(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0130160
(43) 공개일자 2022년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 47/65* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07D 307/20* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 47/65 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-7027736
(22) 출원일자(국제) 2021년01월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월10일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/073314
(87) 국제공개번호 WO 2021/148003
국제공개일자 2021년07월29일
(30) 우선권주장
202010073671.6 2020년01월22일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
상하이 센후이 메디슨 컴퍼니 리미티드
중국, 201203 상하이 푸동 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4
상하이 쉥디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 201210 상하이 푸동 뉴 디스트릭트, 장지앙 타운, 하이커 로드 넘버 1288
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
후앙, 지안
중국, 201203 상하이 푸동 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4
주, 링지안
중국, 201203 상하이 푸동 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **에리불린 유도체의 약물 접합체, 이를 제조하기 위한 방법 및 의료분야에서 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 에리불린 유도체의 약물 접합체, 이를 제조하기 위한 방법 및 의료분야에서 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 에리불린 유도체 약물부를 함유하는 항체-약물 접합체가 제공된다. 본 발명은 또한 본원에 제공된 항체-약물 접합체를 투여함으로써 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 307/20 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)

(71) 출원인
샹하이 헨그루이 파마수티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 샹하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드, 279
지앙수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드
중국, 지앙수 222047, 리안윈강, 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드

(72) 발명자
위, 시우자오
중국, 201203 상하이 푸동 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4
주, 보
중국, 지앙수 222047, 리안윈강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드
렌, 웬밍
중국, 지앙수 222047, 리안윈강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드
탕, 미
중국, 지앙수 222047, 리안윈강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드
선, 싱
중국, 지앙수 222047, 리안윈강 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드
양, 양
중국, 샹하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드 279
량, 진동
중국, 샹하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드 279
후, 치웨
중국, 샹하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드 279

(30) 우선권주장
202010114980.3 2020년02월25일 중국(CN)
202011153368.3 2020년10월26일 중국(CN)

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 I, 즉

화학식 I

$Ab-(L-D)_k$

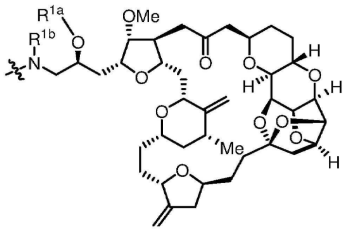
의 구조를 가지되,

식 중, 상기 Ab는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

상기 L은 Ab와 D를 공유 결합시키는 링커이고;

상기 k는 1 ~ 20이고;

상기 -D는 하기 화학식과 같이 표시되고:



여기서 R^{1a}는 수소, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고; R^{1b}는 수소, 알킬, 알콕시, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 수소로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는 R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하되, 상기 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되되, 상기 R^{1a} 및 상기 R^{1b}는 동시에 수소가 아닌, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물.

청구항 2

제1항에 있어서, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있는 항체-약물 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 링커는 절단가능한 펩티드기를 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 절단가능한 펩티드기는 효소로 절단될 수 있고, 바람직하게 카텝신으로 절단될 수 있으며, 또한 상기 카텝신은, 바람직하게 카텝신 B인 항체-약물 접합체.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 링커는 아미노산 단위를 포함하고, 상기아미노산 단위는, 바람직하게 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 군, 더욱 바람직하게 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn), 글리신-글리신-리신(Gly-Gly-lys), 발린-리신(Val-lys), 발린-알라닌(Val-Ala), 발린-페닐알라닌(Val-Phe) 및 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(Gly-Gly-Phe-Gly)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 2개 ~ 7개로 이루어진 펩티드 잔기를 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 링커는 절단가능한 설폰아미드기를 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 링커는 절단가능한 이황화물기를 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 링커는 환원 조건하에 절단될 수 있는 항체-약물 접합체.

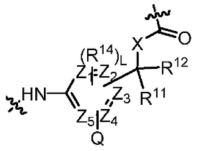
청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 D와 결합하는 스페이서 단위를 포함하는 항체-약물 접합체.

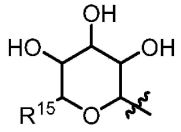
청구항 10

제9항에 있어서, 스페이서 단위는 p-아미노벤질옥시카보닐(PAB)을 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 스페이서 단위는  를 포함하고, 여기서, Z_1 ~ Z_5는 탄소 원자 및 질소 원자로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; 상기 R^{14}는 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 치환되고; R^{11} 및 R^{12}는 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 바람직하게는 수소이거나; 또는 R^{11} 및 R^{12}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; X는 -O- 및 -NH-로 이루어진 군으로부터 선택되고; L은 1 ~ 4의 정수로부터 선택되고;

Q는 V-E-이고, V-E-는 세포내에 위치한 글리코시다아제에 의해 절단가능한 글리코시드 결합을 제공하되, 상기 E는 -O-, -S- 및 $-NR^{13}$-로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^{13}은 수소 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고,

추가로 V는  로부터 선택되고, R^{15}는 -COOH 및 CH_2OH로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

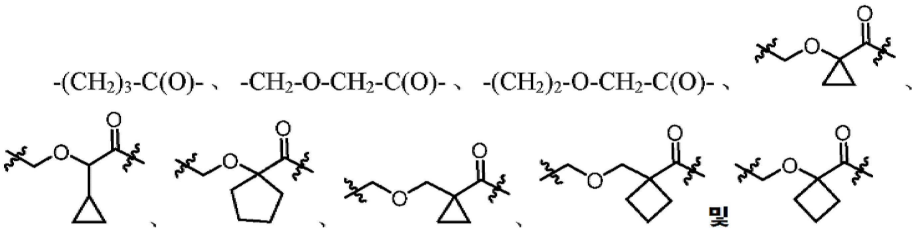
청구항 12

제9항에 있어서, 스페이서 단위는 $-(CR^aR^b)_{m1}-O(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-(CR^aR^b)_{m1}NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-(CR^aR^b)_{m1}O-CR^8R^9(CR^aR^b)_{m2}-$, $-(CR^aR^b)_{m1}OCR^8R^9-C(O)-$, $-(CR^aR^b)_{m1}-O-(CR^aR^b)_{m2}C(O)-$ 및 $-(CR^aR^b)_{m1}-S-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-$

C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택되는 기들을 포함하고, 여기서 R^a 및 R^b는 동일하거나 상이하고, 수소, 중수소, 할로겐 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; m1 및 m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 스페이서 단위는 하기의 기들, 즉



으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기들을 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 14

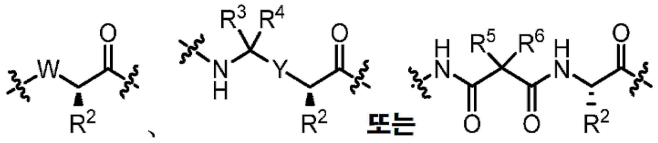
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 L-D는 하기 화학식, 즉

-Str-(Pep)-Sp-D에 의해 표시되는 화학기이고,

Str은 Ab에 공유 결합된 확장 단위(stretching unit)이고;

Sp는 스페이서 단위이고,

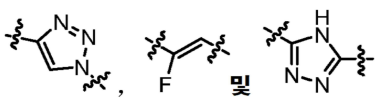
Pep는 아미노산 단위, 이황화물기, 설폰아미드기 및 하기 비펩티드 화학기들, 즉



으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 W는 -NH-헤테로사이클로알킬- 또는 헤테로사이클로알킬이고; Y는 헤테로아릴, 아릴, $-C(O)C_{1-6}$ 알킬렌, C_{2-6} 알케닐렌, C_{1-6} 알킬렌 또는 $-C_{1-6}$ 알킬렌-NH-이고; 각각의 R^2는 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{1-6} 알킬렌-NH_2, -(C_{1-10} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 -(C_{1-10} 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; R^3 및 R^4는 각각 독립적으로 H, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 아릴알킬 및 헤테로아릴알킬이거나, 또는 R^3 및 R^4는 함께 C_{3-7} 사이클로알킬을 형성할 수 있고; R^5 및 R^6은 각각 독립적으로 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 (C_{1-10} 알킬렌)OCH_2-이거나, 또는 R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성하는, 항체-약물 접합체.

청구항 15

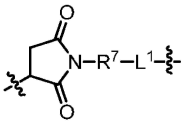
제14항에 있어서, Y는 하기 기들, 즉



로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체-약물 접합체.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 Str은 하기 화학식, 즉



으로 표시되는 화학기로부터 선택되되, 단

상기 R^7은 -W1-C(O)-, -C(O)-W1-C(O)-, $-(CH_2CH_2O)_{p1}C(O)-$, $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 및 $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$으로 이루어진 군으로부터 선택되고, W1은 1개 ~ 8개의 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬, C_{1-8} 알킬렌-사이클로알킬 및 C_{1-8} 알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 헤테로알킬은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 ~ 3개를 포함하고, 상기 C_{1-8} 알킬렌, 상기 사이클로알킬 및 상기 선형 헤테로알킬은, 선택적으로 할로겐, 중수소, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 추가 치환되고;

L^1은 $-NR^{10}(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$, $-NR^{10}(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$, $-(CH_2)_{p1}C(O)-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 화학 결합이고; p1은 1 ~ 20의 정수이고, R^{10}은 수소, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 17

제16항에 있어서, R^7은 C_{1-6} 알킬렌 C(O)-, $-(CH_2-CH_2O)_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_3C(O)-$ 및 $-(CH_2-CH_2O)_4C(O)-$으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체-약물 접합체.

청구항 18

제16항에 있어서, R^7은 $-C_{1-8}$ 알킬렌-사이클로알킬-C(O)-, $-(CH_2-CH_2O)_4CH_2C(O)-$ 및 $-(CH_2-CH_2O)_6CH_2C(O)-$로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체-약물 접합체.

청구항 19

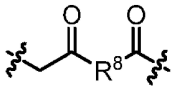
제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 링커 L은 말레이미드-$(PEG)_2$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_6$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_8$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-lys, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Val-Cit, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Val-lys, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_6$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_8$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-설폰아미드, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-lys, 말레이미드-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-설폰아미드 또는 Mal-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-이황화물을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 링커 L은 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_6$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(CH_2)_5C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-C_{1-8} 알킬렌-사이클로알킬-C(O)-$NH(CH_2CH_2O)_4CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-Cit-, 말레이미드-$(PEG)_2$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2C(O)$-Val-Cit-, 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2C(O)$-Val-Cit- 및 말레이미드-$(PEG)_6$-$CH_2C(O)$-Val-Cit-를 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 Str은 하기 화학식, 즉

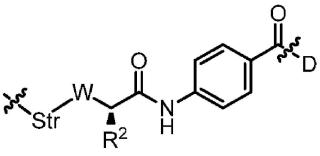


으로 표시되는 화학기로부터 선택되고,

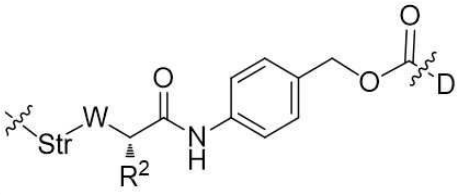
여기서 R^8은 C_{1-10} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, (C_{1-10} 알킬렌)O-, $N(R^d)$-(C_{2-6} 알킬렌)-$N(R^d)$ 및 $N(R^d)$-(C_{2-6} 알킬렌)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 각각의 R^d는 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬인, 항체-약물 접합체.

청구항 22

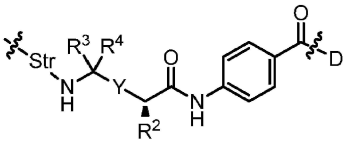
제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 L-D는



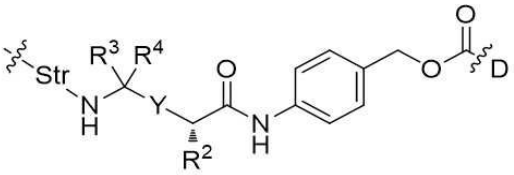
[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];



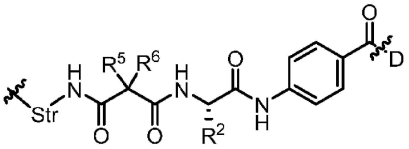
[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];



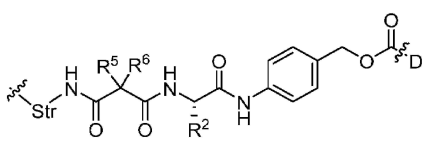
[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐렌, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];



[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐렌, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];



[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성함];



[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬

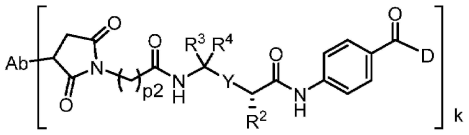
렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성함]

로 이루어진 군으로부터 선택되는 화학식으로 표시되고;

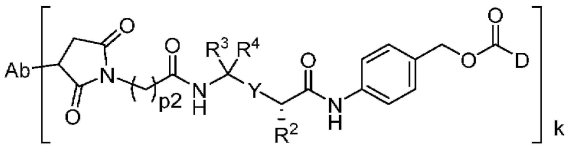
상기 W 및 상기 Str은 제14항에 정의된 바와 같고, 상기 D는 제1항에 정의된 바와 같은, 항체-약물 접합체.

청구항 23

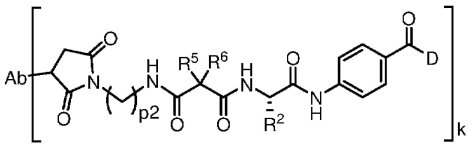
제22항에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식, 즉



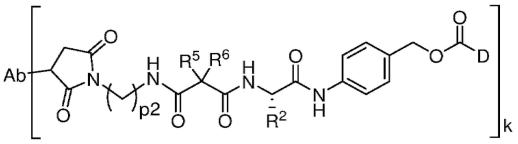
[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택되고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택되고, Y, R^3 및 R^4는 제14항에 정의된 바와 같음];



[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택되고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택되고, Y, R^3 및 R^4는 제14항에 정의된 바와 같음];



[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



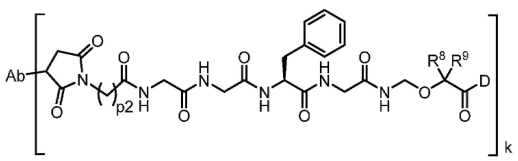
[식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨]

으로 표시되고;

상기 Ab 및 상기 D는 제1항에 정의된 바와 같은, 항체-약물 접합체.

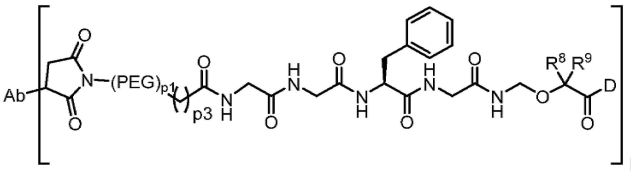
청구항 24

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식, 즉

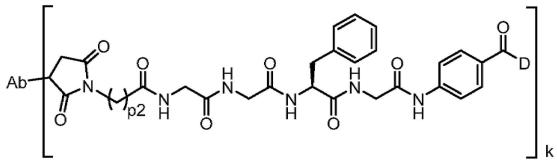


[식 중, R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진

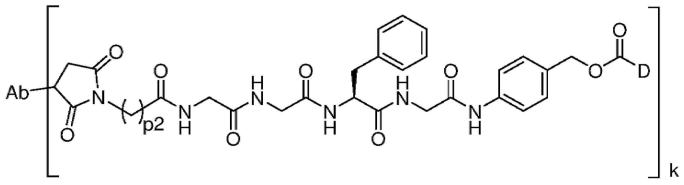
군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



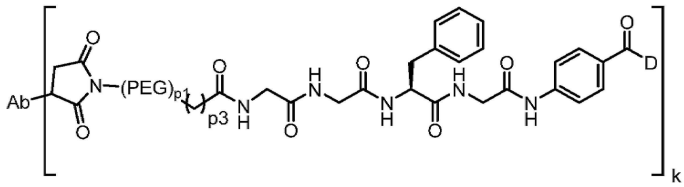
[식 중, R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



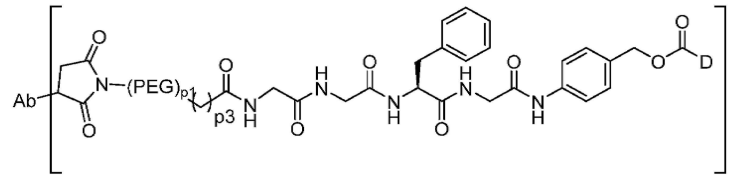
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



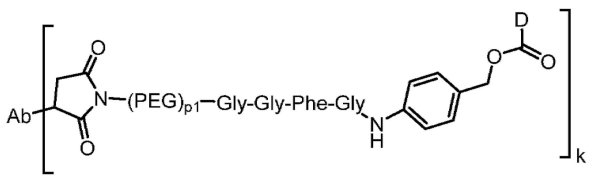
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



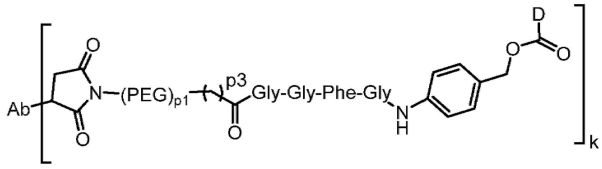
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



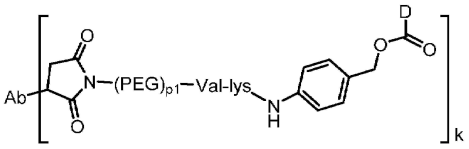
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



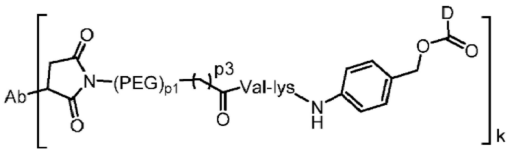
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



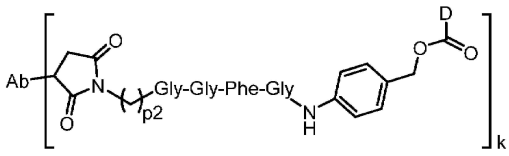
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



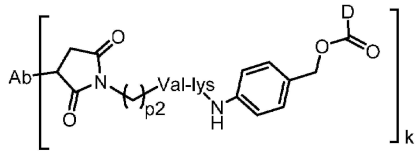
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



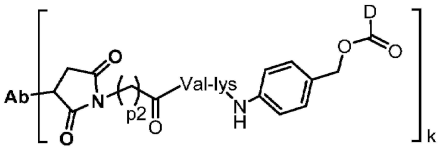
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



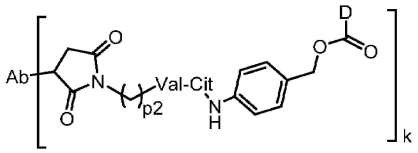
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



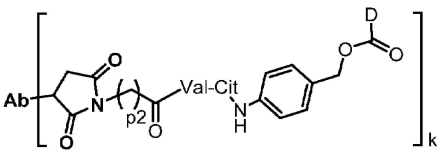
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



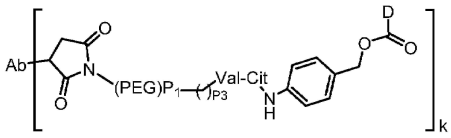
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



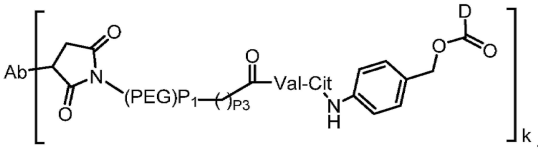
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



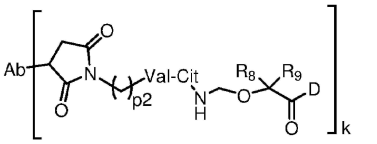
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];



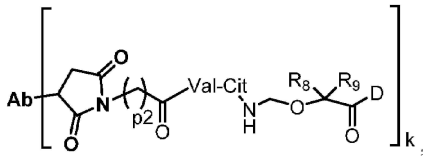
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



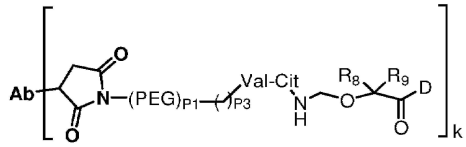
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



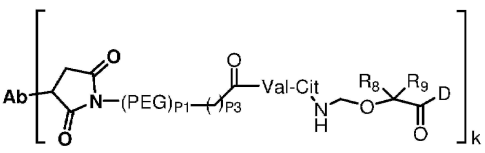
[식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



[식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];



[식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];



[식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선

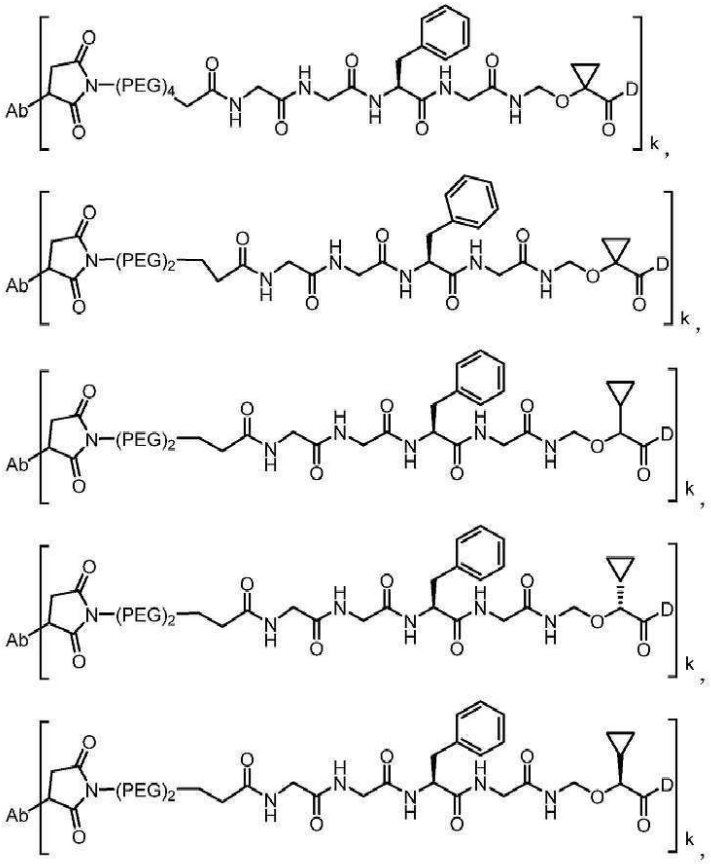
택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨]

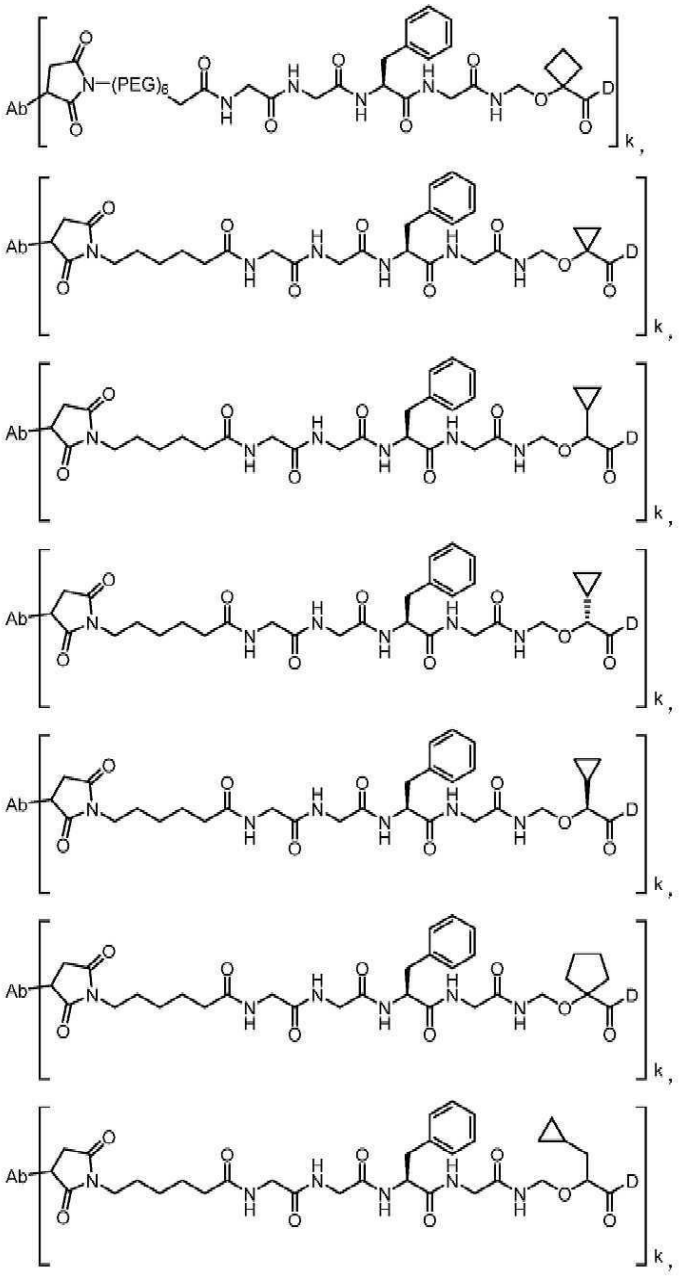
으로 표시되고,

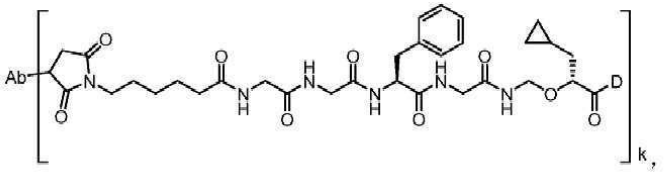
상기 Ab 및 상기 D는 제1항에 정의된 바와 같은 항체-약물 접합체.

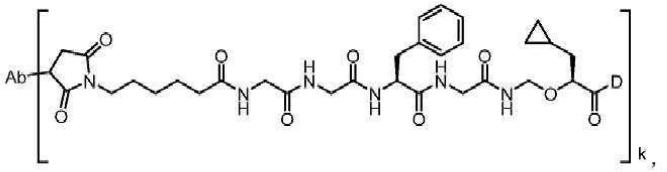
청구항 25

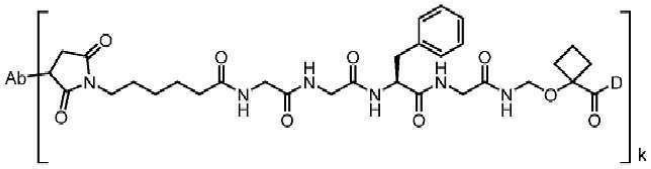
제1항에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 하기 화학식들, 즉



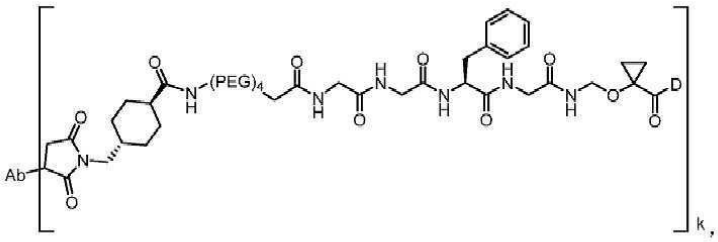


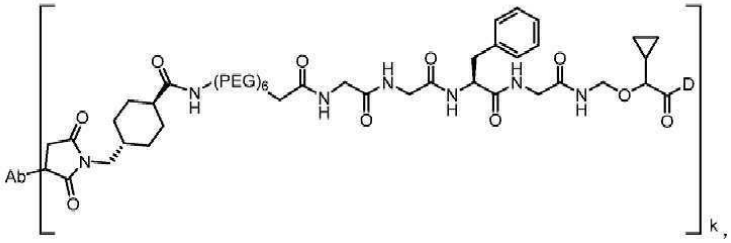


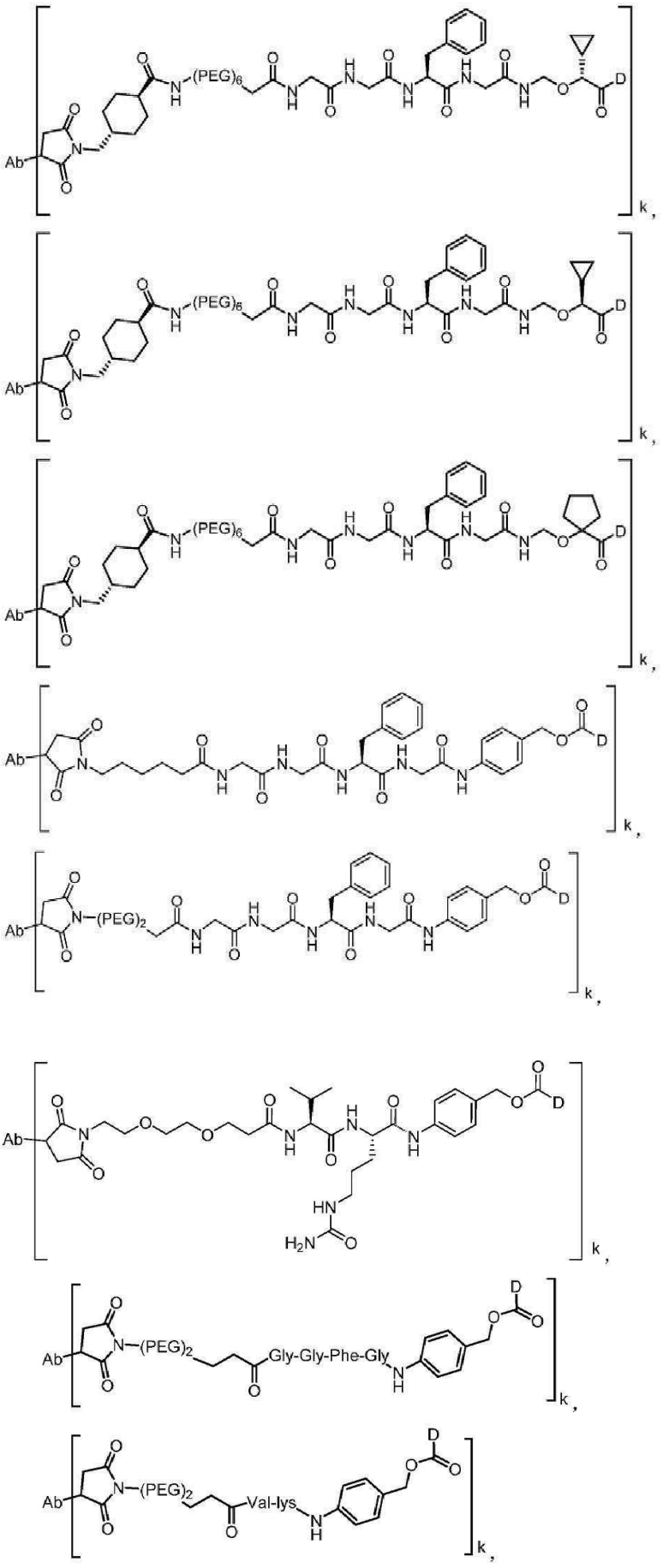




,







으로 표시되고,

여기서 k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있고; Ab 및 D는 제1항에 정의된 바와 같고; 또한 상기 D중 R^{1a}는, 바람직하게 메틸로부터 선택되고, 상기 D중 R^{1b}는, 바람직하게 수소로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 항체는 마우스 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 전체가 인간의 것인 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체-약물 접합체.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항HER2(ErbB2) 항체, 항EGFR 항체, 항B7-H3 항체, 항c-Met 항체, 항HER3(ErbB3) 항체, 항HER4(ErbB4) 항체, 항CD20 항체, 항CD22 항체, 항CD30 항체, 항CD33 항체, 항CD44 항체, 항CD56 항체, 항CD70 항체, 항CD73 항체, 항CD105 항체, 항CEA 항체, 항A33 항체, 항Cripto 항체, 항EphA2 항체, 항G250 항체, 항MUC1 항체, 항루이스 Y 항체, 항VEGFR 항체, 항GPNMB 항체, 항인테그린 항체, 항PSMA 항체, 항테나신-C 항체, 항SLC44A4 항체, 항CD79 항체, 항TROP-2 항체, 항CD79B 항체, 항메소텔린 항체 및 이의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 트라스투주맙(Trastuzumab), 퍼투주맙(Pertuzumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 에노블리투주맙(Enoblituzumab), 에미베투주맙(Emibetuzumab), 이노투주맙(Inotuzumab), 피나투주맙(Pinatuzumab), 브렌툭시맙(Brentuximab), 겜투주맙(Gemtuzumab), 비바투주맙(Bivatuzumab), 로보투주맙(Lorvotuzumab), cBR96, 글레마투마맙(Glematumamab) 및 이의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체-약물 접합체.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CD79B 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되고, 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 단

상기 항체의 상기 중쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 7, 서열 번호 8 및 서열 번호 9 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3; 또는

2) 서열 번호 13, 서열 번호 14 및 서열 번호 15 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3

을 포함하고/포함하거나,

상기 항체의 상기 경쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 10, 서열 번호 11 및 서열 번호 12 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

2) 서열 번호 16, 서열 번호 17 및 서열 번호 18 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 항CD79B 항체는 이하 1) ~ 2), 즉

1) 서열 번호 7, 서열 번호 8 및 서열 번호 9 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열 번호 10, 서열 번호 11 및 서열 번호 12 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

2) 서열 번호 13, 서열 번호 14 및 서열 번호 15 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열 번호 16, 서열 번호 17 및 서열 번호 18 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체

-약물 접합체.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 항CD79B 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데,

상기 중쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 3에 제시된 서열 또는 서열 번호 3에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

2) 서열 번호 5에 제시된 서열 또는 서열 번호 5에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

을 포함하고/포함하거나;

상기 경쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 4에 제시된 서열 또는 서열 번호 4에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

2) 서열 번호 6에 제시된 서열 또는 서열 번호 6에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

을 포함하고;

바람직하게, 상기 항CD79B 항체 또는 항원 결합 단편의 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 3에 제시되어 있고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 4에 제시되어 있거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 5에 제시되어 있고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 6에 제시되어 있는, 항체-약물 접합체.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항CD79B 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데,

상기 중쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 19에 제시된 서열 또는 서열 번호 19에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

2) 서열 번호 21에 제시된 서열 또는 서열 번호 21에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

을 포함하고/포함하거나;

상기 경쇄 가변 영역은

1) 서열 번호 20에 제시된 서열 또는 서열 번호 20에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

2) 서열 번호 22에 제시된 서열 또는 서열 번호 22에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

을 포함하는데;

바람직하게, 상기 항CD79B 항체 또는 항원 결합 단편의 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 19에 제시되어 있고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 20에 제시되어 있거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21에 제시되어 있고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 22에 제시되어 있는, 항체-약물 접합체.

청구항 33

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항TROP-2 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 29에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열과 동일한 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30에 제시된 경쇄 가변 영

역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열과 동일한 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항체는 항TROP2 항체로부터 선택되고, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 23, 서열 번호 24 및 서열 번호 25 각각에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 26, 서열 번호 27 및 서열 번호 28 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 항TROP-2 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 29에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지는, 항체-약물 접합체.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항TROP-2 항체는 서열 번호 29에 제시된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역과, 서열 번호 30에 제시된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 37

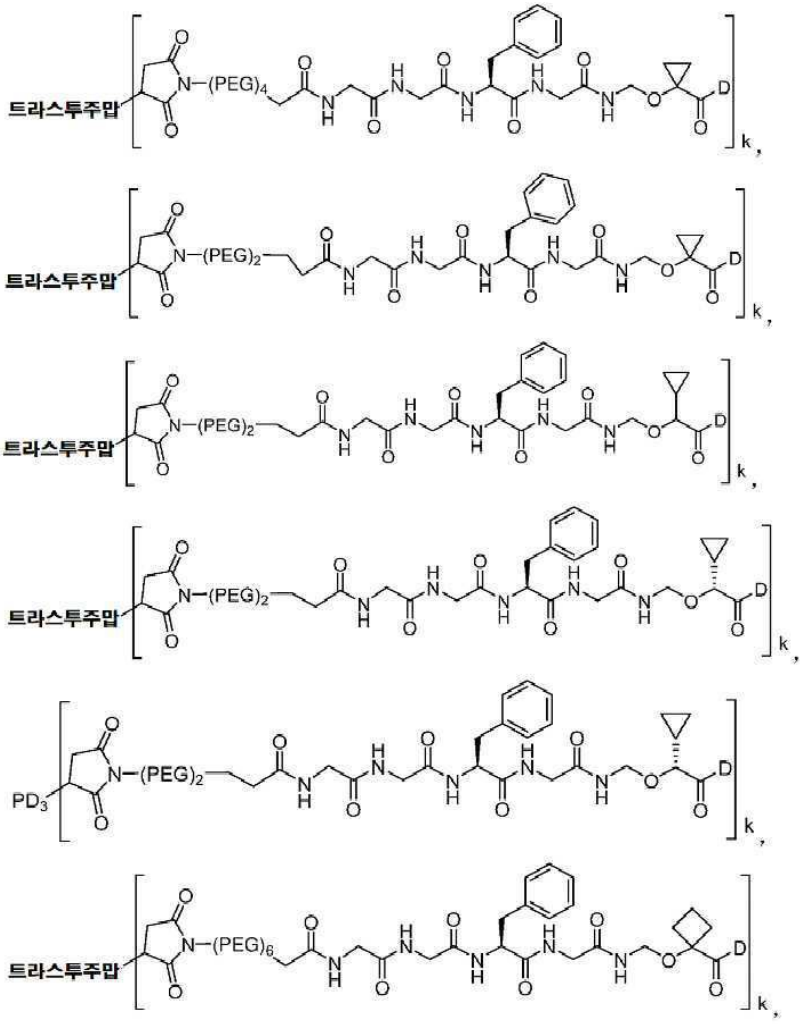
제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항TROP-2 항체는 상기 항체의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하고; 바람직하게 상기 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 κ 및 λ 사슬 불변 영역 및 이의 종래 변이체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 더욱 바람직하게 상기 항체는 서열 번호 31에 제시된 서열을 가지는 중쇄 불변 영역과, 서열 번호 32에 제시된 서열을 가지는 경쇄 불변 영역을 포함하는, 항체-약물 접합체.

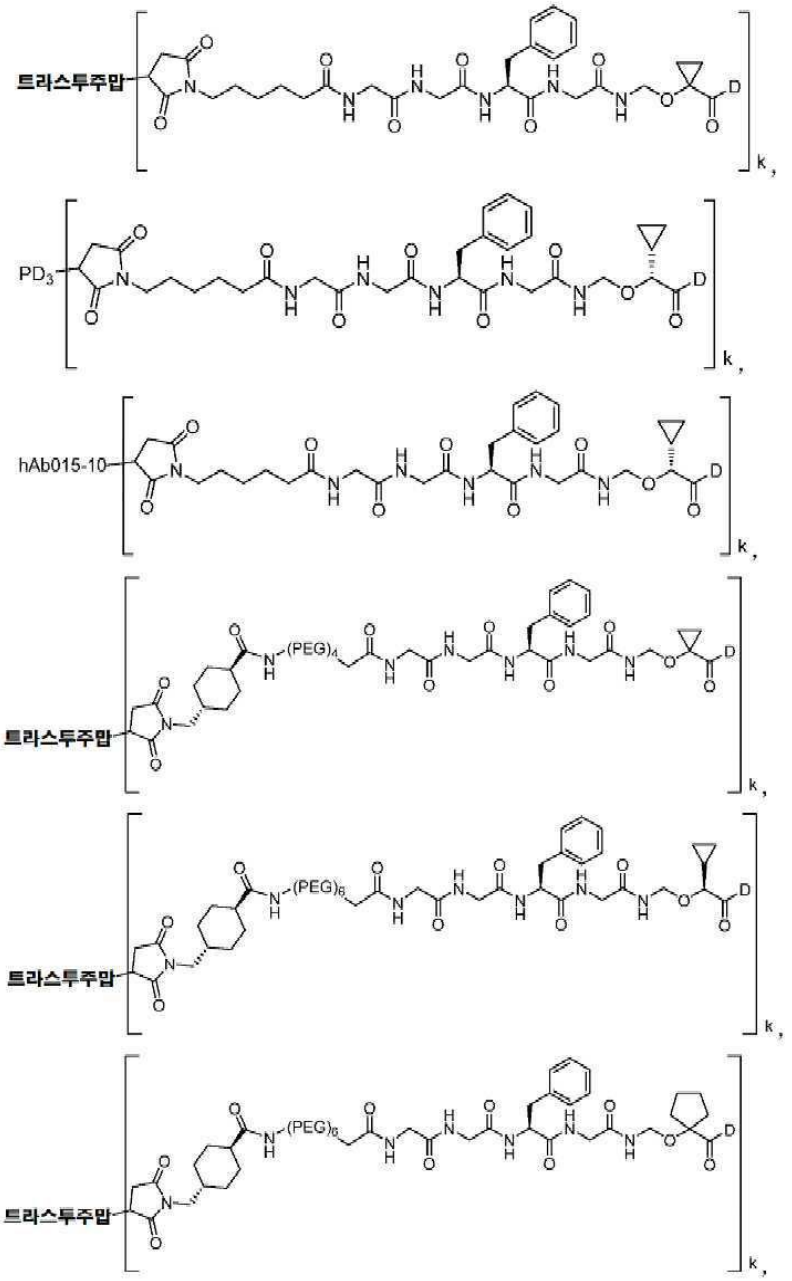
청구항 38

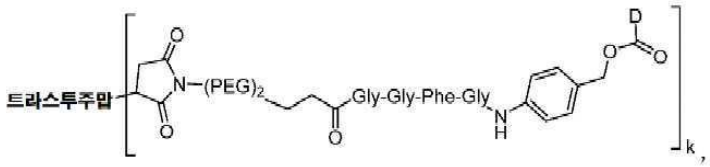
제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항TROP-2 항체는 서열 번호 33에 제시된 서열을 가지는 중쇄와, 서열 번호 34에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하는 항체-약물 접합체.

