



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월13일  
(11) 등록번호 10-2646581  
(24) 등록일자 2024년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/68 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01) C07C 69/92 (2006.01)  
C07H 15/18 (2006.01) C07H 15/26 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 47/6849 (2017.08)  
A61K 45/06 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7032866  
(22) 출원일자(국제) 2018년04월06일  
심사청구일자 2021년03월31일  
(85) 번역문제출일자 2019년11월06일  
(65) 공개번호 10-2020-0018402  
(43) 공개일자 2020년02월19일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2018/050928  
(87) 국제공개번호 WO 2018/185495  
국제공개일자 2018년10월11일  
(30) 우선권주장  
1705686.2 2017년04월07일 영국(GB)  
(56) 선행기술조사문헌  
EP01882684 A1  
EP02590942 A1

(73) 특허권자  
센타우리 테라퓨틱스 리미티드  
영국 이씨1엔 2에이치에이 런던 홀보른 서커스  
3-4 새비스 인 하우스 퍼스트 플로어  
(72) 발명자  
웨스트비, 미카엘  
영국 씨티13 7엔디 켄트 샌드위치 디스커버리 파크  
센타우리 테라퓨틱스 리미티드 내  
글로습, 멜라니  
영국 씨티13 7엔디 켄트 샌드위치 디스커버리 파크  
센타우리 테라퓨틱스 리미티드 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 윤종복

전체 청구항 수 : 총 23 항

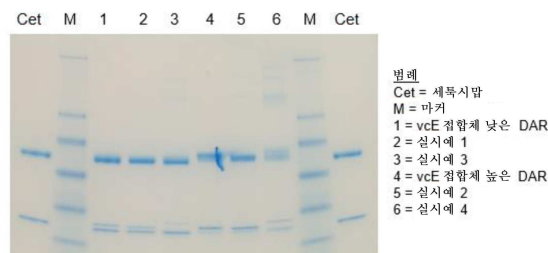
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 신규 화합물 및 그의 치료 용도

(57) 요약

본 발명은 면역 반응을 규정된 치료 표적으로 연결시킬 수 있는 신규 화합물, 암 및 감염성 질환을 치료하는데 있어서의 상기 화합물의 용도, 상기 화합물을 함유하는 조성물, 그의 제조 방법 및 상기 방법에 사용되는 신규 중간체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



실시예 1-4의 환원 SDS 페이지 분석

(52) CPC특허분류

*A61K 47/6897* (2017.08)  
*A61P 31/04* (2018.01)  
*A61P 35/02* (2018.01)  
*C07C 69/84* (2013.01)  
*C07C 69/92* (2013.01)  
*C07H 15/18* (2013.01)  
*C07H 15/26* (2013.01)  
*C07K 16/00* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)

(72) 발명자

**왓슨, 크리스틴**

영국 씨티13 7엔디 켄트 샌드위치 디스커버리 파크  
센타우리 테라퓨틱스 리미티드 내

**픽포드, 크리스토퍼**

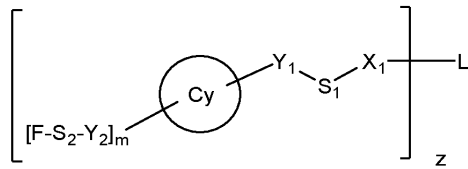
영국 씨티13 7엔디 켄트 샌드위치 디스커버리 파크  
센타우리 테라퓨틱스 리미티드 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:



(I)

여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;

S<sub>1</sub>은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-시클로헥실-CH<sub>2</sub>-3-피롤리딘-2,5-디온-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-시클로헥실-CH<sub>2</sub>-3-피롤리딘-2,5-디온-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C(=NH)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-3-피롤리딘-2,5-디온-으로부터 선택된 스페이서를 나타내고;

S<sub>2</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-로부터 선택된 스페이서를 나타내고;

z는 2 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

X<sub>1</sub>은 -S- 또는 -N(H)-를 나타내고;

Y<sub>1</sub>은 공유결합, -C(O)NH- 또는 -O-를 나타내고;

Y<sub>2</sub>는 공유 결합, -O- 또는 -NHC(O)-를 나타내고;

F는 갈락토실-알파-1,3-갈락토실-베타-1,4-N-아세틸글루코사민, 알파-1-3 갈락토비오스, 알파-1-3-베타-1-4-갈락토트리오스 또는 갈릴리펜타사카라이드를 나타내고;

m은 1 내지 4로부터 선택된 정수를 나타내고;

