해물의 DNA를 가수분해하였다. 샘플을 먼저 1 mM의 MgSO₄ 중에 노출시켰다. 혼합 후, 2 μL의 벤조나제TM DNase (순수)를 각 용해물 (4 μL/mL, v/v, 최종 농도) 바이알에 첨가하였다. 다음에, 샘플을 RT에서 15분 동안 저장한 다음, 얼음상에서 냉각하였다. 이 단계에서, 성공적인 DNase 활성은 양모형 침전물의 출현으로 입증되었다. 다음에, 미세원심분리기에서 5분 동안 최대 속도로 샘플을 회전시킴으로써, 세포 잔사물을 제거하였다. 차후의 사용을 위하여, 상청액을 -70 °C로 냉동하였다. 피어스(Pierce) BCA 단백질 측정 방법론 (서모 사이언티픽(Thermo Scientific) 사)을 사용하여 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 본 연구의 샘플은 2.85 mg/mL의 단백질을 함유하는 것으로 밝혀졌다.

[0214] 2000 μM의 화학식 Ia 화합물 모 용액을 제조하였다. 용해물을 용해물 완충제 중에 2.1 mg/mL로 회석하였다. 반응을 위하여, 5 μL의 화합물 Ia 모액을 95 μL의 용해물에 첨가하였다. 최종 농도는 2 mg/mL의 단백질을 함유하는 용해물 중 화합물 Ia 100 μM이었다. 25 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 0.25 M 수크로스, 0.1 % 트리톤 X 100 및 1 mM MgSO₄를 함유하는 완충제는 pH 5.5에서 완충을 제공하였다.

[0215] 세포 용해물 대신 용해물 완충제를 포함하며, 벤조나제TM DNase 및 MgSO₄도 첨가되는 음성 대조를 사용하였다.

[0216] 시험 샘플 및 대조를 37 °C로 설정된 핫 블록(hot block)에 위치시켰다. 사전결정된 시간 간격으로 (5분, 1시간, 2시간, 4시간 및 8시간), 50 μL의 분취량을 제거하고, 150 μL (3×)의 저온 에탄올의 첨가에 의해 각 분취량의 반응을 중지시켰다. 샘플을 얼음상에서 1시간 동안 저장하고, 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 하기의 조건하의 UPLC 분석을 위하여 상청액을 보존하였다:

[0217] 컬럼: 워터스(Waters) HSS T3 2.1×50 mm C18 UPLC

[0218] 이동상: "A" 완충제: 물/0.1 % TFA; "B" 완충제: 아세토니트릴/0.1 % TFA

[0219] HPLC 시스템: 워터스 UPLC

[0220] 주사 부피: 4 μL

[0221] 용리: 25 내지 40 % "B", 1.8분 이내

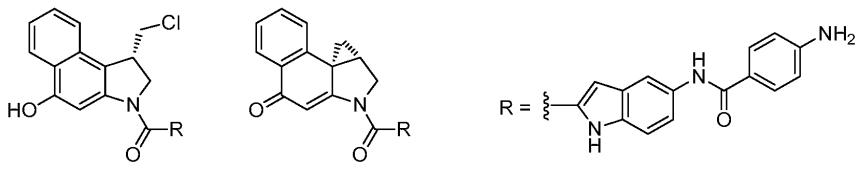
[0222] 유량: 1 mL/분

[0223] 검출: A340

[0224] 반응 후, 각각 탈인산화된 화합물 Ia의 세코 및 시클로프로필 형태인 하기 화학식 IVa 및 IVb 화합물의 생성에 대한 모니터링이 이어졌다.

[0225]

<화학식 IVa ~ IVb>



[0226]

[0227] 8시간 이내에 완료됨으로써, 탈인산화는 극히 빠른 것으로 밝혀졌다. 반응 혼합물의 pH가 리소좀 소기관에서 발견되는 것에 가까운 5.5이었기 때문에, 결과는 탈인산화 반응에 산 포스파타제를 연관시켰다.

[0228] H226 세포 용해물을 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 탈인산화는 3시간 이내에 완료되는 것으로 밝혀졌다.

[0229] 실시예 7 - 간 마이크로솜에 의한 탈인산화

[0230] 본 실시예는 인간 및 마우스 간 마이크로솜 효소에 의한 화합물 Ia의 탈인산화를 입증한다.

[0231] 제노테크 (Xenotech) 사로부터 혼합된 간 재료에서 유래하는 인간 간 마이크로솜을 입수하였다 (파트 번호(Part Number) H-0630). 그것은 20 % 수크로스 용액 중 20 mg/mL의 공칭 단백질 농도로 공급되었다. 단백질 함량은 서모-피셔(Thermo-Fisher) 사의 시약을 사용하는 BCA 분석에 의해 확인하였다.

[0232] 인간 간 마이크로솜을 반응 완충제 (100 mM 트리스-HCl, 1 mM MgCl₂ 0.9 % NaCl, pH 7.4) 중에 8.42 mg/mL로 희석하였다. 희석량은 최종 100 μL의 반응 부피 중 95 μL 당 정확히 0.8 mg을 전달하도록 설계하였다. 다음에, 모액을 1:1 부피 대 부피로 연속 희석함으로써, 모 용액 당 8 내지 0.0156 mg/mL 사이의 마이크로솜을 전달하기 위한 10개 모 용액을 생성시켰다.

[0233] 화학식 Ia 화합물의 2000 μM 모 용액을 제조하였다. 반응을 위하여, 95 μL 의 각 마이크로솜 모액을 37 °C 핫블록에서 평형화시켰다. 다음에, 화합물 Ia 모 용액의 5 μL 분취량을 정확하게 시차 30초의 간격으로 각 반응바이알에 첨가하였다. 최종 화합물 Ia 농도는 100 μM 이었다. 샘플을 일정 온도에 1시간 동안 반응시킨 후, 100 μL 의 저온 에탄올 첨가에 의해 반응을 중지하였다. 다시 정확히 30초 간격으로 중지를 수행함으로써, 각 바이알을 정확히 1시간 동안 반응시켰다. 샘플은 2반복으로 제조하였다. 얼음상에서 30분 동안 단백질을 침전시켰다. 원심분리 후 상청액을 수집하였다. 역시 화합물 IVa 및 IVb의 생성에 대하여 모니터링하면서, 이전의 실시예에서 기술된 것과 동일한 조건을 사용하여 UPLC 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 마이크로솜 농도의 함수로서 화합물 Ia의 화합물 IVa 및 IVb로의 전환율을 나타내는 크로마토그래피 추적율은 5에 나타내었다.

[0234] 도 6은 마이크로솜 농도의 함수로서의 60분 후 화합물 Ia로부터 생성되는 화합물 IVa 및 IVb의 양의 플롯이다. 생성 속도는 0.00156 내지 0.0125 mg/mL 사이의 마이크로솜 농도에서 본질적으로 선형이었다. 이 범위의 데이터를 사용하여, 0.0054 $\mu\text{mol}/\text{분}/\text{mg}$ 의 화합물 IVa 및 IVb 생성 속도가 계산되었다.

[0235] 동일하지만 마우스 간 마이크로솜 (제노테크 사, 파트 No. M-3000)를 사용하는 절차를 사용하여서는, 0.0018 μ mol/분/mg의 속도를 수득하였다.

[0236] 실시예 8 - 화합물 IIc

[0237] 본 실시예 및 도 7은 본원에서 화합물 IIc로도 지칭되는 화합물 30의 합성에 대해 기술한다.

[0238] 화합물 30. DMF (아크로스 사, 무수, 0.5 mL) 중 화합물 27 (20 mg, 0.022 mmol), 5-아지도펜탄산 29 (바켐사, 6.43 mg, 0.045 mmol) 및 BOP (알드리치 사, 19.87 mg, 0.045 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 7.85 μ L, 0.045 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH은 8 초파로 유지하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 정제용 HPLC 컬럼에 주사하고, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용한 용리에 의해 정제함으로써, 화합물 30을 산출하였다 (5 mg, 21.9 %). MS: [M+H] 1015.

[0239] 화합물 30 (IIc)은 아지도 반응성 관능기를 가지고 있어서, 그것을 "클릭" 화학을 사용한 접합에 적합하게 한다.

[0240] 실시예 9 - 화합물 *IIId*

[0241] 본 실시예 및 도 8은 본원에서 화합물 IIId로도 지칭되는 화합물 34의 합성에 대해 기술한다.

[0242] 화합물 32. 1,4-디옥산 (알드리치 사, 무수, 2 mL) 중 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (아크로스 사, 126 mg, 1.098 mmol), (Boc-아민옥시)아세트산 31 (TCI 사, 200 mg, 1.046 mmol)의 용액에 디시클로헥실카르보디이미드 ("DCC", 노바바이오켐(Novabiochem) 사, 277 mg, 1.098 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트™를 통하여 여과하고, 여과액을 농축하였다. 잔류물을 EtOAc (30 mL)에 용해시키고, 포화 NaHCO₃ 용액 (20 mL) 및 물 (20 mL)로 세척하였다. 유기상을 농축하여 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 32를 산출하였다 (275 mg, 91.2 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.66(s, 1H), 4.78 (s, 2H), 2.87 (s, 4H), 1.49 (s,

[0243] 9H).

[0244] 화합물 33. DMF (알드리치 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 32 (20 mg, 0.07 mmol) 및 화합물 27 (31 mg, 0.035 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 36.5 μL, 0.21 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하는 정제용 HPLC에 의해 반응 혼합물을 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 33을 산출하였다 (24 mg, 64.5 %). MS: [M+H] 1063.

[0245] 화합물 34. DCM (알드리치 사, 무수, 0.5 mL) 중 화합물 33 (24 mg, 0.023 mmol)의 용액에 TFA (아크로스 사, 0.5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 0.5시간 동안 교반하였다. 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하는 정제용 HPLC에 의해 반응 혼합물을 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 34를 산출하였다 (10 mg, 45.7 %). MS: [M+H] 963.

[0246] 화합물 34 (IIId)는 히드록실아민 반응성 관능기를 가지고 있어서, 그것을 케톤 기를 함유하도록 변형된 (예를 들면 비-자연 아미노산인 p-아세틸페닐알라닌의 도입에 의함) 항체와의 옥심 형성에 의한 접합에 적합하게 한다.

[0247] 실시예 10 - 화합물 IIe

[0248] 본 실시예 및 도 9a-9b는 합쳐서 본원에서 화합물 IIe로도 지칭되는 화합물 48의 합성에 대해 기술한다.

[0249] 화합물 37. DMF (알드리치 사, 무수, 15 mL) 중 *tert*-부틸 4-아미노벤조에이트 36 (플루카 사, 1.5 g, 7.76 mmol), Fmoc-보호 류신 35 (바캡 사, 2 g, 5.66 mmol), EDC (플루카 사, 1.786 g, 9.31 mmol) 및 *t*-부탄올 (캡-임페스 사, 1.426 g, 9.31 mmol)의 용액에 구리(II) 클로라이드 (알드리치 사, 1.252 g, 9.31 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (30 mL), 물 (30 mL) 및 염수 (30 mL)로 후처리하였다. 유기상을 농축하여 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 37을 산출하였다 (3.7 g). MS: [M+H] 529.

[0250] 화합물 38. DMF (알드리치 사, 무수, 15 mL) 중 조 화합물 37 (3.7 g)의 용액에 피페리딘 (알드리치 사, 3 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 유지한 다음, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 38을 산출하였다 (1.7 g, 2단계에 걸쳐 70.8 %). MS: [M+H] 307.

[0251] 화합물 41. DMF (알드리치 사, 무수, 20 mL) 중 알라닌 *t*-부틸 에스테르 히드로클로라이드 39 (바캡 사, 0.4 g, 2.22 mmol) 및 화합물 40 (바캡 사, 1 g, 2.22 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 0.97 mL, 5.5 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하고, EtOAc (100 mL), 물 (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 후처리하였다. 유기상을 농축하고 고진공하에서 건조함으로써 화합물 41을 산출하였다 (1.3 g). MS: [M+H] 481.

[0252] 화합물 42. DCM (아크로스 사, 무수, 10 mL) 중 조 화합물 41 (1.3 g)의 용액에 TFA (아크로스 사, 10 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 유지하고, 농축한 후, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 42를 산출하였다 (0.68 g, 2단계에 걸쳐 72.2 %). MS: [M+H] 425.