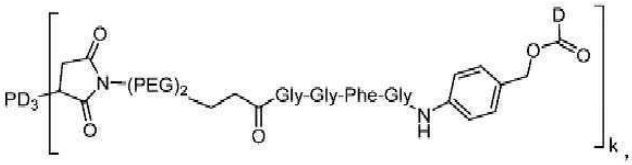
청구항 39

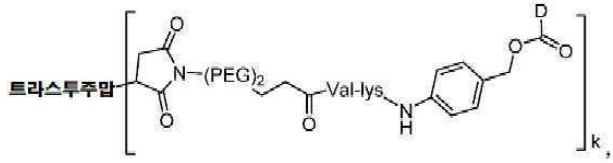
제1항에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 이하의 구조식을 가지는 것들, 즉

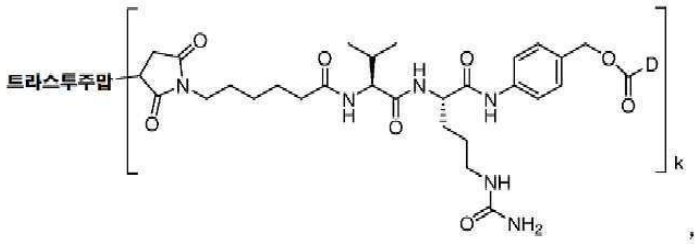


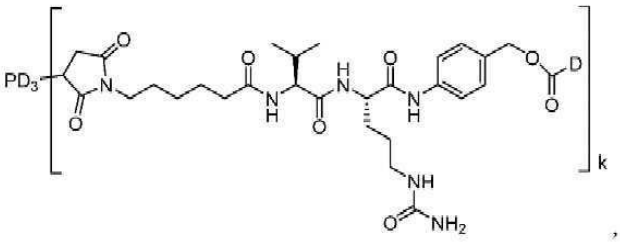

트라스투주맙
PD3
hAb015-10
트라스투주맙
(PEG)4
트라스투주맙
(PEG)6
트라스투주맙
(PEG)6
k,

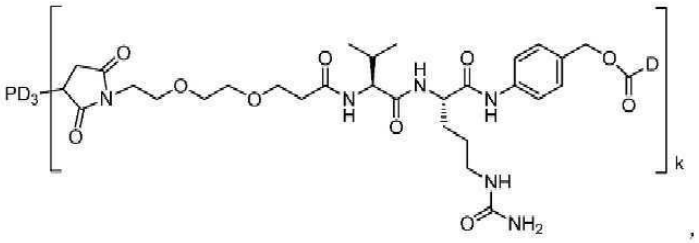

트라스투주맙
(PEG)2
Gly-Gly-Phe-Gly
D
k

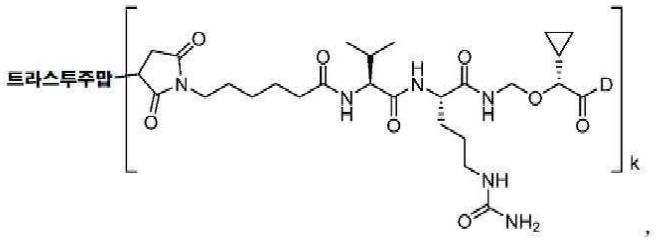

PD3
(PEG)2
Gly-Gly-Phe-Gly
D
k


트라스투주맙
(PEG)2
Val-lys
D
k

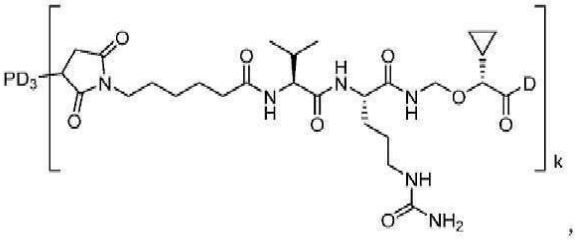

트라스투주맙
NH
NH2
D
k


PD3
NH
NH2
D
k

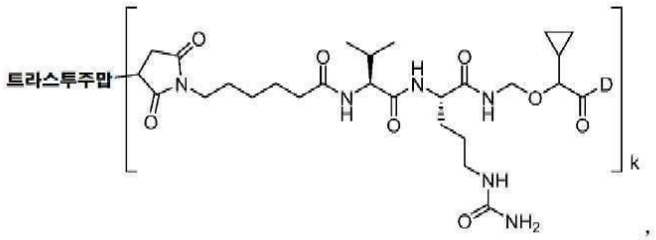

PD3
NH
NH2
D
k


트라스투주맙
k
NH
NH2
D

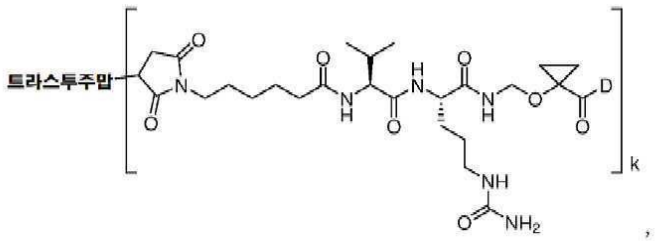
,


PD3
k
NH
NH2
D

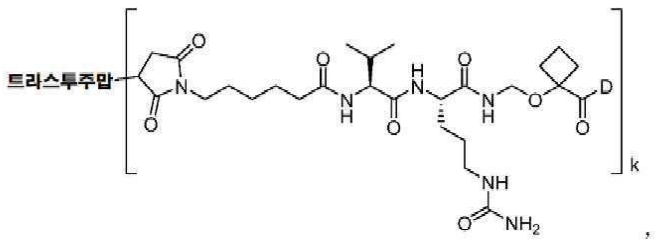
,


트라스투주맙
k
NH
NH2
D

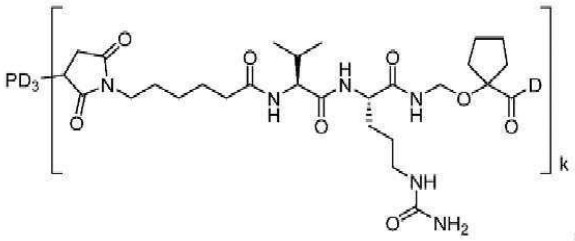
,


트라스투주맙
k
NH
NH2
D

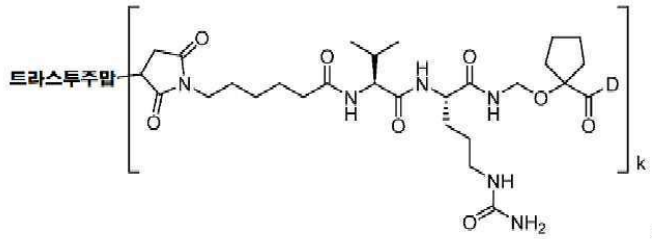
,


트라스투주맙
k
NH
NH2
D

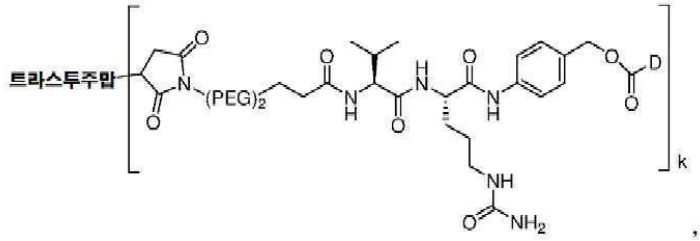
,



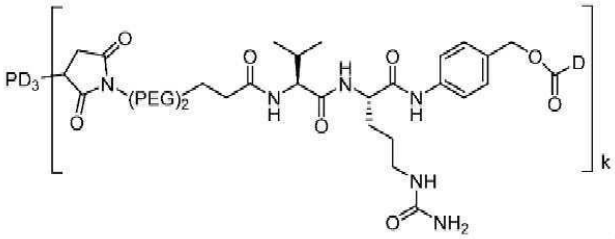
,



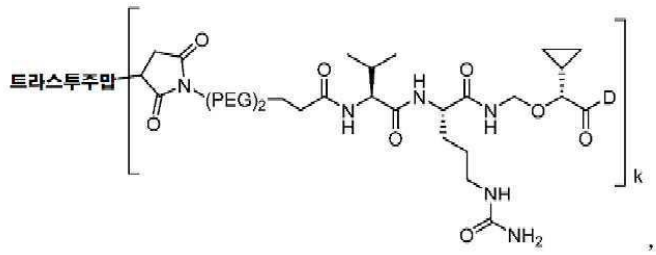
,



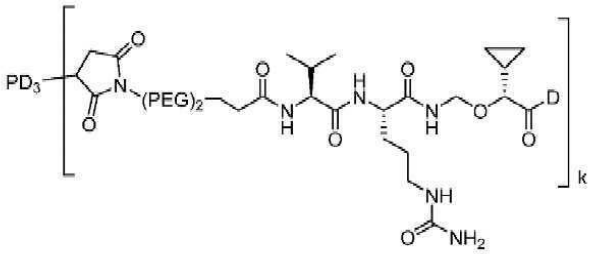
,

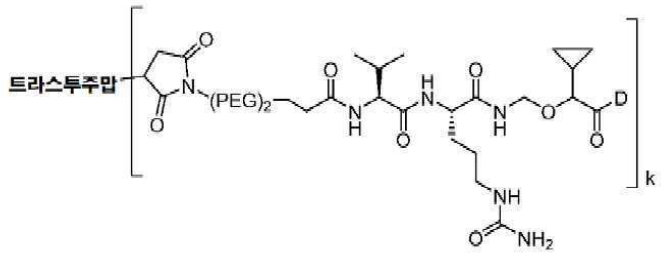


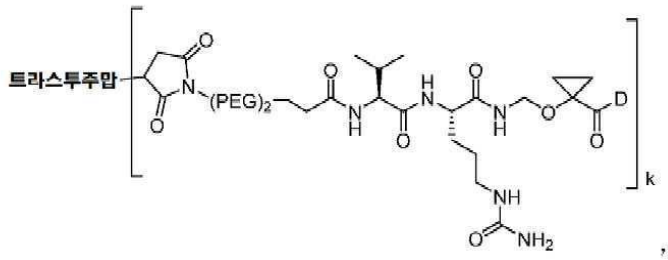
,



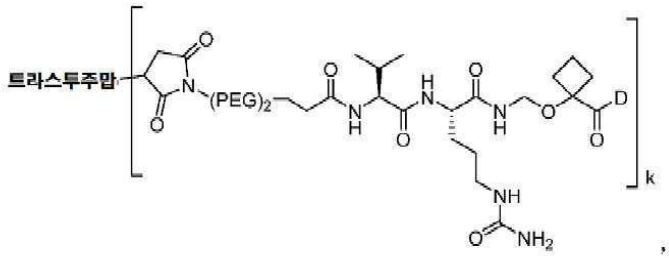
,



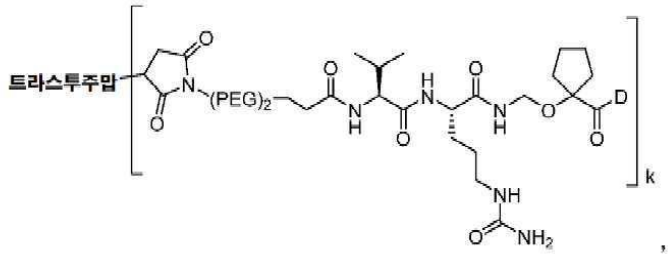

트라스투주맙


트라스투주맙

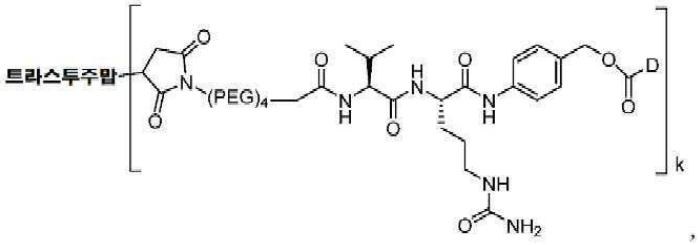
,


트라스투주맙

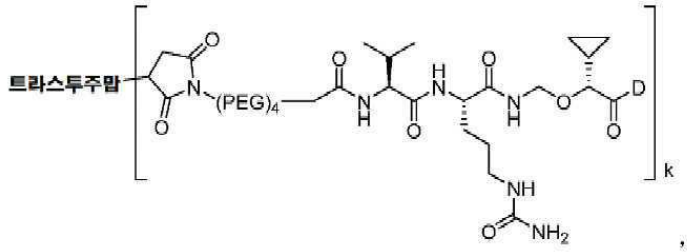
,


트라스투주맙

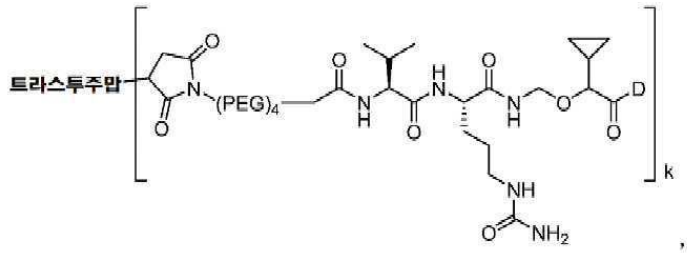
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

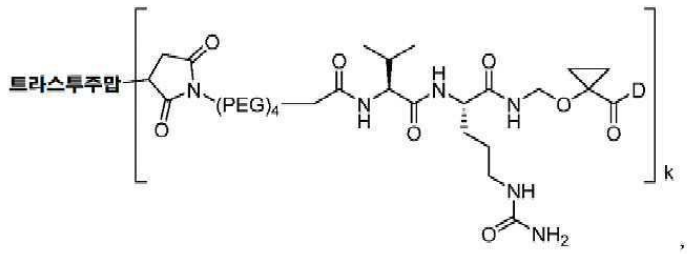
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

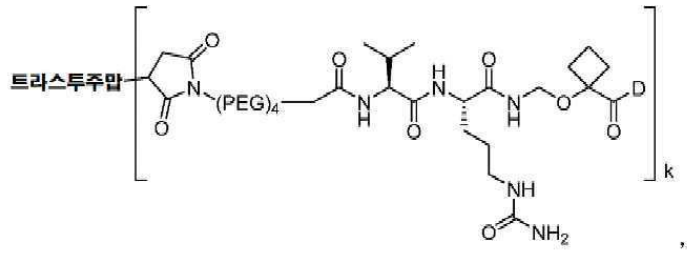
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

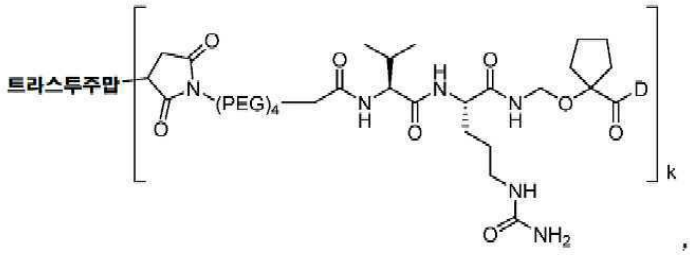
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

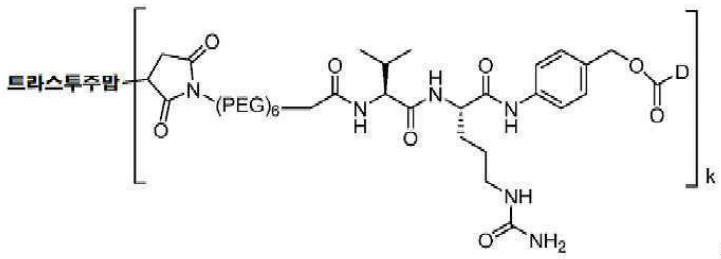
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

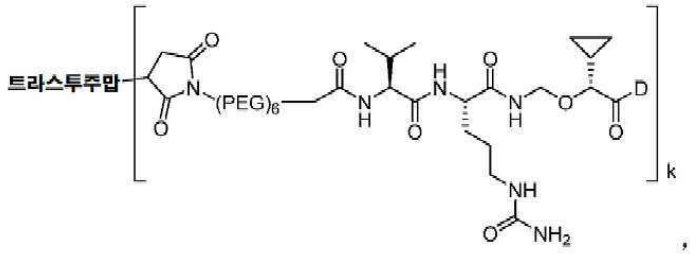
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

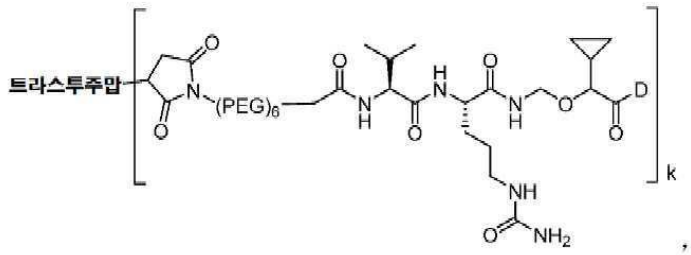
,


트라스투주맙
(PEG)6
k

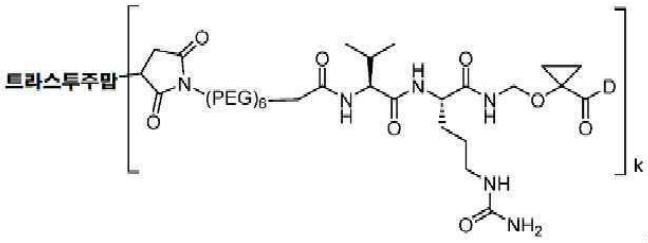
,


트라스투주맙
(PEG)6
k

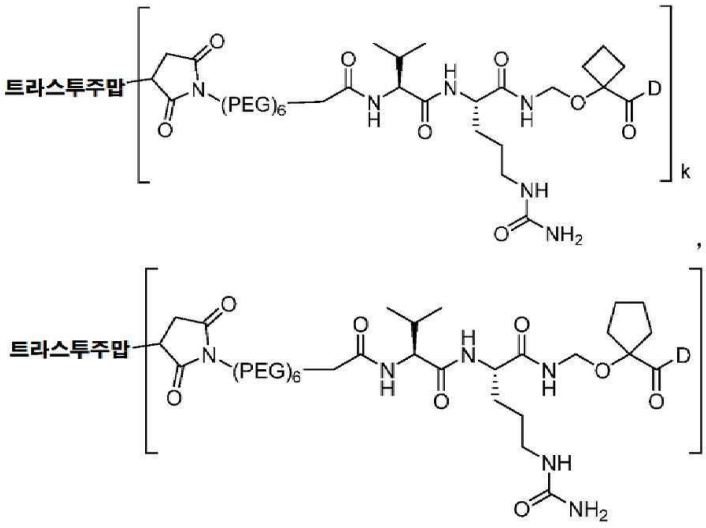
,


트라스투주맙
(PEG)6
k

,


트라스투주맙
(PEG)6
k

,

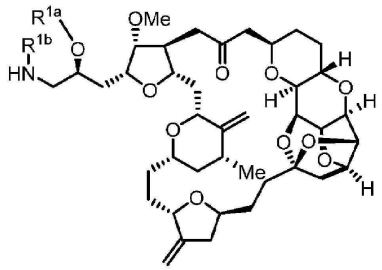


로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며; 또한 상기 D중 R^{1a}는 메틸로부터 선택되고, 상기 D중 R^{1b}는 수소로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

청구항 40

화학식 D, 즉

화학식 D



의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서,

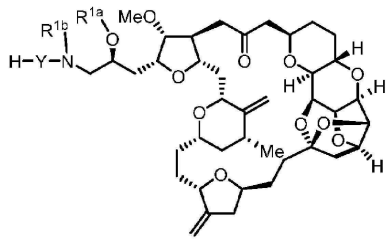
식 중,

R^{1a}는 수소, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고; R^{1b}는 수소, 알킬, 알콕시, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 수소로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는 상기 R^{1a} 및 상기 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 상기 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되고, 상기 R^{1a} 및 상기 R^{1b}는 동시에 수소가 아닌, 화학식 D의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 41

화학식 DZ, 즉

화학식 DZ



의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서,

여기서 R^{1a}는 수소, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 상기 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고;

R^{1b}는 수소, 알킬, 알콕시, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 수소로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는

R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 상기 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되고, 상기 R^{1a} 및 상기 R^{1b}는 동시에 수소가 아니고;

Y는 $-O(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-O-CR^8R^9(CR^aR^b)_{m2}-$, $-OCR^8R^9-C(O)-$, $-O(CR^aR^b)_{m2}C(O)-$ 및 $-S-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^a 및 R^b는 동일하거나 상이하며, 수소, 중수소, 할로겐 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

상기 R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는

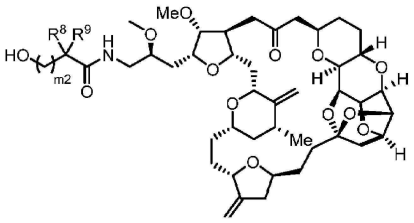
상기 R^8 및 상기 R^9는 이것들과 결합되어 있는 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고;

상기 m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 화학식 DZ-1, 즉

화학식 DZ-1

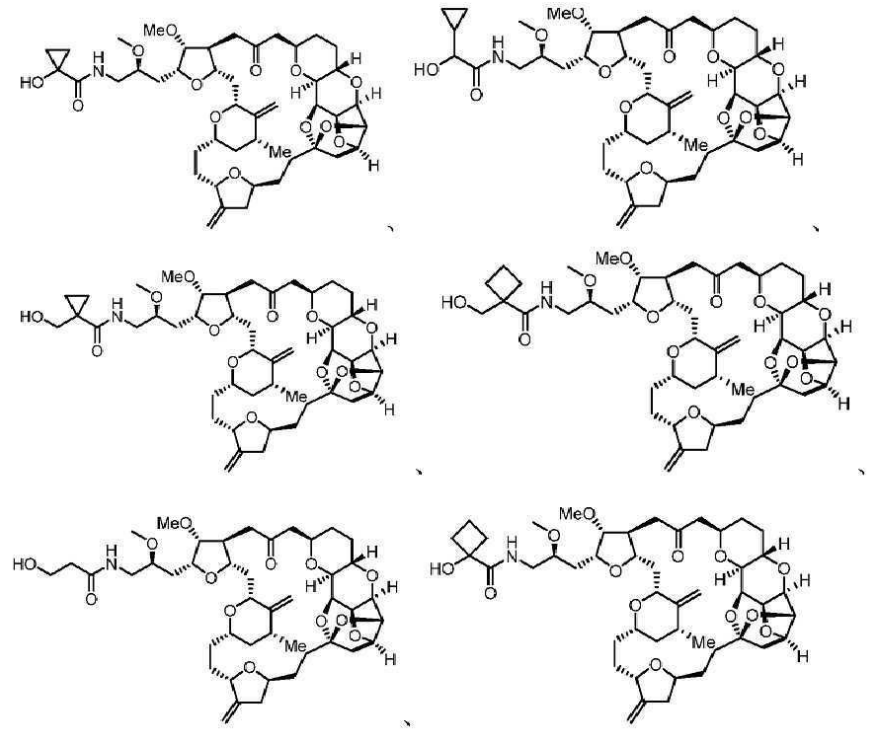


의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이고,

여기서 R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합되어 있는 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 상기 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은



으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 44

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 의한 항체-약물 접합체 치료적 유효량만큼과, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 45

종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 의한 항체-약물 접합체 또는 제44항에 의한 약학 조성물의 용도로서, 상기 종양은, 바람직하게 HER2, HER3, B7H3 또는 EGFR 발현과 연관된 암인 용도.

청구항 46

암을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 의한 항체-약물 접합체 또는 제44항에 의한 약학 조성물의 용도로서, 상기 암은, 바람직하게 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 전립선암, 신장암, 요로암, 방광암, 간암, 위암, 자궁내막암, 타액선암종, 식도암, 흑색종, 신경교종, 신경모세포종, 육종, 폐암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 백혈병, 골암, 피부암, 갑상선암, 췌장암 및 림프종인 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에리불린 유도체의 약물 접합체, 이를 제조하기 위한 방법 및 의료분야에서 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항체 약물 접합체(ADC)는 정상 세포 및 종양 세포의 표면 항원에 대한 항체의 결합 특이성과, 약물의 고효율을 완전히 이용할 뿐 아니라, 치료 효과가 떨어진다는 항체 또는 항체 단편의 단점과 심각한 독성 부작용 등을 가진다는 약물의 단점은 회피한 것으로서, 안정적인 화학 링커 화합물을 통해 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 생물 활성 약물과 결합시킨 것이다. 이는, 항체 약물 접합체가 종양 세포와 더욱 정확하게 결합할 수 있으며, 정상 세포에 대해서는 과거 종래의 화학치료 약물에 비하여 영향력이 감소하였음을 의미한다(Mullard A,(2013) *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:329-332; DiJoseph JF, Armellino DC,(2004) *Blood*, 103:1807-1814).

[0003] Mylotarg(겜투주맙 오조가미신, Wyeth Pharmaceutical Co.,Ltd.), 즉 최초의 항체 약물 접합체는 급성 골수구성백혈병 치료에 대해 2000년에 U.S. FDA 승인을 받았다(*Drugs of the Future*(2000) 25(7):686; US4970198; US5079233; US5585089; US5606040; US5693762; US5739116; US5767285; US5773001).

[0004] Adcetris(브렌툭시맙 베도틴, Seattle Genetics)는 호지킨림프종 및 재발 악성대세포림프종 치료에 대해 2011년 8월 U.S. FDA 승인을 받았다(*Nat. Biotechnol*(2003) 21(7):778-784; WO2004010957; WO2005001038; US7090843A; US7659241; WO2008025020). Adcetris®는 약물이 림프종 세포상 표적 CD30에 직접 작용하여 내포작용을 수행함으로써 종양 세포의 세포자멸을 유도할 수 있도록 만들 수 있는 신규 ADC 표적화 약물이다.

[0005] Mylotarg 및 Adcetris 둘 다는 조직 구조에서 고형 종양에 비해 비교적 단순한 혈액암에 대한 표적 치료제이다. Kadcyla(아도-트라스투주맙 엠탄신, T-DM1)는 HER2 양성 진행 또는 전이 유방암 환자로서 트라스투주맙(Trtuzumab, 상품명: Herceptin®) 및 파클리탁셀(WO2005037992; US8088387)에 대해 약물 내성을 보이는 유방암 환자 치료에 대해 2013년 2월 U.S. FDA 승인을 받았다. Kadcyla는 고형 종양 치료에 대해 U.S. FDA 승인을 받은 최초 ADC 약물이다.

[0006] 미세소관은 세포내 이동 및 운송, 세포 신호전달 및 세포 형상 유지를 비롯한 다양한 세포 기능과 연관된, 강력한 필라멘트형 세포골격 단백질이다. 미세소관은 또한 염색체가 딸세포 2개로 분열하는데 필요한 유사분열 방추사를 형성함으로써 유사 세포 분열에 결정적인 역할을 한다. 모든 세포에서 미세소관의 생물 기능은 자체의 중합 동력학에 의해 아주 많이 조절되고, 미세소관의 중합은 미세소관 양 말단에서 α 및 β 튜불린 이량체의 가역적 비공유 첨가에 의해 일어난다. 이러한 동력학적 행동과 이로 인한 미세소관 길이 제어는 유사분열 방추사의 적절한 기능발휘에 필수이다. 심지어 미세소관 동력학에 있어 소폭의 변화는 방추사 관문이 연루되어 있고, 유사분열시 세포 주기 진행을 억제한 후, 세포 사멸을 유발한다(Mukhtar et al.(2014) *Mol. Cancer Ther*.13:275-84). 암세포는 정상 세포보다 신속하게 분열하므로, 일반적으로 튜불린과 결합하여 미세소관의 정상적 기능을 파괴하는 화합물에 대해 감수성이 더 크다. 그러므로 튜불린 억제제 및 기타 미세소관 표적화 제제는 암 치료용 약물 군일 것으로 예상된다(Dumontet and Jordan(2010) *Nat.Rev.Drug Discov*.9: 790-803).

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 화학식 I, 즉

[0008] 화학식 I

[0009] $Ab-(L-D)_k$

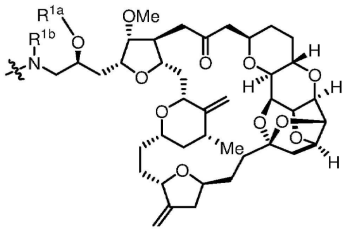
[0010] 의 구조를 가지는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하는데, 단

[0011] 식 중, Ab는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

[0012] L은 Ab와 D를 공유 결합시키는 링커이고;

[0013] k는 1 ~ 20(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 임의의 값 2개 사이의 임의의 값 포함)이고;

[0014] -D는 이하 화학식, 즉



[0015]

[0016] 와 같이 표시되되,

[0017] 단 R^{1a}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고;

[0018] R^{1b}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 수소로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는

[0019] R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하되, 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕

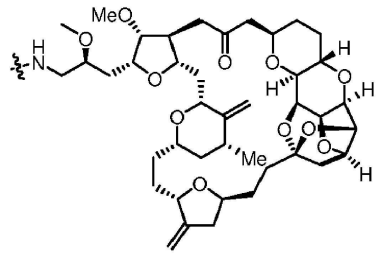
시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되되, R^{1a} 및 R^{1b}가 상이할 때 헤테로사이클로알킬은 수소이다.

[0020] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체의 D중 R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 6원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0021] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체의 D중 R^{1a}는 메틸로부터 선택된다.

[0022] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체의 D중 R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 독립적으로 메틸로부터 선택된다.

[0023] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체의 -D는



[0024] 이다.

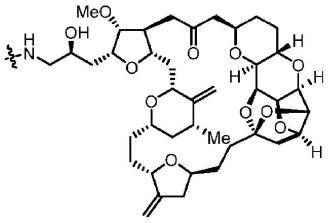
[0025] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체의 $Ab-(L-D)_k$에서 k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 정수 또는 소수일 수 있다.

[0026] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 화학식 I, 즉

[0027] 화학식 I

[0028] $Ab-(L-D)_k$

[0029] 의 구조를 가지는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공하는데, 단 -D는



[0030] 로부터 선택된다.

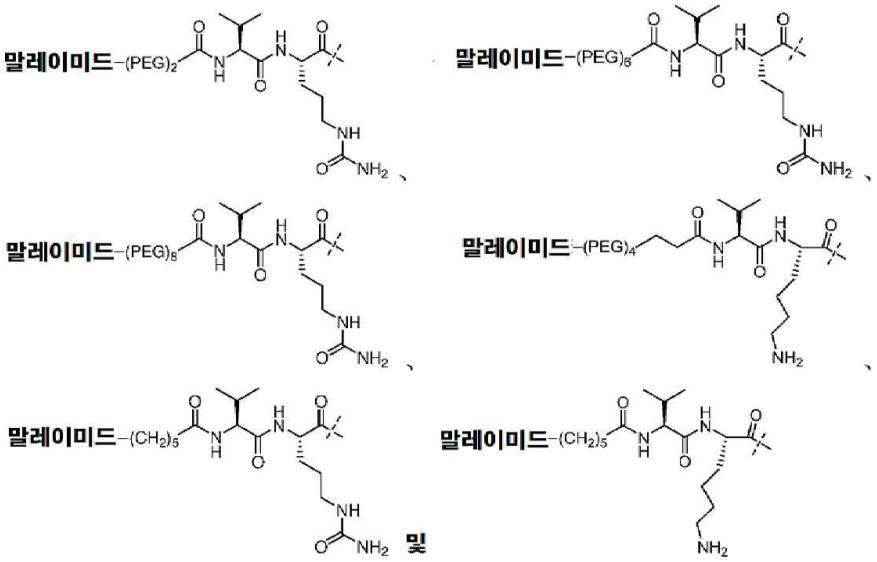
[0031] 몇몇 구현예에서, 링커는 세포외에서 안정적이므로, ADC는 세포외 환경에 존재할 때 비변형 상태로 유지되지만, 암세포와 같은 세포에 내부화될 때 절단되 수 있다. 몇몇 구현예에서, 에리불린 유사체 약물기는, ADC의 항체기에 대해 특이적인 항원을 발현하는 세포에 ADC가 도입될 때 항체기로부터 절단되고, 절단될 때 에리불린 유사체의 비변형 형태로서 방출된다.

[0032] 몇몇 구현예에서, 링커중 절단가능한 기는 절단가능한 펩티드기이다. 몇몇 구현예에서, 절단가능한 펩티드기를 포함하는 ADC는 더 낮은 응집 수준, 개선된 항체 대 약물 비, 암세포 표적 사멸 증가, 표적을 벗어난(off-target) 비암세포 사멸 감소 및/또는 기타 절단가능한 기를 포함하는 ADC에 비하여 더 큰 약물 담지율(p)을 보인다. 몇몇 구현예에서, 절단가능한 기의 첨가는 절단불가능한 링커의 첨가시에 비하여 세포독성 및/또는 역가를 증가시킨다. 몇몇 구현예에서, 증가한 역가 및/또는 세포독성은 ADC의 항체기에 의해 표적화되는 항원을 중간 수준으로 발현하는(예컨대 중간 FRA 발현) 암에서의 역가 및/또는 독성이다. 몇몇 구현예에서, 절단가능한 펩티드기는 효소에 의해 절단될 수 있고, 링커는 효소에 의해 절단될 수 있는 것이다. 몇몇 구현예에서, 효소는 카텝신이고, 링커는 카텝신에 의해 절단될 수 있는 것이다. 임의의 구현예에서, 효소에 의해 절단될 수 있는 링

커(예컨대 카텝신에 의해 절단될 수 있는 링커)는 기타 절단 기작에 의해 절단될 수 있는 링커에 비하여 개선된, 전술된 특성들 중 1가지 이상을 보여준다.

[0033] 몇몇 구현예에서, 링커는 아미노산 단위를 포함하고, 아미노산 단위는, 바람직하게 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 군, 더욱 바람직하게 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn), 글리신-글리신-리신(Gly-Gly-lys), 발린-리신(Val-lys), 발린-알라닌(Val-Ala), 발린-페닐알라닌(Val-Phe) 및 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(Gly-Gly-Phe-Gly)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 2개 ~ 7개로 이루어진 펩티드 잔기를 포함한다.

[0034] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 아미노산 단위를 포함하는 링커는



[0035] 및

[0036] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

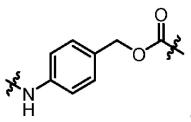
[0037] 몇몇 구현예에서, 아미노산 단위는 발린-시트룰린(Val-Cit)을 포함한다. 몇몇 구현예에서, Val-Cit를 포함하는 ADC는, 기타 아미노산 단위 또는 기타 절단가능한 기를 포함하는 ADC에 비하여 증가한 안정성, 표적을 벗어난 세포 사멸의 감소, 세포의 표적 사멸 증가, 더 낮은 응집 수준 및/또는 더 큰 약물 담지율을 보인다.

[0038] 다른 양태에서, 몇몇 구현예에 의해 제공된 링커는 절단가능한 설폰아미드기를 포함하고, 링커는 환원 조건하에 절단될 수 있다.

[0039] 몇몇 구현예에서, 링커는 절단가능한 이황화물기를 포함하고, 링커는 환원 조건하에 절단될 수 있다.

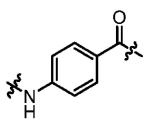
[0040] 다른 양태에서, 본 발명의 항체 접합체중 링커는 에리불린 유도체 D를 절단가능한 기와 결합시키는 스페이서 단위 적어도 1개를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 링커는 D와 결합하는 스페이서 단위를 포함한다.

[0041] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는 *p*-아미노벤질옥시카보닐(PAB), 즉

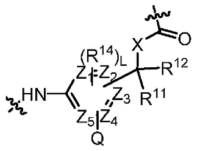


[0042] 를 포함한다.

[0043] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는 *p*-아미노벤조일, 즉

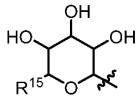


[0044] 를 포함한다.

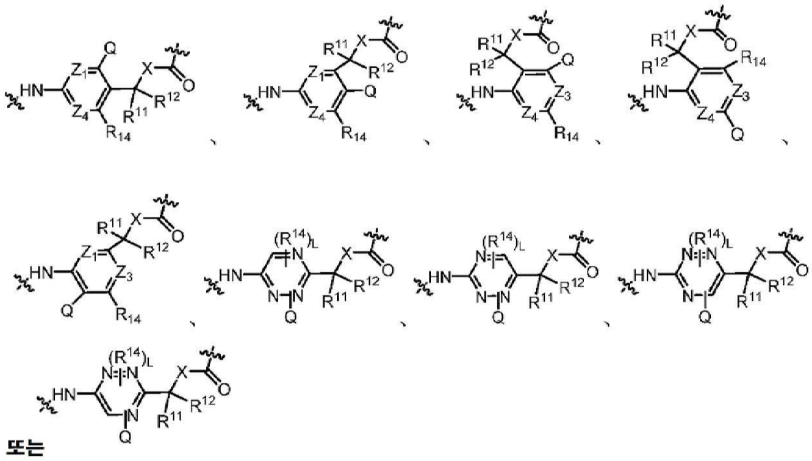


[0045] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는 를 포함하되, 단

[0046] Z_1 ~ Z_5는 탄소 원자 및 질소 원자로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^{14}는 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬, 알콕시, 할로겐, 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 치환되고; R^{11} 및 R^{12}는 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 바람직하게는 수소이거나; 또는 R^{11} 및 R^{12}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; X는 -O- 및 -NH-로 이루어진 군으로부터 선택되고; L은 1 ~ 4의 정수로부터 선택되고;

[0047] Q는 V-E-이되, V-E-는 세포내에 위치한 글리코시다아제에 의해 절단가능한 글리코시드 결합을 제공하되, E는 -O-, -S- 및 $-NR^{13}$-로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^{13}은 수소 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고, 추가로 V는  로부터 선택되되, R^{15}는 -COOH 및 CH_2OH로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구현예에서, V는 -COOH로부터 선택된다.

[0048] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는



또는

[0049]

[0050] 를 포함하되, 단

[0051] Z_1, Z_3, Z_4, X, Q, R^{11}, R^{12} 및 R^{14}는 전술된 바와 같다.

[0052] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는 이하 기들, 즉

[0053] $-(CR^aR^b)_{m1}-O(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$,

[0054] $-(CR^aR^b)_{m1}NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$,

[0055] $-(CR^aR^b)_{m1}O-CR^8R^9(CR^aR^b)_{m2}-$,

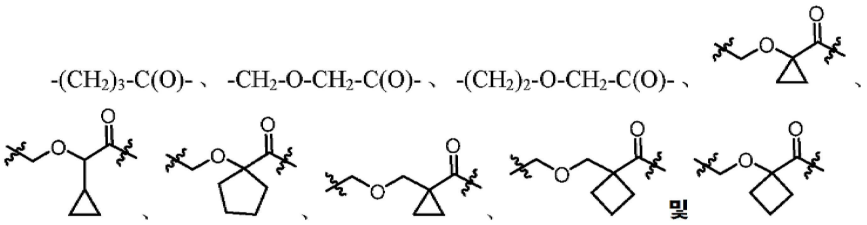
[0056] $-(CR^aR^b)_{m1}OCR^8R^9-C(O)-$,

[0057] $-(CR^aR^b)_{m1}-O-(CR^aR^b)_{m2}C(O)-$ 및 $-(CR^aR^b)_{m1}-S-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$

[0058] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 기들을 포함하되, 단

[0059] R^a 및 R^b는 동일하거나 상이하고, 수소, 중수소, 할로겐 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; m1 및 m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0060] 몇몇 구현예에서, 스페이서 단위는 이하 기들, 즉

[0061] 

[0062] 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기들을 포함한다.

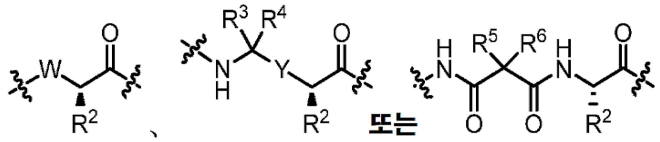
[0063] 다른 양태에서, 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)중 L-D는 하기 화학식, 즉

[0064] -Str-(Pep)-Sp-D에 의해 표시되는 화학기이되, 단

[0065] Str은 Ab에 공유 결합된 확장 단위(stretching unit)이고;

[0066] Sp는 스페이서 단위이고,

[0067] Pep는 아미노산 단위, 이황화물기, 설폰아미드기 및 이하 비펩티드 화학기들, 즉

[0068] 

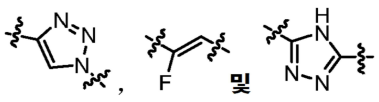
[0069] 으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단 W는 -NH-헤테로사이클로알킬- 또는 헤테로사이클로알킬이고; Y는 헤테로아릴, 아릴, $-C(O)C_{1-6}$ 알킬렌, C_{2-6} 알케닐렌, C_{1-6} 알킬렌 또는 $-C_{1-6}$ 알킬렌-NH-이고;

[0070] 각각의 R^2는 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{1-6} 알킬렌-NH_2, $-(C_{1-10}$ 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 $-(C_{1-10}$ 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0071] R^3 및 R^4는 각각 독립적으로 H, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 아릴알킬 및 헤테로아릴알킬이거나, 또는 R^3 및 R^4는 함께 C_{3-7} 사이클로알킬을 형성할 수 있고;

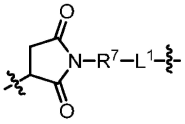
[0072] R^5 및 R^6은 각각 독립적으로 C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 (C_{1-10} 알킬렌)OCH_2-이거나, 또는 R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성할 수 있다.