Cy는 페닐, 비페닐, 트리페닐을 나타내고, 이에 따라 Cy가 비페닐 또는 트리페닐을 나타내는 경우 상기 -Y<sub>1</sub>-S<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L 기는 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있고, 상기 [F-S<sub>2</sub>-Y<sub>2</sub>]<sub>m</sub>- 기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, Y<sub>1</sub>이 -C(O)NH-를 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, Y<sub>2</sub>가 공유 결합 또는 -O-를 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, Y<sub>2</sub>가 -O-를 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, m이 1 내지 3; 1 또는 3; 또는 2 또는 3; 또는 1 또는 2; 또는 1; 또는 2; 또는 3; 또는 4로부터 선택된 정수를 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, z가 2; 또는 4.9; 또는 5; 또는 7; 또는 8; 또는 10; 또는 11; 또는 14; 또는 15; 또는 17; 또는 20으로부터 선택된 정수를 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, Cy가 페닐 또는 비페닐; 또는 비페닐 또는 트리페닐; 또는 페닐 또는 트리페닐; 또는 비페닐을 나타내는 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 항체가 인간화 항체, 인간 항체, 무린 항체 또는 키메라 항체인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 그의 항원 결합 단편이 항원-결합 단편 (Fab) 또는 단일-쇄 가변 단편 (scFv)인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단편이 Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, 및 scFv로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 EGFR 항체 또는 그의 단편으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 세특시맵, 세특시맵 Fab 또는 니모투주맵으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열식별번호: 1 내지 4에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 EGFR 항체 또는 그의 단편으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 CD20 항체 또는 그의 단편으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 리툭시맵 또는 리툭시맵 Fab로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

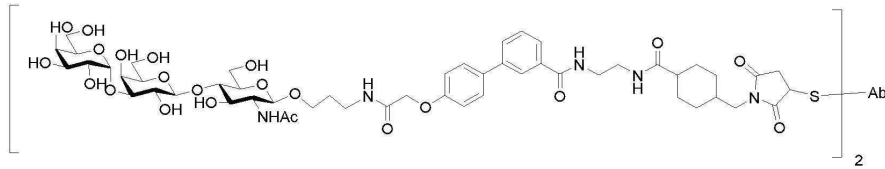
#### 청구항 17

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 병원체 특이적 항체 또는 그의 단편으로부터 선택된 것인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

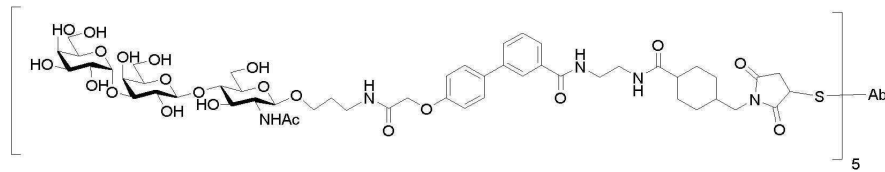
### 청구항 18

제1항에 있어서, 실시예 1-26 중 어느 하나로부터 선택된 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:

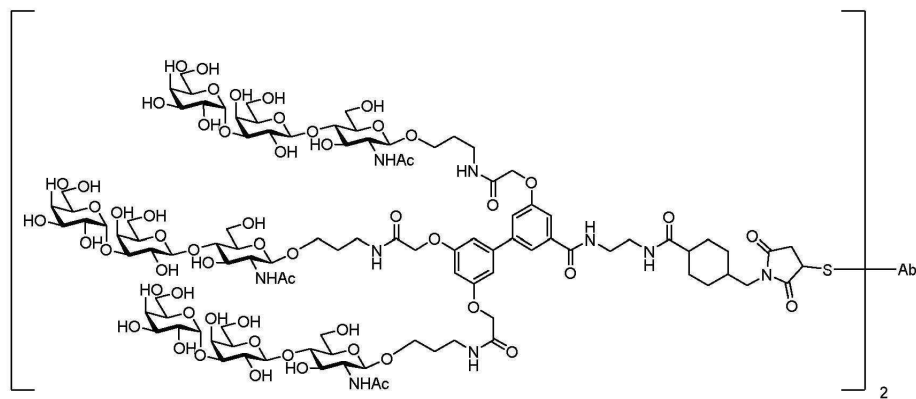
#### 실시예 1



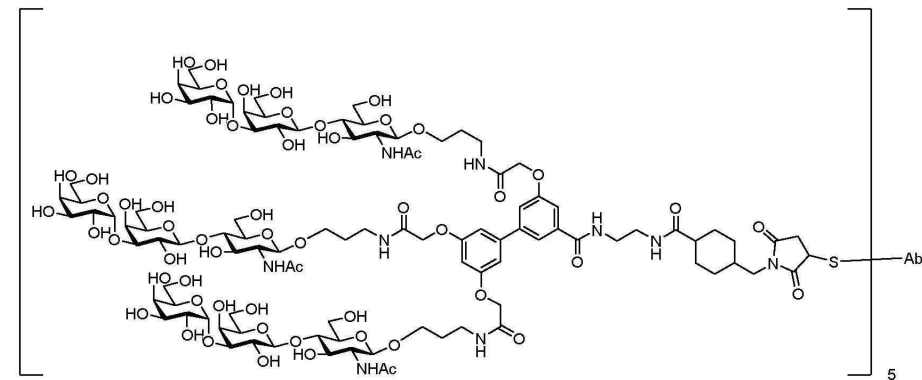
#### 실시예 2



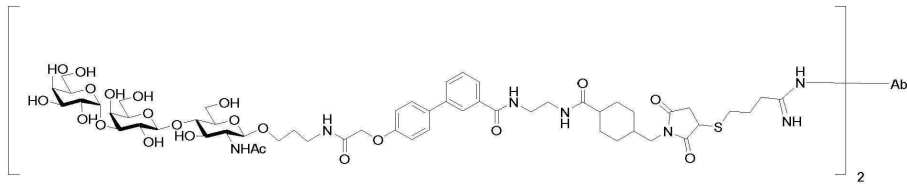
#### 실시예 3



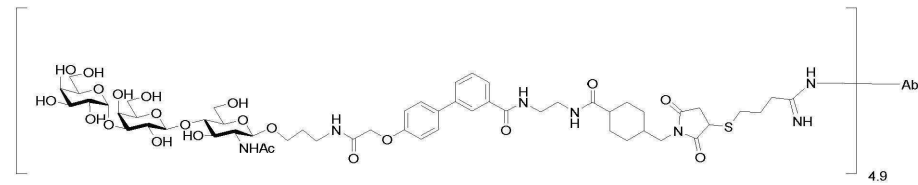
#### 실시예 4



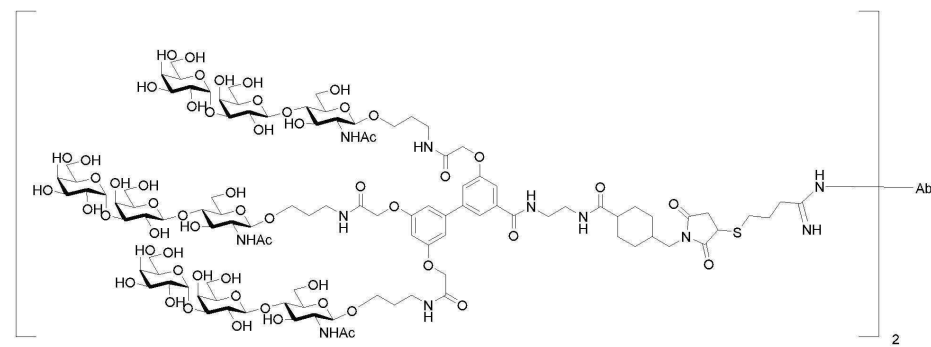
실시예 5



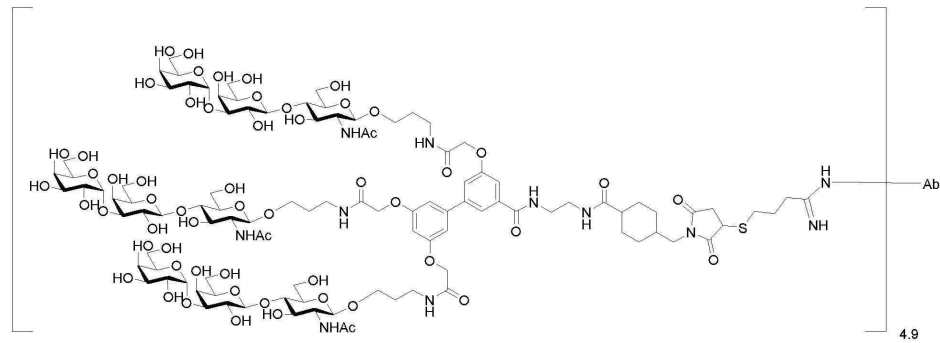
실시예 6



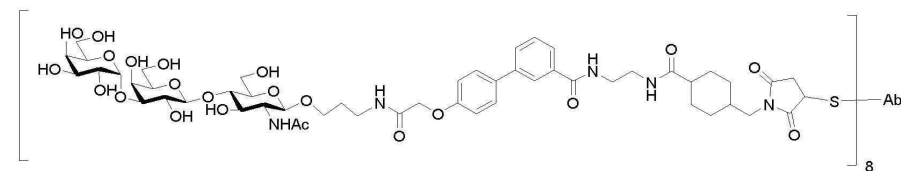
실시예 7



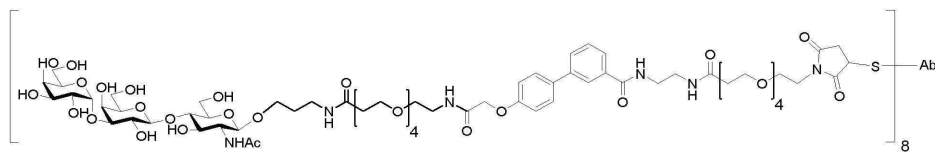
실시예 8



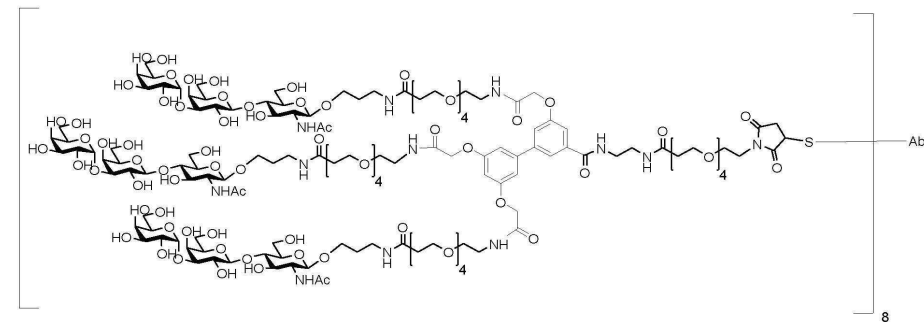
실시예 9



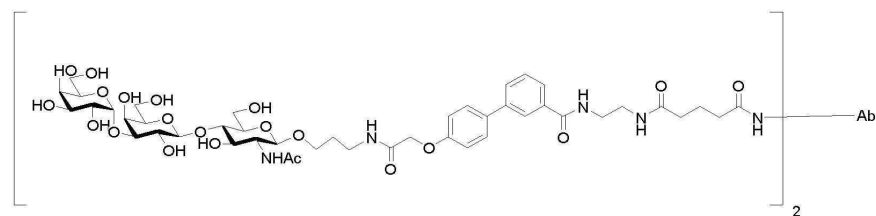
실시예 10