[0253] 화합물 43. DMF (알드리치 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 38 (289 mg, 0.842 mmol), 화합물 42 (200 mg, 0.471 mmol) 및 BOP (바캡 사, 313 mg, 0.707 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 0.246 mL, 1.413 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반하고, EtOAc (30 mL), 물 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 후처리하였다. 유기상을 농축하고, 헥산 중 0-60 %의 EtOAc 구배를 사용하여 용리하는 4 g의 콤비플래시™ 컬럼에서 정제하였다. 유기상을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 43을 산출하였다 (126 mg, 37.5 %).

MS: [M+H] 713.

[0254] 화합물 44. DCM (아크로스 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 43 (126 mg)의 용액에 TFA (아크로스 사, 3 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 0.5 시간 동안 유지하고, 농축한 후, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 44를 산출하였다 (84 mg, 72 %). MS: [M+H] 657.

[0255] 화합물 45. DMF (알드리치 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 44 (40 mg, 0.061 mmol), HATU (오크우드 사, 18.53 mg, 0.049 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 21 μ L, 0.122 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH는 8을 초과하였다. 반응 혼합물을 RT에서 15분 동안 교반하였다. 이 반응 혼합물에, 화합물 10 (34.5 mg, 0.073 mmol), 이어서 추가 DIPEA (알드리치 사, 21 μ L, 0.122 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하고, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 45를 산출하였다 (20 mg, 30 %). MS: [M+H] 1110.

[0256] 화합물 46. DMF (아크로스 사, 무수, 0.5 mL) 중 화합물 45 (20 mg)의 용액에 피페리딘 (알드리치 사, 0.2 mL, 2.02 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 46을 산출하였다 (8 mg, 50 %). MS: [M+H] 888.

[0257] 화합물 48. DMF (아크로스 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 46 (8 mg, 0.009 mmol) 및 N-숙신이미딜 6-말레이이미도헥사노트 47 (TCI 사, 5.55 mg, 0.018 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 10 μ L, 0.006 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-100 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 48을 산출하였다 (2 mg, 20 %). MS: [M+H] 1081.

[0258] 화합물 48 (IIe)의 Leu-Ala-Leu 트리펩티드는 효소 CD10의 기질 모티프(motif)이기 때문에, 이 화합물을 사용하여 제조되는 접합체는 반드시 CD10에 의한 절단에 감수성이다.

실시예 11 - 화합물 IIf

[0260] 본 실시예 및 도 10a-10b는 합쳐서 본원에서 화합물 IIf로도 지칭되는 화합물 56의 합성에 대해 기술한다.

[0261] 화합물 50. DMF (알드리치 사, 무수, 20 mL) 중 *tert*-부틸 4-아미노벤조에이트 36 (플루카 사, 1.312 g, 6.79 mmol), Fmoc-보호 이소류신 49 (바캡 사, 2 g, 5.66 mmol), EDC (플루카 사, 1.302 g, 6.79 mmol) 및 *t*-부탄올 (캡-임팩스 사, 1.040 g, 6.79 mmol)의 용액에 구리(II) 클로라이드 (알드리치 사, 0.913 g, 6.79 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (30 mL), 물 (30 mL) 및 염수 (30 mL)로 후처리하였다. 합쳐진 유기 상을 농축하고, 헥산 중 0-20 %의 EtOAc 구배를 사용하여 용리하는 40 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 50을 산출하였다 (0.85 g, 28.4 %). MS: [M+H] 529.

[0262] 화합물 51. DMF (알드리치 사, 무수, 5 mL) 중 조 화합물 50 (3.7 g)의 용액에 피페리딘 (알드리치 사, 0.5 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (20 mL), 물 (15 mL) 및 염수 (15 mL)로 후처리하였다. 유기 상을 합쳐, 농축하고, 헥산 중 0-75 %의 EtOAc 구배를 사용하여 용리하는 12 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 51을 산출하였다 (0.38 g, 76.9 %). MS: [M+H] 307.

[0263] 화합물 52. DMF (알드리치 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 51 (0.2 g, 0.653 mmol) 및 화합물 40 (바캡 사, 294 mg, 0.653 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 0.228 mL, 1.305 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (50 mL), 물 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 후처리하였다. 합쳐진 유기 상을 농축하고, 헥산 중 0-40 %의 EtOAc 구배를 사용하여 용리하는 4 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 잔류물로 농축하고, 그것을 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 52를 산출하였다 (178 mg, 42.5 %). MS: [M+H] 642.

[0264] 화합물 53. DCM (아크로스 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 52 (178 mg, 0.277 mmol)의 용액에 TFA (아크로스 사, 3 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 0.5시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 농축하고 냉동-건조함으로써 화합물 53을 산출하였다 (145 mg, 89.5 %). MS: [M+H] 586.

- [0265] 화합물 56 (IIf)의 Leu-Ile 디펩ти드는 효소 카텝신 E의 기질 모티프이기 때문에, 이 화합물을 사용하여 제조되는 면역접합체는 반드시 카텝신 E에 의한 절단에 감수성이다.
- [0266] 실시예 12 - 화합물 IIg
- [0267] 본 실시예 및 도 11a-11b는 합쳐서 본원에서 화합물 IIg로도 지칭되는 화합물 67의 합성에 대해 기술한다.
- [0268] 화합물 57. DMF (알드리치 사, 무수, 20 mL) 중 메틸 4-아미노벤조에이트 56 (알드리치 사, 0.913 g, 6.05 mmol), Fmoc-보호 시트룰린 20 (바캡 사, 2 g, 5.04 mmol), EDC (플루카 사, 1.160 g, 6.05 mmol) 및 *t*-부탄올 (캡-임페스 사, 0.926 g, 6.05 mmol)의 용액에 구리(II) 클로라이드 (알드리치 사, 0.913 g, 6.79 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (100 mL), 물 (30 mL) 및 염수 (30 mL)로 후처리하였다. 유기 상을 농축하고, DCM 중 0-20 %의 메탄올 구배를 사용하여 용리하는 40 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 57을 산출하였다 (1.825 g, 68.2 %). MS: [M+H] 531.
- [0269] 화합물 58. DMF (알드리치 사, 무수, 3 mL) 중 화합물 57 (1.25 g, 3.437 mmol)의 용액에 피페리딘 (알드리치 사, 0.2 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (40 mL), 물 (15 mL) 및 염수 (15 mL)로 후처리하였다. 유기 상을 합쳐, 농축하고, DCM 중 0-30 %의 메탄올 구배를 사용하여 용리하는 12 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 58을 산출하였다 (0.778 g, 73.1 %). MS: [M+H] 309.
- [0270] 화합물 59. DMF (알드리치 사, 무수, 10 mL) 중 화합물 58 (778 mg, 2.52 mmol), 화합물 18 (655 mg, 2.52 mmol) 및 BOP (바캡 사, 1.12 g, 2.52 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 1.0 mL, 5.71 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (50 mL), 물 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 후처리하였다. 합쳐진 유기 상을 농축하고, DCM 중 0-15 %의 메탄올 구배를 사용하여 용리하는 40 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 유기 상을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 59를 산출하였다 (1.06 g, 76 %). MS: [M+H] 551.
- [0271] 화합물 60. DCM (아크로스 사, 무수, 5 mL) 중 화합물 59 (1.06 g, 1.92 mmol)의 용액에 TFA (아크로스 사, 5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고 냉동-건조함으로써 그의 TFA 염으로서 화합물 60을 산출하였다 (1.09 g). MS: [M+H] 451.
- [0272] 화합물 62. DMF (알드리치 사, 무수, 10 mL) 중 화합물 60 (500 mg, 1.109 mmol), 6-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)헥산산 61 (플루카 사, 450 mg, 1.946 mmol) 및 BOP (바캡 사, 0.720 g, 1.629 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 1.02 mL, 5.838 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (60 mL), 물 (30 mL) 및 염수 (30 mL)로 후처리하였다. 합쳐진 유기 상을 농축하고, DCM 중 0-20 %의 메탄올 구배를 사용하여 용리하는 12 g의 콤비플래시™ 컬럼상에서 정제하였다. 유기 상을 합쳐, 농축하고, 고진공하에서 건조함으로써, 화합물 62를 산출하였다 (427 mg, 58 %). MS: [M+H] 664.
- [0273] 화합물 63. 아세톤 (베이커(Baker) 사, 10 mL) 중 화합물 62 (0.427 g, 0.643 mmol)의 용액에 LiOH 용액 (알드리치 사, 물 10 mL 중 150 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 3시간 동안 교반하고, 아세트산 (피셔 사, 빙초산, 0.3 mL)을 사용하여 중화하였다. 반응 혼합물을 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 63을 산출하였다 (325 mg, 77.8 %). MS: [M+H] 650.
- [0274] 화합물 64. DMF (알드리치 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 63 (59.5 mg, 0.092 mmol), HATU (오크우드 사, 23.21 mg, 0.061 mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 27 μ L, 0.153 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하였다. 여기에, 화합물 10 (36 mg, 0.076 mmol), 이어서 추가 DIPEA (알드리치 사, 27 μ L, 0.153 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하고, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 64를 산출하였다 (38 mg, 55.7 %). MS: [M+H] 1103.
- [0275] 화합물 65. DCM (아크로스 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 64 (38 mg, 0.034 mmol)의 용액에 TFA (아크로스 사, 1 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고 냉동-건조함으로써 그의 TFA 염으로서 화합물 65를 산출하였다 (43 mg). MS: [M+H] 1003.
- [0276] 화합물 66. DMF (알드리치 사, 무수, 1 mL) 중 화합물 32 (15.4 mg, 0.053 mmol) 및 화합물 65 (43 mg, 0.043

mmol)의 용액에 DIPEA (알드리치 사, 29 μ L, 0.159 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 66을 산출하였다 (22 mg, 43.5 %). MS: [M+H] 1176.

[0277] 화합물 67. 4 N HCl 1,4-디옥산 용액 (알드리치 사, 10 mL) 중 화합물 66 (22 mg, 0.019 mmol)의 용액을 RT에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고, 수중 (0.1 % TFA 포함) 10-65 %의 아세토니트릴 구배를 사용하여 용리하는 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물-함유 분획을 합쳐 냉동-건조함으로써 화합물 67을 산출하였다 (12 mg, 58.7 %). MS: [M+H] 1076.

[0278] 실시예 13 - 생체내 결과

[0279] 도 12a-12i는 다양한 암 유형에 대한 마우스를 사용한 이종이식 연구에서의 본 발명 면역접합체의 생체내 효능을 입증한다.

[0280] OVCAR3 세포 연구. 0.1 mL의 포스페이트 완충 식염수 ("PBS") 더하기 0.1 mL의 마트리겔(matrigel)에 재현탁된 5백만개의 OVCAR3 난소암 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 23일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 90 mm^3 의 평균 종양 크기를 갖는 6마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 24일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12a는 OVCAR3 세포에 대하여, 항-메소텔린 항체 6A4의 화합물 IIa와의 면역접합체가 특히 세포독소 0.314 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 의 높은 투여량에서 종양 성장을 억제한다는 것을 보여준다. 동형 대조로서, 항-CD19 항체 21D4의 상응하는 면역접합체의 비교용 데이터도 제시하였다.

[0281] N87 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 2백5십만개의 N87 위 종양 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 12일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 110 mm^3 의 평균 종양 크기를 갖는 7마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 14일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12b는 N87 세포에 대하여, 항-메소텔린 항체 6A4의 화합물 IIa와의 면역접합체가 종양 성장을 강하게 억제한다는 것을 보여준다. 제제화 완충제 단독, 또는 항-CD19 항체 21D4와 화합물 IIa의 면역접합체의 비교용 데이터를 제시하였는데, 후자는 동형 대조이다.

[0282] H226 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 5백만개의 H226 중피종 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 14일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 110 mm^3 의 평균 종양 크기를 갖는 9마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 15일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12c는 종양 성장에 대한 항-메소텔린 항체 6A4와 화합물 IIa의 면역접합체의 투여량-의존성 효과를 보여준다. 각 경우에서 SR은 3.6이었다.

[0283] H1650 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 2백5십만개의 H1650 폐 종양 (선암종) 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 7일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 110 mm^3 의 평균 종양 크기를 갖는 6마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 9, 14 및 21일 후, 마우스에 복강내로 반복하여 시험 화합물을 투여하였다. 도 12d는 항-메소텔린 항체 6A4와 화합물 IIa의 면역접합체에 의한 종양 억제를 보여준다. 비히를 대조, 및 항-CD19 항체 21D4와 화합물 IIa의 면역접합체의 비교용 데이터를 제시하였는데, 후자는 동형 대조이다.