[0073] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 Y는 이하 기들, 즉

[0074] 

로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 다른 양태에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 Str은 하기 화학식, 즉

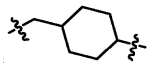
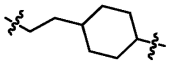
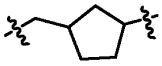


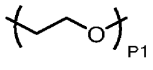
[0076] 으로 표시되는 화학기로부터 선택되되, 단

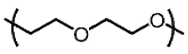
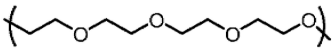
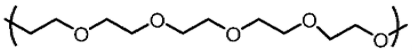
[0077] R^7은 -W1-C(O)-, -C(O)-W1-C(O)-, $-(CH_2CH_2O)_{p1}C(O)-$, $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 및 $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$으로 이루어진 군으로부터 선택되고, W1은 1개 ~ 8개의 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬, C_{1-8} 알킬렌-사이클로알킬 및 C_{1-8} 알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로알킬은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 ~ 3개를 포함하고, C_{1-8} 알킬렌, 사이클로알킬 및 선형 헤테로알킬은, 선택적으로 할로겐, 중수소, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 추가 치환되고;

[0078] L^1은 $-NR^{10}(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$, $-NR^{10}(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$, $-(CH_2)_{p1}C(O)-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 화학 결합이고; p1은 1 ~ 20의 정수이고, R^{10}은 수소, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

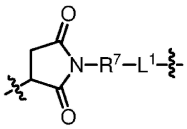
[0079] 몇몇 구현예에서, C_{1-8} 알킬렌-사이클로알킬은

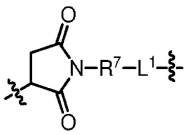
[0080] 메틸렌-사이클로헥실 , 에틸렌-사이클로헥실  및 메틸렌-사이클로펜틸  로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081] 몇몇 구현예에서, 링커는 적어도 1개의 폴리에틸렌글리콜(PEG)기를 포함할 수 있고, PEG기는, 예를 들어 $-(PEG)_{p1}-$,  를 포함할 수 있되, p1은 1 ~ 20의 정수로서, PEG기는, 예컨대

[0082]  $(PEG)_2$;  $(PEG)_4$;  $(PEG)_5$ 이다.

[0083] 몇몇 구현예에서, 링커중 확장 단위는 $(PEG)_2$를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 더 짧은 확장 단위(예컨대$(PEG)_2$)를 포함하는 ADC는, 링커 길이가 더 짧음에도 불구, 더 긴 확장 단위(예컨대$(PEG)_8$)를 포함하는 ADC에 비하여 더 낮은 응집 수준 및/또는 더 큰 약물 담지율을 보인다.

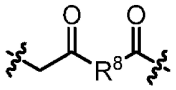
[0084] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체중 Str  의 R^7은 C_{1-6} 알킬렌 C(O)-, $-(CH_2-CH_2O)_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_3C(O)-$ 및 $-(CH_2-CH_2O)_4C(O)-$으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0085] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체중 Str  의 R^7은 $-C_{1-8}$ 알킬렌-사이클로알킬-C(O)-, $-(CH_2-CH_2O)_4CH_2C(O)-$ 및 $-(CH_2-CH_2O)_6CH_2C(O)-$로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0086] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체중 링커 L은 말레이미드-$(PEG)_2$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_6$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_8$-Val-Cit, 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-lys, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Val-Cit, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Val-lys, 말레이미드-$(CH_2)_5$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_6$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_8$-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-설폰아미드, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-lys, 말레이미드-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-설폰아미드 또는 Mal-$(PEG)_4$-트리아졸-$(PEG)_3$-이황화물을 포함한다.

[0087] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체중 링커 L은 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-$(PEG)_6$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(CH_2)_5C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-C_{1-8} 알킬렌-사이클로알킬-C(O)-$NH(CH_2CH_2O)_4CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2C(O)$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2CH_2C(O)$-Val-Cit-, 말레이미드-$(PEG)_2$-Gly-Gly-Phe-Gly-, 말레이미드-$(PEG)_2$-$CH_2C(O)$-Val-Cit-, 말레이미드-$(PEG)_4$-$CH_2C(O)$-Val-Cit- 및 말레이미드-$(PEG)_6$-$CH_2C(O)$-Val-Cit-를 포함한다.

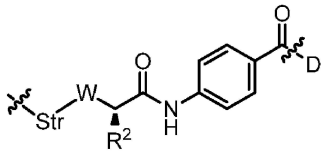
[0088] 다른 양태에서, 몇몇 구현예에 의해 제공되는 항체-약물 접합체중 Str은 하기 화학식, 즉

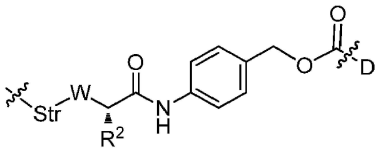
[0089] 

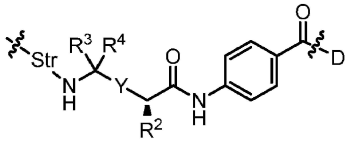
[0090] 으로 표시되는 화학기로부터 선택되되, 단

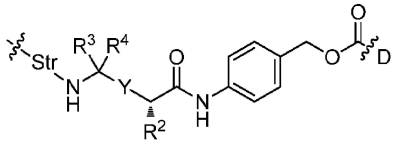
[0091] R^8은 C_{1-10} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, (C_{1-10} 알킬렌)O-, $N(R^d)$-(C_{2-6} 알킬렌)-$N(R^d)$ 및 $N(R^d)$-(C_{2-6} 알킬렌)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 각각의 R^d는 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬이다.

[0092] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체중 L-D는

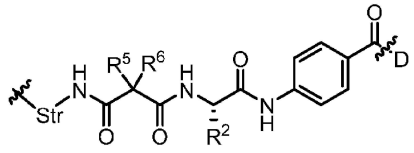
[0093]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌, (C_{1-6} 알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];

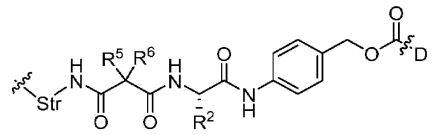
[0094]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];

[0095]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐렌, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2임];

[0096]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐렌, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6}

알킬렌)NHC(O)NH_2임];

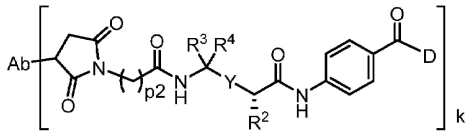
[0097]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성함];

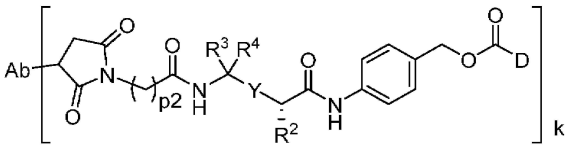
[0098]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 함께 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성함]

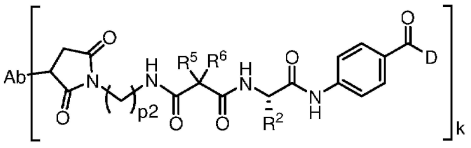
[0099] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 화학식으로 표시되고;

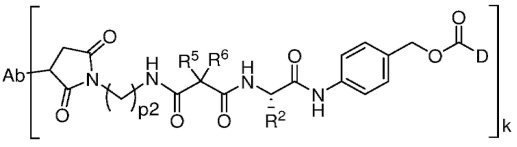
[0100] W, Str 및 D는 전술된 바와 같다.

[0101] 기타 구현예에서, 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)는 하기 화학식, 즉

[0102]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택되고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

[0103]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 및 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택되고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

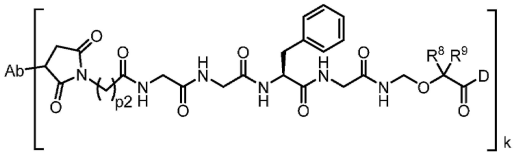
[0104]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

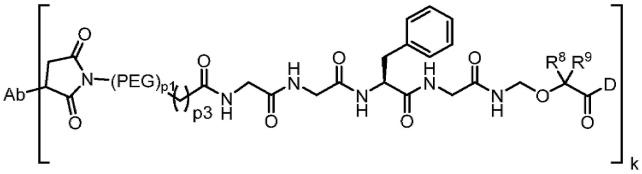
[0105]  [식 중, R^2는 C_{1-6} 알킬렌-NH_2, (C_{1-6} 알킬렌)NHC(NH)NH_2 또는 (C_{1-6} 알킬렌)NHC(O)NH_2이고, R^5 및 R^6은 C_{3-7} 사이클로알킬 고리를 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨]

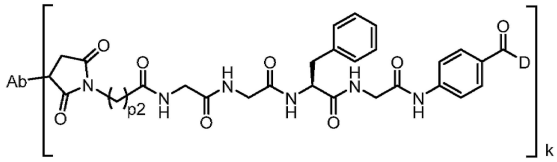
[0106] 으로 표시되고;

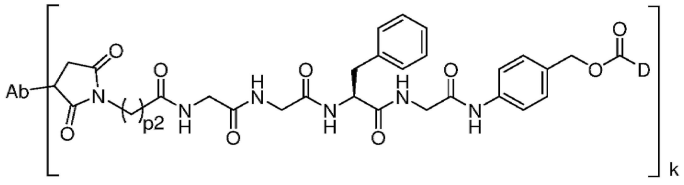
[0107] Y, R^3, R^4, Ab 및 D는 전술된 바와 같다.

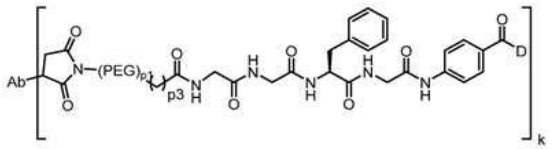
[0108] 다른 양태에서, 몇몇 구현예에 의해 제공되는 항체-약물 접합체(ADC)는 하기 화학식, 즉

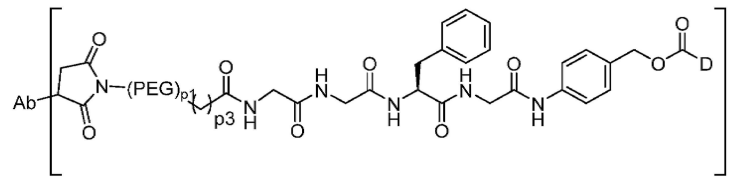
[0109]  [식 중, R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

[0110]  [식 중, R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

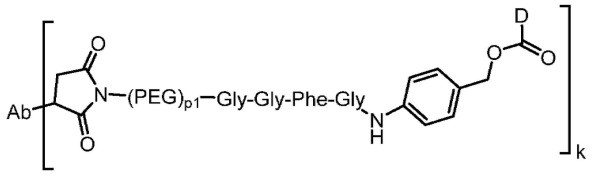
[0111]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

[0112]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

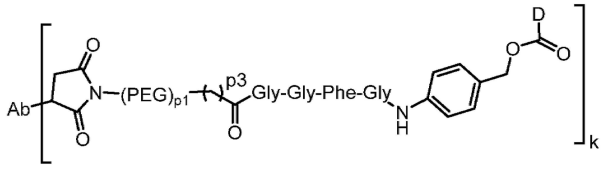
[0113]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0114]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2

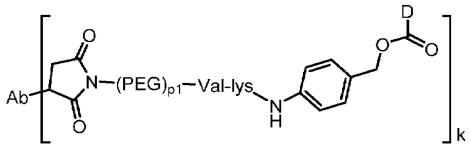
로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0115] 

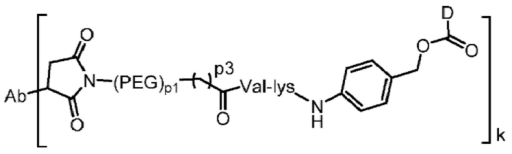
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0116] 

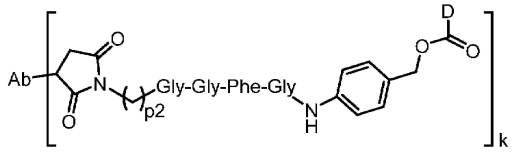
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0117] 

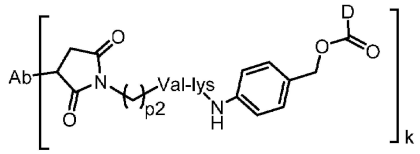
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0118] 

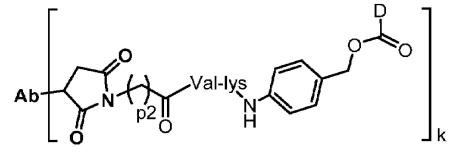
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0119] 

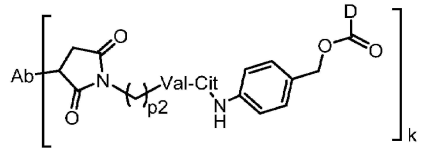
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0120] 

[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

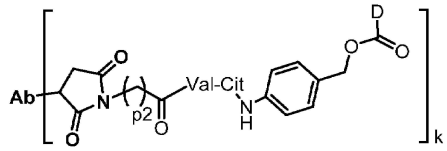
[0121] 

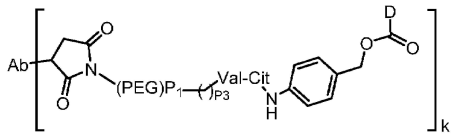
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

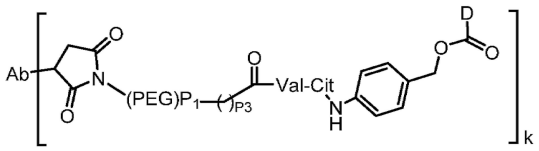
[0122] 

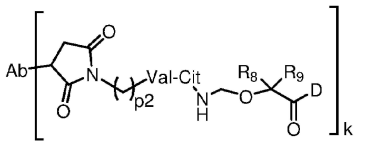
[식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수

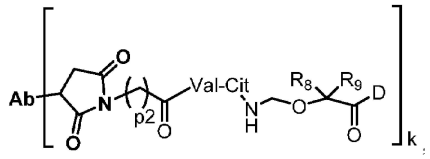
일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

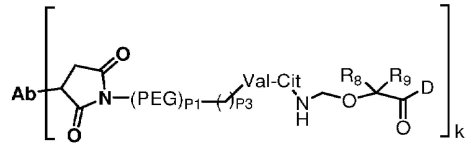
[0123]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택됨];

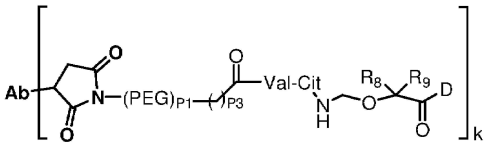
[0124]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0125]  [식 중, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

[0126]  [식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

[0127]  [식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p2는 2 ~ 6의 정수로부터 선택됨];

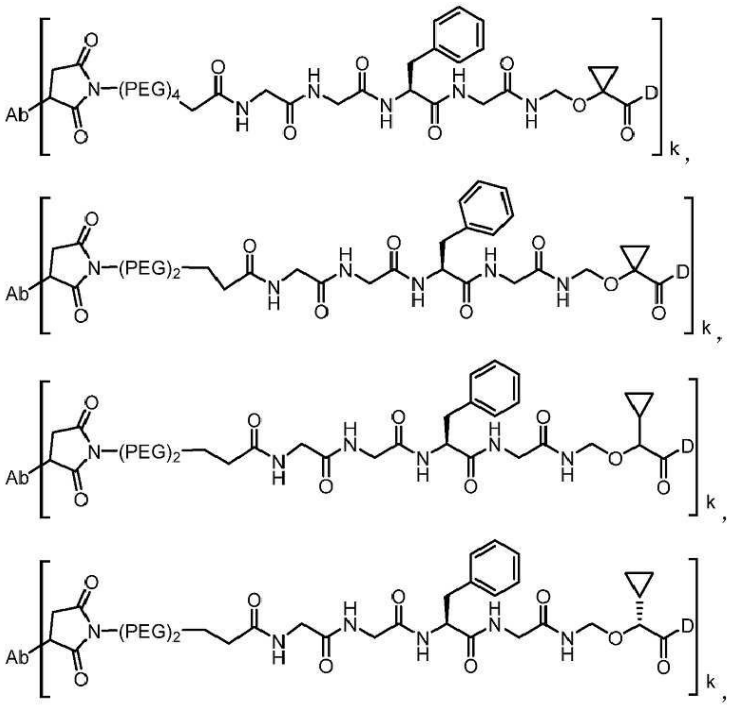
[0128]  [식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨];

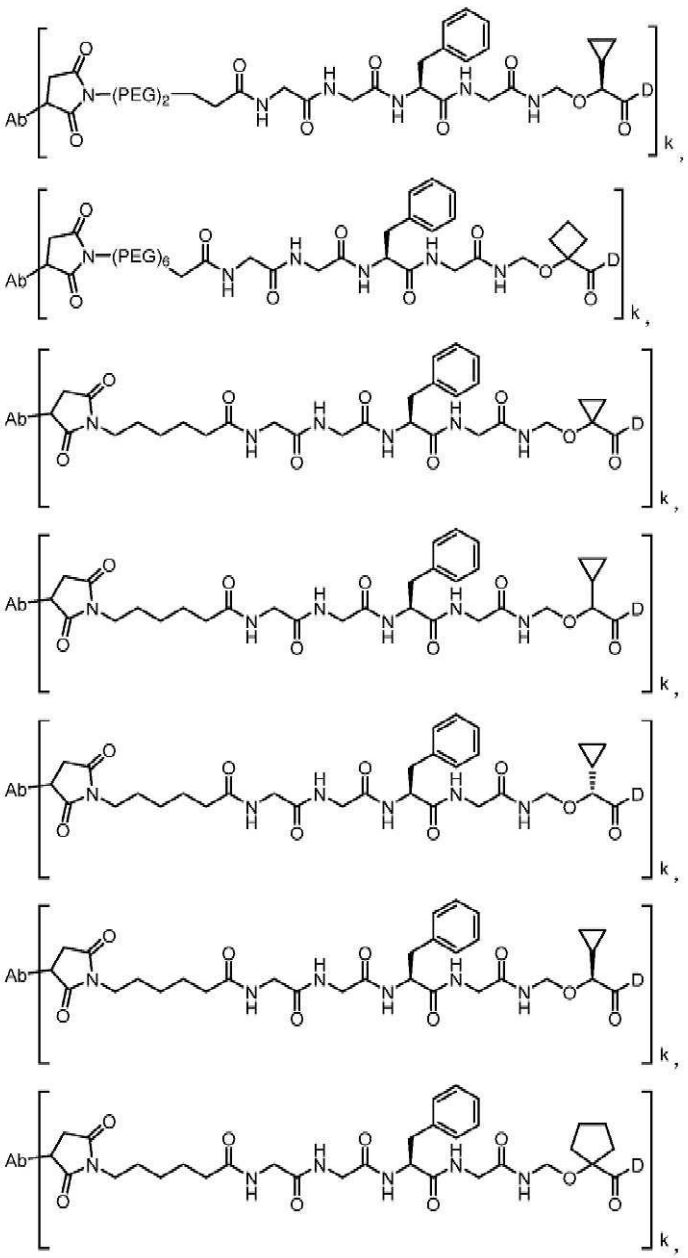
[0129] 

[식 중, R^8은 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이고, R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나, 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고, k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며, p1은 2, 4, 6 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고, p3은 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨]

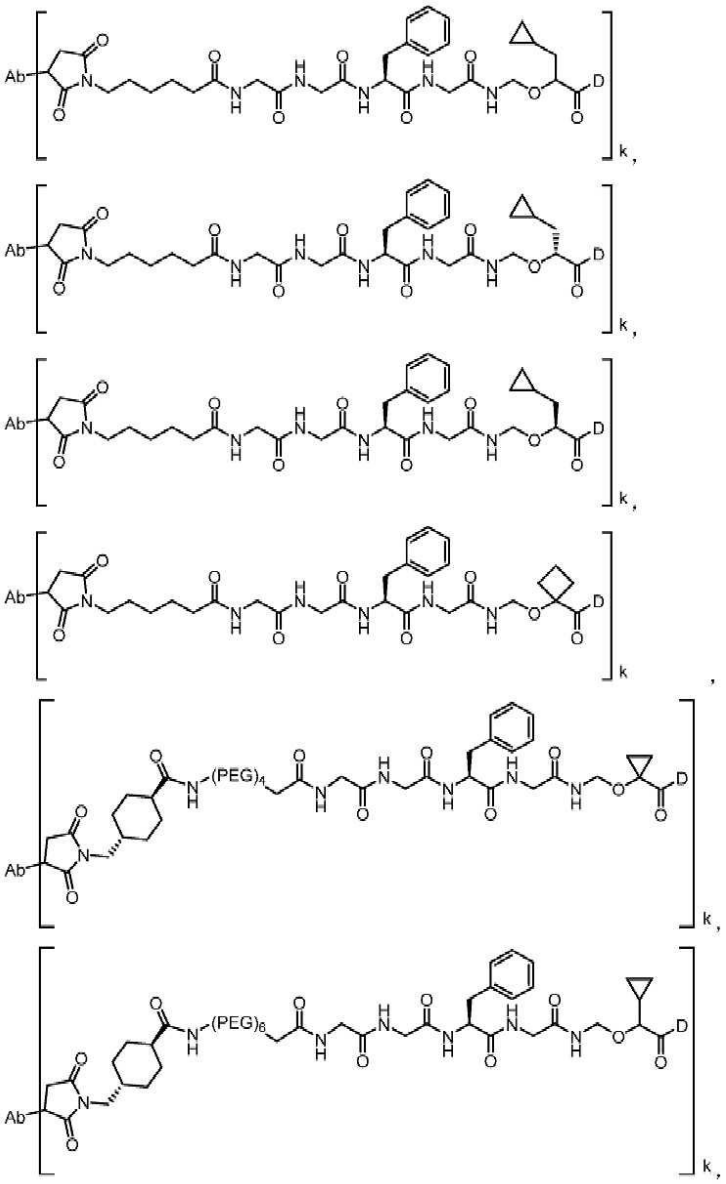
[0130] 으로 표시된다.

[0131] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)는 하기 화학식들, 즉

[0132] 

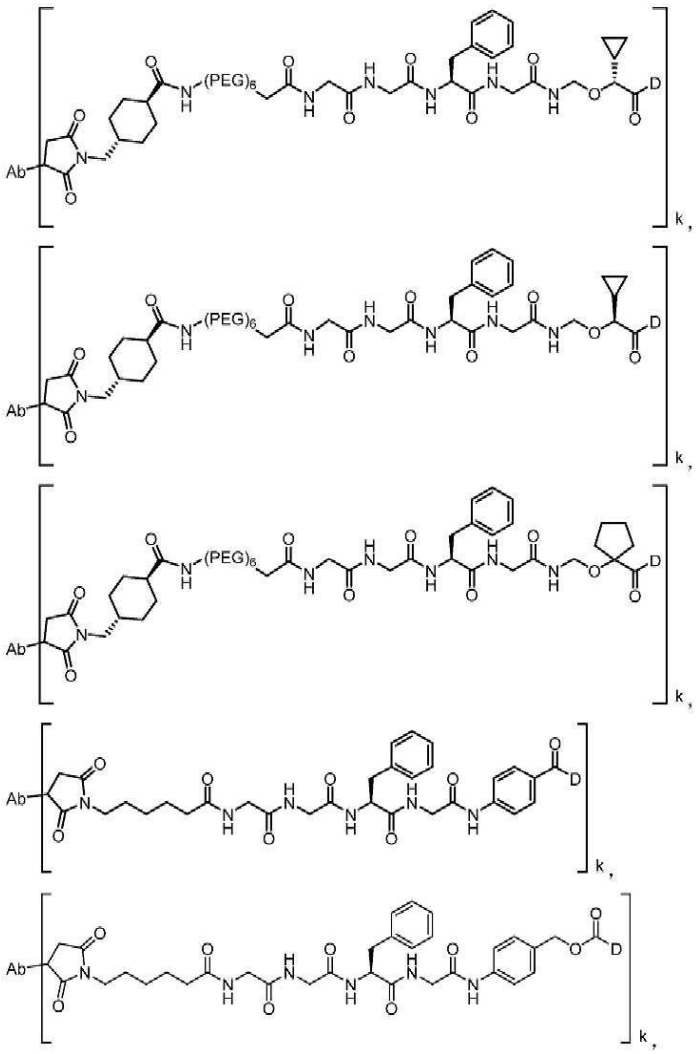


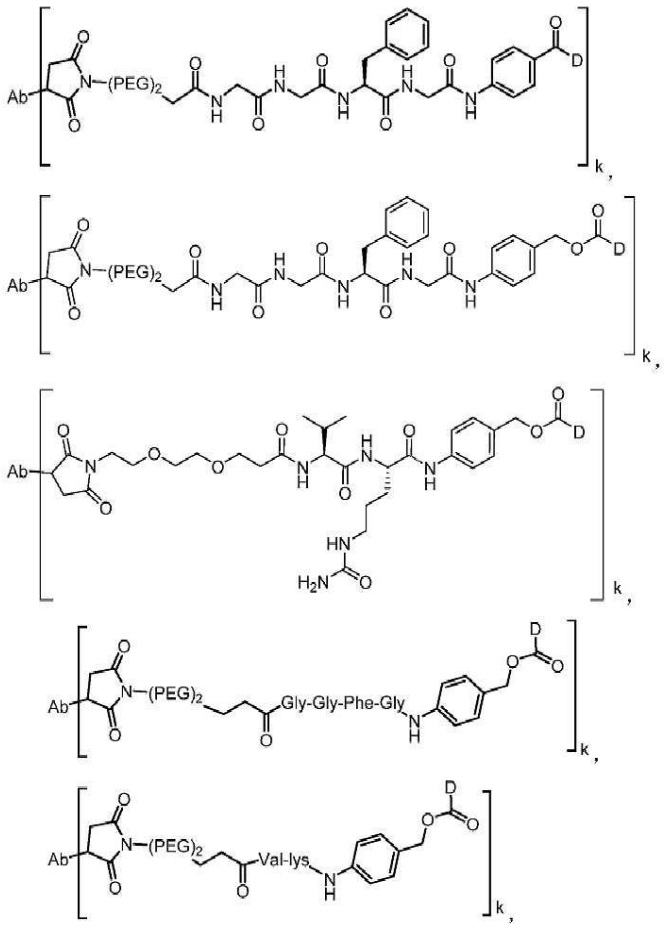
[0133]



[0134]

[0135]





[0136]

[0137] 으로 표시되는데, 단

[0138] k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수며; 또한 D중 R^{1a}는, 바람직하게 메틸로부터 선택되고, D중 R^{1b}는, 바람직하게 수소로부터 선택된다.

[0139] 다른 양태에서, 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)중 항체는 마우스 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 전체가 인간화된 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0140] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항HER2(ErbB2) 항체, 항EGFR 항체, 항B7-H3 항체, 항c-Met 항체, 항HER3(ErbB3) 항체, 항HER4(ErbB4) 항체, 항CD20 항체, 항CD22 항체, 항CD30 항체, 항CD33 항체, 항CD44 항체, 항CD56 항체, 항CD70 항체, 항CD73 항체, 항CD105 항체, 항CEA 항체, 항A33 항체, 항Cripto 항체, 항EphA2 항체, 항G250 항체, 항MUC1 항체, 항루이스 Y 항체, 항VEGFR 항체, 항GPNMB 항체, 항인테그린 항체, 항PSMA 항체, 항테나신-C 항체, 항SLC44A4 항체, 항CD79 항체, 항TROP-2 항체, 항CD79B 항체, 항메소텔린 항체 및 이의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0141] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙, 니모투주맙, 에노블리투주맙, 에미베투주맙, 이노투주맙, 피나투주맙, 브렌툭시맙, 겜투주맙, 비바투주맙, 로보투주맙, cBR96, 글레마투마맙 및 이의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 공지의 항체이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0142] 다른 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항체는 항CD79B 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되고, 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 단

[0143] 항체의 중쇄 가변 영역은

[0144] 1) 서열 번호 7, 서열 번호 8 및 서열 번호 9 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3; 또는

[0145] 2) 서열 번호 13, 서열 번호 14 및 서열 번호 15 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3

[0146] 을 포함하고/포함하거나,

[0147] 항체의 경쇄 가변 영역은

[0148] 1) 서열 번호 10, 서열 번호 11 및 서열 번호 12 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0149] 2) 서열 번호 16, 서열 번호 17 및 서열 번호 18 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0150] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항CD79B 항체는 이하 1) ~ 2), 즉

[0151] 1) 서열 번호 7, 서열 번호 8 및 서열 번호 9 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0152] 서열 번호 10, 서열 번호 11 및 서열 번호 12 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0153] 2) 서열 번호 13, 서열 번호 14 및 서열 번호 15 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0154] 서열 번호 16, 서열 번호 17 및 서열 번호 18 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0155] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0156]

중쇄 CDR1	GSSFTSY**(서열 번호 7)**	GYTFTTY**(서열 번호 13)**
중쇄 CDR2	FPRSGN**(서열 번호 8)**	YPRSGN**(서열 번호 14)**
중쇄 CDR3	GDLGDFDY**(서열 번호 9)**	GSDYDGDFAY**(서열 번호 15)**
경쇄 CDR1	RSSQSIVHSDGNTYFE **(서열 번호 10)**	RSSQSIVHHDGNTYLE **(서열 번호 16)**
경쇄 CDR2	KVSNRFS**(서열 번호 11)**	KVSNRFS**(서열 번호 17)**
경쇄 CDR3	FQGSHVPWT**(서열 번호 12)**	FQGSHVPWT**(서열 번호 18)**

[0157] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항CD79B 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데,

[0158] 중쇄 가변 영역은

[0159] 1) 서열 번호 3에 제시된 서열 또는 서열 번호 3에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

[0160] 2) 서열 번호 5에 제시된 서열 또는 서열 번호 5에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

[0161] 을 포함하고/포함하거나;

[0162] 경쇄 가변 영역은

[0163] 1) 서열 번호 4에 제시된 서열 또는 서열 번호 4에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

[0164] 2) 서열 번호 6에 제시된 서열 또는 서열 번호 6에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

[0165] 을 포함하고;

[0166] 바람직하게, 항CD79B 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 3에 제시되어 있고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 4에 제시되어 있거나; 또는 중쇄 가변 영역은 서열 번호 5에 제시되어 있고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 6에 제시되어 있다.

[0167] > 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb015의 중쇄 가변 영역:

[0168] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGSSFTSYGINWVKQRTGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAKGDLGDFDYW
GQGTTLTVSS **(서열 번호 3)**

[0169] > 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb015의 경쇄 가변 영역:

DFLMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKL
EIK **(서열 번호 4)**

[0170]

[0171] > 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb017의 중쇄 가변 영역:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYGINWVKQRTGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSDYDGDFA
YWGQGTLVTVSA **(서열 번호 5)**

[0172]

[0173] > 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb017의 경쇄 가변 영역:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTQ
LEIK **(서열 번호 6)**

[0174]

[0175] 다른 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항CD79B 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데,

[0176] 중쇄 가변 영역은

[0177] 1) 서열 번호 19에 제시된 서열 또는 서열 번호 19에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

[0178] 2) 서열 번호 21에 제시된 서열 또는 서열 번호 21에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

[0179] 을 포함하고/포함하거나;

[0180] 경쇄 가변 영역은

[0181] 1) 서열 번호 20에 제시된 서열 또는 서열 번호 20에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열; 또는

[0182] 2) 서열 번호 22에 제시된 서열 또는 서열 번호 22에 대해 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 서열

[0183] 을 포함하는데;

[0184] 바람직하게, 항CD79B 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 19에 제시되어 있고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 20에 제시되어 있거나; 또는 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21에 제시되어 있고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 22에 제시되어 있다.

[0185] > 인간화 항체 hAb015-10의 중쇄 서열:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCAKGDLGDFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 19)**

[0186]

[0187] > 인간화 항체 hAb015-10의 경쇄 서열:

DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
[0188] EC **(서열 번호 20)**

[0189] > 인간화 항체 hAb017-10의 중쇄서열:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYDGDFA
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
[0190] HEALHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 21)**

[0191] > 인간화 항체 hAb017-10의 경쇄 서열:

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
[0192] EC **(서열 번호 22)**

[0193] 다른 양태에서, 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 인간 Fc 도메인 융합 단백질(인간 CD79B ECD-hFc)의 아미노산 서열은 이하와 같고:

ARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSASGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
[0194] GK **(서열 번호 1)**

[0195] 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 His 태그의 융합 단백질(인간 CD79B ECD-His)의 아미노산 서열을 이하와 같다:

ARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSASGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
[0196] EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEHHHHHH **(서열 번호 2)**

[0197] 다른 양태의 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항체는 항TROP-2 항체로부터 선택된다. 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 23, 서열 번호 24 및 서열 번호 25 각각에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 26, 서열 번호 27 및 서열 번호 28 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0198] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항TROP-2 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데,

중쇄 가변 영역은 서열 번호 29에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열과 동일한 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열과 동일한 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0199] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항TROP-2 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 29에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대하여 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가진다.

[0200] 다른 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항TROP-2 항체는 서열 번호 29에 제시된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역과, 서열 번호 30에 제시된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0201] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항TROP-2 항체는 항체의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는데; 바람직하게, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 경쇄 불변 영역은 인간 항체 κ및 λ사슬 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게 항체는 서열 번호 31에 제시된 서열을 가지는 중쇄 불변 영역과, 서열 번호 32에 제시된 서열을 가지는 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0202] 몇몇 구현예에서, 항체-약물 접합체(ADC)중 항TROP-2 항체는 서열 번호 33에 제시된 서열을 가지는 중쇄와, 서열 번호 34에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함한다.

[0203] TROP-2의 아미노산 서열(유전자은행: NP_002344.2)은 이하와 같다:

MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLR
HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
AGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKE

[0204] PSL **(서열 번호 35)**

[0205] TROP-2-His의 아미노산 서열은 이하와 같다:

MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLR
HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
AGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKE

[0206] PSLHHHHHH **(서열 번호 36)**

[0207] 항TROP-2 항체 PD3의 중쇄 가변 영역은 이하와 같다:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGSSY
WYFDVWGQGTLVTVSS **(서열 번호 29)**

[0208]

[0209] 항TROP-2 항체 PD3의 경쇄 가변 영역은 이하와 같다:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK
(서열 번호 30)

[0210]

항체	항TROP-2 항체 PD3
중쇄 CDR1	NYGMN(서열 번호 23)
중쇄 CDR2	WINTYTGEPTYTQDFKG(서열 번호 24)
중쇄 CDR3	GGFGSSYWYFDV(서열 번호25)
경쇄 CDR1	KASQDVSIAVA(서열 번호 26)
경쇄 CDR2	SASYRYT(서열 번호 27)
경쇄 CDR3	QQHYITPLT(서열 번호28)

[0211]

[0212] 항체(항TROP-2 항체)의 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG4 불변 영역 및 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 경쇄 불변 영역은 인간 κ 및 λ사슬 경쇄 불변 영역 및 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예시적으로 항체의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 31에 제시된 서열을 가지는 인간 IgG1으로부터 선택되고, 경쇄 불변 영역은 서열 번호 32에 제시된 서열을 가지는 인간 κ 사슬 불변 영역으로부터 선택된다.

[0213] 인간 IgG1 중쇄 불변 영역:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

[0214] SLSPGK **(서열 번호 31)**

[0215] 인간 κ 경쇄 불변 영역:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0216] **(서열 번호 32)**

[0217] 예시적으로 전술된 경쇄/중쇄 불변 영역은 상기 예시된 PD3 항체의 가변 영역과 조합되어, 완전 항체를 형성하는데, 이 완전 항체의 경쇄/중쇄 서열은 이하와 같다:

[0218] 항TROP-2 항체(PD3)의 중쇄:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGSSY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 33)**

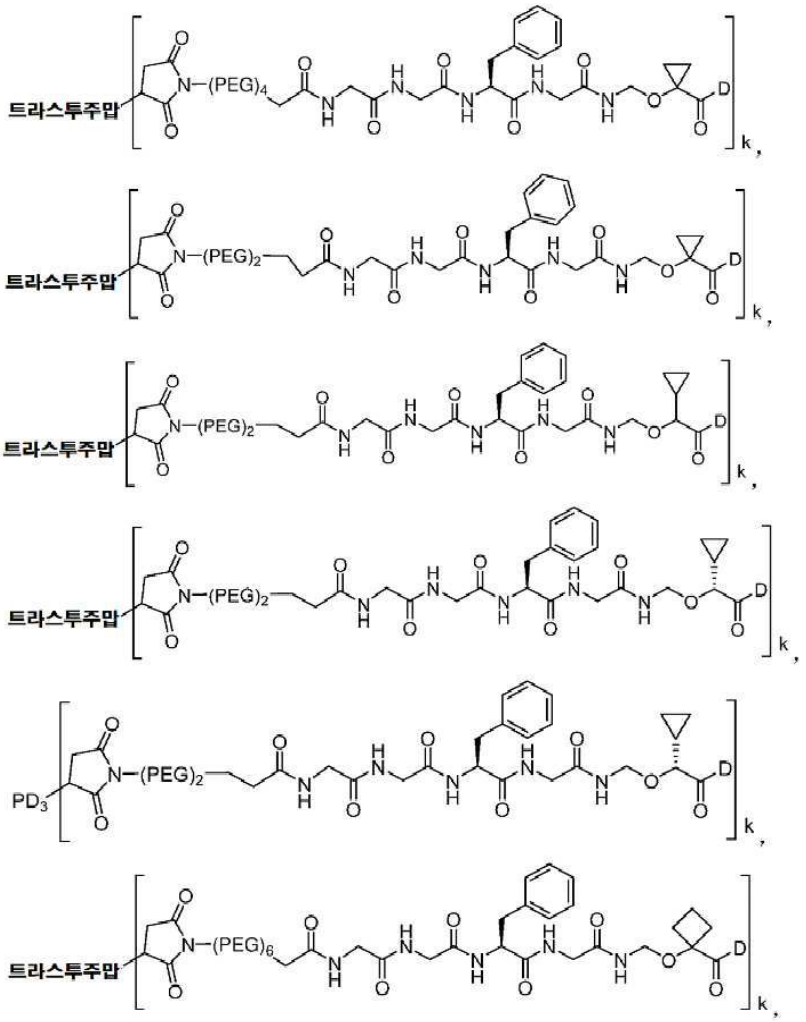
[0219]

[0220] 항TROP-2 항체(PD3)의 경쇄:

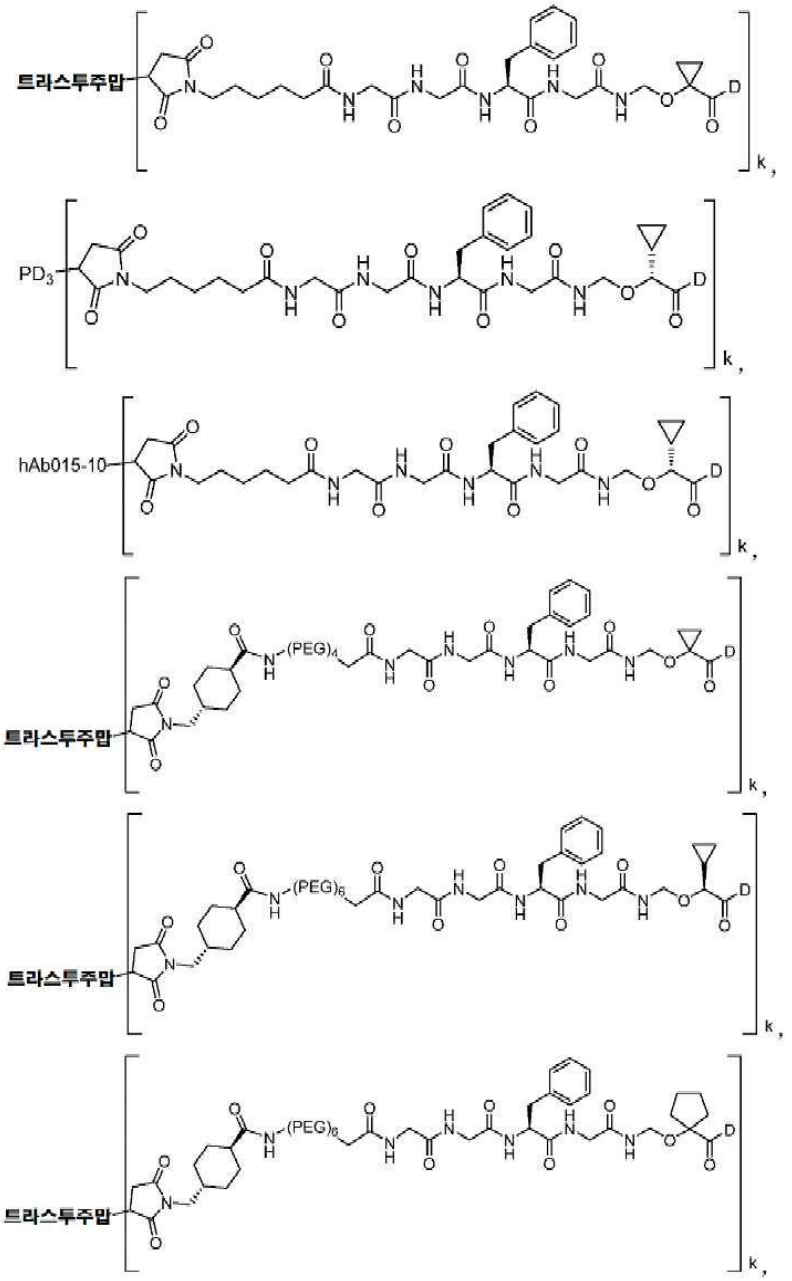
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0221] **(서열 번호 34)**

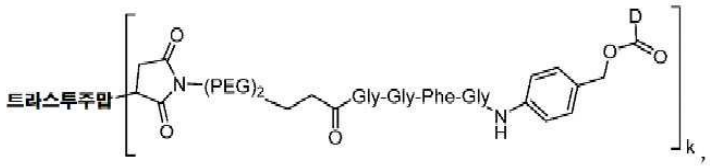
[0222] 또한, 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)는 이하의 것들, 즉

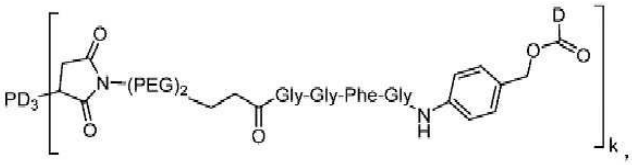


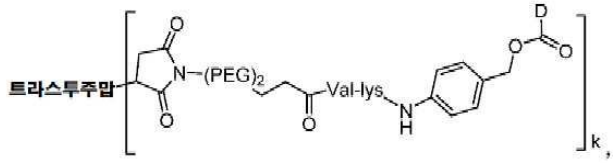
[0223]

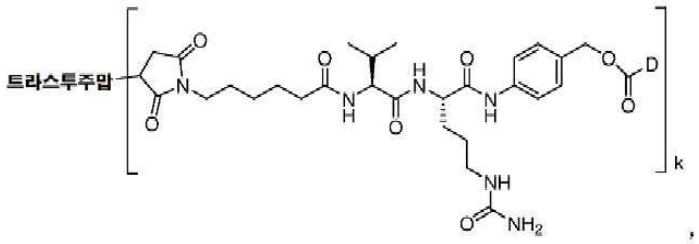


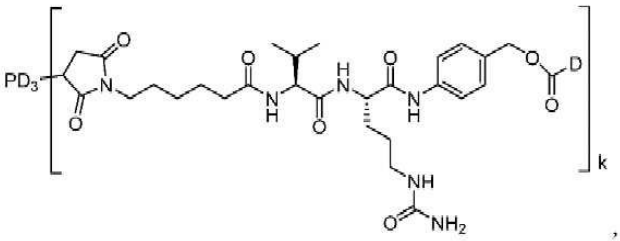
[0224]

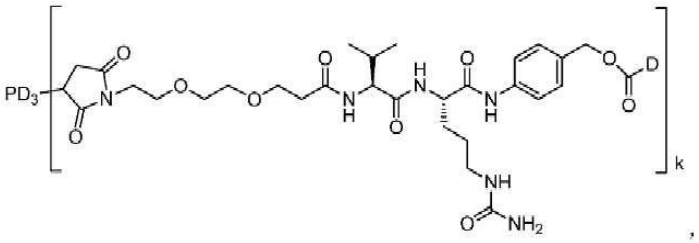

트라스투주맙
(PEG)2
Gly-Gly-Phe-Gly
D
k


PD3
(PEG)2
Gly-Gly-Phe-Gly
D
k

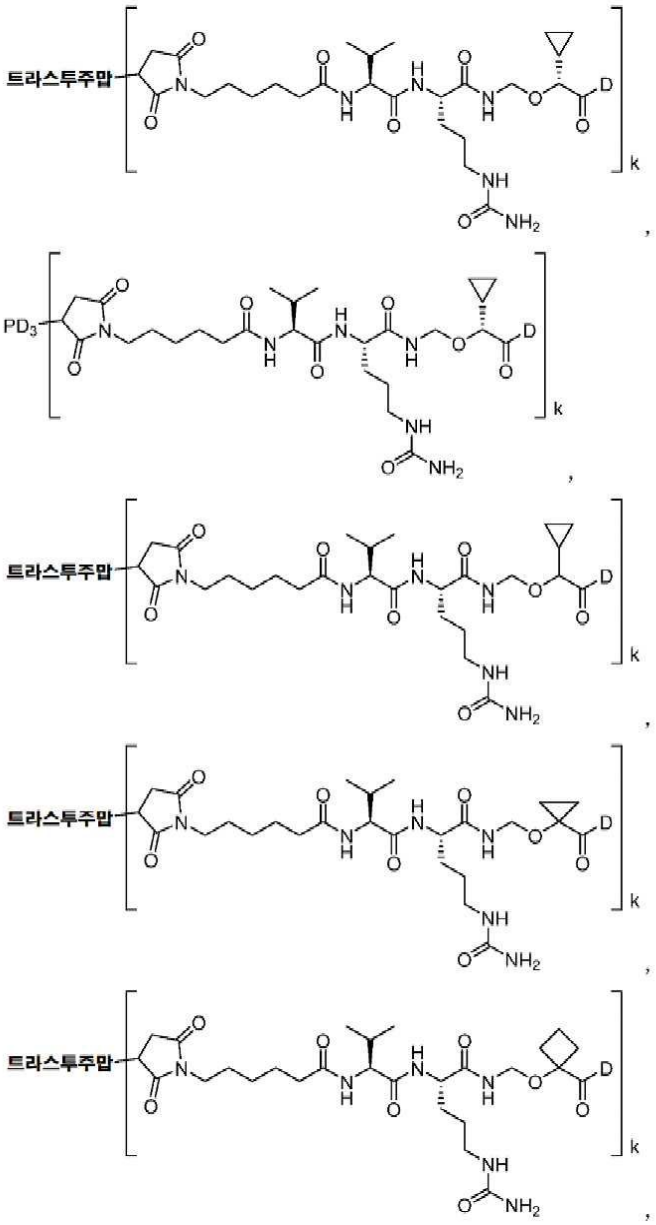

트라스투주맙
(PEG)2
Val-lys
D
k

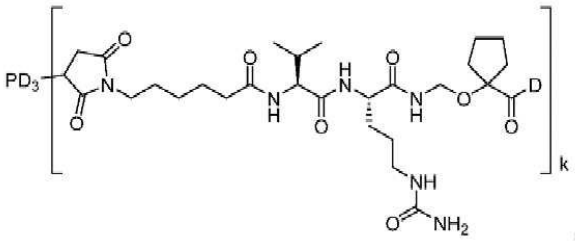

트라스투주맙
NH
NH2
D
k


PD3
NH
NH2
D
k

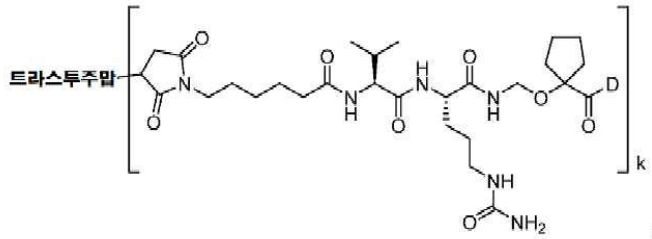

PD3
NH
NH2
D
k

[0225]

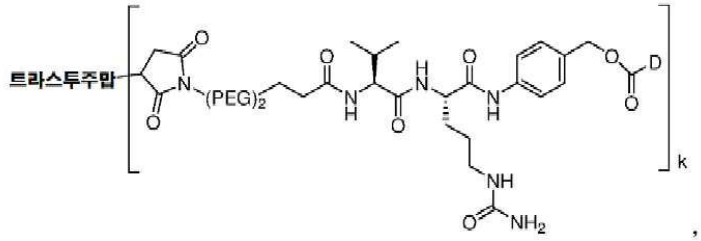
[0226] 



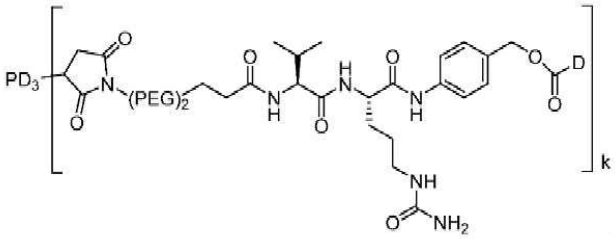
,



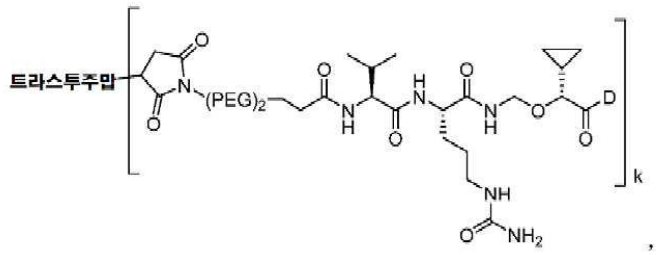
,



,

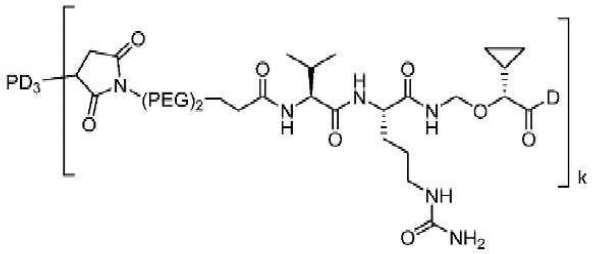


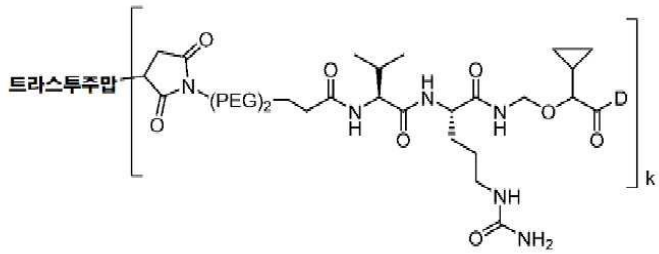
,

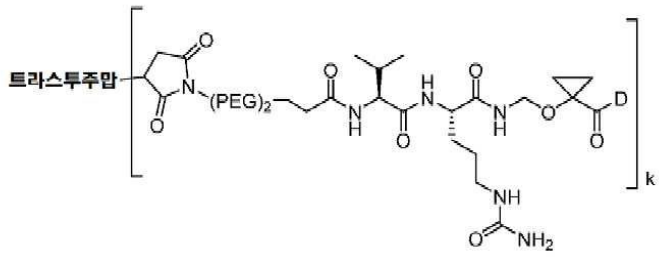


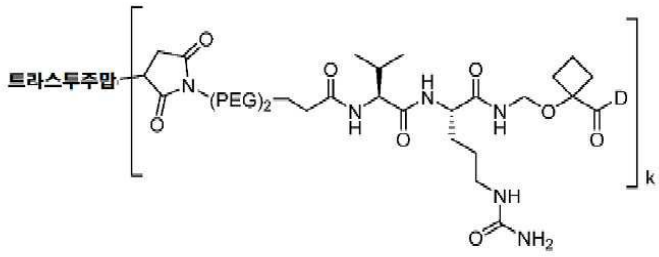
,

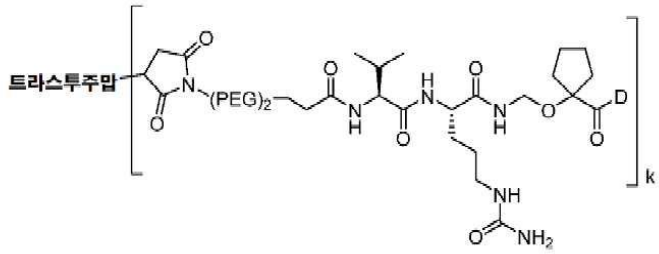
[0227]



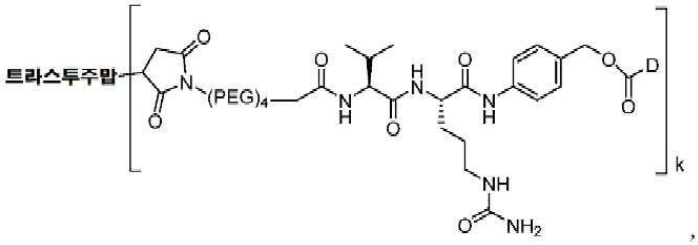



,

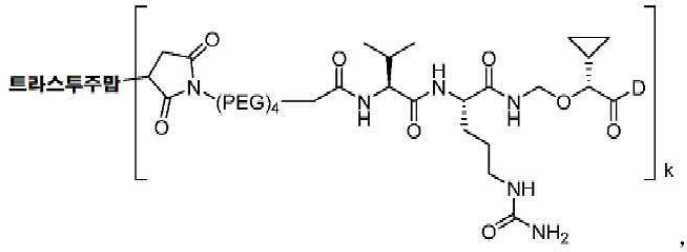

,


,

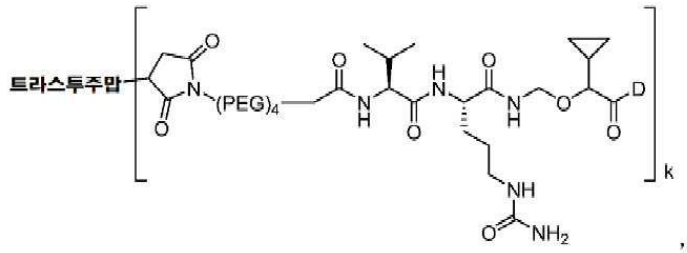
[0228]


트라스투주맙
(PEG)4
k

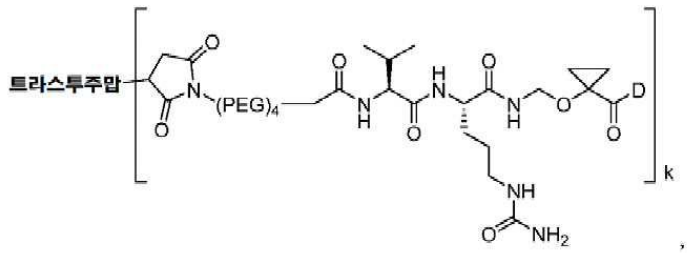
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

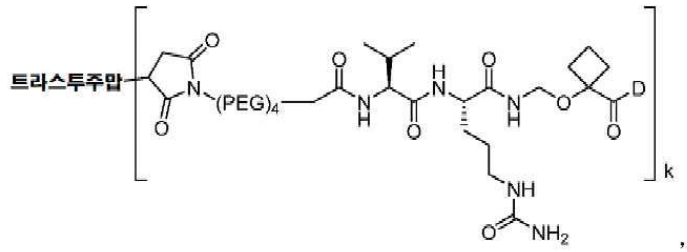
,


트라스투주맙
(PEG)4
k

,

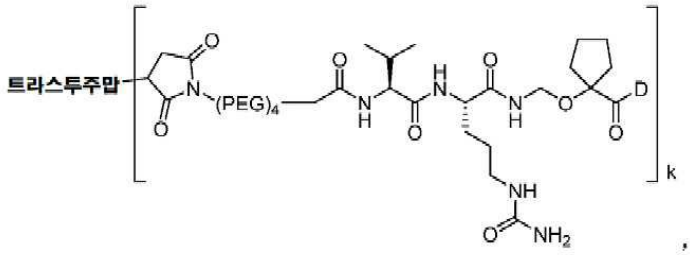

트라스투주맙
(PEG)4
k

,

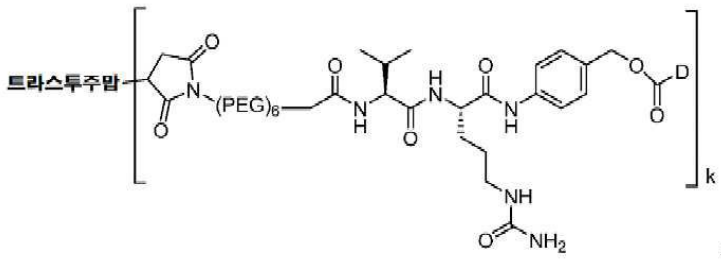

트라스투주맙
(PEG)4
k

,

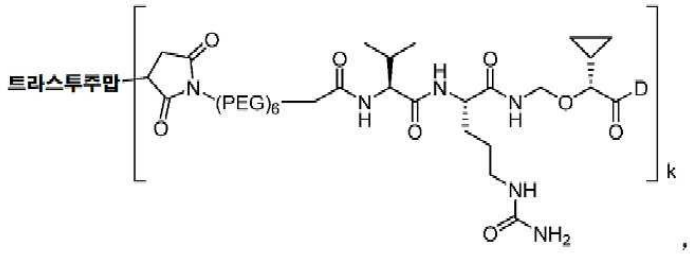
[0229]


트라스투주맙
(PEG)4
k

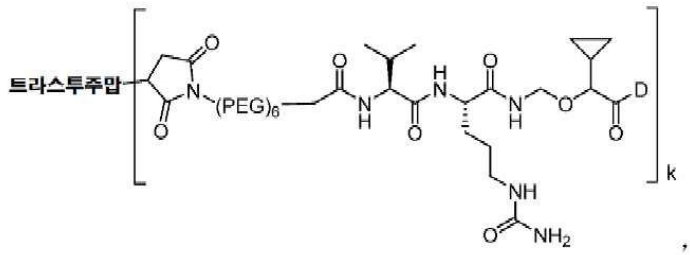
,


트라스투주맙
(PEG)6
k

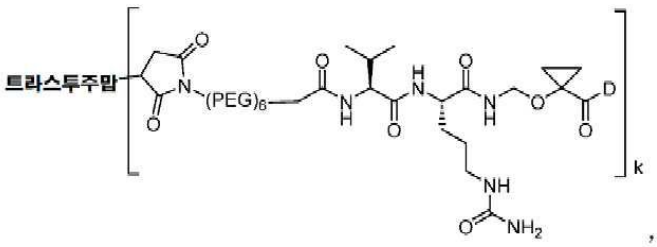
,


트라스투주맙
(PEG)6
k

,

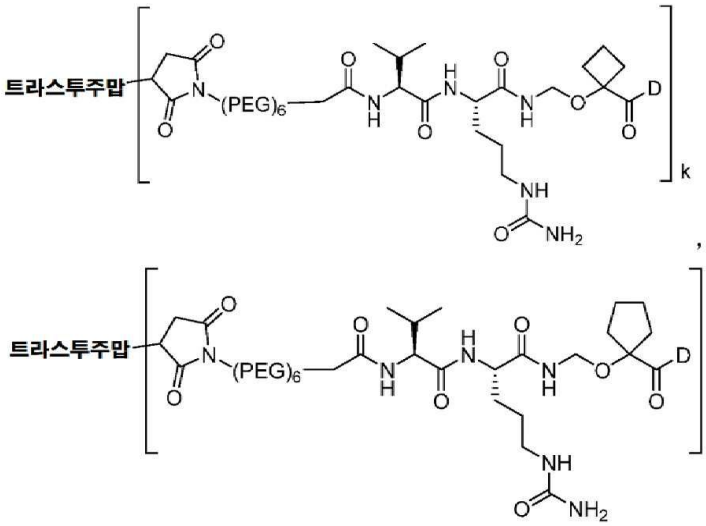

트라스투주맙
(PEG)6
k

,


트라스투주맙
(PEG)6
k

,

[0230]

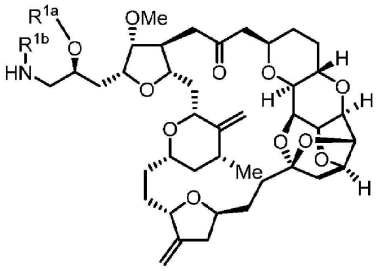


[0231]

[0232] 로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단 k는 1 ~ 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수 또는 소수일 수 있으며; 또한 D중 R^{1a}는 메틸로부터 선택되고, D중 R^{1b}는 수소로부터 선택된다.

[0233] 본 발명은 또한 화학식 D, 즉

[0234] 화학식 D



[0235]

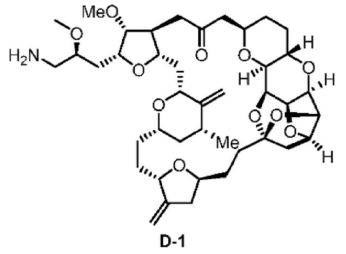
[0236] 의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는데, 식 중,

[0237] R^{1a}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고; R^{1b}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군, 바람직하

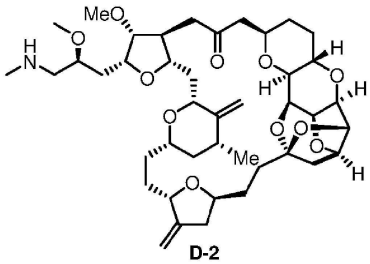
게 수소 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는 R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되고, R^{1a} 및 R^{1b}가 상이할 때 헤테로사이클로알킬은 수소이다.

[0238] 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물중 R^{1a} 및 R^{1b}는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬로부터 각각 독립적으로 선택된다. 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물중 R^{1a}는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; R^{1b}는 수소로부터 선택된다.

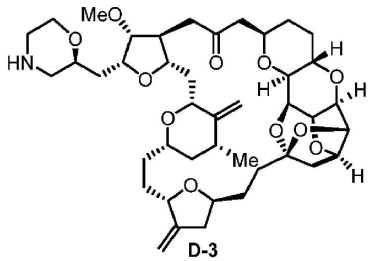
[0239] 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물중 R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0240] 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물은  이다.

D-1

[0241] 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물은  이다.

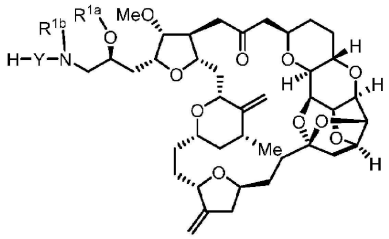
D-2

[0242] 몇몇 구현예에서, 화학식 D의 화합물은  이다.

D-3

[0243] 본 발명은 또한 화학식 DZ, 즉

[0244] 화학식 DZ



[0245]

[0246] 의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는데, 단

[0247] R^{1a}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 메틸로 각각 독립적으로 치환되고;

[0248] R^{1b}는 수소, 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되, 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상, 바람직하게 수소로 각각 독립적으로 치환되거나; 또는

[0249] R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 헤테로사이클로알킬은, 선택적으로 알킬(예컨대 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬), 알콕시(예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시 및 이소프로폭시를 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알콕시), 할로겐(예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모), 중수소, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬(예컨대 사이클로프로필, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{3-8} 사이클로알킬), 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴중 치환기 1개 이상으로 치환되고, R^{1a} 및 R^{1b}가 상이할 때 헤테로사이클로알킬은 수소이고;

[0250] Y는 $-O(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$, $-O-CR^8R^9(CR^aR^b)_{m2}-$, $-OCR^8R^9-C(O)-$, $-O(CR^aR^b)_{m2}C(O)-$ 및 $-S-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단 R^a 및 R^b는 동일하거나 상이하며, 수소, 중수소, 할로겐 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0251] R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0252] R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는

[0253] R^8 및 R^9는 이것들과 결합되어 있는 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고;

[0254] m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

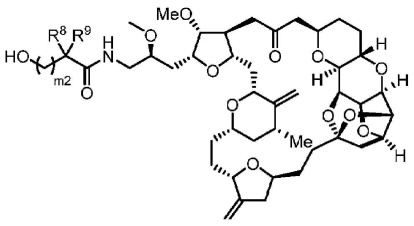
[0255] 몇몇 구현예에서, 화학식 DZ의 화합물중 R^{1a} 및 R^{1b}는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0256] 몇몇 구현예에서, 화학식 DZ의 화합물중 R^{1a}는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; R^{1b}는 수소로부터 선택된다.

[0257] 몇몇 구현예에서, 화학식 DZ의 화합물중 R^{1a} 및 R^{1b}는 이것들과 결합되어 있는 탄소 원자와 함께 5원 ~ 8원 헤테로사이클로알킬을 형성한다.

[0258] 몇몇 구현예에서, 화학식 DZ의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 화학식 DZ-1, 즉

[0259] 화학식 DZ-1

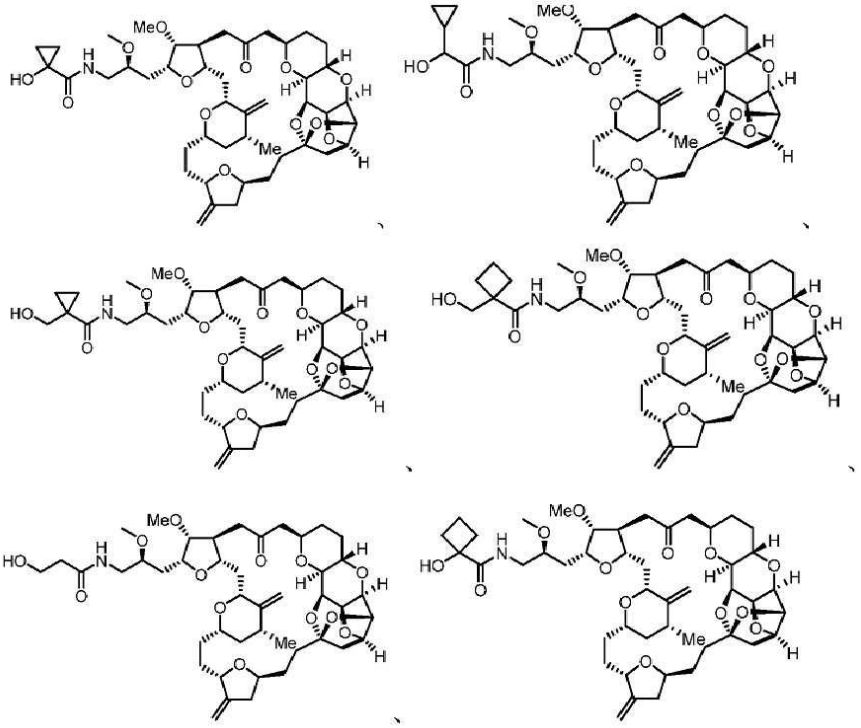


[0260]

[0261] 의 화합물 또는 이의 호변이성체, 공명체, 라세미체, 거울상이성체 또는 부분입체이성체, 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인데, 단

[0262] R^8은 수소, C_{3-6} 사이클로알킬알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^9는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 수소이거나; 또는 R^8 및 R^9는 이것들과 결합되어 있는 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고; m2는 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

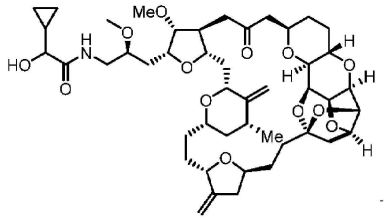
[0263] 몇몇 구현예에서, 화학식 DZ의 화합물은

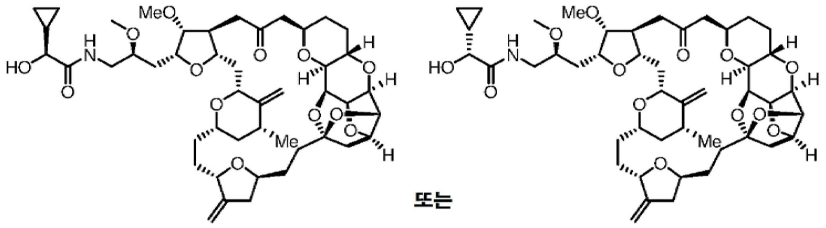


[0264]

[0265] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0266] 다른 양태에서, 몇몇 구현예에 의해 제공되는 화학식 DZ의 화합물은 비대칭 중심 1개 이상을 함유할 수 있는데, 예를 들어

[0267]  는

[0268]  또는 일 수 있다.

[0269] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 전술된 항체-약물 접합체 치료적 유효량만큼과, 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0270] 본 발명은 또한 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물의 용도를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 종양은 HER2, HER3, B7H3 또는 EGFR 발현과 연관된 암이다.

[0271] 본 발명은 또한 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물의 용도를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 암은, 바람직하게 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 전립선암, 신장암, 요로암, 방광암, 간암, 위암, 자궁내막암, 타액선암종, 식도암, 흑색종, 신경교종, 신경모세포종, 육종, 폐암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 백혈병, 골암, 피부암, 갑상선암, 췌장암 및 림프종이다.

[0272] 본 발명은 또한 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물 치료적 유효량만큼을 종양의 치료 또는 예방

이 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 종양은, 바람직하게 HER2, HER3, B7H3 또는 EGFR 발현과 연관된 암인, 종양을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0273] 본 발명은 또한 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물 치료적 유효량만큼을 암의 치료 및/또는 예방이 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 암은, 바람직하게 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 전립선암, 신장암, 요로암, 방광암, 간암, 위암, 자궁내막암, 타액선암종, 식도암, 흑색종, 신경교종, 신경모세포종, 육종, 폐암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 백혈병, 골암, 피부암, 갑상선암, 췌장암 및 림프종인, 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0274] 본 발명은 또한 종양을 치료 또는 예방하기 위해 사용되고, 종양은, 바람직하게 HER2, HER3, B7H3 또는 EGFR 발현과 연관된 암인, 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물을 제공한다.

[0275] 본 발명은 또한 암을 치료 및/또는 예방하는데 사용되고, 암은, 바람직하게 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 전립선암, 신장암, 요로암, 방광암, 간암, 위암, 자궁내막암, 타액선암종, 식도암, 흑색종, 신경교종, 신경모세포종, 육종, 폐암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 백혈병, 골암, 피부암, 갑상선암, 췌장암 및 림프종인, 전술된 항체-약물 접합체 또는 전술된 약학 조성물을 제공한다.

[0276] 활성 화합물은 임의의 적합한 경로에 의한 투여에 적합한 형태, 바람직하게 환자에 의해 자가 투여될 수 있는 단위 용량의 형태 또는 단일 용량의 형태로 제형될 수 있다. 본 발명의 화합물 또는 조성물의 단위 용량은 정제, 캡슐, 사세트, 바이알, 분말, 과립, 로진즈, 좌제, 재생성 분말 또는 액체 제형의 형태일 수 있다.

[0277] 본 발명의 치료 방법에 사용된 화합물 또는 조성물의 투여량은, 일반적으로 질환의 중증도, 환자의 체중, 그리고 화합물의 상대적 효능에 따라 기변적일 것이다. 그러나, 일반적인 지침으로서 적합한 단위 용량은 0.1 mg ~ 1000 mg일 수 있다.

[0278] 본 발명의 약학 조성물은 활성 화합물 이외에도, 충전제(희석제), 결합제, 습윤제, 붕해제 및 부형제 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 보조 재료 1가지 이상을 포함할 수 있다. 투여 방법에 따라서, 조성물은 활성 화합물을 0.1 wt.% ~ 99 wt.% 포함할 수 있다.

[0279] 발명의 상세한 설명

[0280] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자들에 의해 보통 이해되는 바와 같은 의미와 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 재료는 또한 본 발명을 실행하거나 시험하는데 사용될 수 있으며, 바람직한 방법과 재료가 본원에 기재되어 있다. 본 발명을 기재 및 청구함에 있어 하기 용어들이 이하 정의에 따라 사용된다.

[0281] 본 발명에 상표명이 사용될 때, 출원인은 해당 상표명으로 시판되는 제품의 제형 및 해당 상표명으로 시판되는 제품의 활성 약물 성분 및 비특허 약물을 포함하도록 의도된다.

[0282] 달리 진술되지 않는 한, 본 명세서와 청구의 범위에 사용된 용어는 이하의 의미를 가진다.

[0283] "약물"이란 용어는, 세포독성 약물 또는 면역조절제를 지칭한다. 세포독성 약물은 종양 세포 자체의 정상적인 성장을 파괴하기에 충분히 강력한 화학 분자를 종양 세포내에 존재하게 할 수 있다. 세포독성 약물은 원칙적으로 충분히 높은 농도로 종양 세포를 사멸시킬 수 있지만; 세포독성 약물은 특이성 결여로 말미암아 종양 세포를 사멸시킴과 동시에 정상 세포의 세포자멸을 일으켜, 심각한 부작용을 초래할 수 있다. 세포독성 약물은 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 방사성동위원소(예컨대 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} 및 Lu의 방사성동위원소), 독성 약물, 화학치료약물, 항생제 및 핵산분해효소를 포함한다. 면역조절제는 면역 관문 분자의 억제제이다. 본 발명의 몇몇 구현예에서, 약물은 D로서 표시되고, 면역조정제, 구체적으로 TLR8 효현제에 속한다.

[0284] "링커 단위", "링커" 또는 "링커 단편"이란 용어는, 한쪽 말단은 리간드와 결합하고, 다른쪽 말단은 약물과 결합할뿐더러, 다른 링커와 결합한 후 약물과 결합할 수도 있는 화학 구조 단편 또는 결합을 지칭한다.

[0285] 링커는 링커 성분 1개 이상을 포함할 수 있다. 예시적 링커 성분은 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로피오닐(MP), 발린-시트룰린(Val-Cit 또는 vc), 알라닌-페닐알라닌(ala-phe), *p*-아미노벤질옥시카보닐(PAB), 그리고 링커 시약과의 커플링(coupling)으로부터 유래한 것: *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP), *N*-숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로헥산-1 카복실레이트(SMCC, 본원에서 MCC라고 지칭되기도 함), 및 *N*-숙신이미딜(4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트(SIAB)를 포함한다. 링커는 확장 단위, 스페이서 단위, 아미노

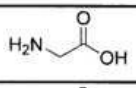
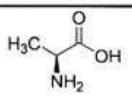
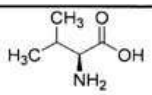
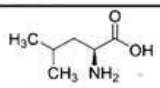
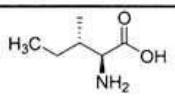
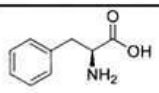
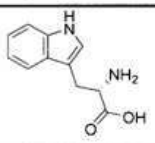
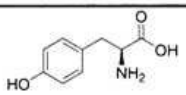
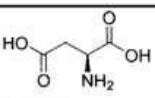
산 단위 및 연장 단위(extension unit)를 포함할 수 있다. 링커는 당 분야에 공지된 방법, 예컨대 US2005-0238649A1에 기재된 방법이 사용되어 합성될 수 있다. 링커는 세포내 약물의 방출을 유리하게 만드는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어 산에 불안정한 링커(예컨대 히드라존), 프로테아제 감수성(예컨대 펩티다아제 감수성) 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커가 사용될 수 있다(Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992);미국특허 제5,208,020호).

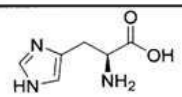
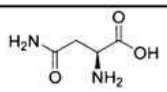
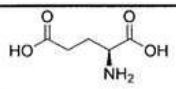
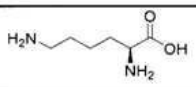
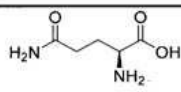
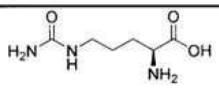
[0286] "연장 단위"란 용어는, 한쪽 말단은 탄소 원자를 통해 항체와 공유 결합하고, 다른쪽 말단은 아미노산 단위, 이황화물기, 설폰아미드기 또는 비펩티드 화학기와 결합하는 화학 구조 단편을 지칭한다.

[0287] "스페이서 단위"란 용어는, 세포독성 약물과 아미노산 단위가 선택적으로 결합하는 방식으로 세포독성 약물과 아미노산 단위를 커플링하여 항체-약물 접합체를 형성하는데 사용될 수 있는 2기능성 복합 구조 단편이다.

[0288] "아미노산"이란 용어는, 분자 구조내에 아미노 및 카복실을 함유하고, 아미노 및 카복실 둘 다는 -CH- 구조와 직접 결합하는 유기 화합물을 지칭한다. 일반식은 $H_2NCHRCOOH$인데, 식 중, R은 H, 치환 또는 비치환 알킬 등이다. 아미노산은 아미노가 결합한, 카복실산의 탄소 원자 위치에 따라 α, β, γ, δ, ε … -아미노산으로 분류된다. 생물 세계에서, 천연 단백질을 구성하는 아미노산은 자체의 특이적인 구조적 특징을 가지는데, 즉 아미노산 자체의 아미노는 α-탄소 원자에 직접 결합한다(즉 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 페닐알라닌, 트립토판, 티로신, 아스파르트산, 하스티딘, 아스파라긴, 글루탐산, 리신, 글루타민, 메티오닌, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 프롤린 등을 포함하는 α-아미노산). 비천연 아미노산은, 예를 들어 시트룰린이다. 당업자들에게 널리 공지된 바와 같이, 비천연 아미노산은 천연 단백질을 구성하지 않으므로, 본 발명에서 항체 합성에 연루되지 않는다. 본 발명에 사용된 아미노산에 대한 3문자 및 1문자 암호는 문헌[*J. biol. chem*, 243, p3558(1968)]에 기재되어 있는 바와 같다.

[0289]

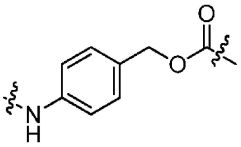
아미노산 약칭	축약어	명칭	구조
G	Gly	글리신	
A	Ala	알라닌	
V	Val	발린	
L	Leu	루신	
I	Ile	이소루신	
F	Phe	페닐알라닌	
W	Trp	트립토판	
Y	Tyr	티로신	
D	Asp	아스파르트산	

H	His	히스티딘	
N	Asn	아스파라긴	
E	Glu	글루탐산	
K	Lys	리신	
Q	Gln	글루타민	
C	Cit	시트룰린	

[0290]

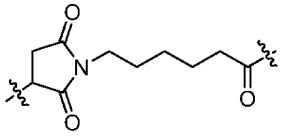
[0291] 본 발명에서 스페이서 단위는 *p*-아미노벤질옥시카보닐 단편이라 표시되는 구조를 가지는 PAB로서, 화학식 VI, 즉

[0292] 화학식 VI

[0293] 

[0294] 에 의해 표시되는 구조를 가지며, D에 결합된다.

[0295] 링커 성분은 하기의 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0296] MC = 구조  를 가지는 6-말레이미도카프로일;

[0297] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린(프로테아제 절단가능 링커중 예시적 디펩티드);

[0298] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도펜탄산;

[0299] Me-Val-Cit = *N*-메틸-발린-시트룰린(단 링커 펩티드 결합은 카텝신 B에 의해 절단되는 것이 방지되도록 변형됨);

[0300] $MC(PEG)_6$-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌글리콜(항체 시스테인에 부착 가능);

[0301] SPP = *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)발레레이트;

[0302] SPDP = *N*-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트;

[0303] SMCC = 숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트;

[0304] IT = 이미노티올란;

[0305] PBS = 인산염 완충 염수.

[0306] "항체-약물 접합체"란 용어는, 리간드가 안정적인 결합 단위에 의해 생물 활성 약물에 결합한 경우를 의미한다. 본 발명에서 "항체-약물 접합체"(ADC)란, 모노클로날 항체 또는 항체 단편이 안정적인 결합 단위에 의해 생물학적으로 활성인 독성 약물에 결합한 경우를 의미한다.

[0307] "약물 담지율"이란 용어는 또한 약물 대 항체의 비로서 표시될 수 있다. 약물 담지율은 항체(Ab)당 부착된 세포독성 약물(D) 1 ~ 20, 바람직하게는 1 ~ 10의 범위일 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 약물 담지율은 k로 표시되고, 예시적으로는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 임의의 값 2개의 평균; 바람직하게 1 ~ 10의 평균, 더욱 바람직하게는 1 ~ 8, 또는 2 ~ 8, 또는 2 ~ 7, 또는 3 ~ 8, 또는 3 ~ 7, 또는 2 ~ 6, 또는 4 ~ 7, 또는 4 ~ 6, 또는 4 ~ 5의 평균일 수 있다. 커플링 반응 후 ADC 분자당 약물의 평균 수는 UV/가시광선 분광분석법, 질량분광도법, ELISA 검정, 모노클로날 항체 분자체 변법 검정(CE-SDS) 및 HPLC와 같은 종래의 방법에 의해 특징지어질 수 있다.

[0308] 본 발명의 모노클로날 항체 분자 크기 변법 검정(CE-SDS)은, 환원 및 비환원 조건하에 분자량을 기반으로 모세관전기영동방법(*Chinese Pharmacopoeia* 0542, 2015 Edition)에 따라 모세관전기영동-황산도데실나트륨(CE-SDS) 자외광 검정을 채택함으로써 재조합 모노클로날 항체 생성물의 순도를 정량적으로 확정하는데 사용될 수 있다.

[0309] 본 발명의 일 구현예에서, 세포독성 약물은 결합 단위를 통해 리간드의 N 말단 아미노 및/또는 리신 잔기의 e-아미노에 커플링되고, 일반적으로 커플링 반응에서 항체에 커플링될 수 있는 약물 분자의 수는 이론상 최대값에 못미칠 것이다.

[0310] 항체-약물 접합체의 담지율은 이하 비제한적 방법들, 즉

[0311] (1) 결합 시약 대 모노클로날 항체의 몰비 제어;

[0312] (2) 반응 시간 및 온도 제어; 그리고

[0313] (3) 상이한 시약 선택

[0314] 에 의해 제어될 수 있다.

[0315] "항체"란 용어는, 동일한 중쇄 2개와 동일한 경쇄 2개 사이 사슬간 이황화 결합에 의한 결합에 의해 형성된 테트라펩티드 사슬 구조를 가지는 면역글로불린을 지칭한다. 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 자체의 아미노산 조성 및 배열에 있어 차이를 보이므로, 자체의 항원성에도 차이를 보인다. 그러므로 면역글로불린은 면역글로불린의 이소타입(isotype)이라고도 칭하여지는 5개의 군, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 구분될 수 있는데, 이것들의 대응 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ε 사슬이다. 동일 군의 Ig는 경첩 영역의 아미노산 조성과 중쇄들의 이황화 결합 수 및 위치의 차이에 따라서 상이한 하위군으로 구분될 수 있는데; 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 구분될 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 차이에 의해 κ 사슬 또는 λ사슬로 구분된다. Ig 군 5개 각각은 κ 사슬 또는 λ 사슬을 가질 수 있다. 본 발명에 기재된 항체는, 바람직하게 표적 세포상 세포 표면 항원에 대한 특이적 항체로서, 이 항체의 비제한적 예로서는 이하의 것들, 즉 항HER2(ErbB2) 항체, 항EGFR 항체, 항B7-H3 항체, 항c-Met 항체, 항HER3(ErbB3) 항체, 항HER4(ErbB4) 항체, 항CD20 항체, 항CD22 항체, 항CD30 항체, 항CD33 항체, 항CD44 항체, 항CD56 항체, 항CD70 항체, 항CD73 항체, 항CD105 항체, 항CEA 항체, 항A33 항체, 항Cripto 항체, 항EphA2 항체, 항G250 항체, 항MUC1 항체, 항루이스 Y 항체, 항VEGFR 항체, 항GPNMB 항체, 항인테그린 항체, 항PSMA 항체, 항테나신-C 항체, 항SLC44A4 항체, 항CD79 항체, 항TROP-2 항체, 항CD79B 항체, 항메소텔린 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이 있다. 몇몇 구현예에서, 항체는 트라스투주맙(상표명: Herceptin®), 퍼투주맙(2C4라고도 공지됨, 상표명: Perjeta®), 니모투주맙(상표명: Taixinsheng®), 에노블리투주맙, 에미베투주맙, 이노투주맙, 피나투주맙, 브렌툭시맙, 겜투주맙, 비바투주맙, 로보투주맙, cBR96 및 글레마투마맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0316] 항체의 중쇄 및 경쇄에 있어서 N 말단 근처 약 110개의 아미노산으로 된 서열은 상당히 가변적이므로, 가변 영역(Fv 영역)이라 지칭되고; C 말단 근처 나머지 아미노산 서열은 비교적 안정적이므로, 불변 영역이라 지칭된다. 가변 영역은 초가변 영역(HVR) 3개와 비교적 보존적인 서열을 가지는 틀 영역(FR) 4개를 포함한다. 초가변 영역 3개는 항체의 특이성을 결정하므로, 상보성결정영역(CDR)이라고도 공지되어 있다. 각각의 경쇄 가변 영역(LCVR) 또는 중쇄 가변 영역(HCVR)은 아미노 말단으로부터 카복시 말단에 이르기까지 CDR 3개 및 FR 4개가 이하의 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 경쇄의 CDR 3개는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭하고, 중쇄의 CDR 3개는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭한다.