[0284] Hep 3B 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 4백만개의 Hep 3B 간 종양 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 10일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 90 mm^3 의 평균 종양 크기를 갖는 7마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 11일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12e는 항-글리피칸 3 항체 4A6과 화합물 IIa의 면역접합체의 투여량-의존성 종양 성장 억제 효과를 보여준다. 가장 강한 효과는 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 의 투여량에서 관찰되었다. 비히를 단독, 항체 4A6 단독, 또는 항-CD19 항체 21D4와 화합물 IIa의 면역접합체의 비교용 데이터도 제시하였는데, 후자는 동형 대조이다. 도 12f는 동일하지만 종양-관련 악액질을 완화하는 항체 4A6-화합물 IIa 면역접합체의 능력을 입증하는 연구의 그래프이다. 항-CD19-화합물 IIa 면역접합체의 데이터도 제시하였는데, 항-CD19 접합체가 종양 성장을 감소시키기는 하지만 (도 12e에 따름), 악액질을 완화하지는 않는다는 것 (도 12f에 따름)을 보여준다.

- [0285] *LNCaP* 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 2백5십만개의 LNCaP 전립선 종양 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 30일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 150 mm³의 평균 종양 크기를 갖는 7마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 31일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12g는 제제화 완충제, 및 동형 대조로서의 항-CD19 항체 21D4와 화합물 IIa의 면역접합체와 비교한 항-PSMA 항체 2A10과 화합물 IIa의 면역접합체에 의한 종양 성장 억제를 보여준다. 각 경우에서, 세포독소 농도는 0.1 μmol/kg이었다. 도 12h는 항-CD19 면역접합체의 동형 대조와 함께 항-RG-1 항체 19G9와 화합물 IIa의 면역접합체를 사용한 동일한 연구로부터의 또 다른 일련의 결과들을 보여준다.
- [0286] 라지 세포 연구. 0.1 mL의 PBS 더하기 0.1 mL의 마트리겔에 재현탁된 1천만개의 라지(Raji) 인간 버켓 림프종 세포를 SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하로 이식하였다. 6일 후 종양 측정을 개시하고, 종양의 LWH/2로 추정하였을 때 각각 90 mm³의 평균 종양 크기를 갖는 8마리 마우스의 군으로 마우스를 무작위화하였다. 종양 이식 7일 후, 마우스에 복강내로 1회 시험 화합물을 투여하였다. 도 12i는 항-메소텔린 항체 6A4, 항-CD19 항체 21D4, 항-CD22 항체 12C5 및 항-CD70 항체 1F4의 각각 화합물 IIa와의 면역접합체에 의한 종양 성장 억제 효과를 보여준다 (항체 1F4의 전체 서열 정보는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Coccia *et al.* 2010]에 개시되어 있음. 항체 1F4의 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_K CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 각각 서열 55, 서열 56, 서열 57, 서열 58, 서열 59 및 서열 60에 제시함).
- [0287] 전기한 본 발명의 상세한 설명은 주로 또는 전적으로 본 발명의 특정 부분 또는 측면과 관련되어 있는 구절들을 포함한다. 이는 명료성 및 편리성을 위한 것이라는 것, 구체적인 특징이 그것이 개시되는 그 구절을 초과하여 관련될 수 있다는 것, 그리고 본원의 개시내용이 상이한 구절들에서 발견되는 정보의 모든 적절한 조합을 포함한다는 것이 이해되어야 한다. 마찬가지로, 본원에서 다양한 도면 및 상세한 설명이 본 발명의 구체적인 실시양태와 관련되기는 하지만, 특정 도면 또는 실시양태의 문맥에서 구체적인 특징이 개시되는 경우, 그와 같은 특징은 적절한 정도까지 또 다른 특징과 조합되어 또 다른 도면 또는 실시양태의 문맥에서, 또는 본 발명에 일반적으로 사용될 수도 있다는 것이 이해되어야 한다.
- [0288] 또한, 본 발명이 소정의 바람직한 실시양태와 관련하여 구체적으로 기술되기는 하였지만, 그와 같은 바람직한 실시양태로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 그보다는, 본 발명의 영역은 첨부된 청구범위에 의해 한정된다.
- [0289] 참고문헌
- [0290] 본 명세서에서 앞부분에 제1 저자 (또는 발명자) 및 일자로 약어화된 양식으로 인용되어 있는 하기 참고문헌들의 전체 인용문을 하기에 제시한다. 이를 참고문헌 각각은 모든 목적에 있어서 본원에 참조로써 개재된다.

Aristoff *et al.*, WO 91/16324 (1991).
 Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571-6584.
 Boger *et al.*, *Synthesis* **1999**, 1505-1509.
 Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1 (2008).
 Boyd *et al.*, US 7,691,962 B2 (2010).
 Cacciari *et al.*, *Expert Opinion Therapeutic Patents* **2000**, *10*(12), 1853-1871.
 Cardarelli *et al.*, US 7,875,278 B2 (2011).
 Chen *et al.*, US 7,517,903 B2 (2009).
 Chen *et al.*, US 2010/0113476 A1 (2010).
 Coccia *et al.*, US 2010/0150950 A1 (2010).
 Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 855-869.
 Gangwar *et al.*, US 2008/0293800 A1 (2008).
 Glazier, WO 03/000201 A2 (2003).
 Huang *et al.*, US 2009/0297438 A1 (2009).
 King *et al.*, US 2010/0104509 A1 (2010) [2010a].
 King *et al.*, US 2010/0143368 A1 (2010) [2010b].
 King *et al.*, US 2011/0020329 A1 (2011).
 Kobayashi *et al.*, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2404-2410.
 Korman *et al.*, US 2009/0074660 A1 (2009).
 Kutyavin *et al.*, US 5,659,022 (1997).
 Ng *et al.*, WO 02/096910 A1 (2002).
 Ng *et al.*, US 6,989,452 B2 (2006) [2006a].
 Ng *et al.*, US 7,129,261 B2 (2006) [2006b].
 Ng *et al.*, US 7,498,302 B2 (2009) [2009a].
 Ng *et al.*, US 7,507,420 B2 (2009) [2009b].
 Ng *et al.*, US RE41,252 E (2010).
 Rao-Naik *et al.*, US 8,097,703 B2 (2012).
 Suckling, *Expert Opinion Therapeutic Patents* **2004**, *14*(12), 1693-1724.

[0291]

Sufi *et al.*, US 2010/0145036 A1 (2010).
 Terrett *et al.*, US 2010/0034826 A1 (2010) [2010a].
 Terrett *et al.*, US 2010/0209432 A1 (2010) [2010b].
 Terrett *et al.*, US 2011/0085970 A1 (2011) [2011a].
 Terrett *et al.*, US 2011/0262448 A1 (2011) [2011b].
 Terrett *et al.*, US 2012/0027782 A1 (2012) [2012a].
 Terrett *et al.*, US 8,124,738 B2 (2012) [2012b].
 Zhao *et al.*, Poster 45, 28th National Medicinal Chemistry Symposium (San Diego, CA, 8-12 June 2002), “An improved synthesis of CC-1065 analogs and development of prodrugs” (abstract). [2002a].

Zhao *et al.*, Poster MEDI 147, 224th National Meeting of the American Chemical Society (Boston, MA, 18-22 August 2002), “New water-soluble CC-1065 analog prodrugs: Design, synthesis and evalution” (abstract) [2002b].

Zhao *et al.*, US 7,655,660 B2 (2010).

[0292]

서열 목록

[0293]

본원에 그 전체가 참조로써 개재되는 것은 "SEQT_11770WOPCT.txt"로 지칭되며 본원에서 개시되는 핵산 및/또는 아미노산 서열을 포함하는 서열 1 내지 서열 60을 포함하는 서열 목록이다. 서열 목록은 EFS-Web을 통하여 ASCII 텍스트 포맷으로 첨부 제출되었으며, 그에 따라 지면 및 그의 컴퓨터 해독가능 형태 모두를 구성한다. 서열 목록은 먼저 2012년 4월 27일자 페이턴트인(PatentIn) 3.5를 사용하여 생성되며, 크기가 10 KB이 있다.

[0295]

하기의 표로써, 본 출원에서 개시되는 서열들의 설명을 요약한다.

서열 번호	서열 설명
1	2H5 V _H CDR1 아미노산
2	2H5 V _H CDR2 아미노산
3	2H5 V _H CDR3 아미노산
4	2H5 V _K CDR1 아미노산
5	2H5 V _K CDR2 아미노산
6	2H5 V _K CDR3 아미노산
7	6A4 V _H CDR1 아미노산

[0296]

서열 번호	서열 설명
8	6A4 V _H CDR2 아미노산
9	6A4 V _H CDR3 아미노산
10	6A4 V _K CDR1 아미노산
11	6A4 V _K CDR2 아미노산
12	6A4 V _K CDR3 아미노산
13	21D4 V _H CDR1 아미노산
14	21D4 V _H CDR2 아미노산
15	21D4 V _H CDR3 아미노산
16	21D4 V _K CDR1 아미노산
17	21D4 V _K CDR2 아미노산
18	21D4 V _K CDR3 아미노산
19	2A10 V _H CDR1 아미노산
20	2A10 V _H CDR2 아미노산
21	2A10 V _H CDR3 아미노산
22	2A10 V _K CDR1 아미노산
23	2A10 V _K CDR2 아미노산
24	2A10 V _K CDR3 아미노산
25	4A6 V _H CDR1 아미노산
26	4A6 V _H CDR2 아미노산
27	4A6 V _H CDR3 아미노산
28	4A6 V _K CDR1 아미노산
29	4A6 V _K CDR2 아미노산
30	4A6 V _K CDR3 아미노산
31	2A7 V _H CDR1 아미노산
32	2A7 V _H CDR2 아미노산
33	2A7 V _H CDR3 아미노산
34	2A7 V _L CDR1 아미노산

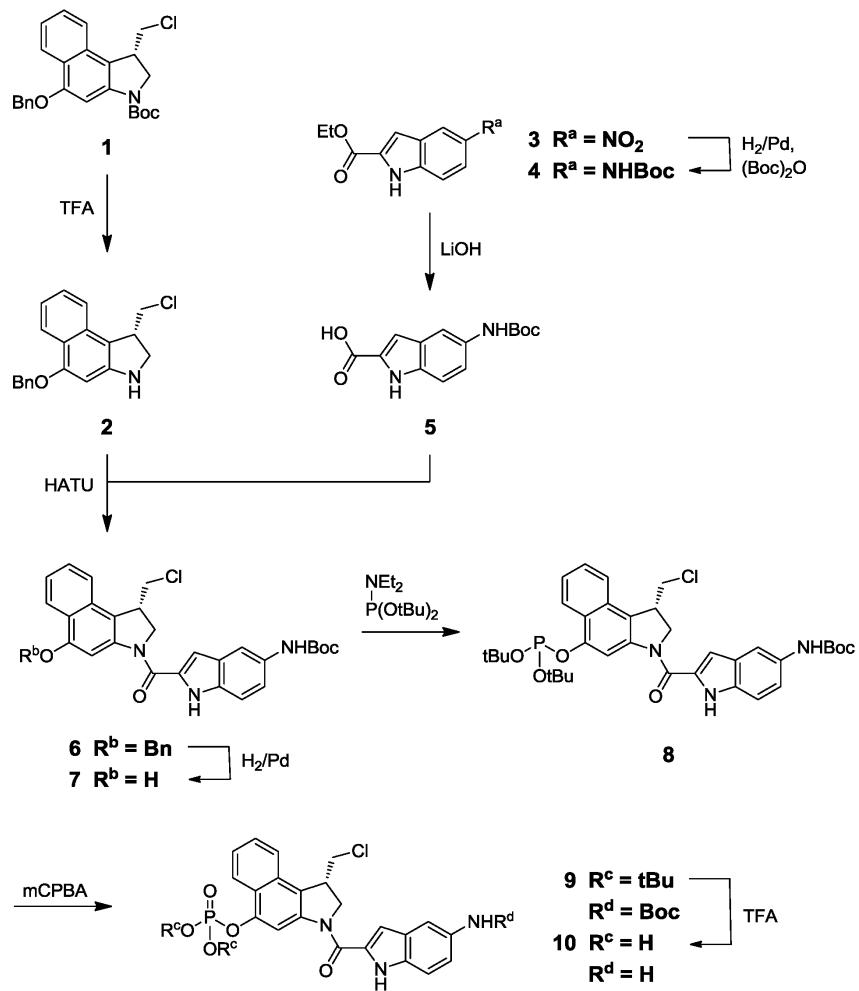
[0297]