[0317] 본 발명의 항체는 마우스 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 전체가 인간화된 항체, 바람직하게 인간화 항체 및 전체가 인간화된 항체를 포함한다.

[0318] 본원에 사용된 "마우스 항체"란 용어는, 당 분야의 지식과 기술에 따라 마우스로부터 제조된 항체를 지칭한다. 제조중 시험대상체에는 특정 항원이 주사되고, 이후에는 원하는 서열이나 기능적 특성을 발현하는 항체 하이브

리도마가 단리된다.

[0319] "키메라 항체"란 용어는, 마우스 항체의 가변 영역과 인간 항체의 불변 영역을 융합하여 수득된 항체로서, 마우스 항체에 의해 유도된 면역 반응을 완화할 수 있는 항체를 지칭한다. 키메라 항체는, 우선 마우스 특이적 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 확립한 다음, 마우스 하이브리도마 세포로부터 가변 영역 유전자를 클로닝하고 나서, 필요에 따라 인간 항체의 불변 영역 유전자를 클로닝하고, 마우스 가변 영역 유전자 및 인간 불변 영역 유전자를 연결시켜 키메라 유전자를 만들어, 이 키메라 유전자를 발현 벡터에 삽입한 후, 마지막으로 진핵생물계 또는 원핵생물계에서 키메라 항체를 발현시킴으로써 확립된다.

[0320] CDR 그래프팅(grafting) 항체라고도 공지된 "인간화 항체"란 용어는, 마우스 CDR 서열을 인간 항체 가변 영역 틀, 즉 상이한 유형의 인간 생식계열 항체 틀 서열에 그래프팅하여 제조된 항체를 지칭한다. 이러한 항체는 키메라 항체내 다수의 마우스 단백질 구성성분이 존재함으로 말미암아 유도되는 이질적 반응을 극복할 수 있다. 이러한 틀 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 개시된 참고문헌 또는 공공의 DNA 데이터베이스로부터 수득될 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식계열 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스(인터넷 주소 www.mrccpe.cpm.ac.uk/vbase에서 입수 가능)뿐 아니라, 문헌[Kabat, E. A. et al., 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition]에서 살펴볼 수 있다. 면역원성 감소로 유발되는 활성 감소를 회피하기 위해, 인간 항체의 가변 영역 틀 서열은 최소 역전 돌연변이 또는 역 돌연변이되고, 이로써 활성은 유지될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 또한 파아지 전시에 의해 추가로 CDR 친화성 성숙 이후에 형성된 인간화 항체도 포함한다. 접근 가능한 마우스 항체의 인간화에 사용되는 방법을 추가로 기술하고 있는 문헌은, 예를 들어 문헌[Queen et al., *Proc., Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 2869, 1991]을 포함하고, Winter 및 공동연구자에 의해 제공된 방법이 사용되는 인간화를 기술하고 있는 문헌은 문헌[Jones et al., *Nature*, 321, 522(1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, 323-327(1988), Verhoeyen et al, *Science*, 239, 1534(1988)]을 포함한다.

[0321] "전체가 인간화된 모노클로날 항체"라고도 공지된 "전체가 인간화된 항체", "전체가 인간의 것인 항체" 또는 "완전히 인간의 것인 항체"란 용어는, 면역원성과 독성 부작용을 제거하기 위해 인간화 가변 영역 및 불변 영역 둘 다를 가질 수 있다. 모노클로날 항체의 개발은 4가지 방식, 즉 마우스 모노클로날 항체, 키메라 모노클로날 항체, 인간화 모노클로날 항체 및 전체가 인간화된 모노클로날 항체로 이루어져 있다. 본 발명의 항체는 전체가 인간화된 모노클로날 항체이다. 전체가 인간의 것인 항체의 제조를 위한 주요 유관 기술은 인간 하이브리도마 기술, EBV 형질전환된 B 림프구 기술, 파아지 전시 기술, 유전자이식 마우스 항체 제조 기술 및 단일 B 세포 항체 제조 기술 등을 포함한다.

[0322] "항원 결합 단편"이란 용어는, 항원과 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편 1개 이상을 지칭한다. 전장 항체의 단편은 항체의 항원 결합 기능을 수행하는데 사용될 수 있는 것으로 보인다. "항원 결합 단편"이란 용어에 포함되는 결합 단편의 예로서는 (i) Fab 단편, 즉 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 즉 경첩 영역내 이황화 가교에 의해 결합된 Fab 단편 2개를 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 팔(arm) 1개의 VH 및 VL 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인들로 이루어진 단일 도메인 또는 dAb 단편(Ward et al.,(1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성결정영역(CDR) 또는 (vii) 선택적으로 합성 링커에 의해 결합될 수 있는 단리된 CDR 2개 이상의 조합을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 도메인 2개, 즉 VL 및 VH는 별도 유전자에 의해 암호화되지만, 이 도메인 2개는 합성 링커에 의해 재조합을 통해 결합될 수 있으므로, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단일 사슬 Fv(scFv)라 지칭됨)를 형성하는 단일 단백질 사슬이 생산될 수 있다[예컨대 문헌들(Bird et al.(1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston et al.(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883)을 참조한다]. 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체 단편은 당 업자들에게 공지된 종래의 기술이 사용되어 수득되고, 동일한 방식으로 비변형 항체에 대해 그 유용성이 스크리닝된다. 항원 결합부는 재조합 DNA 기술, 또는 비변형 면역글로불린의 효소 절단 또는 화학 절단이 사용되어 제조될 수 있다. 항체는 그 이소타입이 상이할 수 있는데, 예컨대 IgG(예컨대 아형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체가 있을 수 있다.

[0323] Fab는 분자량이 약 50,000이고, 항원 결합 활성을 가지며, IgG 항체 분자를 프로테아제, 즉 (H 사슬의 224번 위치에 있는 아미노산 잔기를 절단하는) 파페인으로 처리함으로써 수득될 수 있는 항체 단편이되, 단 여기서 H 사슬의 거의 절반과 전체 N 말단쪽은 이황화 결합에 의해 L 사슬과 합하여진다.

[0324] $F(ab')_2$는 분자량이 약 100,000이고, 항원 결합 활성을 가지며, 경첩 위치에 결합된 Fab 영역 2개를 포함하고,

IgG 경첩 영역내 이황화 결합 2개중 하단 일부를 효소인 펩신으로 분해함으로써 수득되는 항체 단편이다.

[0325] Fab'는 분자량 약 50,000이고, 항원 결합 활성을 가지며, 전술된 $F(ab')_2$의 경첩 영역중 이황화 결합을 절단함으로써 수득되는 항체 단편이다.

[0326] 또한 Fab'는 항체의 Fab' 단편을 암호화하는 DNA를, 원핵생물 발현 벡터 또는 진핵생물 발현 벡터에 삽입하고, 이 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab'를 발현시킴으로써 제조될 수 있다.

[0327] "단일 사슬 항체", "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"란 용어는, 링커에 의해 결합된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 영역; VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(또는 영역; VL)을 포함하는 분자를 지칭한다. 이러한 scFv 분자는 일반 구조 NH_2-VL-링커-VH-COOH 또는 NH_2-VH-링커-VL-COOH를 가질 수 있다. 선행 기술의 적합한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체, 예컨대 반복된 변이체 1개 ~ 4개로 이루어져 있다(Holliger et al.(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). 본 발명에 사용될 수 있는 다른 링커는 문헌(Alfthan et al.(1995), *Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al.(2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106; Hu et al.(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al.(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56; 및 Roovers et al.(2001), *Cancer Immunol.*)에 기재되어 있다.

[0328] "CDR"이란 용어는, 주로 항원 결합에 기여하는 항체 가변 도메인내 6개 초가변 영역중 1개를 지칭한다. CDR 6개에 대해 가장 일반적인 정의중 하나는 문헌[Kabat E.A. et al.,(1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242]에 제공되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR의 Kabat 정의는 단지 경쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3에만 적용될 수 있을 뿐아니라(CDR L1, CDR L2, CDR L3 또는 L1, L2, L3), 중쇄 가변 도메인의 CDR2 및 CDR3에도 적용될 수 있다(CDR H2, CDR H3 또는 H2, H3). 일반적으로 각각의 중쇄 가변 영역에는 CDR이 3개 존재하고(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3), 각각의 경쇄 가변 영역에는 CDR이 3개 존재한다(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3). "Kabat" 번호메김 체계[문헌(Kabat et al.,(1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) 참조], "Chothia" 번호메김 체계[문헌(Al-Lazikani et al.,(1997) JMB 273: 927-948) 참조] 및 ImMunoGenTics(IMGT) 번호메김 체계[문헌(Lefranc M. P., *Immunologist*, 7, 132-136(1999); Lefranc, M. P., et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77(2003)) 참조] 등을 비롯하여 널리 공지된 다양한 체계중 임의의 것 1가지가 CDR의 아미노산 서열 경계를 확정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어 Kabat 체계에 따른 고전적 포맷에 있어서 중쇄 가변 도메인(VH)중 CDR 아미노산 잔기는 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)와 같이 번호가 메겨지고; 경쇄 가변 도메인(VL)중 CDR 아미노산 잔기는 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR 3)와 같이 번호가 메겨진다. Chothia 체계에 따르면, VH중 CDR 아미노산은 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)와 같이 번호가 메겨지고; VL중 아미노산 잔기는 26-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 91-96(LCDR3)과 같이 번호가 메겨진다. Kabat 체계와 Chothia 체계 둘 다를 조합함으로써 내려지는 CDR 정의에 따르면, CDR은 인간 VH내 26번 ~ 35번(HCDR1), 50번 ~ 65번(HCDR2) 및 95번 ~ 102번(HCDR3) 아미노산 잔기와, 인간 VL내 24번 ~ 34번(LCDR1), 50번 ~ 56번(LCDR2) 및 89번 ~ 97번(LCDR3) 아미노산 잔기로 이루어져 있다. IMGT 체계에 따르면, VH내 CDR 아미노산 잔기는 대략 26번 ~ 35번(CDR1), 51번 ~ 57번(CDR2) 및 93번 ~ 102번(CDR3)으로 번호가 메겨지고, VL내 CDR 아미노산 잔기는 대략 27번 ~ 32번(CDR1), 50번 ~ 52번(CDR2) 및 89번 ~ 97번(CDR3)으로 번호가 메겨진다. IMGT 체계에 따르면, 항체의 CDR은 프로그램 IMGT/DomainGap Align이 사용되어 확정될 수 있다.

[0329] "항체 틀"이란 용어는, 가변 도메인의 항원 결합 루프(CDR)에 대해 틀로서 사용되는 가변 도메인 VL 또는 VH의 일부를 지칭한다. 이는 본질적으로 CDR이 없는 가변 도메인이다.

[0330] "에피토프" 또는 "항원 결정기"란 용어는, 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원상 부위를 지칭한다. 에피토프는 통상 독특한 공간 입체배열내 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 연속적 또는 불연속적 아미노산을 포함한다. 예컨대 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, volume 66, G.E. Morris, Ed.(1996)]을 참조한다.

[0331] "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적으로 결합하다" 및 "특이적으로 결합하다"란 용어는, 예정된 항원상 에피토프에 항체가 결합하는 것을 지칭한다. 일반적으로 항체는 약 10^{-7} M 미만, 예컨대 약 10^{-8} M, 약 10^{-9} M 미만 또는 약 10^{-10} M 이하의 친화도(KD)로 결합한다.

[0332] "핵산 분자"란 용어는, DNA 분자 또는 RNA 분자를 지칭한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으

나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능상 관련이 있도록 배치될 때 "작동 가능하도록 결합"되어 있다고 한다. 예를 들어 프로모터 또는 인핸서는 만일 이것이 암호화 서열의 전사에 영향을 미치면, 암호화 서열과 작동 가능하도록 결합된 것이다.

[0333] "벡터"란 용어는, 이 자체와 결합하였던 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 일 구현예에서, 벡터는 추가의 DNA 분절이 결찰될 수 있는 것으로서, 원형의 이중 가닥 DNA 루프라 지칭되는 "플라스미드"이다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 추가 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결찰될 수 있는 바이러스 벡터이다. 본원에 개시된 벡터(예컨대 세균 복제 기원을 가지는 세균 벡터 및 에피좀 포유동물 벡터)는 그것이 도입된 숙주 세포내에서 자율적으로 복제할 수 있거나, 또는 숙주 세포에 도입된 후 숙주 세포의 게놈에 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제할 수 있다(예컨대 비 에피좀 포유동물 벡터).

[0334] 항체 및 항원 결합 단편을 제조 및 정제하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있는데, 예를 들어 문헌(*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)의 챕터 5 ~ 8 및 15에 기재된 방법이 있다. 마찬가지로 항원 결합 단편은 종래의 방법이 사용되어 제조될 수 있다. 본 발명에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 비인간 CDR에 추가의 인간 FR 1개 이상이 함유되도록 유전자 조작된다. 인간 FR 생식계열 서열은, IMGT 인간 항체 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스를 MOE 소프트웨어와 비교함으로써, IMGT 웹사이트(http://imgt.cines.fr)에서 수득될 수 있거나, 또는 면역글로불린 저널 2001 ISBN 012441351로부터 수득될 수 있다.

[0335] "숙주 세포"란 용어는, 내부에 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 세균, 미생물, 식물 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 형질전환에 민감한 세균은 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 과의 일원, 예컨대 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*) 변종, 바실라세아에(*Bacillaceae*) 과의 일원, 예컨대 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 해모필러스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*)를 포함한다. 적합한 미생물로서는 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 적합한 동물 숙주 세포주는 CHO(중국햄스터난소세포주) 및 NSO 세포를 포함한다.

[0336] 본 발명의 조작된 항체 또는 항원 결합 단편은 종래의 방법이 사용되어 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 서열은 GS 발현 벡터에 클로닝되어 재조합될 수 있다. 재조합 면역글로불린 발현 벡터는 CHO 세포를 안정적으로 형질감염시킬 수 있다. 더욱 많이 권장되는 선행 기술인 포유동물 발현계는 항체의 당화, 구체적으로 Fc 영역의 매우 보존적인 N 말단 부위의 당화를 초래할 수 있다. 양성의 클론은 생물반응기내 무혈청 배지중에서 증식되어 항체를 생산하게 된다. 분비된 항체를 포함하는 배양액은 종래의 기술이 사용되어 정제될 수 있는데, 예컨대 조정된 완충제를 함유하는 A 또는 G 세파로스 FF 컬럼상에서 정제가 수행된다. 비특이적으로 결합된 분획들은 세척에 의해 떨어져 나간다. 결합된 항체는 pH 구배 방법이 사용되어 용리되고, 항체 단편은 SDS-PAGE가 사용되어 검출된 후 수집된다. 항체는 종래의 방법이 사용되어 여과 및 농축될 수 있다. 가용성 혼합물 및 중합체는 또한 종래의 방법, 예컨대 분자체 및 이온 교환법이 사용되어 제거될 수 있다. 획득된 생성물은, 예컨대 -70℃에서 즉시 동결되어야 하거나, 동결건조되어야 한다.

[0337] 아미노산 서열 "동일성"이란, 제1 서열과 제2 서열이 공유하는 아미노산 잔기의 퍼센트를 지칭하는데, 이때 아미노산 서열들을 정렬함에 있어 필요하다면 겝이 도입되어 최고의 서열 동일성%가 달성될 수 있고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성%를 확정하기 위해, 당 분야의 기술에 속하는 다양한 방법, 예컨대 공중이 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어가 사용되어 정렬이 이루어질 수 있다. 당 업자는, 정렬을 측정하기 적합한 매개변수, 예컨대 정렬되는 서열들 전장에 대해 최대의 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 결정할 수 있다.

[0338] "펩티드"란 용어는, 아미노산과 단백질 사이의 화합물 단편을 지칭한다. 펩티드는 2개 이상의 아미노산 분자를 펩티드 결합에 의해 결합시킴으로써 생성되고, 단백질의 구조적 단편이자 기능적 단편으로서, 예컨대 본질적으로 펩티드인 호르몬과 효소이다.

[0339] "당"이란 용어는, 원소 C, H 및 O로 이루어진 생체거대분자를 지칭한다. 당은 단당체, 이당체 및 다당체 등으로 분류될 수 있다.

[0340] "형광 프로브"란 용어는, 자외-가시-근적외 영역에서 특징적인 형광을 보이는 형광 분자의 한 유형을 지칭하며, 이의 형광 특성(여기 및 발광 파장, 세기, 수명, 편광 등)은, 핵산(DNA 또는 RNA)과의 비공유 상호작용, 단백질

또는 기타 거대분자 구조에 의해 거대분자 성분의 특성 및 행동을 연구하는데 사용될 수 있는 환경의 특성, 예컨대 편광, 굴절지수 및 점성을 변경함으로써 민감하게 변경될 수 있으며, 그 결과 형광 특성중 1가지 이상이 변경될 수 있다.

[0341] "알킬"이란 용어는, 탄소 원자를 1개 ~ 20개 함유하는 선형 또는 분지형 기인 포화 지방족 탄화수소기, 바람직하게는 탄소 원자를 1개 ~ 12개 함유하는 알킬, 더욱 바람직하게 탄소 원자를 1개 ~ 10개 함유하는 알킬, 그리고 가장 바람직하게 탄소 원자를 1개 ~ 6개 함유하는 알킬을 지칭한다. 비제한적 예로서는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, *n*-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-디메틸부틸, *n*-헵틸, 2-메틸헥실, 3-메틸헥실, 4-메틸헥실, 5-메틸헥실, 2,3-디메틸펜틸, 2,4-디메틸펜틸, 2,2-디메틸펜틸, 3,3-디메틸펜틸, 2-에틸펜틸, 3-에틸펜틸, *n*-옥틸, 2,3-디메틸헥실, 2,4-디메틸헥실, 2,5-디메틸헥실, 2,2-디메틸헥실, 3,3-디메틸헥실, 4,4-디메틸헥실, 2-에틸헥실, 3-에틸헥실, 4-에틸헥실, 2-메틸-2-에틸펜틸, 2-메틸-3-에틸펜틸, *n*-노닐, 2-메틸-2-에틸헥실, 2-메틸-3-에틸헥실, 2,2-디에틸펜틸, *n*-데실, 3,3-디에틸헥실, 2,2-디에틸헥실 및 이의 다양한 측쇄 이성체 등을 포함한다. 탄소 원자를 1개 ~ 6개 가지는 저급 알킬이 더욱 바람직하고, 비제한적 예로서는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, *n*-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸 및 2,3-디메틸부틸 등을 포함한다. 알킬은 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있다. 치환될 때, 치환기는 이용 가능한 임의의 결합 부위에서 치환될 수 있되, 단 치환기는, 바람직하게 하기 기, 즉 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 중 1개 이상이다.

[0342] "헤테로알킬"이란 용어는, N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 이상을 함유하며, 상기 정의된 바와 같은 알킬을 지칭한다.

[0343] "1가 기"는 화합물로부터 1가 원자 또는 기를 "정식으로" 제거함으로써 수득된다. "서브유닛"은 화합물로부터 1가 원자 또는 원자기 2개 또는 2가로 형성된 원자 또는 원자기 1개를 "정식으로" 제거함으로써 수득된다. 예시적 "알킬"이란, 알칸 분자로부터 수소 원자 1개가 제거된 후 남은 기를 지칭하며, 탄소 원자 1개 ~ 20개로 된 1가 선형 또는 분지형 기를 포함한다. 탄소 원자 1개 ~ 6개를 함유하는 알킬의 비제한적 예로서는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필 및 이의 다양한 분지형 이성체 등을 포함한다.

[0344] "알킬렌"이란 용어는, 동일한 탄소 원자 또는 상이한 탄소 원자 2개로부터 수소 원자 2개가 제거됨으로 말미암아 부모 알칸으로부터 유래하게 된 잔기 2개를 가지는 포화 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소기를 지칭한다. 이는 탄소 원자를 1개 ~ 20개 함유하는 선형 또는 분지형 기로서, 바람직하게는 탄소 원자를 1개 ~ 12개 함유하는 알킬렌, 더욱 바람직하게는 탄소 원자를 1개 ~ 6개 함유하는 알킬렌이다. 알킬렌의 비제한적 예로서는 메틸렌(-CH_2-), 1,1-에틸리덴(-CH(CH_3)-), 1,2-에틸리덴(-CH_2CH_2)-, 1,1-프로필리덴(-CH(CH_2CH_3)-), 1,2-프로필리덴(-CH_2CH(CH_3)-), 1,3-프로필리덴(-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-부틸리덴(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-) 및 1,5-부틸리덴(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 알킬렌은 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있다. 치환될 때, 치환기는 이용 가능한 임의의 결합 부위에서, 선택적으로는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 바람직하게는 독립적으로 선택되는 치환기 1개 이상으로 치환될 수 있다. 마찬가지로 "알케닐렌"은 상기 정의된 바와 같다.

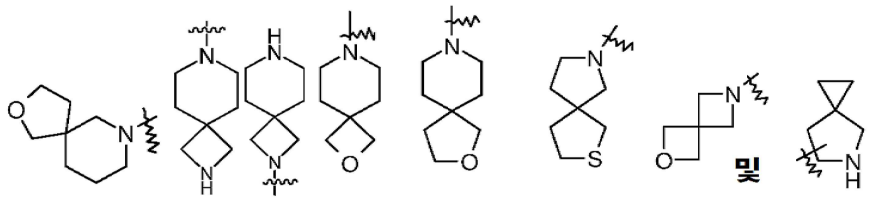
[0345] "알콕시"란 용어는, -O-(알킬) 및 -O-(치환되지 않는 사이클로알킬)을 지칭하는데, 여기서 알킬 또는 사이클로알킬은 상기 정의된 바와 같다. 알콕시의 비제한적 예로서는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 사이클로프로필옥시, 사이클로부톡시, 사이클로펜틸옥시 및 사이클로헥실옥시를 포함한다. 알콕시는, 선택적으로 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환될 때 이 치환기는, 바람직하게 하기 기, 즉 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬,

아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 1개 이상이다.

[0346] "사이클로알킬"이란 용어는, 포화 또는 부분 불포화 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 치환기를 지칭한다. 사이클로알킬 고리는 탄소 원자를 3개~ 20개, 바람직하게 탄소 원자를 3개 ~ 12개, 더욱 바람직하게는 탄소 원자를 3개 ~ 10개, 그리고 가장 바람직하게는 탄소 원자를 3개 ~ 8개 함유한다. 모노사이클릭 사이클로알킬의 비제한적 예로서는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로펜테닐, 사이클로헥실, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵틸, 사이클로헵타트리에닐 및 사이클로옥틸 등을 포함한다. 폴리사이클릭 사이클로알킬로서는 스피로 사이클로알킬, 융합 사이클로알킬, 및 가교 사이클로알킬을 포함한다.

[0347] "헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 고리 원자를 3개 ~ 20개 함유하는 포화 또는 부분 불포화 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 치환기를 지칭하는데, 여기서 고리 원자 1개 이상은 -O-O-, -O-S- 또는 -S-S-의 사이클릭부를 제외하고, 질소, 산소 및 $S(O)_m$(식 중, m은 0 ~ 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 헤테로사이클로알킬은, 바람직하게 고리 원자를 3개 ~ 12개 함유하는데, 이 중 1개 ~ 4개는 헤테로원자이고; 더욱 바람직하게, 사이클로알킬 고리는 고리 원자를 3개 ~ 10개 함유한다. 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬의 비제한적 예로서는 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 모폴리닐, 티오모폴리닐, 호모피페라지닐 등을 포함한다. 폴리사이클릭 헤테로사이클로알킬은 스피로 헤테로사이클릴, 융합 헤테로사이클릴 및 가교 헤테로사이클로알킬을 포함한다.

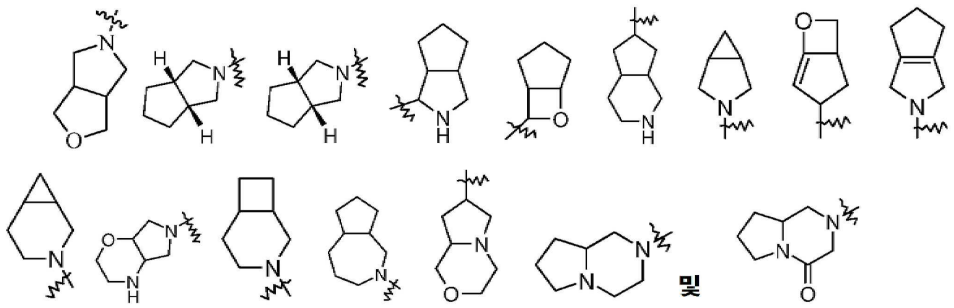
[0348] "스피로 헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 모노사이클릭 고리들이 원자(스피로 원자라 지칭됨) 1개를 공유하는 5원 ~ 20원 폴리사이클릭 헤테로사이클로알킬기를 지칭하는데, 여기서 고리 원자 1개 이상은 질소, 산소 및 $S(O)_m$(식 중, m은 0 ~ 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 이러한 고리는 이중 결합을 1개 이상 함유할 수 있지만, 이것들 중 그 어느 것도 전체 공액 π 전자계를 가지지 않는다. 바람직하게 스피로 헤테로사이클로알킬은 6원 ~ 14원이고, 더욱 바람직하게는 7원 ~ 10원이다. 고리들이 공유하는 스피로 원자 수에 따르면, 스피로 헤테로사이클로알킬은 모노스피로 헤테로사이클로알킬, 바이스피로 헤테로사이클로알킬 또는 폴리스피로 헤테로사이클로알킬일 수 있으며, 바람직하게는 모노스피로 헤테로사이클로알킬 및 바이스피로 헤테로사이클로알킬일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4원/4원, 4원/5원, 4원/6원, 5원/5원 또는 5원/6원 모노스피로 헤테로사이클로알킬일 수 있다. 스피로 헤테로사이클로알킬의 비제한적 예로서는



[0349]

[0350] 를 포함한다.

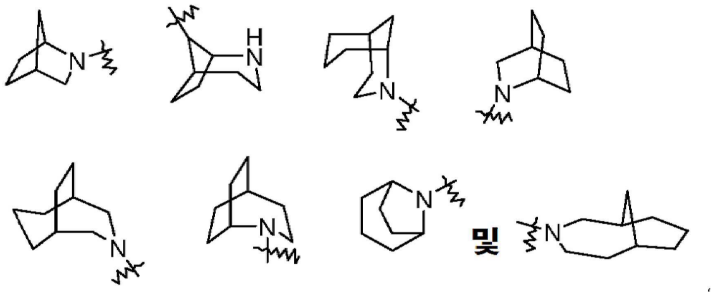
[0351] "융합 헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 각각의 고리가 계내 또 다른 고리와 인접 원자쌍을 공유하는 5원 ~ 20원 폴리사이클릭 헤테로사이클로알킬기를 지칭하는데, 여기서 고리들 중 1개 이상은 이중 결합 1개 이상을 함유할 수 있지만, 이것들 중 그 어떤 것도 전체 공액 π 전자계를 가지지 않으며, 고리 원자들 중 1개 이상은 질소, 산소 및 $S(O)_m$(식 중, m은 0 ~ 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 바람직하게 융합 헤테로사이클로알킬은 6원 ~ 14원이고, 더욱 바람직하게는 7원 ~ 10원이다. 형성된 고리들의 수에 따라서, 융합 헤테로사이클로알킬은 바이사이클릭, 트리사이클릭, 테트라사이클릭 또는 폴리사이클릭일 수 있으며, 바람직하게는 바이사이클릭 또는 트리사이클릭일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 5원/5원 또는 5원/6원 바이사이클릭 융합 헤테로사이클로알킬일 수 있다. 융합 헤테로사이클로알킬의 비제한적 예로서는



[0352]

[0353] 를 포함한다.

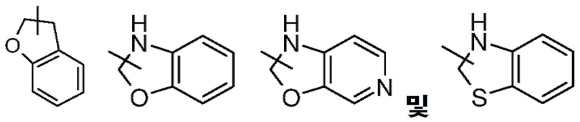
[0354] "가교 헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 임의의 고리 2개가, 서로간에 직접 결합되어 있지 않은 탄소 원자 2개를 공유하는 5원 ~ 14원 폴리사이클릭 헤테로사이클로알킬기를 지칭하는데, 여기서 이 고리는 이중 결합을 1개 이상 함유할 수 있지만, 이것들 중 그 어느 것도 전체 공액 π전자계를 가지지 않으며, 고리 원자들 중 1개 이상은 질소, 산소 및 $S(O)_m$(식 중, m은 0 ~ 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 바람직하게 가교 헤테로사이클릴은 6원 ~ 14원이고, 더욱 바람직하게는 7원 ~ 10원이다. 형성된 고리의 수에 따라서, 가교 헤테로사이클로알킬은 바이사이클릭, 트리사이클릭, 테트라사이클릭 또는 폴리사이클릭일 수 있으며, 바람직하게는 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 바이사이클릭 또는 트리사이클릭일 수 있다. 가교 헤테로사이클로알킬의 비제한적 예로서는



[0355]

[0356] 를 포함한다.

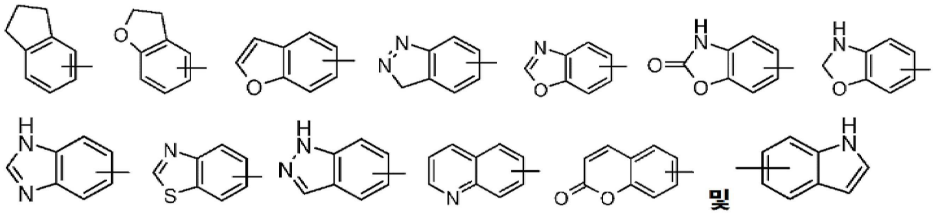
[0357] 헤테로사이클로알킬 고리는 아릴, 헤테로아릴 또는 사이클로알킬 고리와 융합될 수 있는데, 여기서 부모 구조에 결합된 고리는 헤테로사이클로알킬이고; 헤테로사이클로알킬 고리의 비제한적 예로서는



[0358] 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0359] 헤테로사이클로알킬은 선택적으로 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환될 때, 치환기는, 바람직하게 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기들중 1개 이상이다.

[0360] "아릴"이란 용어는, 6원 ~ 14원, 바람직하게 6원 ~ 10원의 탄소 모노사이클릭 또는 융합 폴리사이클릭(즉 인접 탄소 원자쌍을 공유하는 고리들) 기로서, 페닐 및 나프틸, 바람직하게 페닐과 같이 공액 π전자계를 가지는 기를 지칭한다. 아릴 고리는 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 또는 사이클로알킬 고리와 융합될 수 있는데, 여기서 부모 구조와 결합되어 있는 고리는 아릴 고리이고; 사이클로알킬 고리의 비제한적 예로서는

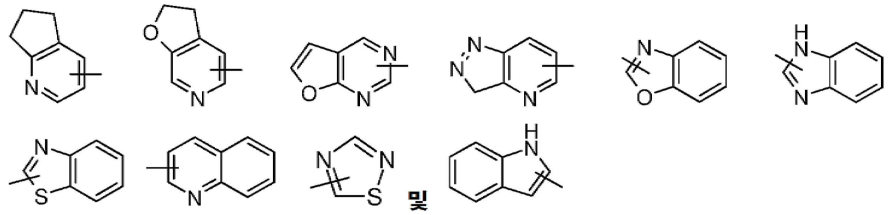


[0361]

[0362] 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0363] 아릴은 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환될 때, 치환기는, 바람직하게 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 1개 이상이다.

[0364] "헤테로아릴"이란 용어는, 헤테로원자 1개 ~ 4개와 고리 원자 5개 ~ 14개를 함유하는 헤테로방향계를 지칭하는데, 여기서 헤테로원자는 산소, 황 및 질소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 헤테로아릴은, 바람직하게 5원 ~ 10원이고, 더욱 바람직하게는 5원 또는 6원으로서, 예컨대 푸라닐, 티에닐, 피리디닐, 피롤릴, *N*-알킬피롤릴, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸릴 및 테트라졸릴이 있다. 헤테로아릴 고리는 아릴, 헤테로사이클로알킬 또는 사이클로알킬 고리와 융합할 수 있는데, 여기서 부모 구조와 결합된 고리는 헤테로아릴이다. 헤테로아릴 고리의 비제한적 예로서는



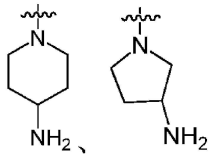
[0365]

[0366] 을 포함한다.

[0367] 헤테로아릴은, 선택적으로 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환될 때, 치환기는, 바람직하게 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 1개 이상이다.

[0368] "아미노 보호기" 란 용어는, 용이하게 제거될 수 있고, 반응이 분자내 어느 곳에서 진행이 될지라도 아미노기가 하전되는 것을 막고자하는 기를 지칭한다. 아미노 보호기의 비제한적 예로서는 9-플루오레닐메톡시카보닐, *tert*-부톡시카보닐, 아세틸, 벤질, 알릴, *p*-메톡시벤질 등을 포함한다. 이러한 기는, 선택적으로 할로겐, 알콕시 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 ~ 3개로 치환될 수 있다. 아미노 보호기는, 바람직하게 9-플루오레닐메톡시카보닐이다.

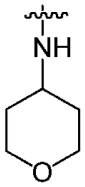
[0369] "아미노헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 아미노기 1개 이상, 바람직하게 아미노기 1개로 치환된 헤테로사이클로알킬을 지칭하는데, 여기서 헤테로사이클로알킬은 상기 정의된 바와 같고, "아미노기"는 $-NH_2$를 의미한다. 본 발명의 대표적 예는 이하와 같다:



[0370] .

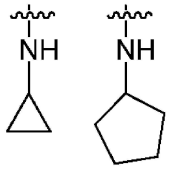
[0371] "헤테로사이클로알킬아미노"란 용어는, 헤테로사이클로알킬기 1개 이상, 바람직하게 헤테로사이클로알킬기 1개로 치환된 아미노를 지칭하는데, 여기서 아미노는 상기 정의된 바와 같고, 헤테로사이클로알킬은 상기 정의된

바와 같다. 본 발명의 대표적 예는 이하와 같다:



[0372]

[0373] "사이클로알킬아미노" 란 용어는, 사이클로알킬기 1개 이상, 바람직하게 사이클로알킬기 1개로 치환된 아미노를 지칭하는데, 여기서 아미노는 상기 정의된 바와 같고, 사이클로알킬은 상기 정의된 바와 같다. 본 발명의 대표적 예는 이하와 같다:



[0374]

[0375] "사이클로알킬알킬"이란 용어는, 사이클로알킬기 1개 이상, 바람직하게는 사이클로알킬기 1개로 치환된 알킬을 지칭하는데, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같고, 사이클로알킬은 상기 정의된 바와 같다.

[0376] "할로알킬"이란 용어는 할로겐 1개 이상으로 치환된 알킬을 지칭하는데, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같다.

[0377] "중수소함유 알킬"이란 용어는 중수소 원자 1개 이상으로 치환된 알킬을 지칭하는데, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같다.

[0378] "하이드록시"란 용어는 -OH기를 지칭한다.

[0379] "할로겐"이란 용어는, 플루오르, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭한다.

[0380] "아미노"란 용어는 $-NH_2$를 지칭한다.

[0381] "니트로"란 용어는 $-NO_2$를 지칭한다.

[0382] 화학식에서 축약어 "Me"는 메틸을 지칭한다.

[0383] 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물의 다양한 중수소함유 형태를 포함한다. 이용가능하고 탄소 원자와 결합된 각각의 수소 원자는 중수소 원자로 독립적으로 치환될 수 있다. 당업자들은 유관 문헌을 참조하여 화학식 I의 화합물의 중수소함유 형태를 합성할 수 있다. 시판중인 중수소함유 출발 재료는 화학식 I의 화합물의 중수소함유 형태를 제조하는데 사용될 수 있거나, 또는 중수소함유 시약, 예컨대 중수소함유 보란, 테트라하이드로푸란중 트리-중수소함유 보란, 중수소함유 수소화알루미늄리튬, 중수소함유 요오도에탄 및 중수소함유 요오도메탄 등(이에 한정되는 것은 아님)이 사용되는 종래의 기술이 사용되어 합성될 수 있다.

[0384] 또 다른 양태에서, 본 발명의 화합물의 작용기중 수소는 중수소를 함유하므로, 대응 중수소함유 화합물이 수득된다. 중수소함유 화합물은 수소 유도체의 선택성 및 잠재성과 동일한 선택성 및 잠재성을 보유하며; 중수소 결합은 더욱 안정적인데, 이 점은 "ADME"를 상이하게 만듦으로써 임상상 유리한 효과를 제공한다.

[0385] ADME란, 외인성 화학물질의 유기체에 의한 흡수, 분배, 대사작용 및 배출을 지칭한다.

[0386] "선택적" 또는 "선택적으로"란 용어는, 이후 기재될 이벤트나 환경이 발생/조성될 수 있지만 반드시 그러한 것은 아닌 경우, 그리고 그 기재가 이벤트나 환경이 발생/조성되거나 발생하지 않는/조성되지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들어 "알킬로 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴기"란, 알킬이 존재할 수 있되 반드시 그러한 것은 아님과, 그 기재가 헤테로사이클릴기가 알킬로 치환되거나 치환되지 않는 경우를 포함함을 의미한다.

[0387] "치환된"이란 용어는, 기내 수소 원자 1개 이상, 바람직하게는 5개 이하, 더욱 바람직하게는 1개 ~ 3개가 대응하는 수의 치환기로 독립적으로 치환되는 경우를 의미한다. 치환기는 오로지 자체의 가능한 화학적 위치에 있으며, 당 업자는 과도한 노력을 들이지 않고 실행 가능하거나 불가능한 치환을 (실험에 의하거나 이론상으로) 확정할 수 있을 것이다. 예를 들어 자유 수소를 가지는 아미노 또는 하이드록시가 불포화 결합을 가지는 탄소 원

자(예컨대 올레핀)와 결합할 때, 치환은 불안정할 수 있다.

[0388] "약학 조성물"이란 용어는, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 생리학적/약학적으로 허용 가능한 염 또는 전구약물중 1개 이상과, 기타 화학적 성분, 예컨대 생리학적/약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 함유하는 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물의 용도는, 유기체로의 투여를 촉진하여, 활성 성분의 흡수를 가속화하고, 이로써 생물 활성을 발휘시키기 위함이다.

[0389] "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어는, 본 발명의 항체-약물 접합체의 염, 또는 본 발명에 기재된 화합물의 염을 지칭한다. 이러한 염은 포유동물 체내에서 사용될 때 안전하고 유효하며, 필요한 생물 활성을 보유한다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 아미노기를 포함하므로, 산과 염을 형성할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염의 비제한적 예로서는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오데이트, 설페이트, 비설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트, 아스코르베이트, 옥살레이트, 나이트레이트, 솔베이트, 하이드로포스페이트, 디하이드로포스페이트, 살리실레이트, 하이드로시트레이트, 타르트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 메실레이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트 및 *p*-톨루엔설포네이트를 포함한다.

[0390] "용매화물"이란 용어는, 본 발명의 리간드-약물 접합체 화합물과 용매 분자 1개 이상에 의해 생성된, 약학적으로 허용 가능한 용매화물을 지칭하는데, 여기서 용매 분자의 비제한적 예로서는 물, 에탄올, 아세토니트릴, 이소프로판올, DMSO 및 아세트산에틸을 포함한다.

[0391] "약물 담체"란 용어는, 약물이 인간의 체내에 도입되고, 인간의 체내 약물 분포가 약물의 방출율을 제어하며, 약물이 표적화된 장기에 전달되는 방식을 변경할 수 있는 시스템을 지칭한다. 약물 담체 방출 및 표적화 시스템은 약물의 분해와 소실을 감소시킬 수 있고, 부작용을 줄일 수 있으며, 생체내이용가능성을 개선할 수 있다. 예를 들어 담체로서 사용될 수 있는 중합체 계면활성제는 자체의 독특한 양친매성 구조로 말미암아 자가조립되어, 바람직한 예를 들자면 미셀, 마이크로에멀전, 겔, 액정 및 소포체와 같이 다양한 형태의 응집체로 형성될 수 있다. 응집체는 약물 분자를 캡슐화하는 역량을 가지고, 막에 대해 우수한 투과성을 가지므로, 월등한 약물 담체로서 사용될 수 있다.

[0392] "부형제"란 용어는, 주요 약물과는 별도로 약학 조성물에 첨가되는 것이다. 이는 또한 아주반트라 지칭될 수 있다. 예를 들어 정제의 경우에는 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제; 반고체 연고 및 크림 제제의 경우에는 베이스 부분; 액체 제형의 경우에는 보존제, 항산화제, 교정제, 향수, 공용매, 유화제, 가용화제, 등장성 조정제 및 착색제 등은 모두 부형제라 지칭될 수 있다.

[0393] 충전제라고도 지칭되는 "희석제"란 용어는, 주로 정제의 중량 및 용적을 증가시키는데 사용된다. 희석제의 첨가는 임의의 용적을 보장할뿐 더러, 주요 성분의 용량 편차를 감소시키고, 약물의 압축 성형성 등을 개선한다. 정제 형태중 약물이 유성의 성분을 함유하면, 흡수제는 반드시 유성의 성분을 흡수하여 "건조된" 상태를 유지하고, 정제의 제조를 가속화하도록 첨가되어야 한다.

[0394] 본 발명의 화합물은 1개 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있으므로, 거울상이성체와 부분입체이성체가 생성될 수 있다. 거울상이성체 및 부분입체이성체는 아미노산에 대한 (*R*)- 또는 (*S*)-와 같은 절대 입체화학, 또는 (*D*)- 또는 (*L*)-의 기타 부분입체이성체형태의 관점에서 정의될 수 있다. 본 발명은 가능한 모든 이성체뿐아니라, 이의 라세미 형태 및 광학적으로 순수한 형태를 포함한다. 광학적으로 활성인 (+) 및 (-), (*R*)- 및 (*S*)-, 또는 (*D*)- 및 (*L*)-이성체들은 키랄 신톤 또는 키랄 시약을 사용함으로써 제조될 수 있거나, 또는 크로마토그래피 및 분별결정화와 같은 종래의 방법을 사용함으로써 제조될 수 있다. 거울상이성체의 제조/분리를 위한 종래의 방법은 광학적으로 순수하고 적합한 전구체로부터의 키랄 합성 또는, 예를 들어 키랄 고성능액체크로마토그래피(HPLC)가 사용되는 라세미체(또는 염이나 유도체의 라세미체)의 해상(resolution)을 포함한다. 본원에 기재된 화합물이 올레핀 이중 결합 또는 기타 기하학적 비대칭 중심을 함유할 때, 이는, 달리 명시되지 않는 한, 화합물이 *E* 및 *Z* 기하학적 이성체 둘 다를 포함함을 의미한다. 더욱이 모든 호변이성체 형태도 또한 포함되도록 의도된다.

[0395] 본 발명의 화합물의 화학 구조에서, 결합 ""는 미지정 입체배열을 표시하는데, 즉 만일 키랄 이성체가 화학구조로 존재하면, 결합 ""는 "" 또는 ""일 수 있거나, 또는 "" 및 ""의 입체배열 둘 다를 동시에 함유한다.

[0396] "부분입체이성체"란, 동일 결합에 의해 결합된 동일 원자로 구성되되, 호환될 수 없는 3차원 구조가 상이한 화

합물을 지칭한다. 본 발명은, 서로 겹쳐질 수 없는 거울상인 부분입체이성체 쌍을 지칭하는 "거울상이성체"를 포함하여 다양한 입체이성체 및 이의 혼합물을 고려한다.

[0397] "호변이성체"란, 분자의 한 원자로부터 동일 분자의 또 다른 원자로 양자가 이동한 이성체를 지칭한다. 화합물들중 임의의 것의 호변이성체가 본 발명에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0398] 도 1은 시험 실시예 7에 있어 블랭크 비이클군과 상이한 시험 투여군에서 동물 체중의 변화 동향을 보여주는 그래프이다(x축: 일, y축: 체중).

도 2는 비이클군과 상이한 시험 약물 투여군들에서 동물 종양 부피의 변화 동향을 보여주는 그래프이다(x축: 일, y축: 종양 부피).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0399] 이하 실시예들은 본 발명을 추가로 설명하는 것이되, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

[0400] 본 발명의 실시예에서 조건이 명시되지 않은 실험 절차는, 일반적으로 종래의 조건이나 출발 재료 또는 시판제품 제작자에 의해 권장되는 조건에 따라 진행된다. 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *CurrentProtocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY]을 참조한다. 구체적인 출처가 표시되지 않은 시약들은 시판중인 종래의 시약들이다.

[0401] 화합물의 구조는 핵자기공명(NMR)분광분석법 및/또는 질량 분광도법(MS)에의해 결정하였다. NMR 이동(δ)은 10^{-6}(ppm) 단위로 제공된다. NMR 스펙트럼은 Bruker AVANCE-400 핵자기공명장치를 사용하여 측정하였는데, 이때 중수소함유 설폭시화디메틸(DMSO-d_6), 중수소함유 클로로포름($CDCl_3$) 및 중수소함유 메탄올(CD_3OD)은 확정 용매로서 사용하였고, 테트라메틸실란(TMS)은 내부 표준으로서 사용하였다.

[0402] 질량 스펙트럼은 Agilent 1200/1290 DAD-6110/6120 사중극자 MS 액체 크로마토그래피-질량 분광도 시스템(제조사: Agilent; MS 모델: 6110/6120 사중극자 MS), Waters ACQuity UPLC-QD/SQD(제작사: Waters; MS 모델: Water ACQuity Qda 검출기/Water SQ 검출기) 및 THERMO Ultimate 3000-Q Exactive(제작사: THERMO; MS 모델: THERMO Q Exactive)를 사용하여 측정하였다.

[0403] Agilent HPLC 1200DAD, Agilent HPLC 1200VWD 및 Waters HPLC e2695-2489 고압 액체 크로마토그래피를 사용하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였다.

[0404] Agilent 1260 DAD HPLC로 키랄 HPLC를 수행하였다.

[0405] HPLC 준비는 Waters 2545-2767, Waters 2767-SQ Detecor2, Shimadzu LC-20AP 및 Gilson GX-281 예비 크로마토그래피를 사용하여 수행하였다.

[0406] 키랄 준비는 Shimadzu LC-20AP 예비 크로마토그래프를 사용하여 수행하였다.

[0407] 신속한 준비를 위해서는 CombiFlash Rf200(TELEDYNE ISCO) 시스템을 사용하였다.

[0408] 박층 크로마토그래피(TLC) 분석을 위해서는 사양이 0.15 mm ~ 0.2 mm인 Huanghai HSGF254 또는 Qingdao GF254 실리카 겔 평판을 채택하였으며, TLC 분리 및 정제를 위해서는 0.4 mm ~ 0.5 mm인 것을 채택하였다.

[0409] 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피는, 일반적으로 담체로서 200 메쉬 ~ 300 메쉬 실리카 겔(Huanghai, Yantai)을 사용하였다.

[0410] 본원에 기재된 공지의 출발 재료는 당 분야에 공지된 방법을 사용하거나 이러한 방법에 따라 합성될 수 있었거나, 또는 ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Chembee Chemicals, 및 기타 제조사로부터 구입할 수 있었다.

[0411] 실시예에서 달리 명시되지 않는 한 반응은 아르곤 대기 또는 질소 대기에서 진행시켰다.

[0412] 아르곤 대기 또는 질소 대기에서 진행시켰다 함은, 아르곤 또는 질소 약 1 L를 함유하는 풍선에 반응 플라스크가 연결되어 있음을 의미한다.

[0413] 수소 대기에서 진행시켰다 함은, 수소 약 1 L를 함유하는 풍선에 반응 플라스크가 연결되어 있음을 의미한다.

[0414] Parr 3916EKX 수소화장치, Qinglan QL-500 수소화장치 또는 HC2-SS 수소화장치는 가압 수소화 반응에서 사용하였다.

[0415] 수소화 반응은, 보통 진공화와 수소 퍼징(purging)으로 이루어진 주기 3회로 이루어진다.

[0416] CEM Discover-S 908860 극초단파 반응기는 극초단파 반응에 사용하였다.

[0417] 실시예들에서 용액이란, 달리 명시되지 않는 한 수용액을 지칭한다.

[0418] 실시예들에서 반응 온도는 달리 명시되지 않는 한, 실온, 즉 20℃~ 30℃이었다.

[0419] 실시예들에서 반응의 과정을 모니터링하는 것은 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 수행하였다. 반응용 전개 용매, 컬럼 크로마토그래피 정제용 용리 시스템, 그리고 박층 크로마토그래피 시스템용 전개 용매 시스템 그리고 용매들의 용적비는 화합물 극성에 따라 조정하거나, 또는 트리에틸아민 및 아세트산과 같은 염기성 또는 산성 시약 소량을 첨가하여 조정하였다.

[0420] 본 발명의 항체 약물 접합체는 WO2020063676A에서 살펴볼 수 있으며, 유관 화합물들의 합성과 시험은 전체로서 본원에 참고로 제시되어 있다. 합성의 비제한적 예는 이하와 같이 제시된다:

[0421] 1. 항체의 제조

[0422] 실시예 1-1. 단백질 항원의 클로닝 및 발현

[0423] (경쇄 및 중쇄를 포함하는) 항체 및 항원은 당 분야에 공지된 중첩 연장 PCR 방법(overlap extension PCR method)에 의해 구성하였고, 중첩 연장 PCR에 의해 수득한 DNA 단편은 HindIII/BstBI 효소분해부위를 사용하여 발현 벡터 pEE6.4(Lonza Biologics)에 삽입하여, 293F 세포(Invitrogen, Cat# R790-07)내에서 발현시킴으로써, 재조합 단백질을 수득하였다. 수득한 재조합 단백질을 면역화 또는 스크리닝에 사용하였다. 인간 CD79B 유전자 서열은 NCBI(NP_000617.1)로부터 유래하였으며, 이의 세포외 영역(ECD)은 159개의 아미노산(Met1-Asp159)을 포함하였다

[0424] 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 인간 Fc 도메인의 융합 단백질(인간 CD79B ECD-hFc)의 아미노산 서열을 서열 번호 1에 보였다:

[0425] ARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSASGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK **(서열 번호 1)**

[0426] 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 His 태그의 융합 단백질(인간 CD79B ECD-His)의 아미노산 서열을 서열 번호 2에 보였다:

[0427] ARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSASGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEHHHHHH **(서열 번호 2)**

[0428] 실시예 1-2. 마우스 모노클로날 항체의 제조

[0429] 1. 마우스 면역화 및 혈청 역가 검출

[0430] 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 인간 Fc 도메인의 융합 단백질(인간 CD79B ECD-hFc)과, 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD) 및 His 태그의 융합 단백질(인간 CD79B ECD-His)을 면역원으로 채택하고, 복막내 주사 방법에 의해 Balb/c 및 SJL 마우스를 면역화하여 자극함으로써, 인간 CD79B 세포외 도메인(ECD)에 대한 항체를 생성하였다.

또한, 사이노몰거스 원숭이 CD79B 세포외 도메인 및 His 태그의 융합 단백질(사이노 CD79B ECD-His)을 면역원으로 채택하고, 복막내 주사 방법에 의해 SJL 마우스를 면역화하여 자극함으로써, 원숭이 CD79B 세포외 도메인(ECD)에 대한 항체를 생성하였다.

[0431] 실험 절차:

[0432] 1) 복막내 주사 면역화: 면역화 프로그램에 따른 면역화에 필요한 항원의 양을 산정하였다. 필요에 따라 단백질 항원을 PBS를 사용하여 대응 농도로 희석한 다음, 항원을 유화하였다. 유화한 항원과 아주반트 혼합물을 2.0 mL들이 멸균 시린지에 옮겨담고, 시린지 내부 공기 방울을 제거하였다. 마우스 꼬리는 오른손으로, 그리고 마우스 두경부 피부는 왼손 엄지와 검지로 조심스럽게 잡고, 복강을 위로 향하게 한 상태에서 마우스 우측 복부 주사 부위를 75% 알코올을 묻힌 솜뭉치로 닦았다. 우선 항원 의약품이 담긴 시린지 바늘 끝 부분을 위로 향하게 하며 기울인 다음, 마우스 머리는 아래로 향하게 한 상태에서 피부에 평행하게 꽂아넣어, 시린지를 마우스 복강에 대해 45도 각도로 하여 복강에 삽입한 채 항원과 아주반트의 혼합물을 천천히 주사하였다. 면역화를 완료한 후, 적어도 2시간 동안 관찰을 수행하였다.

[0433] 2) 마우스 혈청 수집: 각각의 마우스의 대응 혈청 튜브에 라벨을 붙이고, 마우스 귀 태그네일(tag nail)을 체크하였는데, 이 때 마우스를 한손으로 잡고, 마우스 안면 하악 정맥으로부터 전혈 약 100 μL를 채혈한 다음, 실온에 약 2시간 동안 방치한 후, 원심분리하여 원심분리 튜브 윗부분 혈청을 수집하였다. 혈청을 냉장고(4℃에 1주일 이내로 보관할 수 있었으며, 항체 역가 등과 같은 관련 검출값을 구하는데 사용할 수 있었다. 만일 혈청을 장기간 동안 보관하고자 한다면, 혈청을 -80℃의 냉장고에 넣어서, 잦은 동결과 해동을 피하도록 하였다.

[0434] 3) 면역화한 마우스 ELISA 혈청 역가 확정: 실험전 96웰 평판에, 웰과 상응하도록 라벨을 붙이고, 4℃ 냉장고에 밤새도록 넣어두어 1 μg/mL 항원(웰당 50 μL)으로 코팅하였다. 다음날, 전날에 코팅한 항원 평판을 꺼낸 다음, 평판 세척액(세정 용액 1× PBST)으로 1회 세척하였다. 세척이 끝난 후, 37℃에서 1시간 동안 1% BSA 차단 용액(1× PBST중 제조)으로 평판을 차단하였다. 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 다음, 평판에 검출할 혈청(상이한 희석 농도의 혈청)을 첨가하고 나서, 항온처리기에서 항온처리하였다(37℃1시간). 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 다음, 평판에 1:5000으로 희석한 염소 항마우스 2차 항체 100 μL를 첨가하고 나서, 항온처리기에서 항온처리하였다(37℃, 0.5시간). 평판을 세척하고 나서, TMB 발색 용액인 A 용액과 B 용액(1:1 비)을 취하여 발색을 진행시켰다. 1 N 염화수소산을 15분 동안 처리하여 발색 반응을 종결시켰다. 형광도 값을 Spectra Max M5 다기능 평판 판독기로 450 nm에서 판독하였다.

[0435] 4) 면역화한 마우스 FACS 혈청 역가 검정: 원심분리 후, DoHH2 세포 또는 원숭이 밀초혈액 단핵구 현탁액을 0.1% BSA 함유 PBS중에 재현탁하고 나서, 계수한 다음, 여기에 면역화한 마우스 군 각각의 시험 혈청을 첨가하고 나서, 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척한 다음, 여기에 항마우스 IgG(Fc 특이적)-FITC 2차 항체를 첨가한 후, 어두운 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척한 다음, 0.1% BSA 함유 PBS중에 가만히 재현탁한 후, 기계를 사용하여 검정하였다.

[0436] 면역화한 마우스에서 CD79B에 대한 특이적 항체를 상기 검정에 의해 제조하였는데, 이 마우스를 세포 융합에 사용하여, CD79B에 특이적인 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포주를 제조할 수 있었다.

[0437] 2. 하이브리도마 제조 및 항체 스크리닝

[0438] 세포 융합은 마우스 림프구 및 골수종 세포 SP2/0(ATCC, CCL-121™)이 자발적 유도 또는 인위적 유도하에 하이브리도마 세포와 융합하는 것을 촉진하기 위한 것이며, 하이브리도마 세포는 항체 분비 기능을 가지고, 무한 증식할 수 있다. 면역화한 마우스의 림프구 및 골수종 세포를 전기세포융합에 의해 융합한 다음, 후속 항체 스크리닝을 위해 사용하였다.

[0439] 1) 전기세포융합 실험: 융합 1주전, 10% DMEM 배지중에서 SP2/0 세포를 증식시켰다. 사멸시킨 마우스의 비장 및 림프절을 생물안전작업대에서 골라낸 다음, 세척하고 나서, 페트리 접시에서 분쇄하여, 림프구를 수집하였다. SP2/0 및 림프구를 안분 비례로 혼합한 다음, 전기세포융합 장치를 켜고, 융합이 수행되도록 프로그래밍하였다. 융합후, 세포를 96웰 평판에 도말한 다음, 항온처리기(37℃5% CO_2)에서 밤새도록 배양하고 나서; 세포의 상태를 매일 관찰하였으며, 세포 융합율(cell fusion rate)은 융합한 지 5일 후에 산정하였다. 융합한 하이브리도마 세포를 융합 후 9일 ~ 14일차에 스크리닝하였으며, 양성 웰내 세포를 선택하여 24웰 평판내 증폭 배양을 수행하였다.

[0440] 2) 한계희석법(limiting dilution method)에 의한 서브클로닝: 서브클로닝할 세포주를 24웰 배양 웰내에서 재현

탁한 다음, 계수하였다. 세포 변종 각각의 세포 농도를 5개 ~ 10개 세포/mL로 희석한 다음, 희석한 세포 현탁액을 15 cm 1회용 페트리 접시에 첨가하였으며, 96웰 배양 평판내 각각의 웰에 현탁액 0.2 mL를 첨가하여, 1개 ~ 2개의 세포가 함유되도록 만들었다. 세포를 도말한 96웰 평판을 항온처리기(37℃5% CO_2)에서 배양하였다. 7일 ~ 10일후, 서브클로닝 평판을 검출하였으며, 세포의 성장 조건에 따라 스크리닝하였고, 24웰중 양성 클론을 선택하여 추가의 양성 확인을 도모하였다.

[0441] 3) ELISA 스크리닝: 실험전 96웰 평판에, 웰과 대응하여 라벨을 붙인 다음, 냉장고(4℃내에서 밤새도록 웰당 1 μg/mL 항원(50 μL)로 코팅하였다. 그 다음날, 전날에 코팅한 항원 평판을 꺼낸 다음, 평판 세척액(세정 용액 1× PBST)으로 1회 세척하였다. 세척이 끝난 후, 37℃에서 1시간 동안 1× PBST중에 제조한 1% BSA 차단 용액으로 평판을 차단하였다. 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 후, 검출할 세포 상청액 50 μL를 평판에 첨가하고 나서, 37℃항온처리기내에서 1시간 동안 항온처리하였다. 평판을 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 다음, 여기에 염소 항마우스 2차 항체(1:5000으로 희석) 100 μL를 첨가하고 나서, 항온처리기(37℃내에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. 평판을 세척한 다음, TMB 발색 용액인 A 용액 및 B 용액을 1:1의 비율로 취하여 발색을 진행시켰다. 1 N 염화수소산을 15분 동안 처리하여 발색 반응을 종결시켰다. 형광도 값을 Spectra Max M5 다기능 평판 판독기로 450 nm에서 판독하였다.

[0442] 4) FACS 스크리닝: 원심분리후, DOHH2의 세포 현탁액을 0.1% BSA 함유 PBS중에 재현탁하고 나서, 계수한 다음, 시험 세포 상청액을 첨가한 후, 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척한 다음, 여기에 항마우스 IgG(Fc 특이적)-FITC 2차 항체를 첨가하고 나서, 어두운 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척한 다음, 0.1% BSA 함유 PBS중에 가만히 재현탁하고 나서, 기계를 사용하여 검정하였다.

[0443] 5) 하이브리도마 양성 클론의 동정: 마우스 비장세포 융합 및 서브클론 스크리닝후, 인간 CD79B 항원에 대한 특이적 항체 다수를 수득하여, ELISA 및 FACS에 대해 최고의 결합을 보이는 하이브리도마 변종 17개로부터 항체를 생산 및 정제하였다. 항인간 CD79B 하이브리도마 양성 세포의 배양 상청액을 대상으로 한 ELISA 검정 결과를 표 1에 보였다. 항인간 CD79B 하이브리도마 양성 클론 세포 배양 상청액의 FACS 검정 결과를 표 2에 보였다. 이러는 와중에, 원숭이 CD79B 항원에 대한 특이적 항체를 수득하였으며, ELISA 및 FACS에 대해 최고의 결합을 보이는 하이브리도마 변종 4개를 취하여 항체의 제조 및 정제를 도모하였다. 양 검정에서 mIgG를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0444] 표 1

항인간 CD79B 하이브리도마 양성 클론의 ELISA 검정 결과		
항체 번호	클론 번호	결과(OD450)
음성 대조군	mIgG	0.05
mAb015	83B2G2	3.41
mAb017	86F11F6	3.80

[0445]

[0446] 표 2

항인간 CD79B 하이브리도마 양성 클론의 FACS 검정 결과		
항체 번호	클론 번호	형광도 평균값
음성 대조군	mIgG	58
mAb015	83B2G2	10036
mAb017	86F11F6	8132

[0447]

[0448] 3. 마우스 모노클로날 항체의 제조, 정제 및 동정

[0449] 1) 마우스 모노클로날 항체의 제조 및 정제:

[0450] 항체 제조에 필요한 하이브리도마 세포를 70% 이상 성장하였는지, 또는 우수한 세포 상태를 보이는지 현미경으

로 관찰하였으며, 세포를 수집하여 Countstar IC1000형 세포 계수기로 계수하였다. 준비한 배지를 사용하여 세포의 농도를 1 ~ 5 × 10^5개 세포/mL로 조정한 다음, 롤러 보틀(Roller Bottle)에 옮겨담았다. 옮긴 세포가 담긴 이 롤러 보틀을 롤러 보틀 항온처리기에 넣어 37℃에서 10일 ~ 15일 동안 배양하였으며, 세포의 배양 조건을 매일 관찰하면서 배양 용액이 오렌지색을 띠거나 투명해졌을 때 정제를 위해 세포를 취하였다. 종래의 방법에 따라 단백질 A 컬럼을 사용하여 세포 상청액을 대상으로 항체 정제를 수행하였다.

[0451] 2) 항인간 CD79B 마우스 모노클로날 항체에 대한 ELISA 검정: 실험전 96웰 평판에, 웰에 대응하여 라벨을 붙인 다음, 냉장고(4℃에서 웰당 1 μg/mL 항원(50μL)으로 밤새도록 코팅하였다. 그 다음날, 전날에 코팅한 항원 평판을 꺼낸 다음, 평판 세척액(세정 용액 1× PBST)으로 1회 세척하였다. 세척이 끝난 후, 37℃에서 1시간 동안 1× PBST중에 제조한 1% BSA 차단 용액으로 평판을 차단하였다. 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 다음, 평판에 1:10 희석 항체 50 μL(100 nM)를 첨가하여, 항온처리기(37℃)에서 1시간 동안 항온처리하였다. 평판을 1× PBST 세정 용액으로 3회 세척한 다음, 여기에 1:5000 희석 염소 항마우스 2차 항체 100 μL를 첨가하고 나서, 항온처리기(37℃에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. 평판을 세척하고 나서, TMB 발색 용액인 A 용액과 B 용액(1:1 비)을 취하여 발색을 진행시켰다. 1 N 염화수소산을 15분 동안 처리하여 발색 반응을 종결시켰다. 형광도값을 Spectra Max M5 다기능 평판 판독기로 450 nm에서 판독하였다. 이 가운데, mAb015 및 mAb017을 포함하여 항인간 CD79B 마우스 모노클로날 항체 4개는 최대 ELISA 결합능을 보였다.

[0452] 3) 항인간 CD79B 마우스 모노클로날 항체에 대한 FACS 검정: 원심분리후, DOHH2의 세포 현탁액을 0.1% BSA 함유 PBS중에 재현탁하고 나서, 계수한 다음, 여기에 1:10 희석 항체 100 μL(100 nM)를 첨가한 다음, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척하고 나서, 여기에 항마우스 IgG(Fc 특이적)-FITC 2차 항체를 첨가한 다음, 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 3회 세척한 다음, 0.1% BSA 함유 PBS중에 가만히 재현탁한 후, 기계를 사용하여 검정하였다. 이 가운데, mAb015 및 mAb017을 포함하여 항인간 CD79B 마우스 모노클로날 항체 4개는 최고의 FACS 결합능을 보였다.

[0453] 4) 항인간 CD79B 마우스 모노클로날 항체에 대한 SPR 검정: 항인간 CD79B 항체의, 이의 항원인 인간 CD79B-His에 대한 친화성을 표면플라스몬공명(SPR) 기술에 의해 검정하였다. 항원인 인간 CD79B-His 단백질을 CM5칩상에 부동화하였다. 커플링 수준을 100 RU로 설정하였다. 전개 완충제는 HBS-EP+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20)였다. 희석한 항체를, 실험 채널 및 대조군 채널을 통해 30 μL/분의 유량으로 3분 동안 흘려보내고 나서, 5분 동안 해리시켰다. 그 다음, 재생 완충제(10 mM 글리신, pH 1.5)를 30 μL/분의 유량으로 30초 동안 전개시켰다. Biacore 8K 평가 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0454] 실시예 1-3. 마우스 모노클로날 항체 가변 영역 아미노산의 서열결정

[0455] 실시예 1-2에서 수득한 것으로서, 친화성이 큰 하이브리도마 모노클로날 세포주를 대상으로 가변 영역 아미노산 서열결정을 실시한 다음, 인간 마우스 키메라 항체(cAb)의 재조합 발현을 진행시켰으며, 이후 항체 동정을 실시하였다. 역전사 PCR에 의해 항체 유전자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시키고 나서, 서열결정을 위해 벡터에 결합시킴으로써, 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄 서열을 수득하였다. 실시예 2에서 잘 활성화시킨 단일 세포 변종의 세포성 총 RNA를, RNA 정제 키트를 사용하여(Qiagen, Cat# 74134, 단계 진행은 매뉴얼 참조) 처음 추출하였다. 그 다음, Invitrogen사 cDNA 합성 키트(Cat# 18080-051)를 사용하여 cDNA 단일 가닥, 즉 Oligo-dT 프라이머 cDNA 역전사물을 제조하였다. 주형으로서 단일 가닥을 사용하고 PCR 방법을 채택함으로써 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열을 합성하였으며, PCR 생성물을 TA 벡터인 pMD-18T에 클로닝한 다음, 서열결정 업체로 보냈다. 항체의 경쇄 및 중쇄 서열을 수득하여 발현 벡터에 클로닝한 다음(실시예 1-1 참조), 재조합 모노클로날 항체를 발현시켰으며, 활성을 인증한 후(실시예 1-2 참조), 인간화를 수행하였다.

[0456] Chothia 번호메김 체계를 사용하여 항인간 CD79B 항체 VH/VL CDR의 아미노산 잔기를 동정하여 주석을 달았다.

[0457] 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb015의 서열:

[0458] 중쇄 가변 영역:

[0459] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGSSFTSYGINWVKQRTGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAKGDLGDFDYW
GQGTTLTVSS **(서열 번호 3)**

[0460] 경쇄 가변 영역:

[0461] DFLMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKL EIK **(서열 번호 4)**

[0462] 마우스 하이브리도마 세포 모노클로날 항체 mAb017의 서열:

[0463] 중쇄 가변 영역:

[0464] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYGINWVKQRTGQGLEWIGEIYP RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSDYDGDFA YWGQGTLVTVSA **(서열 번호 5)**

[0465] 경쇄 가변 영역:

[0466] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTQ LEIK **(서열 번호 6)**

[0467] 마우스의 CDR 서열을 표 3에 보였다.

[0468] 표 3

[0469]

마우스 항인간 CD79B 항체의 CDR 서열		
항체 CDR	**mAb015**	**mAb017**
중쇄 CDR1	GSSFTSY**(서열 번호 7)**	GYTFTTY**(서열 번호 13)**
중쇄 CDR2	FPRSGN**(서열 번호 8)**	YPRSGN**(서열 번호 14)**
중쇄 CDR3	GDLGDFDY**(서열 번호 9)**	GSDYDGDFAY**(서열 번호 15)**
경쇄 CDR1	RSSQSIVHSDGNTYFE **(서열 번호 10)**	RSSQSIVHHDGNTYLE **(서열 번호 16)**
경쇄 CDR2	KVSNRFS**(서열 번호 11)**	KVSNRFS**(서열 번호 17)**
경쇄 CDR3	FQGSHVPWT**(서열 번호 12)**	FQGSHVPWT**(서열 번호 18)**

[0470] 실시예 1-4. 항인간 CD79B 항체의 인간화

[0471] 실시예 1-3에서 수득한 마우스 항CD79B 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄 서열에 대한 항체 데이터베이스 기반 상동성 비교를 수행한 후, 인간화 항체 모델을 확립한 다음, 모델 선택 역돌연변이에 따라 최적의 인간화 항 CD79B 모노클로날 항체를 바람직한 분자로 스크리닝하였다. 마우스 Fab에 대해 공개된 것으로서, 수득한 마우스 후보 분자의 상동성과 유사한 상동성을 가지는 결정 구조 모델 데이터베이스(예컨대 PDB 데이터베이스)를 검색함으로써 본 방법을 개시하였으며, 고해상도(예컨대 2.5Å 미만)로 Fab 결정 구조를 선택하여 마우스 Fab 모델을 확립하였다. 마우스 항체의 경쇄 및 중쇄 서열을 모델내 서열과 비교하였는데, 마우스 항체 구조 모델을 수득하기 위하여 모델내 마우스 항체의 서열과 일치하는 서열, 그리고 불일치하는 아미노산은 발생가능한 역돌연변이 부위일 수 있었다. 마우스 항체 구조 모델을 Swiss-pdb 뷰어 소프트웨어로 전개하여, 에너지를 최적화(최소화)하였다. CDR을 제외하고 모델내 상이한 아미노산 위치를 역돌연변이시키고 나서, 이로부터 생성된 돌연변이 항체(인간화 항체)를 인간화 이전의 항체와 비교하여 활성 검출을 도모하였다. 활성이 우수한 인간화 항체를 비축하였다. 그 다음, CDR 영역을 최적화(당화, 탈아미드화, 산화 부위 등의 회피)하였다. 유전자 클로닝 및 재조합 발현 방법을 사용하여 항체를 클로닝한 다음 발현시키고 나서, 정제하였으며, 마지막으로 최대 활성을 보이는 인간화 항체 hAb015-10 및 hAb017-10을 ELISA, FACS 및 SPR 등의 검정으로 선택하였다.

[0472] 인간화 항체 hAb015-10 및 hAb017-10의 서열을 이하에 보였다:

[0473] hAb015-10 인간화 항체 중쇄:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCAKGDLGDFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
[0474] LHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 19)**

[0475] hAb015-10 인간화 항체 경쇄:

DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
[0476] EC **(서열 번호 20)**

[0477] hAb017-10 인간화 항체 중쇄:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYDGDFA
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
[0478] HEALHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 21)**

[0479] hAb017-10 인간화 항체 경쇄:

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
[0480] EC **(서열 번호 22)**

[0481] 실시예 1-5. TROP-2가 다량 발현되는 세포주의 구성

[0482] pCDH-hTROP-2 렌티바이러스 발현 벡터 플라스미드, pVSV-G 및 pCMV-dR8.91 렌티바이러스계 팩키징(packaging) 벡터를, 리포펙타민 3000 형질감염 시약을 사용하여 바이러스 팩키징 세포 293T에 형질감염시켜 도입하였다. 바이러스를 함유하는 배지 상청액을 수집한 다음, 여과하고 나서, 초고속으로 원심분리하였다. 중국햄스터난소세포 CHO-K1이 농축 바이러스로 감염될 수 있도록 허용한 다음, 2주 ~ 3주 동안 퓨로마이신을 사용하여 스크리닝한 후, FACS 단일 세포 분류를 수행하였다.

[0483] FACS에 의해 확정되는, 렌티바이러스에 감염된 CHO-K1 세포 표면상 TROP-2 발현 수준에 따라, TROP-2가 다량 발현되는 CHO-K1/hTROP-2 모노클로날 세포 변종을 선택하였다.

[0484] TROP-2의 아미노산 서열(유전자은행: NP_002344.2)은 이하와 같다:

MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLR
HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
AGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKE
PSL **(서열 번호 35)**

[0485]

[0486] TROP-2-His의 아미노산 서열:

MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLR
HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
AGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKE
PSLHHHHHH **(서열 번호 36)**

[0487]

[0488] 실시예 1-6. 항인간 TROP-2 모노클로날 항체의 제조

[0489] WO03074566에 개시된 방법에 따라 본 발명의 항인간 TROP-2 모노클로날 항체를 제조한 후, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하고 hRS7의 항체 가변 영역 유전자를 주형으로 삼아 CDR을 대상으로 부위 돌연변이 변형 디자인을 수행하였다. 분자 클로닝을 통해 항체 가변 영역 유전자를 단백질 발현 벡터 Phr-IgG(신호 펩티드 및 불변 영역 유전자(CH1-Fc/CL) 단편 함유)에 삽입하고 나서, HEK293 세포 및 Expi-CHO-S 세포에서 발현시켰다. 종래의 방법에 따라 항체 정제를 수행하였다. CHO-K1 세포 및 huTROP-2 단백질(His27-Thr274 승인번호 NP_002344.2) 과발현 huTROP-2 단백질을 사용하여 활성 인증을 수행하였으며, 표적 결합 활성이 더 우수한 항체를 선택하였는데, 이때 PD3의 가변 영역 서열은 이하와 같다:

[0490] PD3 중쇄 가변 영역:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGSSY
WYFDVWGQGTLVTVSS **(서열 번호 29)**

[0491]

[0492] PD3 경쇄 가변 영역:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK
(서열 번호 30)

[0493]

[0494] 주의: 밑줄친 부분은 Kabat 번호메김 체계에 따라 확정된 CDR 영역이다.

[0495] 표 4

PD3 항체의 CDR 영역	
항체	**PD3**
중쇄 CDR1	NYGMN**(서열 번호 23)**
중쇄 CDR2	WINTYTGEPTYTQDFKG**(서열 번호 24)**
중쇄 CDR3	GGFGSSYWYFDV**(서열 번호 25)**
경쇄 CDR1	KASQDVSIAVA**(서열 번호 26)**
경쇄 CDR2	SASYRYT**(서열 번호 27)**
경쇄 CDR3	QQHYITPLT**(서열 번호 28)**

[0496]

[0497] 인간 IgG1, IgG2, IgG4의 불변 영역 및 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 항체 중쇄 불변 영역을 선택할 수 있었으며, 인간 κ 및 λ 사슬의 경쇄 불변 영역 및 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 항체의 경쇄 불변 영역을 선택할 수 있었다. 예시적으로 항체의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 11에 제시된 서열을 가지는 인간 IgG1의 불변 영역으로부터 선택하였고, 항체의 경쇄 불변 영역은 서열 번호 12에 제시된 서열을 가지는 인간 κ 사슬의 불변 영역으로부터 선택하였다.

[0498] 인간 IgG1 중쇄 불변 영역:

[0499] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK **(서열 번호 31)**

[0500] 인간 κ 경쇄 불변 영역:

[0501] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(서열 번호 32)

[0502] 예시적으로, 전술된 경쇄/중쇄 불변 영역을, 전술한 PD3 항체의 가변 영역과 합하여, 완전 항체를 형성하였는데, 이 완전 항체의 경쇄/중쇄 서열은 이하와 같다:

[0503] PD3 중쇄:

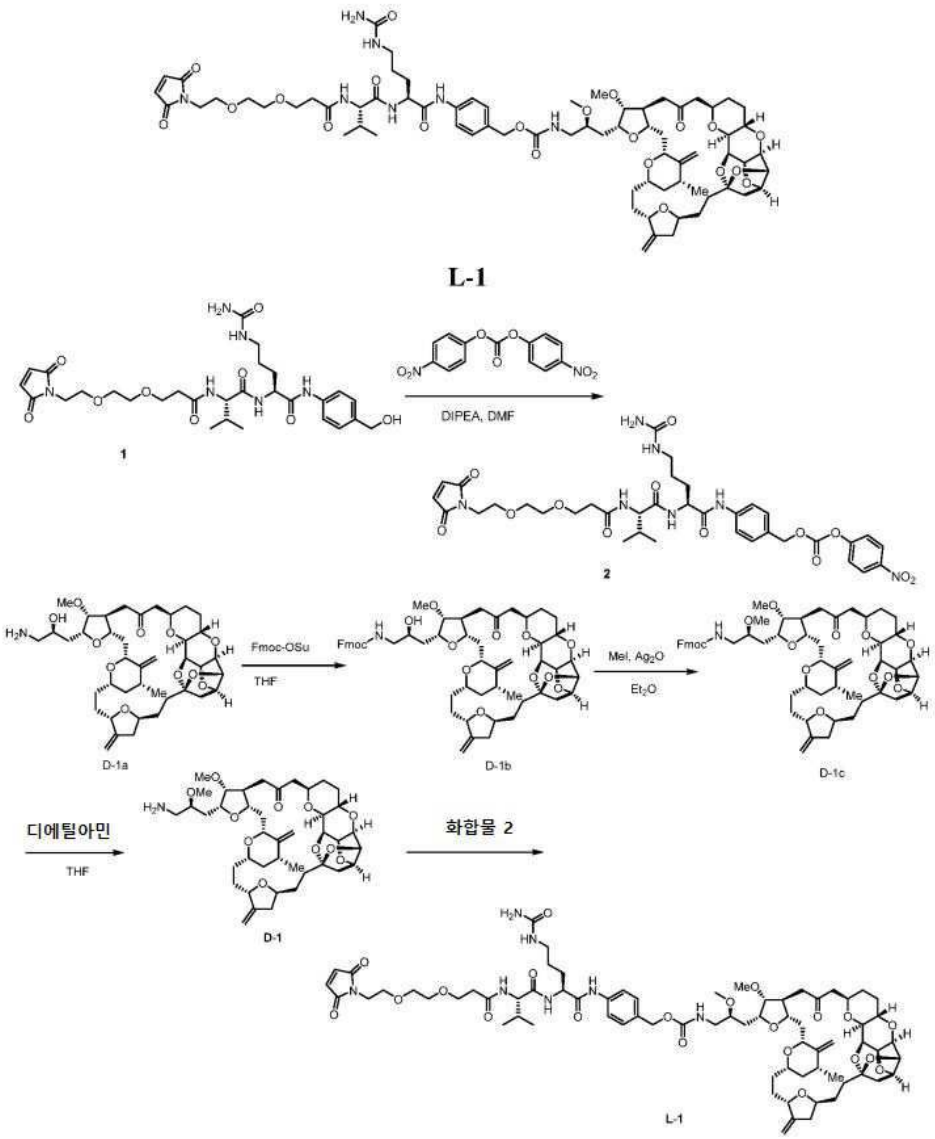
[0504] EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGSSY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **(서열 번호 33)**

[0505] PD3 경쇄:

[0506] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(서열 번호 34)

[0507] 2. 화합물의 제조

[0508] 실시예 2-1: 화합물 **L-1**의 합성



[0509]

[0510] 단계 1: 화합물 **2**의 제조

[0511] 화합물 **1**(50 mg, 0.08 mmol, WO2017151979에 개시된 방법을 참고하여 제조)을 얼음수조내 *N*,*N*-디메틸포름아미드 1.5 mL에 용해하고 나서, 반응계에 DIPEA(*N*,*N*-디이소프로필에틸아민, 18 mg, 0.14 mmol)를 첨가한 후, 비스(*p*-니트로페닐)카보네이트(49 mg, 0.16 mmol)를 첨가하였다. 그 다음, 혼합물을 실온에서 교반한 다음, 여기에 메틸 *tert*-부틸에테르 20 mL를 첨가하여, 20분 동안 교반한 후, 여과하여, 건조한 결과, 고체 화합물 **2** 36 mg을 수득하였다.

[0512] LC/MS(ESI): m/z 784.1 $[M+H]^+$.

[0513] 단계 2: 화합물 **D-1b**의 제조

[0514] 화합물 **D-1a**(에리불린, ZL201010236637.2에 기재된 바와 같이 제조)(72.91 mg, 0.1 mmol)을 얼음수조내 테트라하이드로푸란 10 mL중에 용해한 다음, 반응계에 Fmoc-OSu(플루오레닐메톡시카보닐숙신이미드, 41 mg, 0.12 mmol)를 첨가한 후, 반응이 종결될 때까지 실온에서 교반하였다. 계를 감압하에 농축한 다음, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0515] 단계 3: 화합물 **D-1c**의 제조

[0516] 상기 단계에서 수득한 미정제 화합물 **D-1b**를 무수 에테르 10 mL중에 용해한 다음; 반응계에 산화은(34.8 mg, 0.15 mmol)을 첨가한 후, 요오드화메틸(28.4 mg, 0.2 mmol)을 첨가하고 나서, 반응이 종결될 때까지 실온에서

교반하였다. 반응 혼합물을 여과한 후, 감압하에 농축하여, 미정제 생성물을 수득하였는데, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0517] 단계 4: 화합물 **D-1**의 제조

[0518] 상기 단계에서 수득한 미정제 화합물 **D-1c**를 테트라하이드로푸란 10 mL에 용해한 다음; 반응계에 디에틸아민 2 mL를 첨가한 후, 반응이 종결될 때까지 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여, 미정제 생성물을 수득하고 나서, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 디클로로메탄/아세트산에틸/석유 에테르)로 정제한 결과, 표적 화합물 **D-1** 3 mg을 수득하였다.

[0519] LC/MS(ESI): m/z 744.2 $[M+H]^+$.

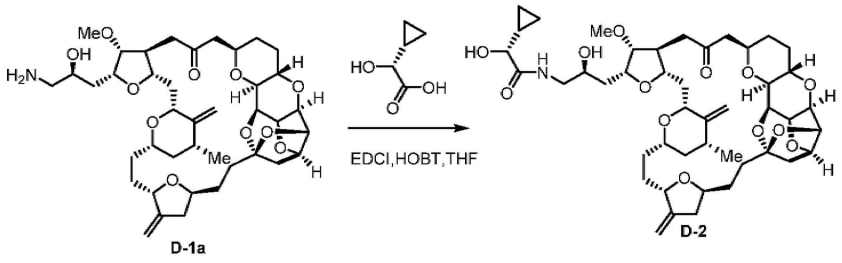
[0520] 단계 5: 화합물 **L-1**의 제조

[0521] 화합물 **D-1**(13.5 mg, 0.018 mmol)을 DMF 1.5 mL에 용해하고 나서; 반응계에 DIPEA(7 mg, 0.054 mmol)를 첨가한 다음, 화합물 **2**(18 mg, 1.3 mmol)를 일부 첨가하였다. 반응이 실질적으로 종료될 때까지 반응 혼합물을 교반하고 나서, 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였다. 미정제 생성물을 예비 HPLC(컬럼: Welch XTimate C18(5.0 μm × 30.0 × 150 mm), 이동상: A-물(0.1% 포름산): B-아세토니트릴, 구배 용리 = 70:30 → 5:95(16분, 유량: 30.0 mL/분))로 분리한 결과, 화합물 **L-1**(순도 96.95%)을 6.5 mg 수득하였다.

[0522] LC/MS(ESI): m/z 1388.3 $[M+H]^+$.

[0523] ^{1}HNMR($CDCl_3$, 400M) δ 0.85~0.90(m, 3H), 0.93~1.00(m, 3H), 1.08-1.10(m, 3H), 1.20~1.50(m, 15H), 1.75~2.04(m, 6H), 2.13~2.55(m, 16H), 2.70~2.77(m, 1H), 2.80~2.96(m, 2H), 3.16~3.97(m, 20H), 3.99~4.39(m, 8H), 4.60~4.80(m, 6H), 4.88~5.10(m, 5H), 5.24~5.37(m, 4H), 6.71(s, 2H), 7.03(d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.18~7.30(m, 3H), 7.63(d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.92(bs, 1H).

[0524] 실시예 2-2: 화합물 **D-2**의 합성



[0525]

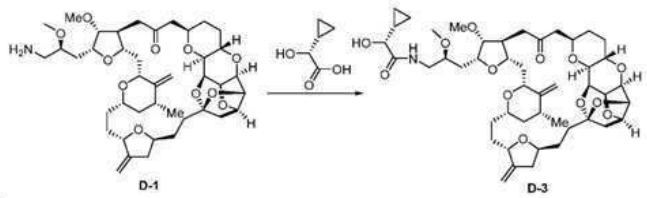
[0526] (*R*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산(4.7 mg, 0.04 mmol, 1.5 eq)을 반응 플라스크에 첨가하고 나서, 여기에 THF를 첨가하였다. 혼합물을 교반하여 용해하였으며, 이를 얼음수조에서 냉각하였다. 반응계에 EDCI HCl(8.0 mg, 0.04 mmol, 1.5 eq, 1-에틸-3(3-디메틸프로필아민)카보디이미드 하이드로클로라이드) 및 HOBT(5.4 mg, 0.04 mmol, 1.50 eq, 1-하이드록시벤조트리아졸)을 첨가하고 나서, 화합물 **D-1a**(20 mg, 0.027 mmol, 1.0 eq)를 첨가한 다음, 마지막으로 DIPEA(10.5 mg, 0.08 mmol, 3.0 eq)를 첨가하였다. 첨가를 종결한 후, 반응계를 실온(20℃으로 승온시키고 나서, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 교반한 후, 물 2 mL를 첨가하여 반응을 급랭시켰다. 반응 혼합물을 아세트산에틸로 추출하였으며(2 × 5 mL), 유기상들을 합한 다음, 무수 황산나트륨 상에서 건조하고 나서, 여과 및 감압하에 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였는데, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르)로 정제한 결과, 화합물 **D-2**(순도 98%) 6.0 mg을 수득하였다.

[0527] MS: 827.8$[M+H]^+$.

[0528] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ6.82(s, 1H), 5.08(s, 1H), 4.93(s, 1H), 4.89(s, 1H), 4.81(s, 1H), 4.70(t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.61(t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.42 - 4.25(m, 3H), 4.23 - 4.16(m, 1H), 4.12(s, 1H), 4.03(d, *J* = 9.3 Hz, 3H), 4.02 - 3.87(m, 3H), 3.82(d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.78 - 3.70(m, 3H), 3.58(dd, *J* = 50.7, 8.9 Hz, 4H), 3.43(s, 3H), 3.32 - 3.23(m, 2H), 2.88(d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 2.72(dd, *J* = 16.0, 10.0 Hz, 1H), 2.46(d, *J* = 13.9 Hz, 4H), 2.33(d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 2.19(dd, *J* = 21.4, 14.3 Hz, 4H), 2.08(s, 1H), 1.97(ddd, *J* = 13.6, 9.4, 4.7 Hz, 5H), 1.44(d, *J* = 11.5 Hz, 3H), 1.27(d, *J* = 12.2 Hz, 4H), 1.10(d, *J* =

6.2 Hz, 3H), 0.68 - 0.45(m, 4H).

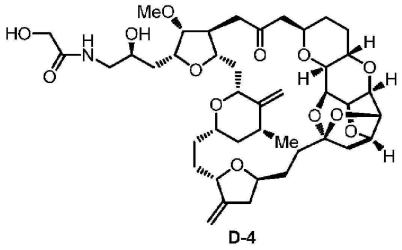
[0529] 실시예 2-3: 화합물 **D-3**의 합성

[0530] 

[0531] 질소 대기중에 실온에서 화합물 **D-1**(22 mg, 0.03 mmol) 및 (*R*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산(7.0 mg, 0.06 mmol)을 DCM 2 mL로 용해하고 나서; 반응 혼합물에 Et_3N(21 μL, 0.15 mmol) 및 DMTMM(20.3 mg, 0.069 mmol, 4-(4,6-디메톡시트리아진-2-일)-4-메틸모폴린 하이드로클로라이드)을 이 순서로 첨가한 다음, 실온에서 밤새도록 교반하였다. 반응이 종결된 후, H_2O(2 mL)를 첨가하여 반응을 급랭시키고 나서, 반응 혼합물을 DCM으로 추출하였으며(2 mL × 3), 유기상을 감압하에 농축하였다(조 온도 30℃잔류물을 실리카 겔 컬럼크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르)로 정제한 결과, 화합물 **D-3**(18 mg, 순도 95%)을 수득하였다.

[0532] MS: 863.8 $[M+Na]^+$.

[0533] 실시예 2-4: 화합물 **D-4**의 합성

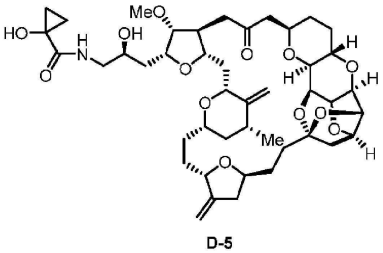
[0534] 

[0535] 실시예 2-2를 참고하되, 단 (*R*)-2-사이클로프로필-2-글리콜산을 글리콜산으로 바꾸어 화합물 **D-4**를 수득하였다.

[0536] MS: 787.82 $[M+H]^+$.

[0537] ^{1}HNMR($CDCl_3$, 400M):0.86~0.90(m, 1H), 1.04~1.13(m, 4H), 1.22~1.41(m, 4H), 1.71~1.74(m, 3H), 1.94~2.00(m, 5H), 2.15~2.22(m, 8H), 2.48(S, 3H), 2.71~2.75(m, 2H), 2.87~2.89(m, 2H), 3.26~3.31(m, 2H), 3.43(S, 3H), 3.53~3.55(m, 1H), 3.64~3.70(m, 2H), 3.74(s, 1H), 3.80~3.84(m, 1H), 3.90~4.05(m, 4H),4.12(s, 3H), 4.18~4.20(m,1H), 4.26~4.39(m, 3H), 4.61(t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.619(t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.82(s, 1H), 4.82(s, 1H), 4.88(s, 1H), 4.93(s, 1H), 5.08(s, 1H),6.89(m, 1H).

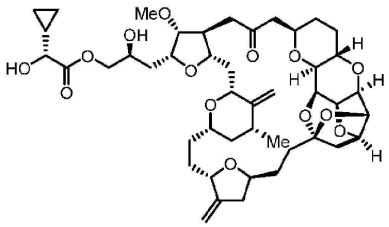
[0538] 실시예 2-5: 화합물 **D-5**의 제조

[0539] 

[0540] 실시예 2-2를 참고하되, 단 (*R*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산을 1-하이드록시사이클로프로판-1-카복실산으로 바꾸어 화합물 **D-5**를 수득하였다.

[0541] MS: 835.7 $[M+Na]^+$.

[0542] 실시예 2-6: 화합물 **D-6**의 합성



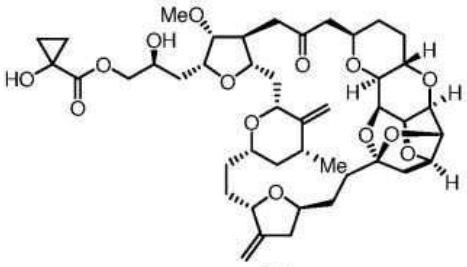
D-6

[0543]

[0544] 실시예 2-2를 참고하되, 출발 물질 (*R*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산 및 E1-30(문헌(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(2004) 5551-5554)에 따라 합성 및 수득)을 사용하여 화학식 D-6의 화합물을 제조하였다.

[0545] MS: 850.64 $[M+Na]^+$.

[0546] 실시예 2-7: 화합물 **D-7**의 합성



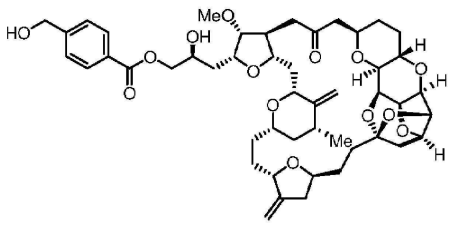
D-7

[0547]

[0548] 실시예 2-2를 참고하되, 출발 물질 1-하이드록시사이클로프로판-1-카복실산 및 E1-30(문헌(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(2004) 5551-5554)에 따라 합성 및 수득)을 사용하여 화학식 D-7의 화합물을 제조하였다.

[0549] MS: 836.73 $[M+Na]^+$.

[0550] 실시예 2-8: 화합물 **D-8**의 합성



D-8

[0551]

[0552] 실시예 2-2의 방법을 참고하되, 출발 물질 *p*-하이드록시에틸벤조산 및 E1-30을 사용하여 화학식 D-8의 화합물을 제조하였다.

[0553] MS: 886.75 $[M+Na]^+$.

[0554] 시험 실시예 1: 시험관내 세포독성 활성 스크리닝

[0555] 1.1 원리 및 방법

[0556] 실험에서 ATP 함량을 검출하기 위해 CTG를 사용하였으며, 종양 세포의 생존 조건을 반영시켰다. 상이한 밀도로 세포를 접종하고, 3일 및 5일 동안 세포를 배양함으로써 IC_{50} 및 최고 억제율을 기반으로 최종 배양 조건을 처음 확정하였다. 그 다음, 이 조건에 따라 독소 분자의 사멸 효과를 검정하였다.

[0557] 1.2. 세포주의 선택

[0558] 실험의 목적에 따라 유방암 및 NSCLC와 같은 2가지 질병 모델을 선택하였으며, 스크리닝을 위해 SKBR3 종양 세포(HER2+, ATCC, Cat# HTB-30), MDA-MB-468(HER2-, ATCC, Cat# HTB-132) 및 A549(인간 비소세포폐암 세포, ATCC, Cat# CCL-185)를 선택하였다.

[0559] 1.3. 세포 배양 조건의 결정

[0560] 1) 세포 배양액: A549, SK-BR-3 및 MDA-MB-468 세포를 Ham F-12K(Kaighn's) 배지(Gibco, 21127030) 및 McCoy's 5A 배지(ThermoFisher, Cat# 16600108) 및 Leibovitz L-15 배지(ThermoFisher, Cat# 11415-114)(10% FBS(Gibco, 10099-141) 함유) 각각에서 배양하였다.

[0561] 2) 세포 도말: A549 세포를 트립신으로 분해한 다음, 상기 배지로 세포를 종결시킨 후, 4.3 × 10^5개 세포, 7.2 × 10^5개 세포 및 11.5 × 10^5개 세포를 배지에 첨가하여, 최종 용적 26 mL으로 만들었다. 세포 현탁액 180 μL를 96웰 평판(Corning, Cat# 3903)의 2번째 ~ 11번째 컬럼내 각각의 웰에 첨가하여, 세포 밀도를 웰당 3K, 5K 및 8K로 만들었다. 12번째 컬럼의 웰을 배양 배지 200 μL로 충전하였고, 나머지 웰은 PBS로 충전하였다. SKBR3 세포 및 MDA-MB-468 세포를 대상으로 상기 작업을 반복하였다. 시료를 2개씩 준비하였다.

[0562] 3) 약물 제조: 양성 대조군 에리불린 및 본 발명의 화합물 모액을 96웰 둥근 바닥 평판(Corning, Cat# 3788)내 DMSO중에 제조하였다. 모액 2 mM(DMSO로 10배 희석한 모액)을 약물 제조 평판 1의 1번째 컬럼에서 제조한 다음, 10번째 컬럼에서 DMSO로 구배를 주며 10배 희석하였으며, 11번째 컬럼의 웰을 DMSO로 충전하였다. 대응 배양 용액 95 μL를, 약물 제조 평판 2의 2번째 컬럼 ~ 11번째 컬럼의 각각의 웰에 첨가하였으며, 약물 제조 평판 1 ~ 약물 제조 평판 2의 2번째 컬럼 ~ 11번째 컬럼으로부터 용액 5 μL를 피펫팅하였으며, 용액을 잘 혼합하고 나서, 용액 20 μL를 피펫팅하여, 도말한 세포에 첨가한 다음, 3일 및 5일 동안 연속해서 배양하였다.

[0563] 4) CTG 검정(Cell Titer-GloTM, 발광 세포 생존능 검정, Promega): 3일차 및 5일차에 세포 평판을 꺼낸 다음, 실온으로 밸런스를 맞추었다. CTG 90 μL를 각각의 웰에 첨가한 다음, 실온의 어두운 곳에서 10분 동안 반응시켰다. 미세평판 판독기를 사용하여 흡수 값을 판독하였으며, IC_{50}을 산정하였다.

[0564] 1.4. 데이터 결과

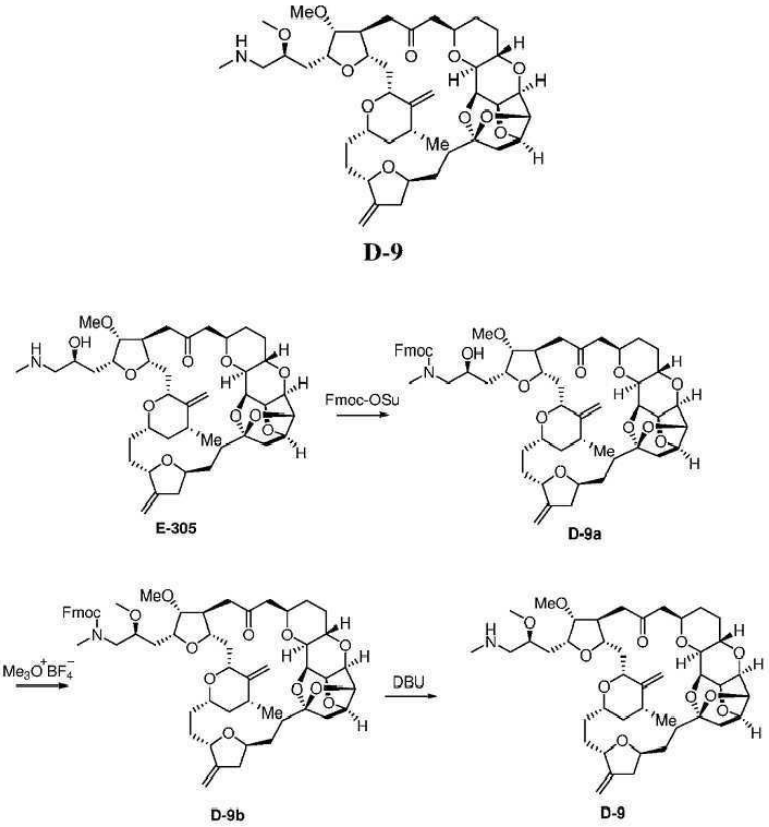
[0565] 표 5

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
화합물	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)
에리블린	0.7147	94.90	0.4819	87.47	0.6609	81.50
D-1	0.2052	96.87	0.1827	88.01	0.5151	81.34
D-2	0.8393	/	0.9088	/	3.156	/
D-3	1.36	/	1.67	/	5.141	/
D-4	1.301	/	1.776	/	5.614	/
D-5	0.3834	/	05309	/	4.024	/
D-6	0.2942	/	0.9963	/	1.849	/
D-7	0.4811	/	0.9034	/	1.783	/
D-8	0.3304	/	0.8428	/	0.8107	/

[0566]

[0567] 결론: 화합물 D-1은 종양 세포주 3가지에서 우수한 사멸 효과를 보였으며, 양성 약물 에리불린에 비해 유의미하게 월등하였다.

[0568] 실시예 2-9: 화합물 **D-9**의 합성



[0569]

[0570] 단계 1: 화합물 **D-9a**의 제조

[0571] 실온에서 1,4-디옥산 0.3 mL와 화합물 **E-305**(31 mg, 0.042 mmol, 문헌(*Bioorg. Med. chem. Lett.* 14(2004) 5551-5554)에 따라 합성 및 수득) 0.3 mL를 취한 다음, 혼합물에 플루오레닐메톡시카보닐숙신이미드(Fmoc-OSu)(17 mg, 0.050 mmol) 및 고체 탄산나트륨(18 mg, 0.168 mmol)을 이 순서대로 첨가하였다. 출발 재료 전환의 실질적으로 완전한 종결이 검출될 때까지 혼합물을 밤새도록 실온에서 교반하였다. 반응을 물로 급랭시켰으며, 아세트산에틸로 추출한 다음, 감압하에 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르)에 의해 정제한 결과, 생성물을 15 mg 수득하였다.

[0572] LC/MS(ESI): m/z 965.64 $[M+H]^+$.

[0573] 단계 2: 화합물 **D-9b**의 제조

[0574] 실온에서 화합물 **D-9a**(7 mg, 0.007 mmol)를 디클로로메탄(0.5 mL)에 용해한 다음, 여기에 4A 분자체(10 mg), 테트라플루오로붕산트리메틸옥소늄(11 mg, 0.07 mmol) 및 양자 스폰지(16 mg, 0.07 mmol)를 이 순서대로 첨가하였으며, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 출발 재료의 완전한 종결이 검출될 때, 물을 첨가하여 반응계를 급랭시키고 나서, 메틸 *tert*-부틸에테르로 추출한 후, 1N 묽은 염산으로 세척하여 감압하에 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르 = 1:1)로 정제한 결과, 생성물 7 mg을 수득하였다.

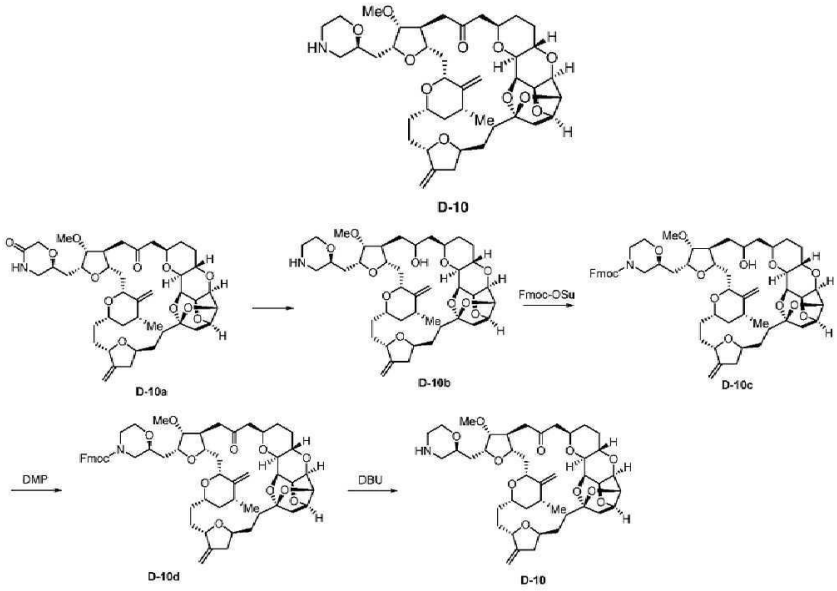
[0575] LC/MS(ESI): m/z 979.68 $[M+H]^+$.

[0576] 단계 3: 화합물 **D-9**의 제조

[0577] 얼음수조에서 화합물 **D-9b**(10 mg, 0.01 mmol)를 테트라하이드로푸란 1 mL로 용해한 다음, 반응 혼합물에 DBU(6 μL, 0.04 mmol)를 적가한 후, 반응이 종결될 때까지 교반하였다. 여기에 물을 첨가하여 반응을 급랭시킨 후, 디클로로메탄으로 추출한 다음, 감압하에 농축하였다. 예비-HPLC(컬럼: Welch Xtimate C18(10 × 150 mm × 5 μm), 이동상: A-물(20 mM NH_4HCO_3): B-아세토니트릴, 구배 용리 = 30%B → 95%B)에 의해 잔류물을 분리한 결과, 화합물 **D-9** 5 mg을 수득하였다.

[0578] LC/MS(ESI): m/z 757.85 $[M+H]^+$.

[0579] 실시예 2-10: 화합물 **D-10**의 합성



[0580]

[0581] 단계 1: 화합물 **D-10b** 의 제조

[0582] 얼음수조에서 테트라하이드로푸란 2 mL로 화합물 **D-10a**(6 mg, 0.008 mmol, 문헌(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21(2011) 1639-1643)에 따라 합성 및 수득)를 용해하였으며, 혼합물에 수소화알루미늄리튬 용액(80 μL, THF중 1 M, 0.08 mmol)을 적가한 다음, 교반하였다. 반응 온도를 천천히 40℃로 승온시켰다. 출발 재료의 실질적으로 완전한 전환이 LCMS에 의해 검출되었을 때, 황산나트륨 10수화물로 반응을 급랭시킨 다음, 얼음수조에서 0.5시간 동안 교반한 후, 여과하였다. 수득한 여과물을 감압하에 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였으며, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0583] LC/MS(ESI): m/z 758.4 $[M+H]^+$.

[0584] 단계 2: 화합물 **D-10c**의 제조

[0585] 1,4-디옥산 0.5 mL 및 물 0.5 mL로, 이전 단계에서 수득한 화합물 **D-10b**를 실온에서 용해한 다음, 반응계에 플루오레닐메톡시카보닐숙신이미드(6.5 mg, 0.019 mmol) 및 탄산나트륨(6.8 mg, 0.064 mmol)을 이 순서대로 첨가하여, 출발 재료의 실질적으로 완전한 전환이 검출될 때까지 실온에서 밤새도록 교반하였다. 반응을 물로 급랭시키고 나서, 아세트산에틸로 추출한 다음, 감압하에 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르 = 3:2)에 의해 정제한 결과, 화합물 **D-10c** 14 mg을 수득하였다.

[0586] LC/MS(ESI): m/z 980.4 $[M+H]^+$.

[0587] 단계 3: 화합물 **D-10d**의 제조

[0588] 이전 단계에서 수득한 화합물 **D-10c**(14 mg, 0.014 mmol)를 얼음수조에서 디클로로메탄 1 mL로 용해한 다음, 여기에 Dess-Martin 퍼요오디난(18.2 mg, 0.042 mmol)을 첨가하였다. 반응계를 교반하고 나서, 실온으로 서서히 온도가 승온하도록 허용한 후, 출발 재료의 실질적으로 완전한 전환이 LCMS에 의해 검출될 때까지 교반하였다. 중탄산나트륨 수용액을 첨가하여 반응을 급랭시킨 다음, 디클로로메탄으로 추출하고 나서, 감압하에 농축하였고; 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세트산에틸/석유 에테르 = 3:2)로 정제한 결과, 화합물 **D-10d** 8 mg을 수득하였다.

[0589] LC/MS(ESI): m/z 978.4 $[M+H]^+$.

[0590] 단계 4: 화합물 **D-10** 의 제조

[0591] 이전 단계에서 수득한 화합물 **D-10D**(8 mg, 0.008 mmol)를 얼음수조에서 테트라하이드로푸란 1 mL에 용해한

다음, 반응계에 DBU(6 μL, 0.032 mmol)를 적가한 후, 출발 재료의 실질적으로 완전한 전환이 LCMS에 의해 검출될 때까지 1시간 동안 교반하였다. 여기에 물을 첨가하여 반응을 급랭시켰으며, 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하고 나서, 감압하에 농축하였으며, 잔류물을 예비-HPLC(컬럼: Welch Boltimate C18 Core-Shell(4.6 × 50 mm × 2.7 μm), 이동상: A-물(20 mM NH_4HCO_3))로 분리한 결과, 표적 화합물 **D-10**(1.3 mg)을 수득하였다.

[0592] LC/MS(ESI): m/z 755.93 $[M+H]^+$.

[0593] 시험 실시예 2: 시험관내 세포독성 활성 스크리닝

[0594] 2.1. 원리 및 방법

[0595] 실험중 ATP 함량의 검출을 위해 CTG를 사용하였으며, 종양 세포의 생존 조건을 반영시켰다.

[0596] 2.2. 세포 배양 조건의 확정

[0597] 1) 세포 배양액: A549 세포, SK-BR-3 세포 및 MDA-MB-468 세포를 Ham F-12K(Kaighn's) 배지(Gibco, 21127030) 및 McCoy's 5A 배지(ThermoFisher, Cat# 16600108) 및 Leibovitz L-15 배지(ThermoFisher, Cat# 11415-114)(10% FBS(Gibco, 10099-141) 함유) 각각과 함께 배양하였다.

[0598] A549, SKBR3 및 MDA-MB-468을 트립신으로 분해하고 나서, 각각을 배양 배지에 세포 밀도 2.2 × 10^4개 세포/mL가 되도록 재현탁하였으며, 세포 현탁액 135 μL를 96웰 평판 2번째 컬럼 ~ 11번째 컬럼의 각각의 웰에 첨가하였고, 12번째 컬럼은 블랭크 대조군으로 설정하였다. 세포를 항온처리기(37℃5% CO_2)에서 24시간 동안 항온처리하였다.

[0599] 2) 약물 제조:

[0600] a) 모액 제조: 시험 화합물 및 양성 대조군 약물을 DMSO에 용해하여, 농도 5 mM의 모액을 수득하였다.

[0601] b) 약물 제조 평판 1: 첫번째 컬럼내 모액을 처음에 40배 희석하였으며, 2번째 컬럼 ~ 11번째 컬럼에서는 구배를 가하면서 순차적으로 3배 희석을 수행하였다. 12번째 컬럼은 DMSO로 충전하였다

[0602] c) 약물 제조 평판 2: 대응하는 배양 배지 196 μL를 2번째 ~ 11번째 컬럼에 첨가한 다음, 약물 제조 평판 1의 3번째 컬럼 ~ 12번째 컬럼으로부터 약물 제조 평판 2의 2번째 컬럼 ~ 11번째 컬럼까지 배양 배지 4 μL씩을 피펫팅하였다. 배양 배지를 잘 혼합하였다.

[0603] 2.3. 세포 처리

[0604] 약물 제조 평판 2로부터 배양 배지 15 μL를 피펫팅하여, 도말한 세포에 첨가하였다. 세포를 항온처리기내에서 연속으로 5시간 동안 항온처리(37℃5% CO_2)하였다.

[0605] 2.4. CTG 검정(Cell Titer-GloTM, 발광 세포 생존능 검정): 세포 평판을 꺼낸 다음, 실온으로 밸런스를 맞추었다. CTG 75 μL를 각각의 웰에 첨가한 후, 실온의 어두운 곳에서 10분 동안 반응시켰다. 미세평판 판독기를 사용하여 흡수 값을 판독하였으며, IC_{50}을 산정하였다.

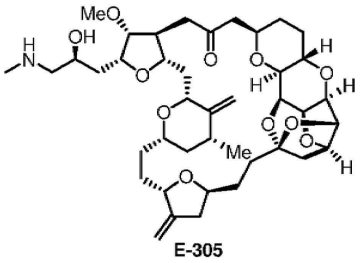
[0606] 2.5. 데이터 결과

[0607] 표 6

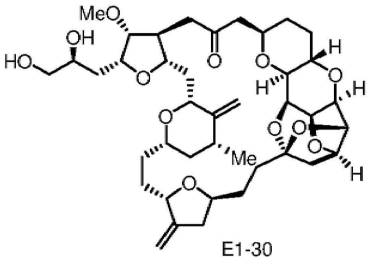
[0608]

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
화합물	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)	IC_{50} (nM)	최고 억제율 (%)
D-3	1.176	96.36	1.983	90.94	2.171	63.03
D-4	1.086	96.85	1.881	89.43	3.076	62.09
E-305	0.571	96.42	1.168	88.53	2.102	61.27
E1-30	0.1659	96.15	0.3596	90.49	0.7813	62.46

[0609] 양성 대조군 약물, 화합물 E-305 및 화합물 E1-30은 이하 보인 바와 같은 구조식을 가졌으며, 문헌[*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14(2004) 5551-5554]에 기재된 바와 같이 제조하였다:



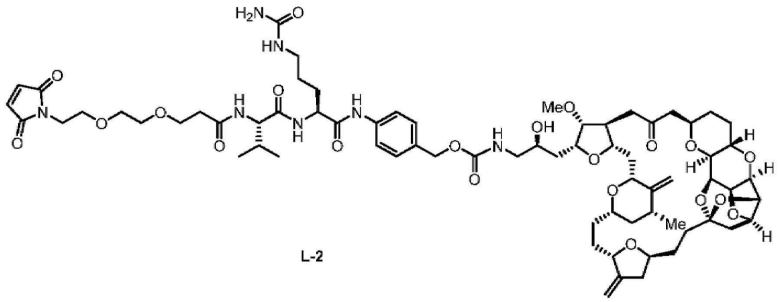
E-305



E1-30

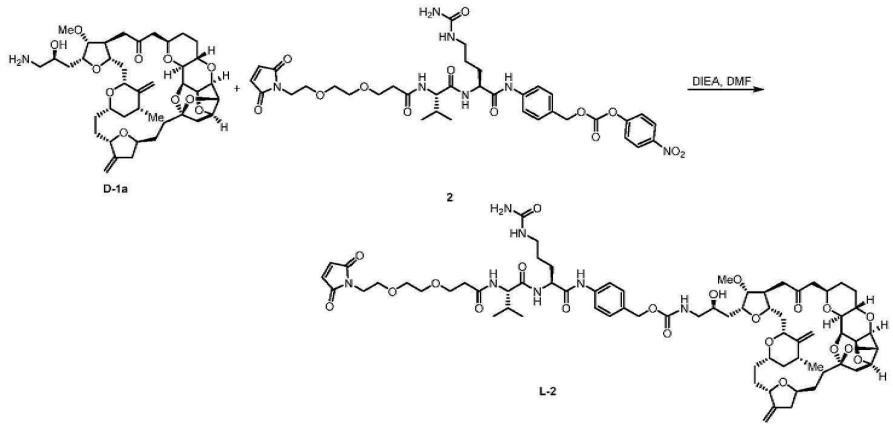
[0610]

[0611] 실시예 2-11: 화합물 **L-2**의 합성



L-2

[0612]

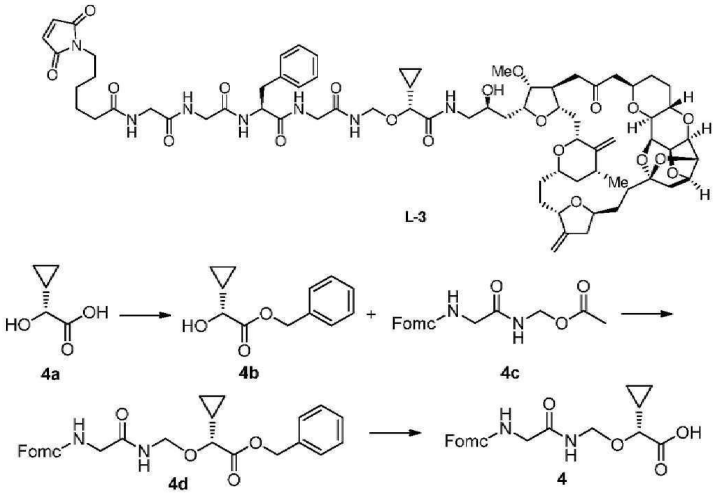


[0613]

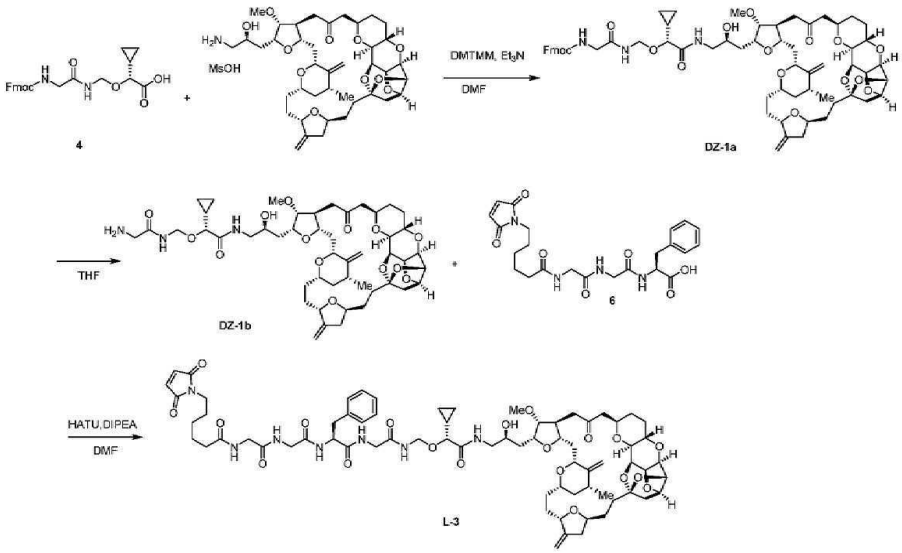
[0614] 화합물 **D-1a**(9 mg, 0.012 mmol)를 얼음수조에서 DMF 0.3 mL에 용해한 다음, 혼합물에 DIPEA(3.5 mg, 0.028 mmol)를 첨가하고 나서, 화합물 2(7.8 mg, 0.011 mmol)를 일부 첨가한 후, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였는데, 이를 예비-HPLC(컬럼: Xbridge Prep C18 OBD 5 μm × 19 × 250 mm; 이동상: A-물(10 mmol NH_4OAc); B-아세토니트릴, 구배 용리)로 분리한 결과, 화합물 **L-2**(순도 97%) 4.95 mg을 수득하였다.

[0615] LC/MS(ESI): m/z 1374.3 $[M+H]^+$.

[0616] 실시예 2-12: 화합물 L-3의 합성



[0617]



[0618]

[0619] 단계 1: 화합물 **4**의 제조

[0620] 화합물 4a(1.3 g, WO2013106717에 개시된 방법에 의해 제조)를 아세토니트릴 50 mL에 용해하고 나서, 여기에 탄산칼륨(6.2 g), 브롬화벤질(1.35 mL) 및 요오드화테트라부틸암모늄(415 mg)을 이 순서대로 첨가하였다. 반응이 실질적으로 종료될 때까지 반응 혼합물을 실온에서 교반한 다음, 여과하여, 농축한 후, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(전개 용매: 석유 에테르/아세트산에틸)로 정제한 결과, 화합물 4b를 수득하였다.

[0621] 화합물 4b(121 mg) 및 화합물 4c(180 mg)를 반응 플라스크에 첨가하고 나서, 혼합물에 테트라하이드로푸란 4 mL를 첨가하였다. 질소 대기에서 반응계를 얼음수조에서 약 0℃로 온도를 강하시킨 다음, 여기에 *tert*-부톡시화칼륨(109 mg, 0.98 mmol)을 첨가하고, 실온으로 승온시킨 후, 40분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 얼음물 10 mL를 첨가한 다음, 아세트산에틸(20 mL × 2) 및 클로로포름(10 mL × 5)으로 추출하였으며; 유기상들을 합한 다음, 농축하였다. 이로부터 생성된 잔류물을 디옥산 4 mL와 물 2 mL에 용해한 후, 중탄산나트륨(49.2 mg, 0.586 mmol) 및 클로로포름산 9-플루오레닐메틸(126 mg, 0.49 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 물 20 mL를 첨가한 후, 아세트산에틸로 추출하였다(10 mL × 3). 유기상을 염화나트륨 포화 용액(20 mL)으로 세척한 다음, 무수 황산나트륨상에서 건조한 후, 여과하였다. 여과물을 감압하에 농축하였다. 반응 혼합물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(전개 용매: 석유 에테르/아세트산에틸)로 정제한 결과, 화합물 4b를 수득하였다.

[0622] MS m/z(ESI): 515.0 $[M+1]^+$.

[0623] 화합물 4b(20 mg, 0.038 mmol)를 테트라하이드로푸란 및 아세트산에틸의 용매 혼합물(V:V = 2:1) 4.5 mL에 용

해한 다음, 탄소상 팔라듐(12 mg, 담지율 10%, 건조 기준)을 첨가하였다. 계를 수소로 3회 퍼징(purging)한 다음, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과하였으며, 필터 케이크를 아세트산에틸로 헹구었다. 여과물을 농축한 결과, 미정제 표제 화합물 **4**(13 mg)을 수득하였는데, 이를 정제를 거치지 않고 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0624] MS m/z(ESI): 424.9 [M+1].

[0625] 단계 2: 화합물 **DZ-1a**의 제조

[0626] 화합물 **4**(13.4 mg, 0.0316 mmol, 1.7 eq) 및 화합물 D-1a의 메실레이트(15 mg, 0.0182 mmol, 1 eq)를 계량하고 나서, DMF(0.5 mL)중에 용해한 다음; 얼음수조에서 반응 혼합물에 트리에틸아민(10 mg, 0.0988 mmol, 5.4 eq) 및 DMTMM(9.8 mg, 0.0332 mmol, 1.8 eq)을 첨가한 후, 자연스럽게 실온으로 승온시키고 나서, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 교반하였다. 여기에 물(2 mL)과 아세트산에틸(3 mL)을 첨가하여 희석시킴으로써 분리를 도모하였고, 수성상을 아세트산에틸로 추출하였고, 유기상들을 합하여 무수 황산나트륨상에 건조한 후, 여과하였으며, 여과물을 감압하에 농축하였으며, 잔류물을 예비 박층 크로마토그래피(아세트산에틸/석유 에테르)로 정제한 결과, 화합물 **DZ-1a** 16 mg(수율 86.7%)을 수득하였다.

[0627] LC/MS(ESI): m/z 1136.3 $[M+H]^+$.

[0628] 단계 3: 화합물 **DZ-1b**의 제조

[0629] 상기 단계에서 수득한 화합물 **DZ-1a**(16 mg, 0.0141 mmol, 1 eq)를 계량하여, 얼음수조에서 THF(0.4 mL)에 용해한 다음; 반응 혼합물에 트리에틸아민(4.2 mg, 0.057 mmol, 4 eq)을 첨가한 후, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 얼음조에서 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(5 mL)으로 희석하고 나서, 물로 세척하였으며(2 mL × 3); 유기상을 무수 황산나트륨상에서 건조한 다음, 여과하였고, 여과물을 감압하에 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였는데, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다.

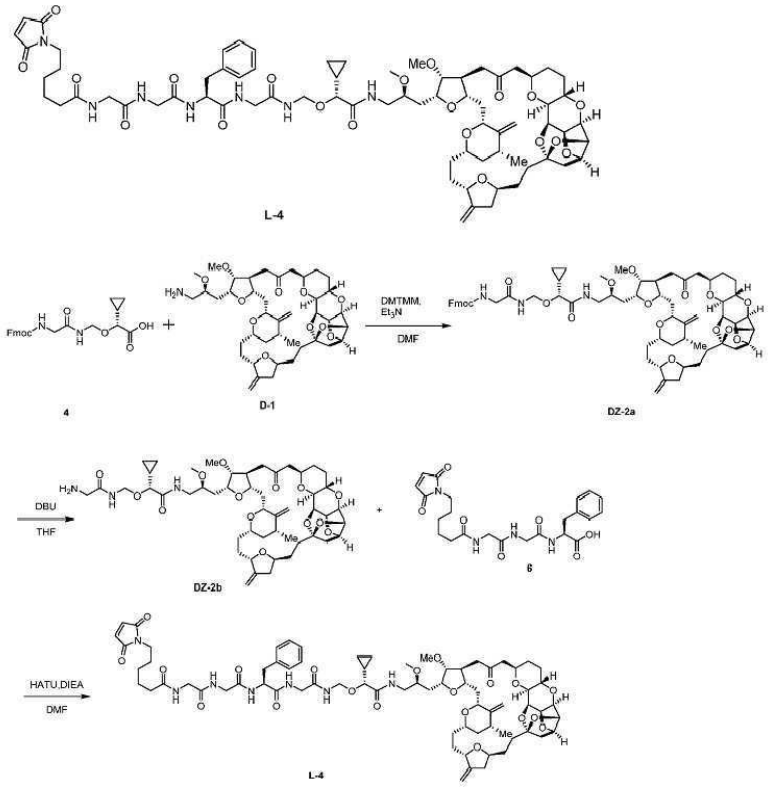
[0630] LC/MS(ESI): m/z 914.3 $[M+H]^+$.

[0631] 단계 4: 화합물 **L-3**의 제조

[0632] 상기 단계에서 수득한 미정제 화합물 **DZ-1b**(16 mg, 0.0175 mmol, 1 eq) 및 화합물 **6**(11.6 mg, 0.0246 mmol, 1.4 eq, EP2907824에 기재된 방법에 의해 제조)을 계량하여, DMF(0.5 mL)에 용해한 후; 반응 혼합물에 HATU(9.9 mg, 0.026 mmol, 1.5 eq) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA)(5.5 mg, 0.0426 mmol, 2.4 eq)을 첨가하고 나서, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 얼음조에서 교반하였다. 여기에 물(2 mL) 및 아세트산에틸(3 mL)을 첨가하여 희석함으로써 분리를 도모하였고, 수성상을 아세트산에틸로 추출하였으며, 유기상들을 합하고 나서, 무수 황산나트륨상에서 건조하여 여과하였고, 여과물을 감압하에 농축하였으며, 잔류물을 예비-HPLC(컬럼: XBridge Prep C18 OBD 5 μm × 19 × 250 mm; 이동상: A-물(10 mmol NH_4OAc): B-아세토니트릴, 구배 용리)에 의해 정제한 결과, 화합물 **L-3** 10 mg을 수득하였다.

[0633] LC/MS(ESI): m/z 1368.3 $[M+H]^+$.

[0634] 실시예 2-13: 화합물 **L-4**의 합성



[0635]

[0636] 단계 1: 화합물 **DZ-2a** 의 제조

[0637] 화합물 **4**(11.6 mg, 0.0273 mmol, 1.5 eq) 및 화합물 **D-1**(13.5 mg, 0.0181 mmol, 1 eq)을 계량한 다음, *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5 mL)에 용해한 다음; 얼음수조에서 반응 혼합물에 DMTMM(10.1 mg, 0.0343 mmol, 1.3 eq)을 첨가한 후, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 교반하였다. 여기에 물(2 mL) 및 아세트산에틸(3 mL)을 첨가하여 반응을 종결 및 희석하였더니 반응 혼합물이 분리되었는데, 수성상을 아세트산에틸로 추출하였고, 유기상들을 합한 다음, 무수 황산나트륨상에서 건조한 후, 여과하였으며, 여과물을 감압하에 농축하고 나서, 잔류물을 예비 박층 크로마토그래피(아세트산에틸/석유 에테르)로 정제한 결과, 화합물 10 mg(수율 47.9%)을 수득하였다.

[0638] LC/MS(ESI): m/z 1150.2 $[M+H]^+$.

[0639] 단계 2: 화합물 **DZ-2b**의 제조

[0640] 이전 단계에서 수득한 생성물인 화합물 **DZ-2a**(10 mg, 0.0087 mmol, 1 eq)를 계량한 다음, THF(1 mL)에 용해하고 나서; 반응 혼합물에 DBU(1,8-디아자비사이클로운덱-7-엔)(5.2 mg, 0.034 mmol, 4 eq)를 첨가한 다음, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 얼음수조에서 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(5 mL)으로 희석한 후, 물로 세척하였으며(2 mL × 3); 유기상을 무수 황산나트륨상에서 건조한 다음, 여과하고 나서, 여과물을 감압하에 농축한 결과, 미정제 생성물을 수득하였는데, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0641] LC/MS(ESI): m/z 928.2 $[M+H]^+$.

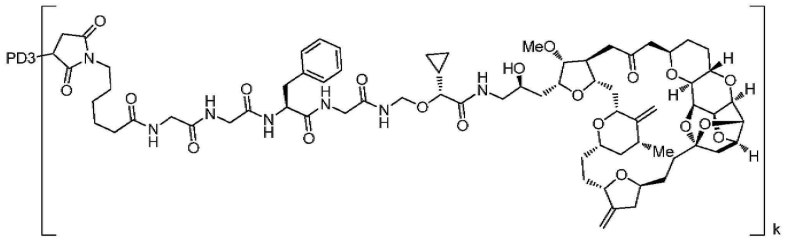
[0642] 단계 3: 화합물 **L-4**의 제조

[0643] 이전 단계에서 수득한 생성물인 화합물 **DZ-2b**(16 mg, 0.0087 mmol, 1 eq) 및 화합물 **6**(7.8 mg, 0.0165 mmol, 1.9 eq)을 계량하고 나서, DMF(0.5 mL)에 용해한 다음; 반응 혼합물에 HATU(6.2 mg, 0.0163 mmol, 1.9 eq) 및 DIEA(5.7 mg, 0.0441 mmol, 5 eq)를 첨가한 후, 반응이 실질적으로 종료될 때까지 얼음조에서 교반하였다. 여기에 물(2 mL)과 아세트산에틸(3 mL)을 첨가하여 희석함으로써 분리를 도모하였고, 수성상을 아세트산에틸로 추출하고 나서, 유기상들을 합한 후, 무수 황산나트륨상에서 건조한 다음, 여과하였으며, 여과물을 감압하에 농축하였고, 잔류물을 예비-HPLC(컬럼: XBridge Prep C18 OBD 5 μm × 19 × 250 mm; 이동상: A-물(10 mmol NH_4OAc): B-아세토니트릴, 구배 용리)에 의해 정제한 결과, 2단계에 대해 화합물 **L-4** 3.5 mg(수율 29.1%)을 수

득하였다.

[0644] LC/MS(ESI): m/z 1382.2 $[M+H]^+$.

[0645] 실시예 2-14: 항체 약물 접합체 ADC-1의 제조



ADC-1

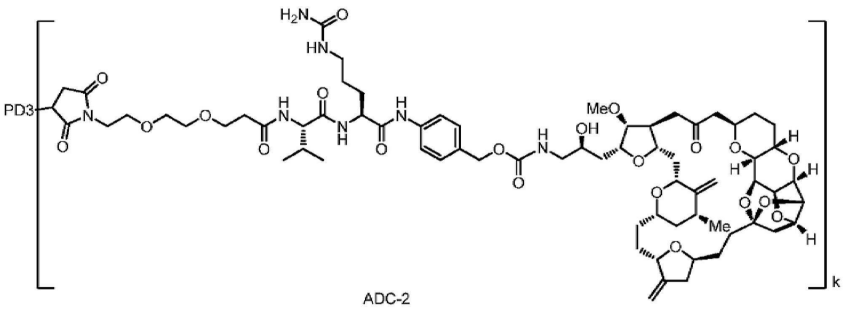
[0646]

[0647] 37℃에서 항체 PD3의 수성 PBS 완충제(0.05 M 수성 PBS 완충제, pH 6.5; 10.0 mg/mL, 0.9 mL, 60.6 nmol)에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 제조 수용액(10 mM, 15.2 μL, 152 nmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 수조 진탕기에서 진탕한 후(37℃3시간), 반응을 종결시켰다. 수조로 반응 혼합물을 25℃로 냉각하였다.

[0648] 화합물 **L-3**(0.83 mg, 606 nmol)을 DMSO 50 μL에 용해하고 나서, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가하였으며, 이 반응 혼합물을 25℃수조 진탕기에서 3시간 동안 진탕하여, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염한 다음, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.05 M PBS 완충제, pH 6.5, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제한 결과, PBS 완충제(0.76 mg/mL, 10 mL)중 표제 화합물 ADC-1을 수득하였는데, 이 표제 화합물을 동결시켜 4℃에 보관하였다.

[0649] 모세관 전기영동-황산도데실나트륨(CE-SDS) 자외선 검정에 의해 평균값을 산정하였다(k = 3.87).

[0650] 실시예 2-15: 항체 약물 접합체 ADC-2의 제조



ADC-2

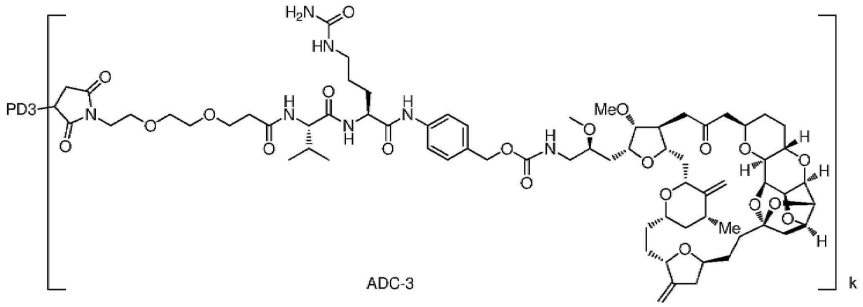
[0651]

[0652] 37℃에서 항체 PD3의 수성 PBS 완충제(0.05 M 수성 PBS 완충제, pH 6.5; 10.0 mg/mL, 1.14 mL, 77.2 nmol)에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 제조 수용액(10 mM, 19.3 μL, 193 nmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃ 수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 후, 반응을 종결시켰다. 수조로 반응 혼합물을 25℃로 냉각하였다.

[0653] 화합물 **L-2**(0.83 mg, 772 nmol)를 DMSO 50 μL에 용해한 다음, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가하고 나서, 이 반응 혼합물을 25℃수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 후, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염하고 나서, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.05 M PBS 완충제, pH 6.5, 0.001 M EDTA 함유)으로 정제한 결과, PBS 완충제중 표제 생성물 ADC-2(0.71 mg/mL, 12 mL)를 수득하였는데, 이를 동결시켜 4℃에 보관하여 두었다.

[0654] CE-SDS에 의해 평균을 산정하였다(k = 3.88).

[0655] 실시예 2-16: 항체 약물 접합체 ADC-3의 제조

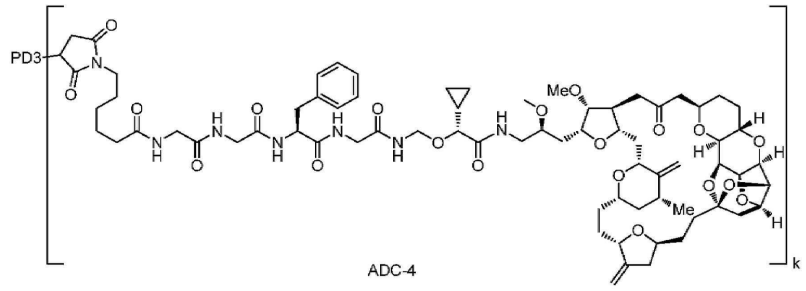
[0656] 

[0657] 37℃에서 항체 PD3의 수성 PBS 완충제(0.05 M 수성 PBS 완충제, pH 6.5; 10.0 mg/mL, 0.9 mL, 60.6 nmol)에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 제조 수용액(10 mM, 15.2 μL, 152 nmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 3시간 동안 수조 진탕기상에서 잔탕한 후, 반응을 종결시켰다. 수조로 반응 혼합물을 25℃로 냉각하였다.

[0658] 화합물 **L-1**(0.84 mg, 605 nmol)을 DMSO 50 μL에 용해한 다음, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가한 후, 이를 25℃ 수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕하고 나서, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염한 다음, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.05 M PBS 완충제, pH 6.5, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제한 결과, PBS 완충제중 표제 생성물 ADC-3(0.77 mg/mL, 10.2 mL)을 수득하였으며, 이를 동결한 다음, 4℃에 보관하여 두었다.

[0659] CE-SDS에 의해 평균을 산정하였다(k = 3.81).

[0660] 실시예 2-17: 항체 약물 접합체 ADC-4의 제조

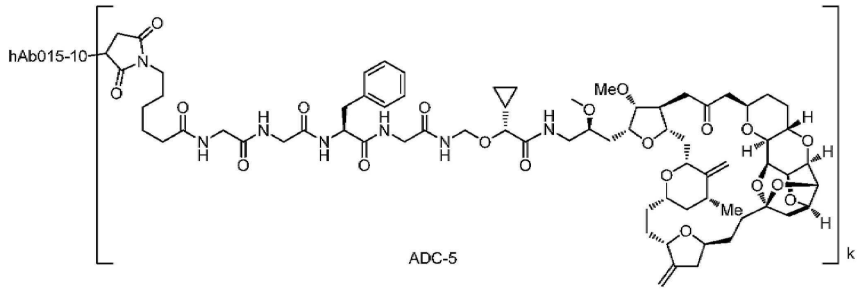
[0661] 

[0662] 37℃에서 항체 PD3의 수성 PBS 완충제(0.05 M 수성 PBS 완충제, pH 6.5; 10.0 mg/mL, 0.9 mL, 60.6 nmol)에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)의 제조 수용액(10 mM, 15.2 μL, 152 nmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃의 수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 종결시켰다. 수조로 반응 혼합물을 25℃로 냉각하였다.

[0663] 화합물 **L-4**(0.84 mg, 608 nmol)를 DMSO 50 μL에 용해하고 나서, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가한 다음, 이를 25℃수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 후, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염한 다음, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.05 M PBS 완충제, pH 6.5, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제한 결과, PBS 완충제중 표제 생성물 ADC-4(0.64 mg/mL, 13.5 mL)을 수득하였으며, 이를 동결한 다음, 4℃에 보관하여 두었다.

[0664] CE-SDS에 의해 평균을 산정하였다(k = 3.88).

[0665] 실시예 2-18: 항체 약물 접합체 ADC-5의 제조



[0666]

[0667] 37℃에서 CD79B 항체 hAb015-10의 수성 PBS 완충제(0.05 M 수성 PBS 완충제, pH 6.5; 10.0 mg/mL, 1.0 mL, 67.3 nmol)에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)의 제조 수용액(10 mM, 16.8 μL, 168 nmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃의 수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 종결시켰다. 수조로 반응 혼합물을 25℃로 냉각하였다.

[0668] 화합물 **L-1**(0.93 mg, 673 nmol)를 DMSO 50 μL에 용해하고 나서, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가한 다음, 이를 25℃수조 진탕기상에서 3시간 동안 진탕한 후, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염한 다음, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.05 M PBS 완충제, pH 6.5, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제한 결과, PBS 완충제중 표제 생성물 ADC-5(0.68 mg/mL, 9.6 mL)을 수득하였으며, 이를 동결한 다음, 4℃에 보관하여 두었다.

[0669] CE-SDS에 의해 평균을 산정하였다(k = 4.07).

[0670] 시험 실시예 3: 인간 확산성대B세포림프종 WSU-DLCL2의 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 ADC-5 및 Polivy의 효능 평가 및 비교

[0671] 3.1 약물 정보

[0672] 블랭크군: hIgG1;

[0673] ADC-5: 차폐한 다음, 밀봉하여 둔(2℃~ 8℃무색의 투명한 액체(농도 0.68 mg/mL 및 순도 98.00%).

[0674] Polivy(폴라투주맙): 차폐한 다음, 밀봉하여 둔(2℃~ 8℃무색의 투명한 액체(농도 5.83mg/mL 및 순도 97.69%).

[0675] 3.2 약물 제조

[0676] 생리식염수로 모든 용액을 원하는 농도로 희석하였다.

[0677] 생리식염수(세부사항: 10 mL, 0.09 g)를 China Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.로부터 구입하였다.

[0678] 3.3 세포

[0679] 인간 확산성대B세포림프종 WSU-DLCL2 세포를 DSMZ로부터 구입하였다. WSU-DLCL2 세포를 10cm 페트리 접시(10% 소태아혈청, 페니실린 및 스트렙토마이신 함유 RPMI 1640 배지(Gibco))(GIBCO, Cat# 15070-063)에서 배양한 다음, 항온처리기(37℃및 5% CO_2) 내에서 항온처리하였다. 계대배양을 매주 2회 ~ 3회 수행하였고, 세포를 수집한 다음, 세포가 장기간 기하급수적으로 성장하였을 때 계수하여 접종하였다.

[0680] 3.4 실험 동물

[0681] 암컷 BALB/c-nu 누드 마우스(성장 기간 28일령 ~ 35일령)를 Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd로부터 구입하였다. 제품허가번호: SCXK(Beijing) 2019-0008, 동물인증번호: 1103221911012510. 수용 환경: SPF 등급.

[0682] 3.5 실험 단계

[0683] 각각의 누드 마우스에 2.0 × 10^7개 WSU-DLCL2 세포를 피하 접종하고 나서, 종양 부피가 약 100 mm^3로 성장하였을 때, 종양의 부피에 따라 동물을 군으로 나누었다(D0). 마우스에 정맥내 주사(IV)로 투여하였는데, 이때 투여 용적은 10 mL/kg이었고; 비투여량 및 투여계획은 표 3에 제시하였다. 종양 부피와 체중을 매주 2회씩 측정하였으며, 그 결과를 기록하였다.

[0684] 실험실 동물의 사용과 복지는 국제실험동물관리평가인증협회(AAALAC) 규정에 맞추어 실시 및 제공하였다. 동물

의 건강 및 사멸 여부를 매일 모니터링하였으며, 일상의 검사에는 동물의 일간 활동성, 예컨대 행동 활동(behavioral activity), 체중 변화 및 외관에 대한 시험 성분 및 약물의 효과를 관찰하는 것을 포함하였다.

[0685] 3.6 실험 지수(experimental index)

[0686] 실험 지수는, 종양 성장에 대한 약물의 영향력을 연구하기 위한 것이고, 비 지수(specific index)는 T/C% 또는 종양 성장 억제 TGI(%)이다.

[0687] 노기스(vernier caliper)로 매주 2회 종양 직경을 측정하였고, 종양 부피(V)는 이하 식에 따라 산정하였다:

[0688] $V = 1/2 \times a \times b^2$

[0689] [식 중, a 및 b는 각각 길이와 폭을 나타냄]

[0690] $T/C(\%) = (T-T0)/(C-C0) \times 100$

[0691] [식 중, T 및 C는 실험 막바지에서의 종양 부피고; T0 및 C0는 실험 개시시의 종양 부피임]

[0692] 종양 억제율(TGI)(%) = 100 - T/C(%).

[0693] 종양이 퇴행하기 시작할 때의 종양 성장 억제율(TGI)(%) = $100 - (T - T0)/T0 \times 100$

[0694] 만일 종양 부피가 처음 부피에 비하여 수축하면(즉 $T < T0$ 또는 $C < C0$이면), 종양의 부분 퇴행(Partial Regression; PR)이라 정의하였고; 만일 종양이 완전히 사라지면, 종양의 완전 퇴행(Complete Regression; CR)이라 정의하였다.

[0695] 실험의 막바지, 실험의 종말점 또는 용매군 평균 종양 부피가 1500 mm^3에 도달하였을 때, 동물을 CO_2로 마취하여 죽인 다음, 해부하여 종양을 꺼냈다. 종양 사진을 촬영하였다.

[0696] 3.7 통계 분석

[0697] 달리 명시되지 않는 한, 2개의 군의 종양 부피들간 비교는 양측 꼬리 스튜던트 t-검정으로 실시하였는데, 여기서 $P < 0.05$는 통계적으로 유의미한 차이로 정의하였다.

[0698] 3.8. 결과

[0699] 인간 확산성대B세포림프종 WSU-DLCL2의 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 ADC-5 및 Polivy(IV; D0, 1 mg/kg)의 종양 억제율은 각각 53% 및 37%였으며; 종양 보유 마우스는 상기 약물에 대해 잘 관용할 수 있었고, 유의미한 체중 감소 등과 같은 증상은 일어나지 않았다.

[0700] 표 7

군	투여일	투여경로	평균종양부피 (평균±SEM, mm^3)		T/C% D17	종양 억제율 (%) D17	P값 D17
			D0	D17			
블랭크 군	D0	IV	109.29± 1.16	810.03± 83.95	-	-	
ADC-5, 1mg /kg	D0	IV	111.07± 2.15	441.02± 96.42	47	53	0.014
Polivy 1 mg /kg	D0	IV	108.07± 1.31	550.88± 52.37	63	37	0.044
주의: IV 정맥내 주사							

[0701]

[0702] 결론:

[0703] 인간 확산성대B세포림프종 WSU-DLCL2의 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 항체-약물 접합체 ADC-5 및 Polivy(양성 대조군)의 종양 억제율은 각각 53% 및 37%였으며; 항체-약물 접합체 ADC-5 및 Polivy는 유의미한 항종양 활성을 가졌고; 종양 보유 마우스는 상기 약물에 잘 관용할 수 있었다.

[0704] 시험 실시예 4: 세포 사멸 연구

[0705] 4.1. 목적

[0706] 본 연구의 목적은 본 발명의 항TROP-2 항체(PD3)-약물 접합체의, 상이한 종양 세포주들, 즉 Miapaca2 종양 세포(인간 췌장암세포, Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd., Cat# CBP60544), Fadu 종양 세포(인간 편평세포암종, ATCC, Cat# HTB-43), SK-OV-3(인간 난소암세포, ATCC, Cat# HTB-77), K562(인간 만성과립구성백혈병세포, ATCC, Cat# CCL-243), HCC827(인간 폐암세포, ATCC, Cat# CRL-2868) 및 BXPC3(인간 췌장암세포, ATCC, Cat# CRL-1687)의 증식에 대한 억제 활성을 시험하기 위한 것이다. 상이한 농도의 항체 약물 접합체로 세포들을 시험관내 처리하였다. 배양 6일 후, CTG(CellTiter-Glo® 발광 세포 생존능 검정, Promega, Cat# G7573) 시약을 사용하여 세포의 증식을 시험하였으며, IC_{50} 값에 따라 항체 약물 접합체의 시험관내 활성을 평가하였다.

[0707] 4.2. 방법

[0708] 1) 세포 배양: MiaPaCa2, Fadu, SK-OV-3, K562, HCC827 및 BXPC3 세포를 DMEM/고글루코스 배지(GE, SH30243.01), MEM 배지(Gibco, 11095080), McCoy 5a 배지(Gibco, 16600108), IMDM 배지(ThermoFisher, 12440061), 10% FBS(Gibco, 10099-141) 함유 RPIM1640 배지(Gibco, 11875119)중에 배양하였다.

[0709] 2) 세포 도말: 연구 당일, 세포를 트립신(0.25% 트립신-EDTA(1x), Life Technologies, Cat# 25200-072)으로 분해하고 나서, MiaPaCa2, Fadu, SK-OV-3, K562, HCC827 및 BXPC3을, 대응 배지를 사용하여 세포 현탁액중 3.7 × 10^3개 세포/mL의 밀도로 현탁하고 나서, 96웰 평판(Corning, Cat# 3903)의 각각의 웰에 현탁액 135 μL를 첨가하여, 37℃에서 24시간 동안 웰당 500개의 세포가 배양되도록 하였다.

[0710] 3) 약물 제조: 우선 시험 ADC 모액을, 그 농도가 4 μM이 되도록 조정한 다음, 이 모액을 약물 제조 평판(Corning, Cat# 3599)의 첫 번째 컬럼에 첨가하였다. 평판의 2번째 컬럼으로부터 9번째 컬럼에 이르기까지 구배를 주며 5배 희석하였는데, 10번째 컬럼은 PBS를 첨가하였다. 각각의 웰에 담긴 모액 15 μL를 세포 배양 평판에 첨가하였다.

[0711] 4) CTG 검정: 37℃에서 6일 동안 배양한 후, 세포 배양 평판을 꺼내어, 실온으로 밸런스를 맞추었다. CTG 75 μL를 각각의 웰에 첨가한 다음, 실온의 어두운 곳에서 10분 동안 반응시켰다. 미세평판 판독기(BMG labtech, PHERAstar FS)를 사용하여 흡수 값을 판독하였다.

[0712] 4.3 데이터 분석

[0713] Graphpad Prism 5를 사용하여 데이터를 처리 및 분석하였다. 그 결과를 이하 표 8에 보였다.

[0714] 표 8

번호	Miapaca	K562	SKOV3	HCC827	BXPC3	Fadu
ADC-1	64.05	73.21	54.14	0.30	0.16	0.96
ADC-2	24.59	27.95	0.27	0.11	0.05	0.11
ADC-3	31.22	44.10	10.42	0.01	0.09	0.60
ADC-4	29.95	39.44	18.73	1.37	1.38	4.04
E1-30	0.45	0.39	0.17	0.31	0.23	0.32

[0715]

[0716] 시험 실시예 5: 방관자 사멸(bystander killing) 연구

[0717] 5.1. 목적

[0718] 본 발명에 의해 개시된 항체 약물 접합체가 TROP-2 양성 세포 BXPC3(인간 현장 췌장선암종세포, Procell) 및

TROP-2 음성 세포 MiaPaCa2(인간 췌장선암종세포, Procell)내에서 공동배양될 때, 항체 약물 접합체가 TROP-2 양성 세포 BXPC3에 대해 사멸 효과를 보이되, TROP-2 음성 세포 MiaPaCa2에 대해서는 사멸 효과를 보이지 않았던 농도 5 nM를 연구를 위해 선택하였으며, 상기 2가지 공동배양계에서 항체 약물 접합체가 TROP-2 음성 세포 Miapaca2에 방관자 사멸 효과를 보이는지 여부를 검사하였다.

[0719] 5.2. 방법

[0720] 1) 세포 배양: MiaPaCa2 세포 및 BXPC3 세포를 DMEM/고글루코스 배지(GE, SH30243.01) 및 10% FBS(Gibco, 10099-141) 함유 RPIM1640 배지(Gibco, 11875119)중에 배양하였다.

[0721] 2) 세포 도말: 연구 당일, 세포를 트립신(0.25% 트립신-EDTA(1x), Life Technologies, Cat# 25200-072)으로 분해하고 나서, 새로운 RPIM1640 배지(10% FBS 함유)로 중화한 다음, 1000 rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 폐기한 후, 세포를 RPMI1640 + 10% FBS에 재현탁하였다. 세포를 계수한 후, BXPC3의 세포 밀도를 6 × 10^4개 세포/mL로 조정하였으며, MiaPaCa2 세포의 세포 밀도는 1 x 10^4개 세포/mL로 조정하였다. BXPC3 세포 500 μL 및 MiaPaCa2 세포 500 μL를 12웰 평판내 평판 1의 각각의 웰에 첨가하였다. MiaPaCa2 세포 500 μL 및 RPMI1640 + 10% FBS 함유 배양 배지 500 μL를 12웰 평판내 평판 2에 첨가하였다. 평판을 37℃및 5% 이산화탄소에서 24시간 동안 배양하였다.

[0722] 3) 항체 약물 접합체 제조: 항체 약물 접합체 ADC-1, ADC-2, ADC-3 및 ADC-4 각각을, RPMI1640으로 농도 600 nM로 희석하고 나서, 항체 약물 접합체 50 μL를 취한 다음, 배양 배지 100 μL로 희석하여, 농도를 200 nM로 만들었다(40×, 최종 농도 5 nM). 항체 약물 접합체 25 μL를 세포 배양 평판에 첨가하였다. PBS 용매 대조군을 추가로 설정하여, 6일 동안 계속 배양하였다.

[0723] 4) 흐름 분석(flow analysis): 12웰 평판(평판 1 및 평판 2)내 세포를 트립신으로 분해한 다음, 새 배지로 중화하고 나서, 1000 rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 폐기한 다음, 세포를 FACS 완충제(PBS+2.5% FBS) 1 mL에 재현탁하였다. 세포 20 μL를 취한 다음, 이를 트리판블루(Sigma, T8154-100ML) 20 μL로 염색하고 나서, 계수하였다. 평판 1의 세포를 1000 rpm에서 3분 동안 원심분리하고 나서, 상청액을 폐기한 다음, 세포를 FACS 완충제 100 μL에 재현탁하였으며, 여기에 TROP-2(EGP-1) 모노클로날 항체(MR54)(ThermoFisher, Cat# 12-6024-42) 2 μL를 첨가하고 나서, 세포를 얼음에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 세포를 2000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였으며(4℃여기에 FACS 완충제 150 μL를 첨가하여, 세포를 재현탁하였고, 상기 절차를 2회 반복하였다. 유세포분석(BD, FACSVerse)에 의해 검출을 수행하였다.

[0724] 5.3 데이터 분석

[0725] Flowjo 10.0를 사용하여 데이터를 처리 및 분석하였다.

[0726] 결론: 모든 항체 접합체는 본 연구에서 방관자 효과를 보였다.

[0727] 시험 실시예 6. 약동학적 연구

[0728] 1. 개관

[0729] 투여 경험이 있는(non-naive) 비글을 시험 동물로 선택하였으며, 화합물 D-1 및 에리불린을 정맥내 투여한 비글을 대상으로 다양한 시점에서의 혈장중 약물 농도를 LC/MS를 사용하여 측정하였다. 본 발명의 화합물을 투여한 비글에서 이 화합물의 약동학적 성능을 연구하였고, 이의 약동학적 프로필을 평가하였다.

[0730] 2. 방법

[0731] 2.1. 시험 화합물

[0732] 화합물 D-1 및 에리불린

[0733] 2.2. 시험 동물

[0734] Shanghai Medicilon Inc.로부터 구입한 수컷 비글 6마리를 2개의 군으로 나누고 나서(군당 3마리) 투여 시험을 실시하였다.

[0735] 2.3. 약물 제조

[0736] 화합물 D-1을 계량한 다음, 5% 용적 DMSO, 20% PG 및 20% PEG400을 첨가하여 용해한 후, 여기에 55% 생리식염수를 첨가하여 무색의 투명한 용액(0.25 mg/mL)을 제조하였다.

[0737] 에리불린을 계량하고 나서, 5% 용적 DMSO, 20% PG 및 20% PEG400을 첨가하여 용해한 후, 여기에 55% 생리식염수를 첨가하여 무색의 투명한 용액(0.25 mg/mL)을 제조하였다.

[0738] 2.4. 투여

[0739] 비글군 하나에 화합물 D-1을 0.5 mg/kg의 용량 및 2 mL/kg의 용적으로 정맥내 주사하였다.

[0740] 또 다른 비글군에는 에리불린을 0.5 mg/kg의 용량 및 2 mL/kg의 용적으로 정맥내 주사하였다.

[0741] 3. 절차

[0742] 비글에 화합물 D-1을 주사한 다음, 투여전과, 투여후 5분, 0.25시간, 0.5시간, 1.0시간, 2.0시간, 4.0시간, 8.0시간, 12.0시간 및 24.0시간 경과시 혈액 시료 1 mL를 채혈한 후, 채혈한 혈액 시료를 EDTA-K2 항응고제가 담긴 채혈 튜브에 넣었으며, 채혈한 전혈 시료를 얼음에 놓은 다음, 1시간 이내에 혈장을 원심분리하였다(원심력: 2200 g, 원심분리시간: 10분, 2℃ ~ 8℃). 혈장 시료를 냉장고(-80℃)에 보관한 후 시험을 수행하였다.

[0743] 비글에 화합물 에리불린을 주사한 다음, 투여전과, 투여후 5분, 0.25시간, 0.5시간, 1.0시간, 2.0시간, 4.0시간, 8.0시간, 12.0시간 및 24.0시간 경과시 혈액 시료 1 mL를 채혈하였으며, 채혈한 혈액 시료를 EDTA-K2 항응고제 채혈 튜브에 넣었으며, 채혈한 전혈 시료를 얼음에 놓은 다음, 1시간 이내에 혈장을 원심분리하였다(원심력: 2200 g, 원심분리시간: 10분, 2℃ ~ 8℃). 혈장 시료를 냉장고(-80℃)에 보관한 후 시험을 수행하였다.

[0744] 약물 주사후 비글의 혈장중 시험 화합물 농도를 확정하였으며; 투여후 다양한 시점에 비글 혈장 25 μL씩을 채취한 후, 여기에 내부 표준 용액 캠프토테신(National Institutes for Drug Control) 50 μL(100 ng/mL) 및 아세토니트릴 200 μL를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 와류(vortexing)한 다음, 10분 동안 원심분리하였다(3700 rpm/분). 혈장 시료 상청액 3 μL ~ 4 μL를 대상으로 LC/MS 검정(API4000 3중 사중극자 탠덤 질량분광도법(No. 2), Applied Biosystems, USA; Shimadzu, LC-30AD 초고성능 액체크로마토그래피시스템, Shimadzu, Japan)을 실시하였다. 분석을 수행하였다.

[0745] 4. 약동학적 매개변수

[0746] 본 발명의 화합물의 약동학적 매개변수를 이하 표 9에 제시하였다.

[0747] 표 9

번호	비글을 대상으로 한 약동학적 연구					
	혈장중 농도	곡선하면적	반감기	체류시간	제거율	겉보기 분포용적
	C5분 (ng /mL)	AUC0-t (ng /mL*h)	T1/2 (h)	MRT (h)	CL (ml/분/kg)	Vz (ml/kg)
화합물 D-1	82.1	433	29.3	41.1	8.9	22039
에리불린	217	106	3.5	3.7	78	15556

[0748]

[0749] 시험 실시예 7: ADC-2 및 ADC-3의 인간 인두편평세포암종 FaDu 세포주 BALB/c 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 효능

[0750] (1) 세포 배양

[0751] 본 연구에 사용한 인간 인두편평세포암종 Fadu 세포주(ScienCell Laboratory, ml-cs-0374)를, 항온처리기(37℃ 5% CO_2)에서 MEM 배지(10%(v/v) 소태아혈청(FBS)(GIBCO, 10099-141) 및 0.1% 인산염 완충제 보충)중에서 배양하였다. 3% ~ 4% 이소플루란으로 마우스를 마취시키고 나서, Fadu 세포주를 접종하였다. 세포를 10회차 계대배양으로 지속적으로 배양하기 전, Fadu 세포 배양 배지 100 μL(밀도 5 × 10^6개)와 동일 용적의 마트리겔(Solarbio)을 잘 혼합한 후, 마우스 액와 근처 등쪽 우측에 피하 접종하였다.

[0752] (2) 동물 군 나누기 및 투여 계획

[0753] 종양이 평균 약 100 mm^3 ~ 150 mm^3까지 성장하였을 때, 종양 부피와 체중에 따라 마우스를 무작위로 8개의 군으로 나누었다. 군 나누기 및 투여일을 0일(당일)이라 정의하였다. 군 나누기 및 투여 계획을 이하 표 10에 제시하였다.

[0754] 표 10

군 나누기 및 투여 계획				
군	시험 화합물	군당 동물수	용량 (mg/kg)	투여 계획
G1	블랭크 비이클 투여군	8	N/A	투여 경로: I.P 당일 및 14일차에 2회씩 투여
G2	ADC-3	8	3	
G3	ADC-3	8	1.5	
G4	ADC-2	8	3	
G5	ADC-2	8	1.5	

[0755]

[0756] 투여 용적: 마우스 체중에 따라 투여 용적을 10 μL/g으로 조정하였다.

[0757] 종양 부피: 군 나누기 이후 연속 4주 동안 매주 2회씩 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피(V)은 이하와 같이 산정하였다:

[0758] $v = (길이 \times 폭^2)/2$.

[0759] 마우스당 상대적 종양 부피(RTV)는 이하와 같이 산정하였다:

[0760] $RTV = Vt/V0$

[0761] [식 중, Vt는 매 시간마다 측정한 부피이고, V0는 처리 개시시 부피임]

[0762] 동물 체중: 군 나누기 이후 마우스 체중을 매주 2회씩 측정하여 기록하였다.

[0763] 동물 상태 관찰: 본 연구에서는 비이클 또는 시험 약물 투여 동물에서 비정상 상태는 관찰되지 않았다. 실험 막바지에 몇몇 동물에서는 궤양이 생겼다.

[0764] (3) 연구에서 약물 투여중지 및 투여 재개를 위한 기준

[0765] 연구 진행중에 마우스 체중이 15% 이상 감소하였을 때, 투여를 중단하였으되; 중단 기간은 마우스 체중이 회복되기에 충분히 길게 두었다. 오로지 한 마리 마우스에 대한 투여를 중단하였던 반면, 다른 마우스에 대한 투여는 정상적으로 진행하였는데; 약물 투여중지하고 나서 마우스 체중이 회복될 때 이하 기준, 즉 마우스 체중이 10% 이하로 감소하면 본 연구를 계속 진행하였다.

[0766] (4) 평가변수

[0767] 생체내 실험의 막바지에 모든 동물을 CO_2로 질식시킨 다음, 경추 탈구에 의해 동물을 죽였다. 종양을 수집한 다음, 측량하고 나서, 사진촬영을 하였다. 생체내 실험이 종결되기 전에 사멸시킨 종양 보유 동물로부터는 시료를 채취하지 않았다.

[0768] (5) 통계 분석

[0769] 결과를 평균 ± S.E.M으로 제시하였다. Dunnett 다중 비교 검정을 통해 2개의 군 사이의 비교를 검정하였다. 만일 $p < 0.05$(*로 기록), $p < 0.01$(**로 기록) 및 $p < 0.001$(***로 기록)이면, 통계적으로 유의미한 차이로 간주하였다.

[0770] (6) 결과

[0771] 체중: 비이클 투여군 및 상이한 시험 약물 투여군에서 동물의 체중 변화 경향을 도 1에 보였다. 동물의 체중은 실험이 진행됨에 따라 정상적으로 증가하였다.

[0772] 종양 부피:

[0773] 동물실험 기간중에 블랭크 비이클 투여군(G1) 동물에 접종한 후, 군을 나눈 다음, 다시 ADC를 투여하였을 때, 종양은 천천히 성장하였는데; 단 종양의 부피는 14일차가 될 때까지 급속하게 증가하였다. G1에 대한 실험 당일 종양 부피의 평균값은 125.05 ± 3.66 mm^3였고; 25일차 종양 부피의 평균값은 1854.48 ± 99.50 mm^3였다. 종양 부피 및 상대적 종양 부피의 실험 데이터는, 인간 인두편평세포암종 Fadu 세포주가 BALB/c 마우스 피하이종이식 종양모델에 성공적으로 확립되었음을 보여주었다.

[0774] 실험 당일 ADC-3 고용량(3 mg/kg) 투여군(G2) 동물의 종양 부피 평균 값은 121.40 ± 3.18 mm^3였고; 25일차 종양 부피 평균 값은 721.56 ± 169.15 mm^3였다. 실험 기간중 ADC-3 고용량 투여군은 블랭크 비이클 투여군에 비하여 종양 성장을 유의미하게 억제할 수 있었다.

[0775] 상대적 종양 증식율 및 종양 중량증가 억제율:

[0776] 상대적 종양 증식율(T/C%), 즉

[0777] 상대적 종양 증식율(T/C%) = 처리군(T)의 평균 RTV/음성 대조군(C)의 평균 RTV x 100%

[0778] 을, 약물의 항종양 활성의 효과를 평가하는데 사용하였다. 각각의 시점에서 각각의 군의 상대적 종양 증식율을 표 11에 보였으며, 동향에 관한 그래프를 도 2에 보였다.

[0779] 표 11

각각의 시점에서 각각의 군의 상대적 종양 증식율					
처리일	블랭크 비이클 투여군	ADC-3 3 mg/kg	ADC-3 1.5 mg/kg	ADC-2 3 mg/kg	ADC-2 1.5 mg/kg
0	N/A	97.08%	100.09%	97.59%	98.47%
4	N/A	79.18%	99.71%	99.84%	97.38%
7	N/A	57.93%	69.61%	56.73%	70.41%
11	N/A	34.24%	68.23%	44.34%	73.83%
14	N/A	34.27%	74.62%	48.35%	83.36%
18	N/A	32.07%	63.41%	50.87%	73.08%
21	N/A	30.56%	64.07%	50.08%	76.87%
25	N/A	38.91%	76.25%	60.07%	84.03%

[0780]

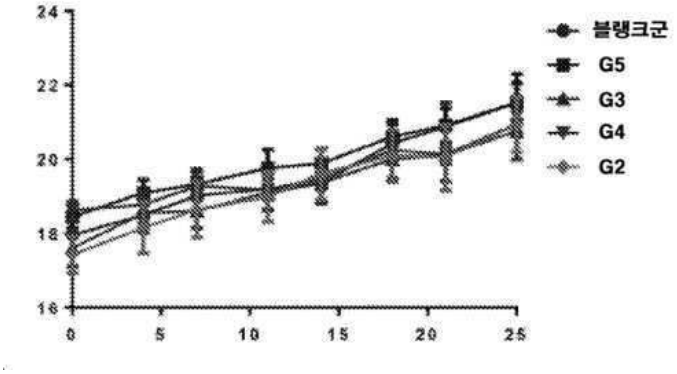
[0781] 결론:

[0782] ADC-3 투여군에 이 약물을 투여한 후, 고용량 투여군에서의 종양 부피는 모델군에서의 종양 부피에 비해 유의미하게 감소하였고, 저용량 투여군에서의 종양 부피는 모델군에서의 종양 부피에 비해 감소하였던 반면, 이 두 군은 통계적 차이를 보이지 않았다. 약물은 용량 의존적 종양 성장을 억제함에 효과를 보였다. 한편, 3 mg/kg 용량만큼을 투여한 후 25일차 이내에 ADC-3 투여군에서의 생체내 효능은 ADC-2 투여군에서의 생체내 효능에 비해 더 우수하였으며, 이 두 군은 유의미한 차이를 보였다.

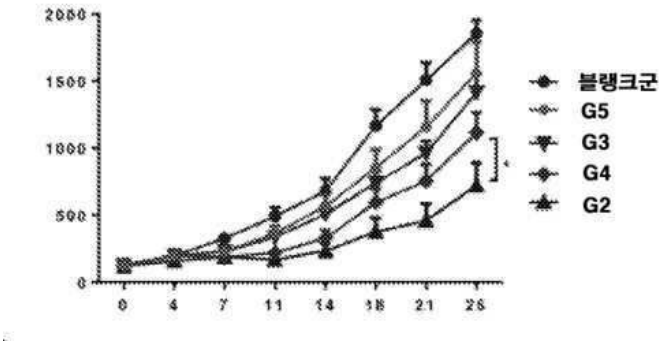
[0783] 본 발명의 특정 구현예가 전술되었지만, 이러한 구현예는 단지 예시적이며, 본 발명의 원리 및 사상을 벗어나지 않고 다수의 변경 또는 수정이 이 구현예에 대해 이루어질 수 있다는 것은 당업자에 의해 인지될 것이다. 따라서 본 발명의 보호 범위는 첨부된 청구범위에 의해 한정된다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SHANGHAI SENHUI MEDICINE CO., LTD.

SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD

SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.

<120> DRUG CONJUGATE OF ERIBULIN DERIVATIVE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF IN MEDICINE

<160> 36

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
115 120 125

Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
130 135 140

Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
145 150 155 160

Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr
165 170 175

Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp
180 185 190

Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
195 200 205

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
210 215 220

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
225 230 235 240

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

245 250 255

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

260 265 270

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

275 280 285

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

290 295 300

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

305 310 315 320

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

325 330 335

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

340 345 350

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

355 360 365

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

370 375 380

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

385 390 395 400

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

405 410 415

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

420 425 430

Lys

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser

1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr

20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp

35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu

50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln

85 90 95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu

100 105 110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr

115 120 125

Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe

130 135 140

Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala

145 150 155 160

Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr

165 170 175

Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp

180 185 190

Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu His His His His His His

195 200 205

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400
> 4

Asp Phe Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Phe Pro Arg Ser Gly Asn

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Tyr Pro Arg Ser Gly Asn

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400

> 18

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 20

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Lys

<210> 22

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 22

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 23
Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 25

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 27

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 28

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 29

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Gln Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 30

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 31
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 32

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 33

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 34
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 35

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 35

Met Ala Arg Gly Pro Gly Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp

20 25 30

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly

35 40 45

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val

50 55 60

Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met

65 70 75 80

Ser Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala
85 90 95

Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly
100 105 110

Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val
115 120 125

Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
130 135 140

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
145 150 155 160

Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu
165 170 175

Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala
180 185 190

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
195 200 205

Thr Ser Gln Lys Ala Ala Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr
210 215 220

Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly
225 230 235 240

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr
245 250 255

Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg
260 265 270

Leu Thr Ala Gly Leu Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu
275 280 285

Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly
290 295 300

Lys Tyr Lys Lys Val Glu Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu
305 310 315 320

Pro Ser Leu

<210> 36

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 36

Met Ala Arg Gly Pro Gly Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp

20 25 30

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly

35 40 45

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val

50 55 60

Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met

65 70 75 80

Ser Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala

85 90 95

Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly

100 105 110

Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val

115 120 125

Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg

130 135 140

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His

145 150 155 160

Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu

165 170 175

Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala

180 185 190

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly

225 230 235 240

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr

245 250 255

Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg

260 265 270

Leu Thr Ala Gly Leu Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu

275 280 285

Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly

290 295 300

Lys Tyr Lys Lys Val Glu Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu

305 310 315 320

Pro Ser Leu His His His His His His

325