서열 번호	서열 설명
35	2A7 V _L CDR2 아미노산
36	2A7 V _L CDR3 아미노산
37	19G9 V _H CDR1 아미노산
38	19G9 V _H CDR2 아미노산
39	19G9 V _H CDR3 아미노산
40	19G9 V _L CDR1 아미노산
41	19G9 V _L CDR2 아미노산
42	19G9 V _L CDR3 아미노산
43	12C5 V _H CDR1 아미노산
44	12C5 V _H CDR2 아미노산
45	12C5 V _H CDR3 아미노산
46	12C5 V _K CDR1 아미노산
47	12C5 V _K CDR2 아미노산
48	12C5 V _K CDR3 아미노산
49	4D5 V _H CDR1 아미노산
50	4D5 V _H CDR2 아미노산
51	4D5 V _H CDR3 아미노산
52	4D5 V _K CDR1 아미노산
53	4D5 V _K CDR2 아미노산
54	4D5 V _K CDR3 아미노산
55	1F4 V _H CDR1 아미노산
56	1F4 V _H CDR2 아미노산
57	1F4 V _H CDR3 아미노산
58	1F4 V _K CDR1 아미노산
59	1F4 V _K CDR2 아미노산
60	1F4 V _K CDR3 아미노산

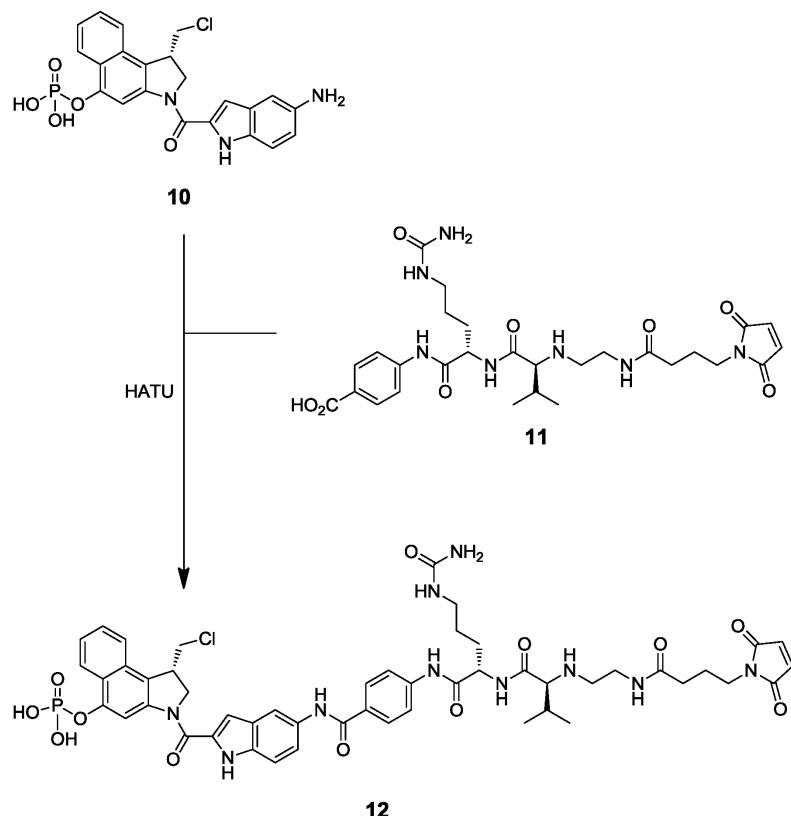
[0298]

도면

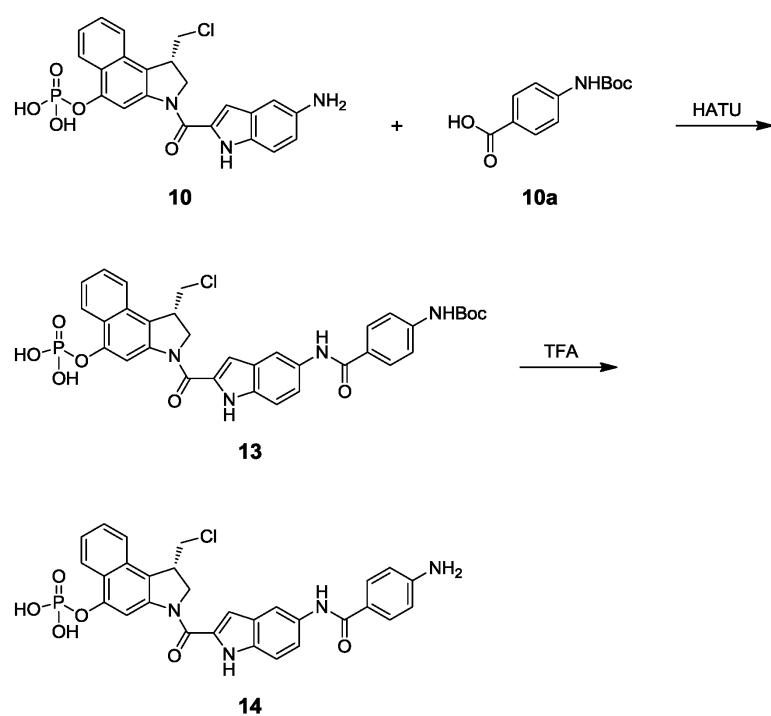
도면 1a



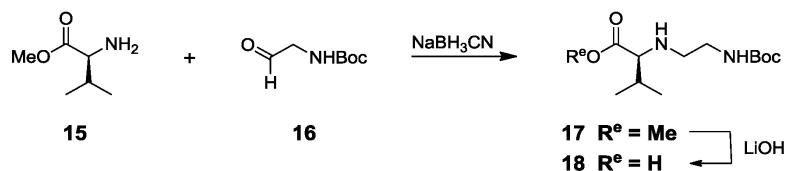
도면1b



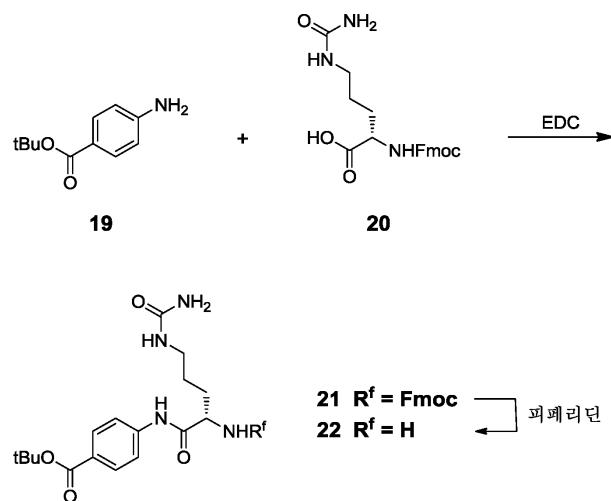
도면2



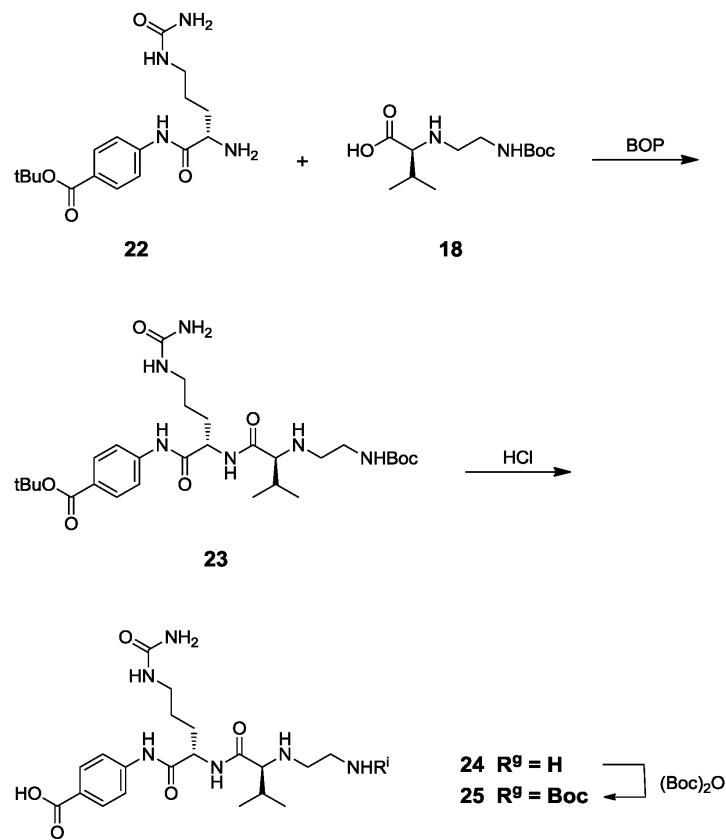
도면3a



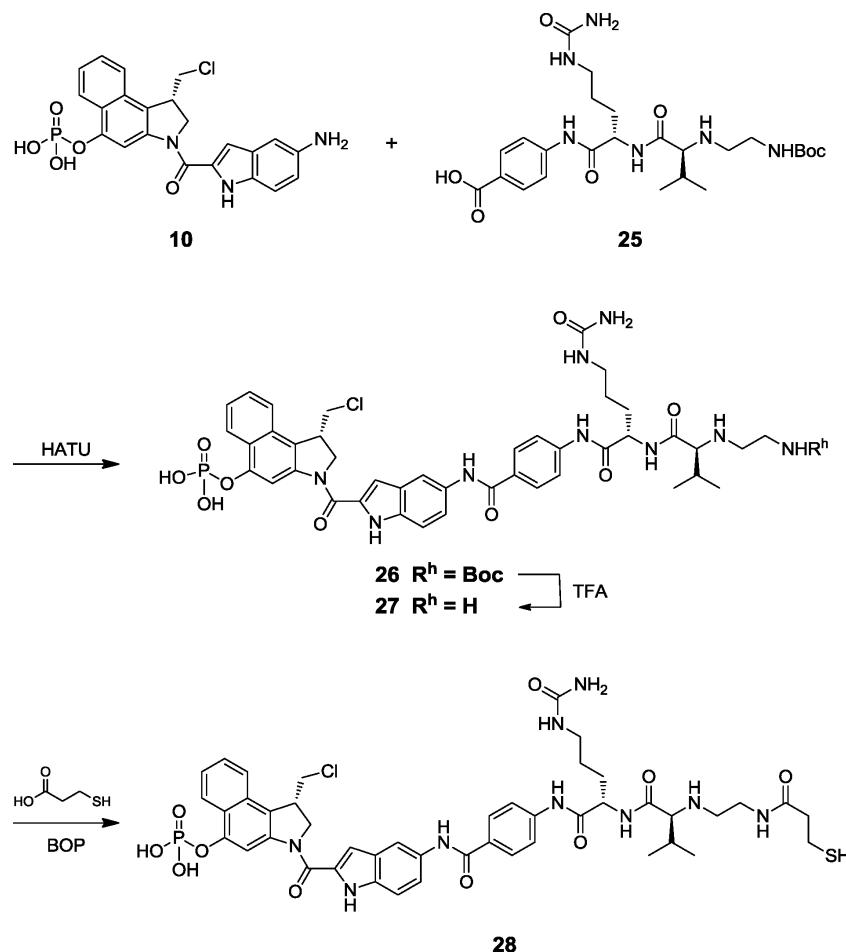
도면3b



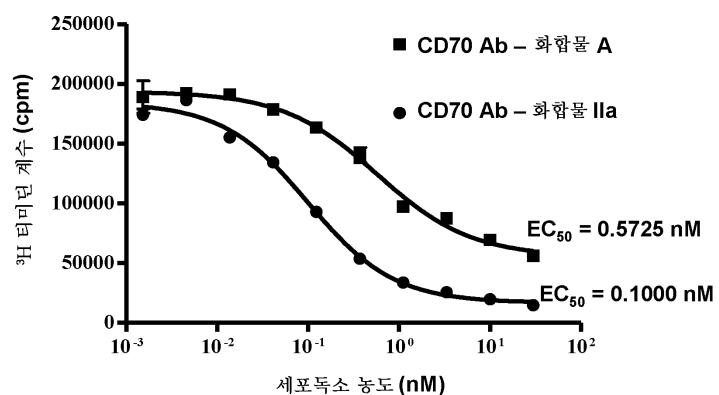
도면3c



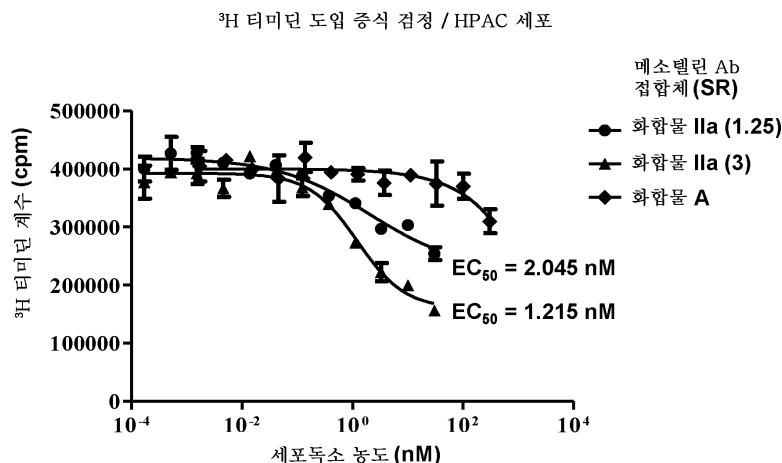
도면3d



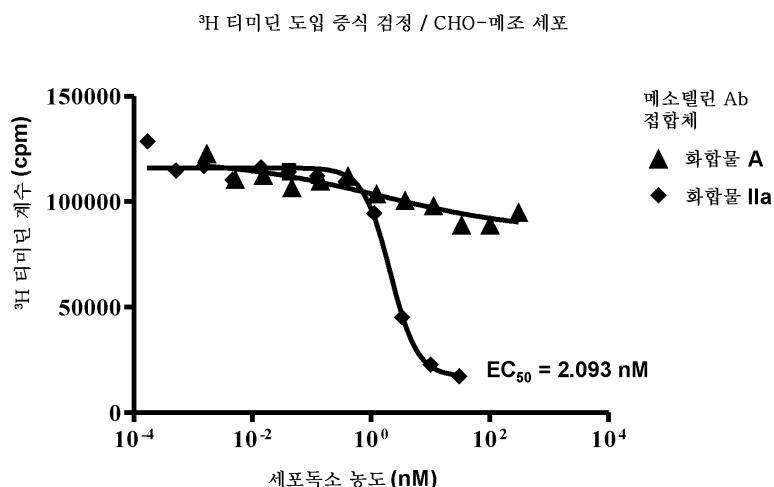
도면4a

³H 티미딘 도입 증식 검정 / 786-O 세포

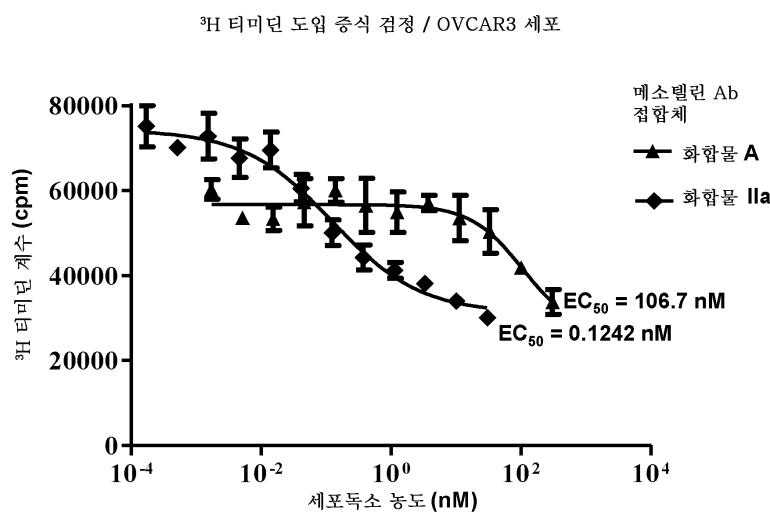
도면4b



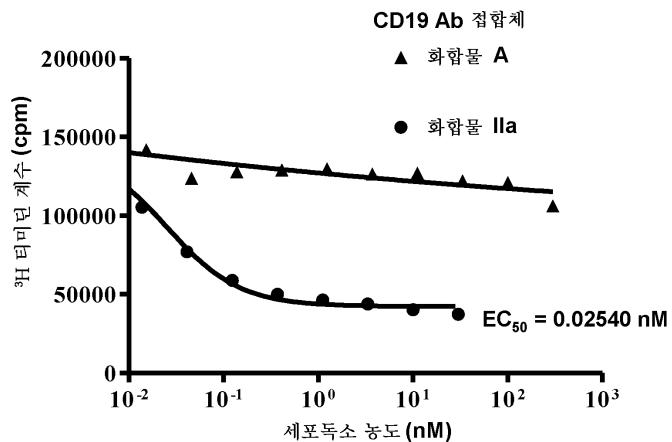
도면4c



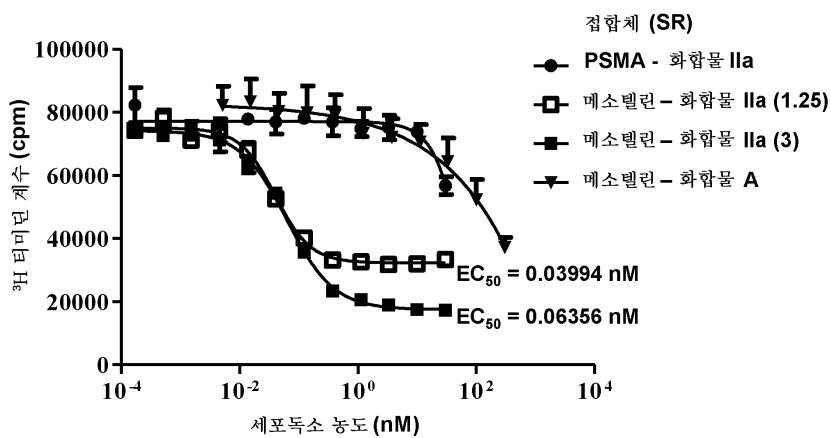
도면4d



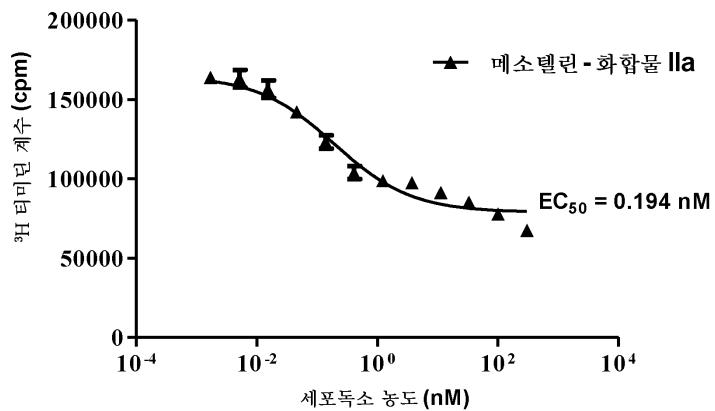
도면4e

³H 티미딘 도입 증식 검정 / 라모스 세포

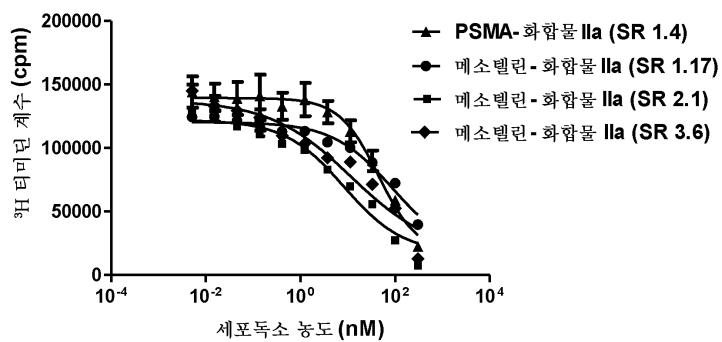
도면4f

³H 티미딘 도입 증식 검정 / H226 세포

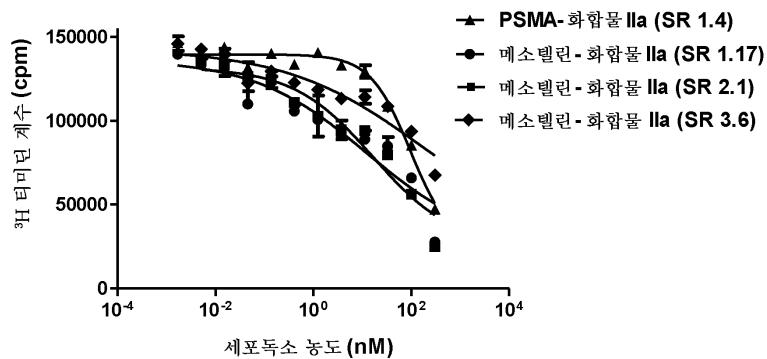
도면4g

³H 티미딘 도입 증식 검정 / N87 세포

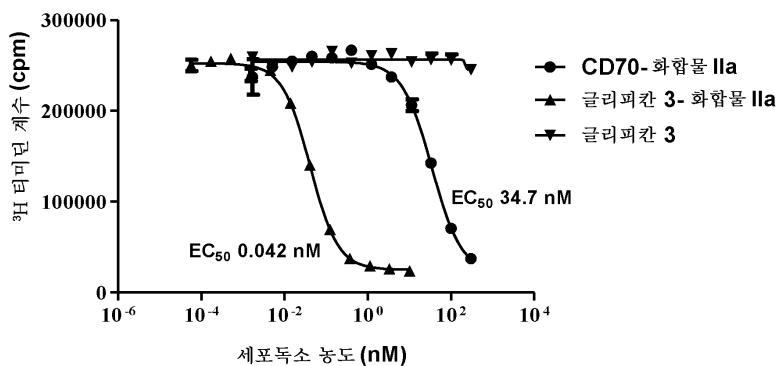
도면4h

³H 티미딘 도입 증식 검정 / H292 세포

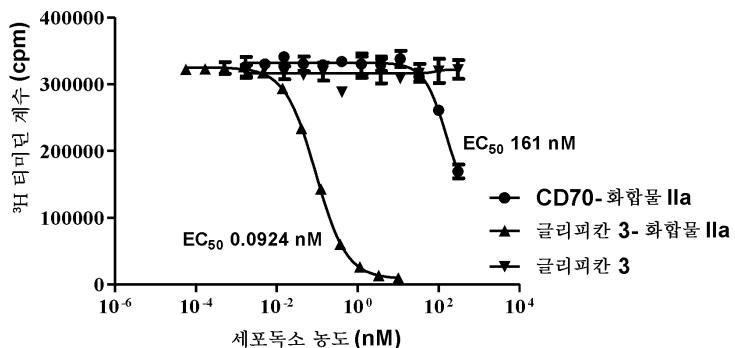
도면4i

³H 티미딘 도입 증식 검정 / H1650 세포

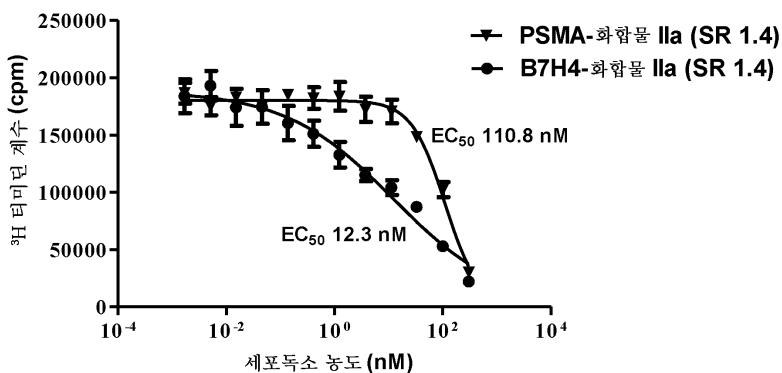
도면4j

³H 티미딘 도입 증식 검정 / Hep 3B 세포

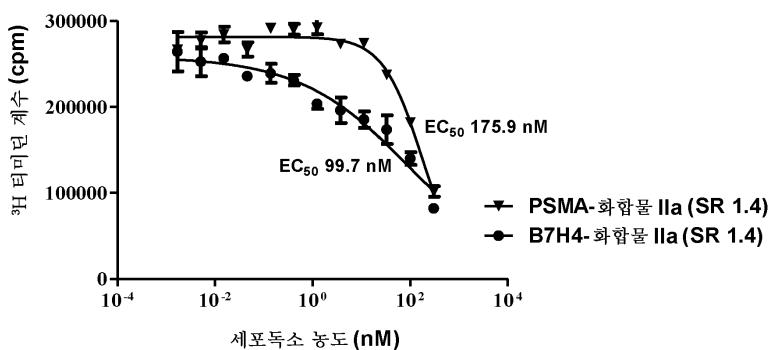
도면4k

³H 티미딘 도입 증식 검정 / Hep G2 세포

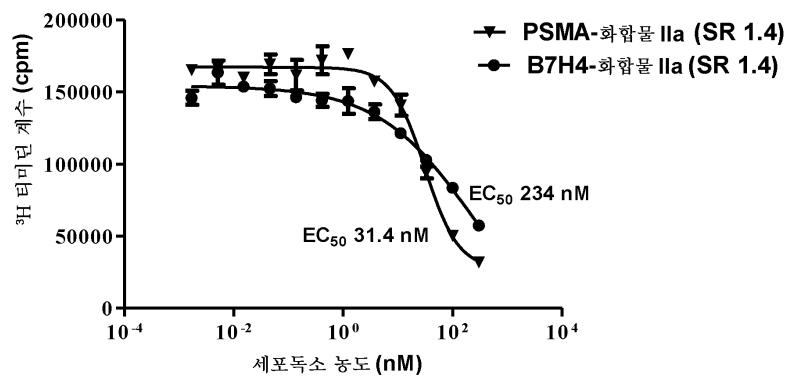
도면4l

³H 티미딘 도입 증식 검정 / MDA-MB-468 세포

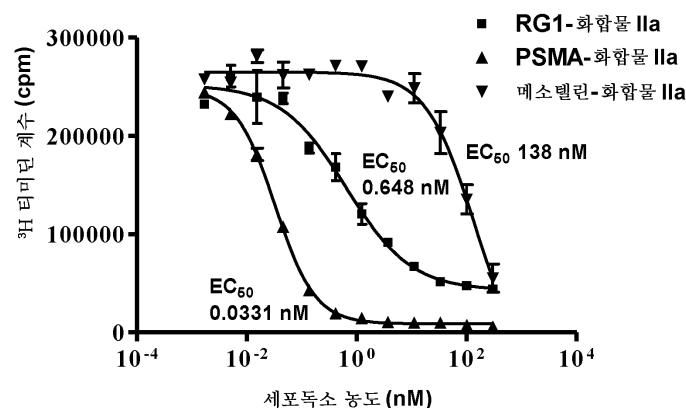
도면4m

³H 티미딘 도입 증식 검정 / HCC-1954 세포

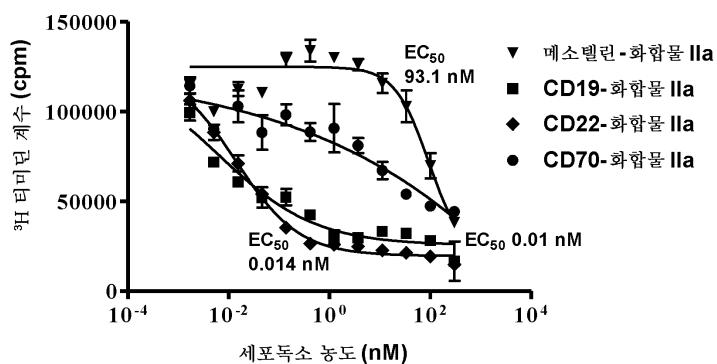
도면4n

³H 티미딘 도입 증식 검정 / OVCAR3 세포

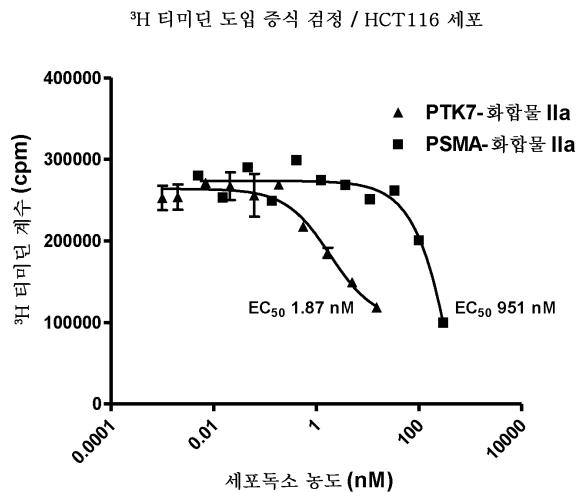
도면4o

³H 티미딘 도입 증식 검정 / LNCaP 세포

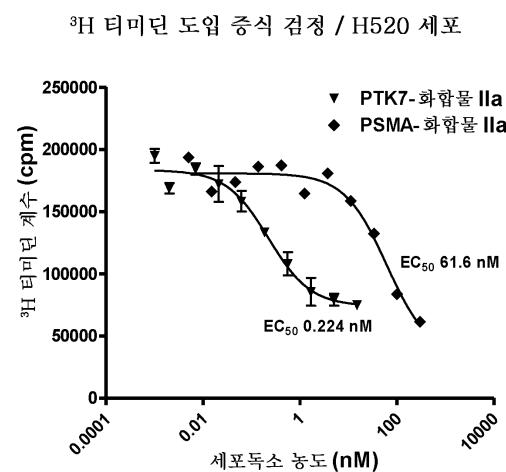
도면4p

³H 티미딘 도입 증식 검정 / 라모스 세포

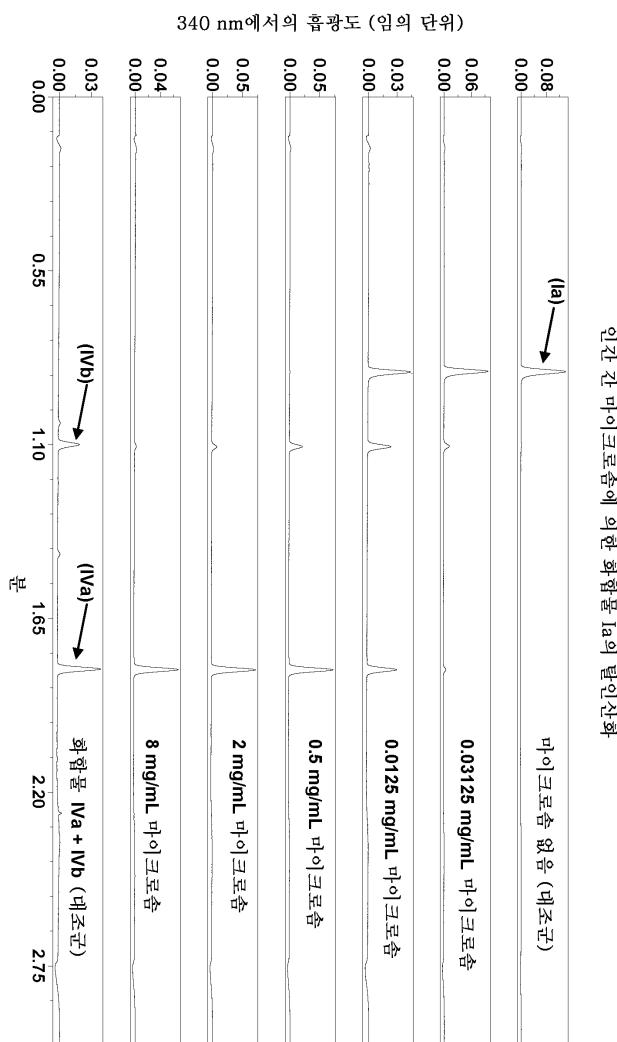
도면4q



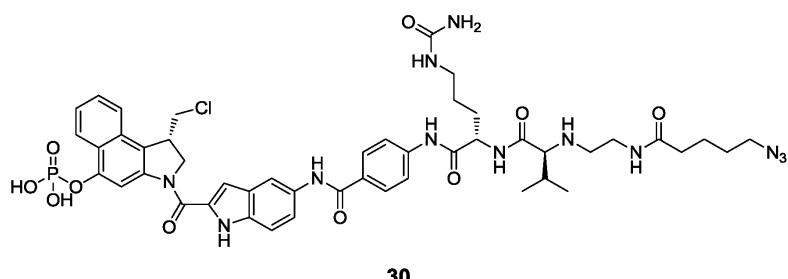
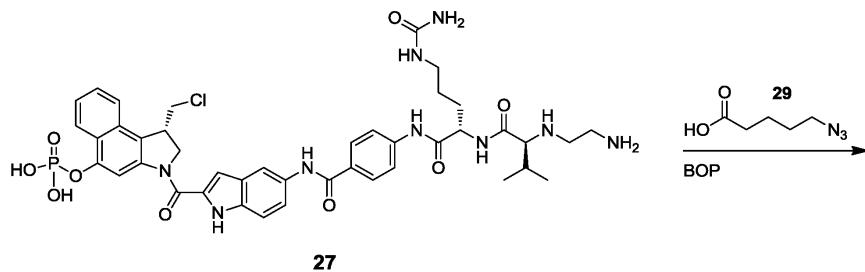
도면4r



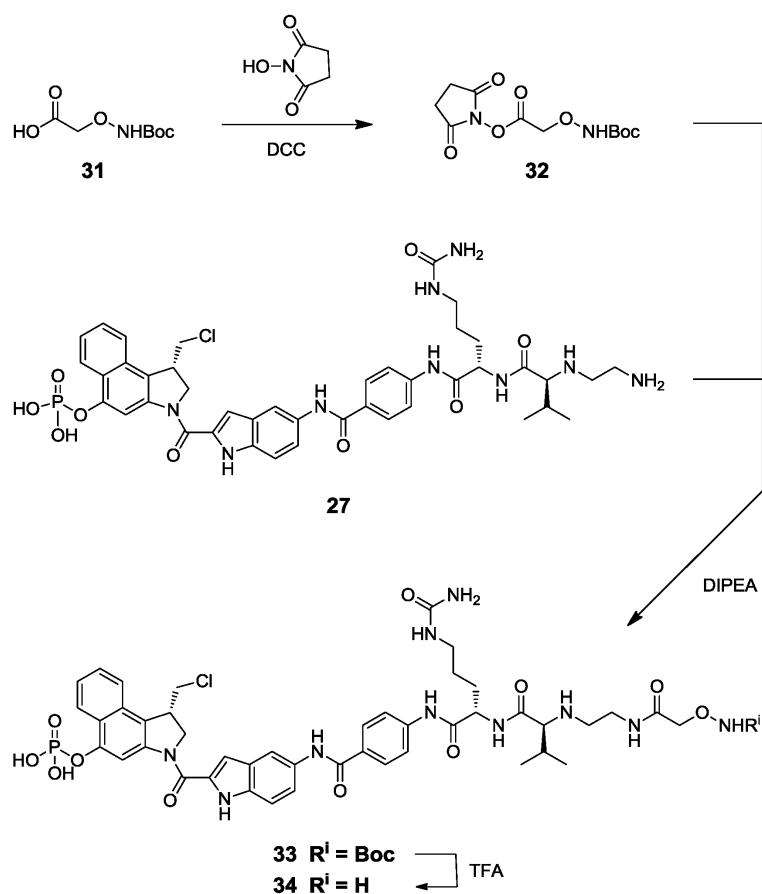
도면5



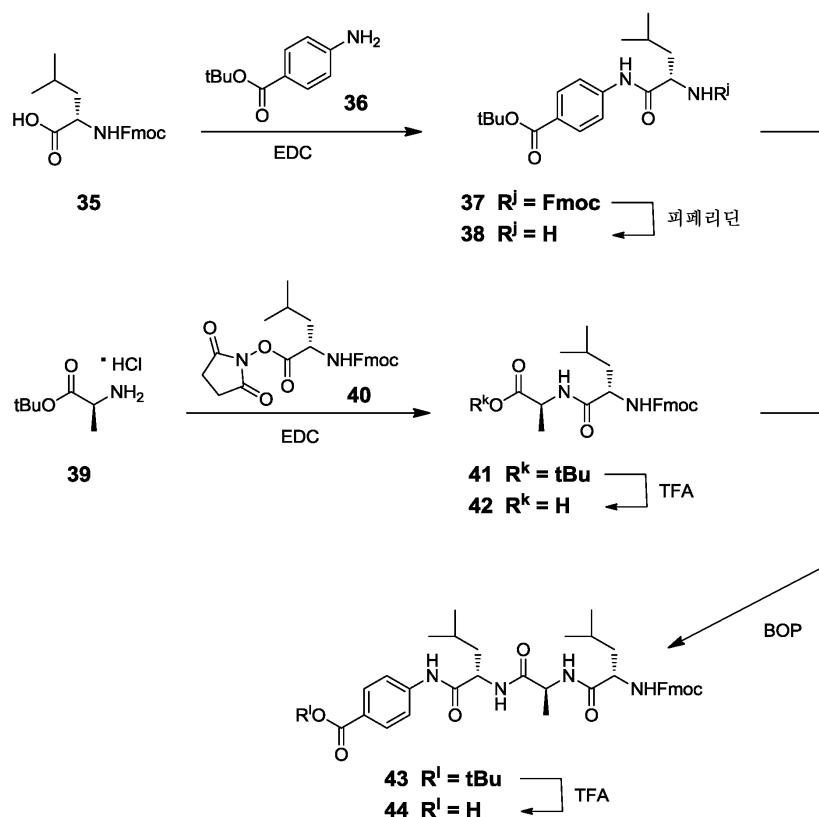
도면7



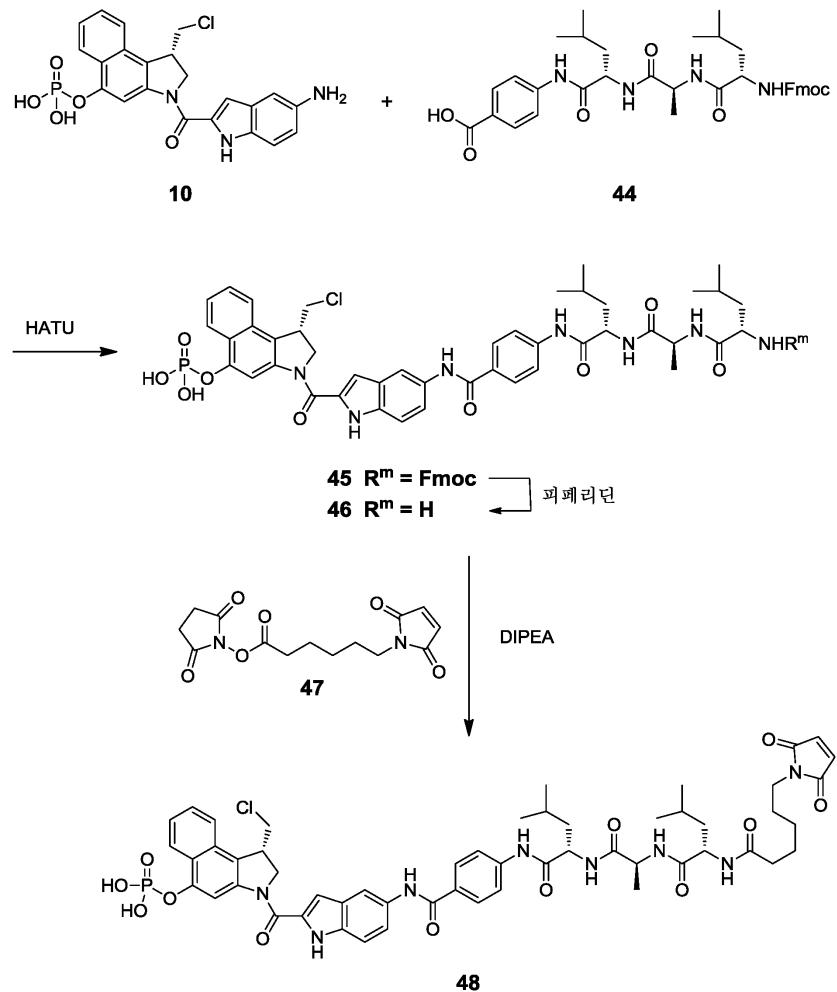
도면8



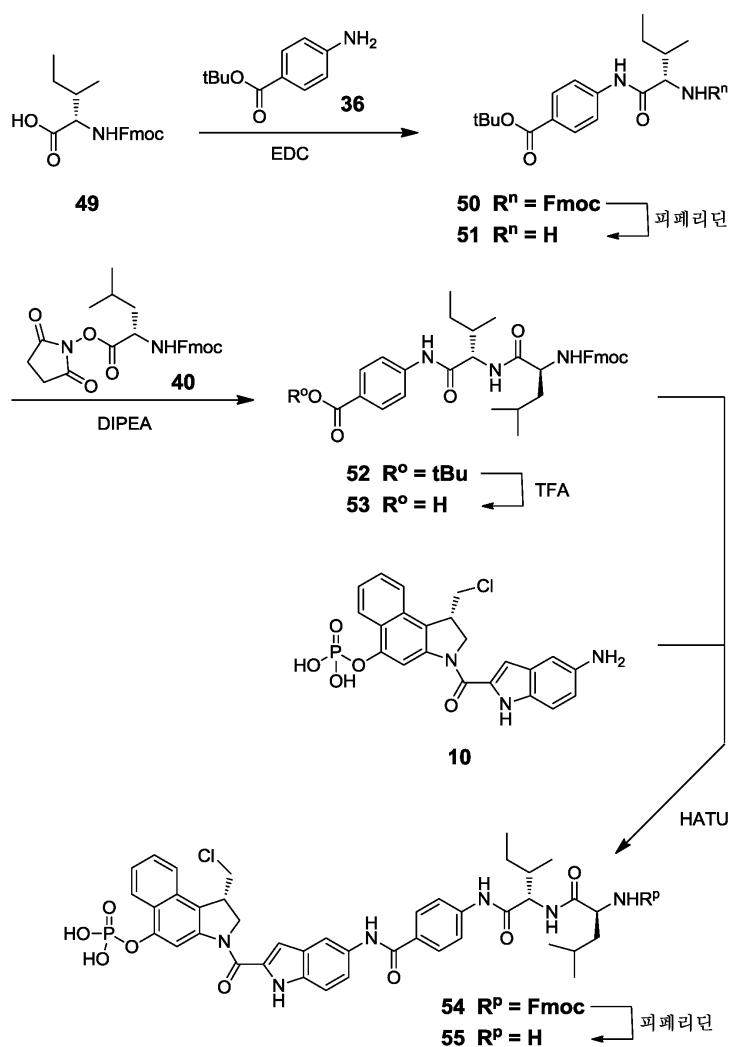
도면 9a



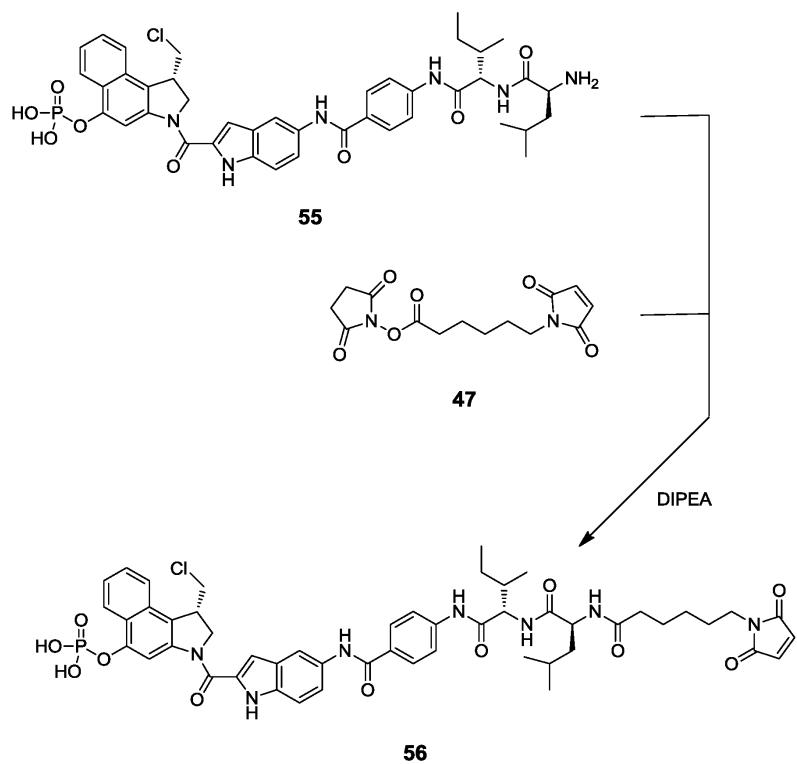
도면9b



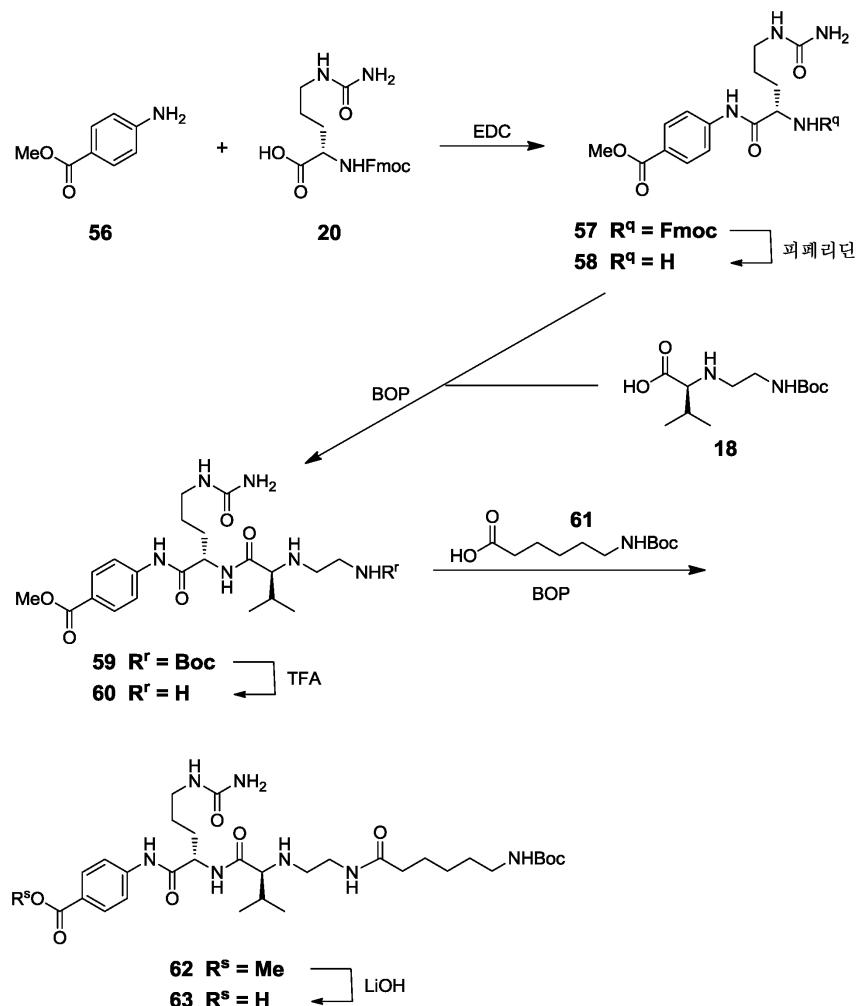
도면10a



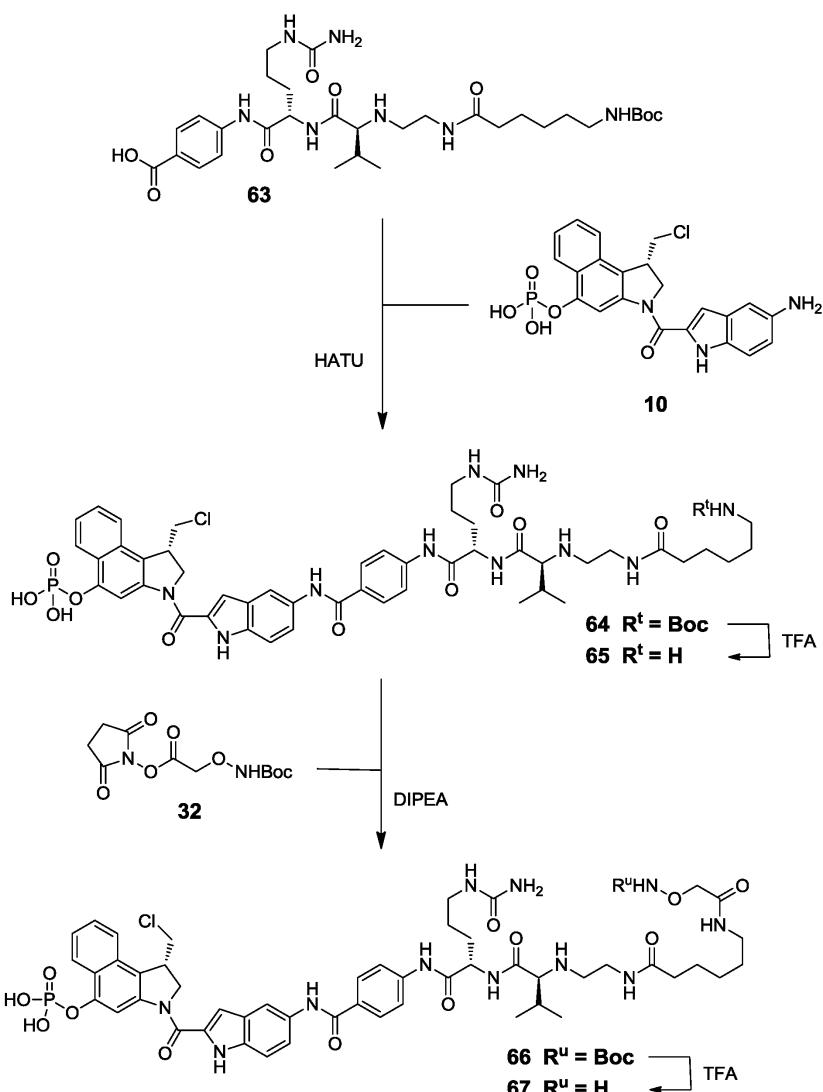
도면10b



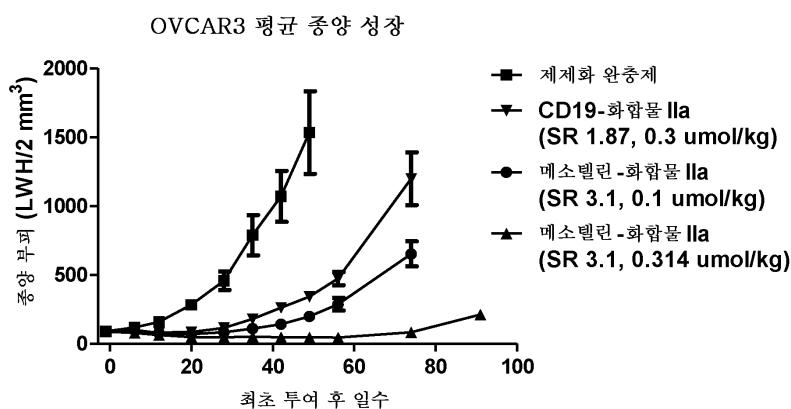
도면11a



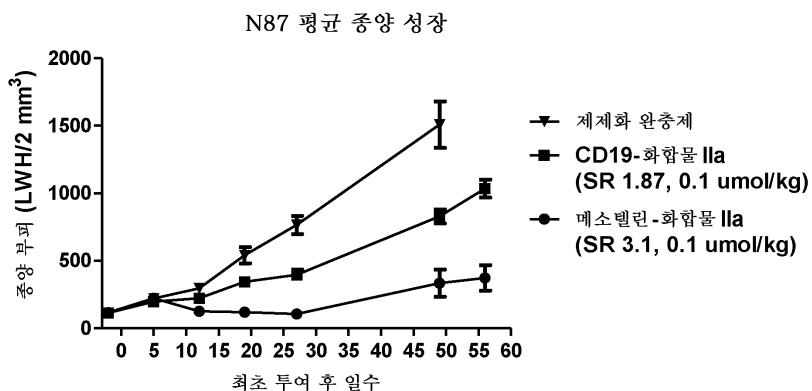
도면11b



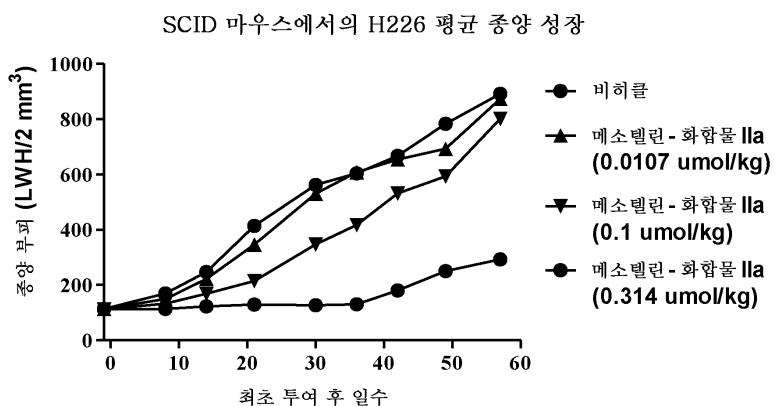
도면12a



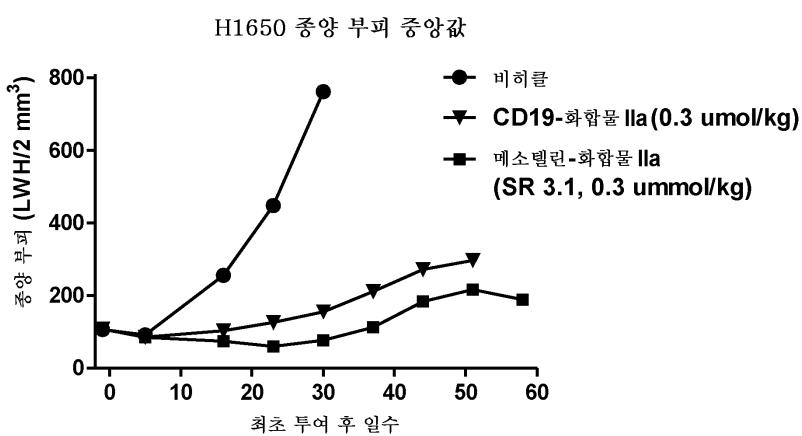
도면12b



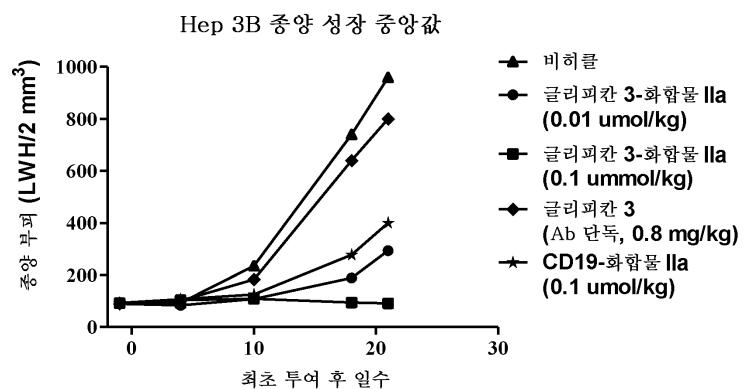
도면12c



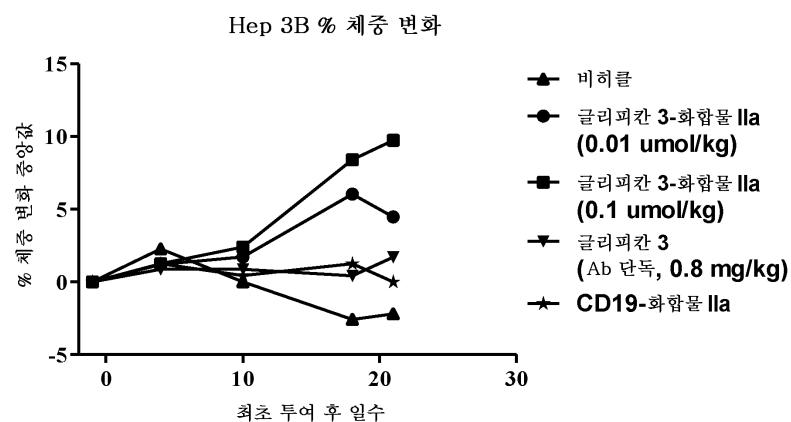
도면12d



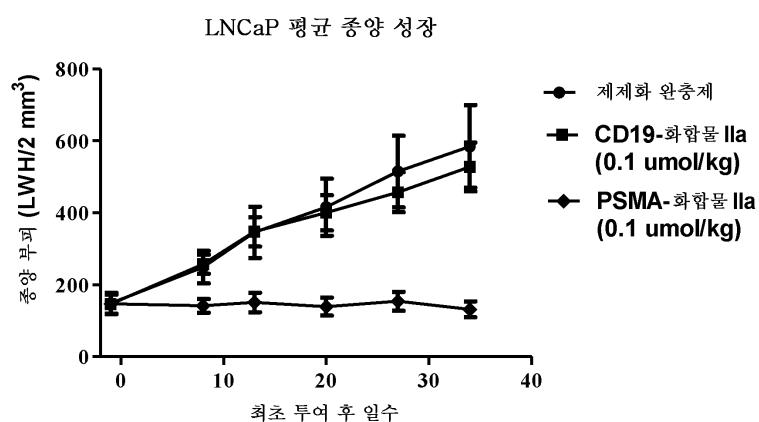
도면12e



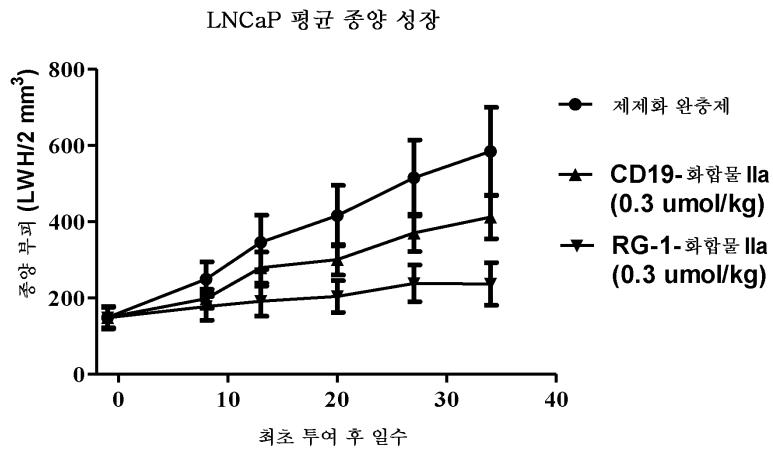
도면12f



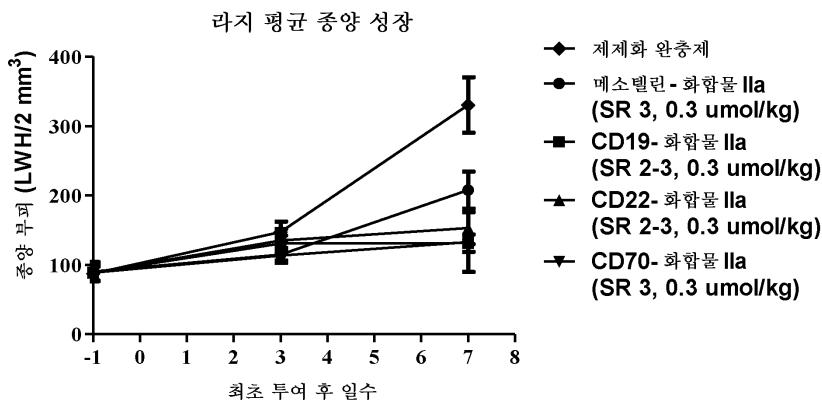
도면12g



도면12h



도면12i



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company

ZHANG, Qian

GANGWAR, Sanjeev

PAN, Chin

DERWIN, Daniel D.

<120> IMMUNOCOCONJUGATES, COMPOSITIONS FOR MAKING THEM, AND METHODS OF
MAKING AND USE

<130> 11770

<150> US 61/490117

<151> 2011-05-26

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Tyr Ile Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Thr Asp Gly Tyr Asp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211

> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Tyr Gly Met His

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Leu Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Ser Trp Ile Gly

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 15

His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Ser Asn Trp Ile Gly

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<

212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Ala Val Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Asn Tyr Met Asn Trp

1 5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val

1 5

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ser Tyr Val Met His

1 5

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ser Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Leu Phe Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Cys Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Thr Leu Val

1 5 10

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Tyr Ala Phe His

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ile Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 56

<211

> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Ile Ser Asp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Val Asp Tyr Ser Asn Tyr Leu Phe Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr