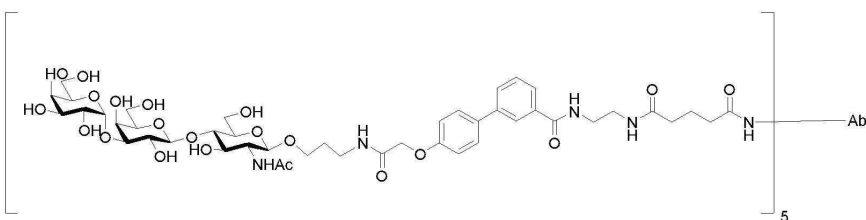
실시예 11



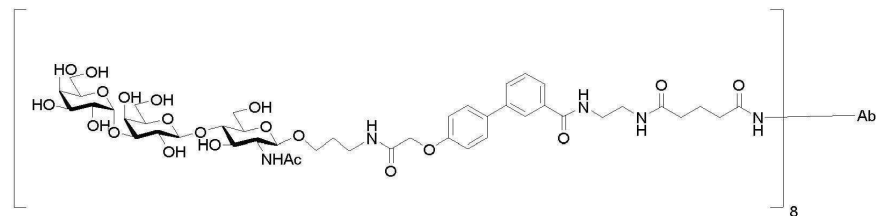
실시예 12



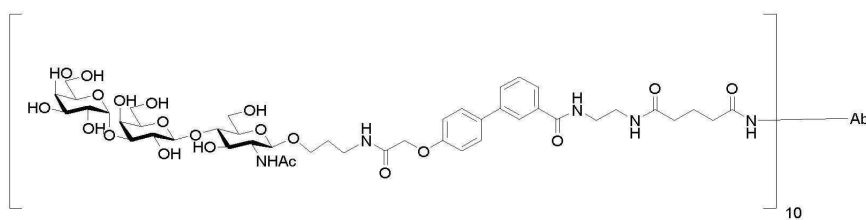
실시예 13



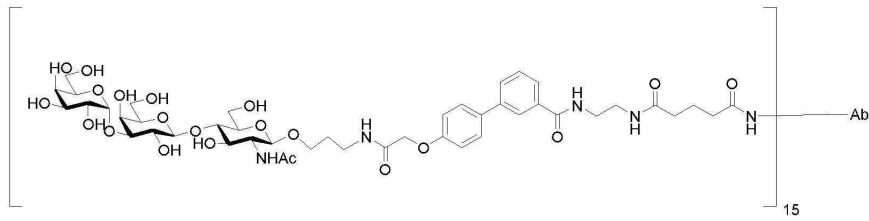
실시예 14



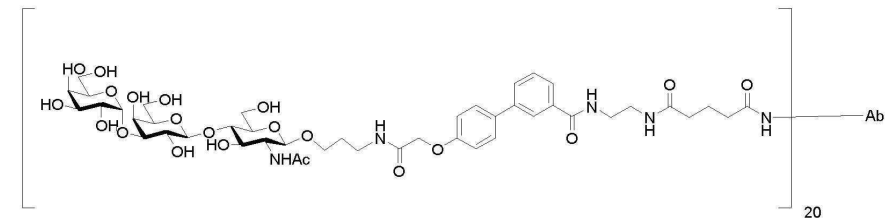
실시예 15



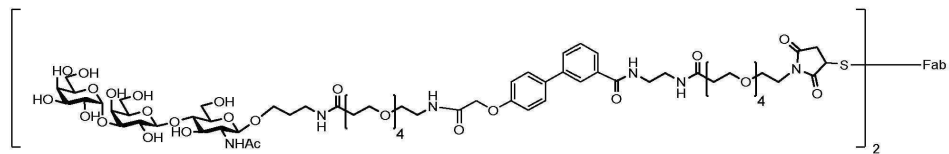
실시예 16



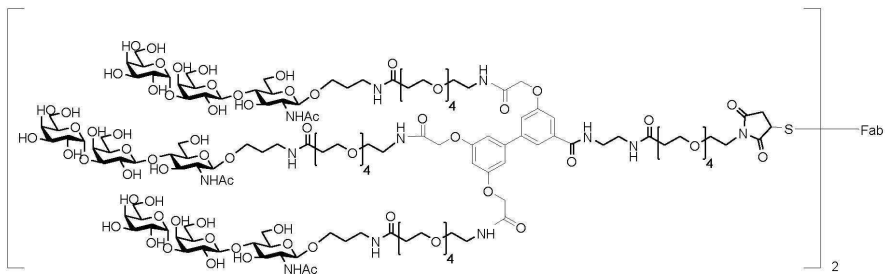
실시예 17



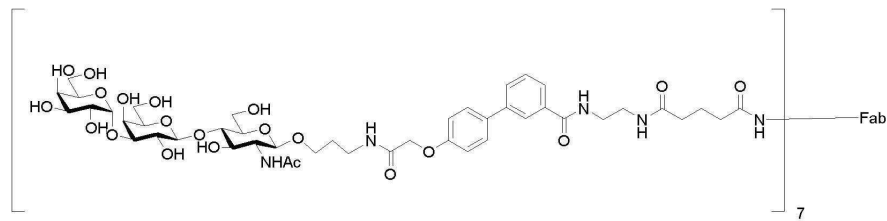
실시예 18



실시예 19

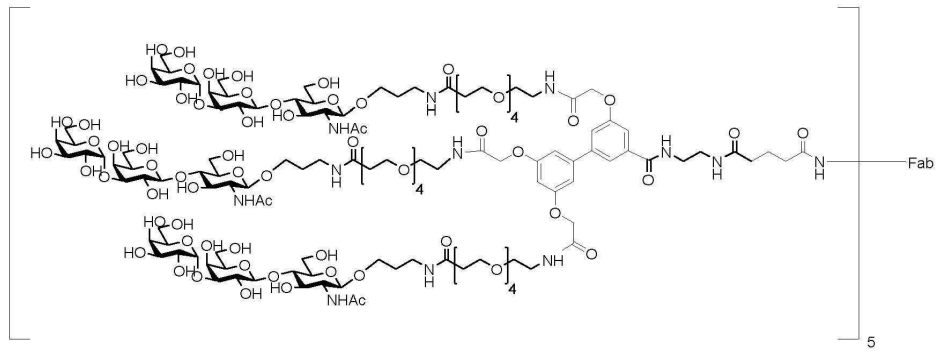


실시예 20

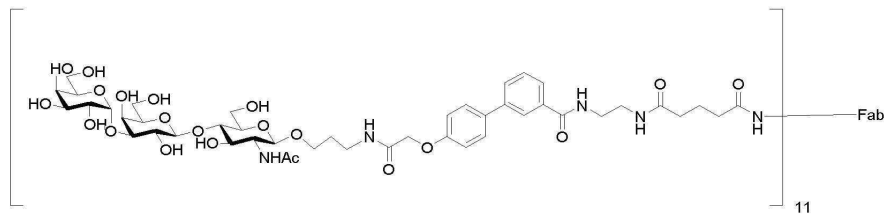




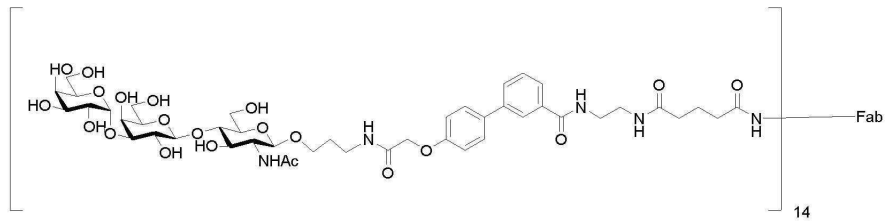
실시예 21



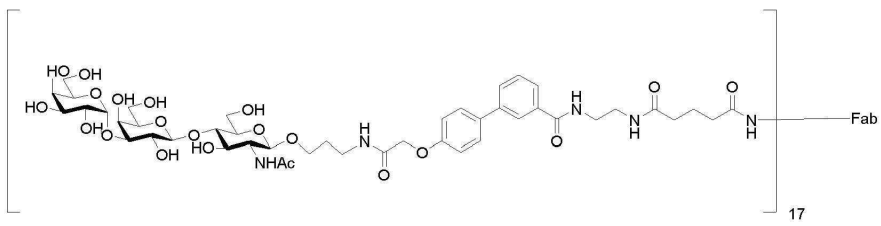
실시예 22



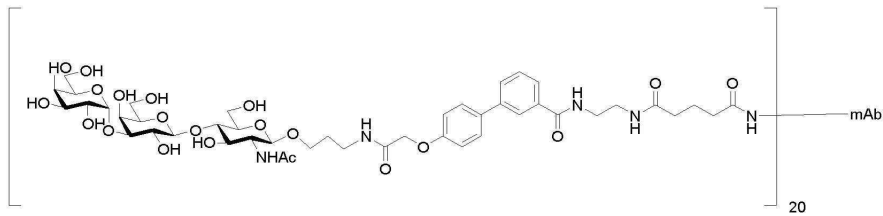
실시예 23



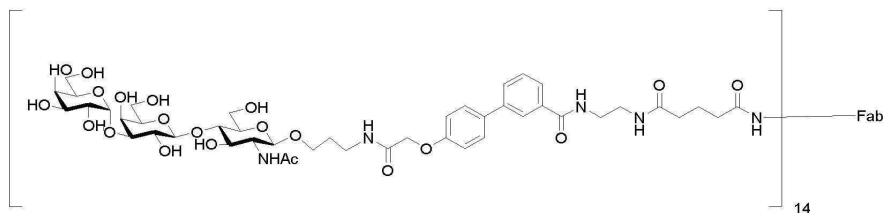
실시예 24



실시예 25



실시예 26



#### 청구항 19

암 또는 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 21

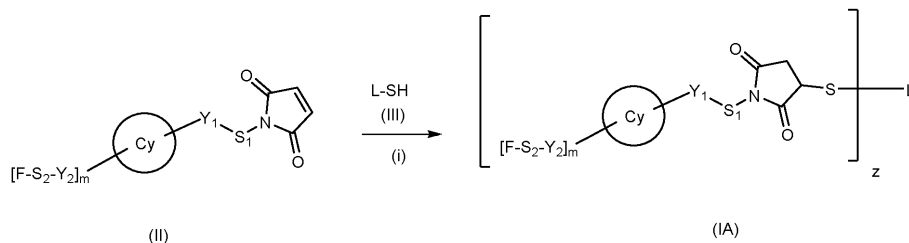
제19항에 있어서, 암이 혈액암인 제약 조성물.

#### 청구항 22

제19항에 있어서, 암이 백혈병 또는 림프종인 제약 조성물.

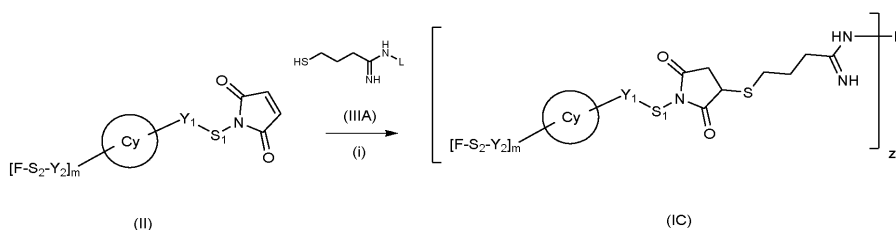
#### 청구항 23

(a) 화학식 (III)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 티올 기를 함유함)을 화학식 (II)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 피롤리딘-2,5-디온으로 종결됨)과 반응시켜 화학식 (IA)의 화합물 (여기서  $X_1$ 은 -S-를 나타냄)을 제조하는 단계:



(여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 제1항에 정의된 바와 같음); 또는

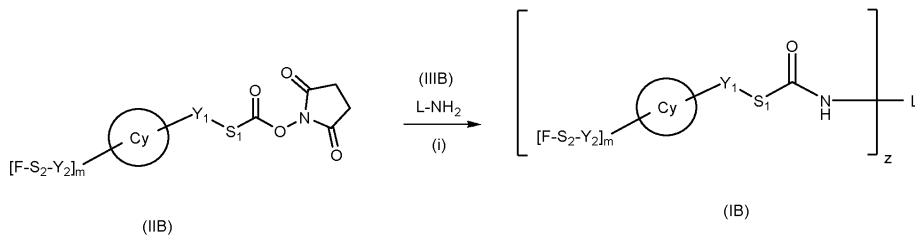
(b) 화학식 (IIIA)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 티올 기를 함유함)을 화학식 (II)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 피롤리딘-2,5-디온으로 종결됨)과 반응시켜 화학식 (IC)의 화합물 (여기서  $X_1$ 은 -NH<sub>2</sub>를 나타내고,  $S_1$ 은 -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(=NH)-를 함유함)을 제조하는 단계:



(여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 제1항에 정의된 바와 같음); 또는

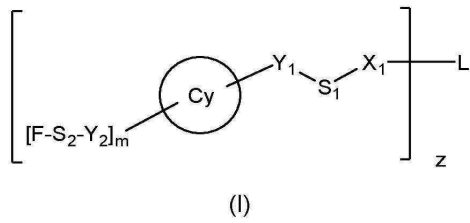
(c) 화학식 (IIB)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 N-히드록시숙신이미드 기로 종결됨)을 화학식 (IIIB)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 아미노 기를 함유함)과 반응시켜 화학식 (IB)의 화합물

(여기서  $X_1$ 은  $-NH_2$ 를 나타냄)을 제조하는 단계:



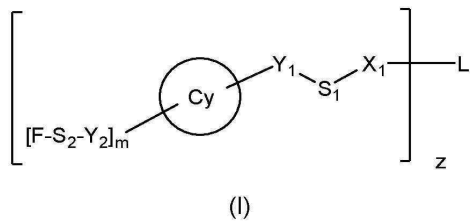
(여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 제1항에 정의된 바와 같음); 및/또는

(d) 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 보호된 형태의 화학식 (I)의 화합물을 추가의 화학식 (I)의 화합물:



또는 그의 보호된 형태의 화학식 (I)의 화합물과 상호전환시키는 단계

를 포함하는, 제1항에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물:



을 제조하는 방법.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 반응을 규정된 치료 표적에 연결시킬 수 있는 신규 화합물, 암 및 감염성 질환을 치료하는데 있어서의 상기 화합물의 용도, 상기 화합물을 함유하는 조성물, 그의 제조 방법 및 상기 방법에 사용되는 신규 중간체에 관한 것이다.

### 배경 기술

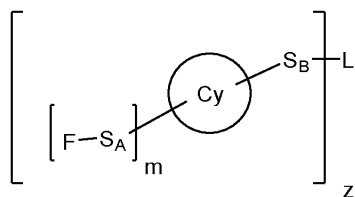
[0002] 질환과 싸우기 위해 개체의 면역계를 동원하기 위한 새로운 방식을 발견할 필요가 있다. 인간 면역계는 잠재적으로 유해한 병원체 또는 돌연변이된 인간 세포 (이는 암성 성장의 원인이 될 수 있음)를 확인하고, 이를 제거하기 위해 표적화하도록, 외래 신호를 찾고자 신체를 계속해서 조사한다. 상기 병원체 또는 돌연변이된 인간 세포로 동원되어 면역계를 구동하여 위협을 제거할 수 있는 천연 항체가 존재한다.

[0003] 암은 신체의 다른 부분으로 침습 또는 확산될 잠재력을 갖는 비정상적 세포 성장을 수반하는 질환의 군이다. 2012년에, 암은 약 14.1백만명의 사람에서 발생하였다. 이는 약 8.2백만건의 사망 또는 모든 인간 사망의 14.6%를 유발하였다. 남성에서 가장 흔한 유형의 암은 폐암, 전립선암, 결장직장암 및 위암이다. 여성에서 가장 흔한 유형은 유방암, 결장직장암, 폐암 및 자궁경부암이다. 면역 반응이 암성 세포의 확인 및 제거에서 필수적인 역할을 하는 것으로 널리 확립되어 있다. 개체의 면역계를 부스팅하여 암과 싸우는 것을 도움으로써 암과 싸우는 약물이 존재한다. 면역 반응을 암 세포에 특이적으로 보다 잘 표적화할 수 있고 보다 넓은 범위의 환자 자신의 종양 연관 항원을 생성할 수 있는 것에 대한 필요가 존재한다. 환자 자신의 종양에 대해 기존의 천연 항체를 표적화하는 것은 이러한 필요를 충족시킬 수 있다. 박테리아, 바이러스 및 진균 감염을 치료하는 신규 방식을 확인하는 것에 대한 긴급한 필요가 존재한다. 항-미생물 약물 저항성은 주요한 세계적인 건강 위협이 되고 있다. 예를 들어, 미국에서 매년 2백만명 초과가 사람이 1종의 항생제 부류에 대해 저항성인 박테리아에 감염되는 것으로 추정된다 (질병 관리 예방 센터, 2013).

- [0004] 감염성 질환 또는 암의 치료를 위한 혁신적인 접근법이 WO 2005/079423에서 개시되었고, 이는 2개의 결합 모이어티를 함유하는 면역 링커를 기재하고 있다. 제1 결합 모이어티는 개체의 면역 반응 성분에 결합할 수 있다. 제2 결합 모이어티는 임의의 화합물 또는 외래 물질, 예컨대 항원, 병원체, 화학물질, 또는 내인성 물질, 예컨대 암에서 발견되는 변경된 세포에 결합할 수 있다. 상기 면역 링커 분자의 생성되는 효과는 개체의 기존 면역 반응이 표적, 즉 암 세포 또는 특이적 병원체로 전환되는 것이다. 상기 제1 결합 모이어티의 예는 상기 개체의 면역계에 의해 외래로 인식되고 따라서 면역 반응을 촉발할 화합물 또는 작용제를 포함한다.
- [0005] 제1 결합 모이어티의 전형적인 예는 소분자 합텐 디니트로페닐 (DNP), 람노스 또는  $\beta$ -1,6-글루칸을 포함한다. 제1 결합 모이어티의 추가의 예는 인간 혈청 항체 항-알파-갈락토실 (즉, 갈락토실-알파-1,3-갈락토실-베타-1,4-N-아세틸글루코사민; '항-Gal')에 결합할 수 있는 탄수화물 분자이다.
- [0006] 면역 기능은 다원자가에 좌우되기 때문에, 항-Gal 동원은 항-Gal의 농도 뿐만 아니라 표적에 대한 항체의 친화도에 좌우될 것이다.
- [0007] 상기 제2 결합 모이어티의 예는 특이적 표적 분자에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 상기 제2 결합 모이어티의 추가의 예는 확립된 치료 항체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 이러한 방식으로 표적화된 세포 또는 병원체는 면역계에 의해 외래로서 인식되고 파괴를 위해 표시될 수 있다. 따라서, 천연 항체는 이들 종양 세포 또는 병원체로 동원되어 면역계를 동력화함으로써 위협을 제거할 수 있다.
- [0008] WO 98/34957은 알파-갈락토실 에피토프로 표지된 항체를 사용한 면역 반응의 자극을 기재한다. 이러한 문헌에는 면역계의 자극이 항체의 불변 영역 내의 조작된 글리코실화 부위 내로의 알파-갈락토실 에피토프의 혼입에 의존하는 실시양태가 기재되어 있다. 알파-1,3-갈락토실 트랜스퍼라제를 발현하는 세포주에서의 적합하게 조작된 항체의 생산이 알파-갈락토실 에피토프의 부가를 발생시키는 것으로 보고되었다. 이 경우에, 혼입되는 에피토프의 수는 글리코실화를 위해 조작된 잔기의 수에 의존하였다. 이러한 접근법의 단점은 도입될 수 있는 알파-갈락토실 잔기의 수의 제한이다 (부위 특이적 아미노산 변형의 수에 의해 제한됨). 접근법의 추가의 단점은 알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라제가 항-갈락토실 항체 동원에 최적이지 아닐 수 있는 탄수화물 유도체의 집단을 전달하여 면역 동원 에피토프의 수를 추가로 제한한다는 것이다. 따라서, 면역 반응을 최대화하기 위해 항체 모이어티에 비해 알파-갈락토실 에피토프의 최적화된 로딩 및 제시를 가능하게 하는 링커 분자에 대한 필요가 존재한다.
- [0009] 따라서, 제2 결합 모이어티 (즉, 항체 또는 항원 결합 단편)의 위치에 비해 제1 결합 모이어티 (즉, 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자)의 수 및 위치를 제어하도록 최적화된 스페이서 기를 함유하는 링커 분자가 매우 필요하다. 이러한 링커 분자는 잠재적인 부작용을 최소화하면서 면역 동원의 효능을 최적화할 수 있는 방식으로 천연 항체를 유인하고 따라서 효과적인 항암 요법 및 감염제에 대한 요법의 제공에 있어서 큰 유용성을 갖도록 설계된다.

### 발명의 내용

- [0010] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자에 링커를 통해 연결된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체가 제공되며, 상기 링커는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 1개 이상의 탄수화물 에피토프를 디스플레이할 수 있는 적어도 1개의 페닐 고리를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 화학식 (A)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염인 면역접합체가 제공된다:

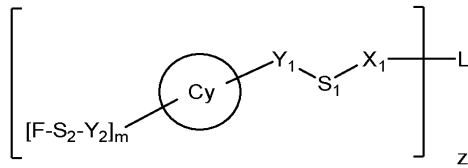


(A)

- [0012] 여기서 F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자이고; Cy는 페닐, 비페닐 또는 트리페닐이고;  $S_A$  및  $S_B$ 는 F 및 L의 최적 거리를 위한 선택된 스페이서를 나타내고; m은 1 내지 5로부터 선택된 정수들

나타내고; z는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타내고; L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0014] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:



[0015]

[0016] 여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;

[0017] S<sub>1</sub>은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>c</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 10개는 -O-, -S-, =N(H)-, -C(=O)-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;

[0018] a는 1 내지 35로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0019] b는 0 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0020] c는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0021] d는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0022] S<sub>2</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개는 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;

[0023] e는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0024] f는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0025] g는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0026] h는 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0027] z는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0028] X<sub>1</sub>은 항체 또는 항원 결합 단편 부착 모이어티를 나타내고;

[0029] Y<sub>1</sub> 및 Y<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, -O-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHSO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NH- 또는 -NHC(O)NH- 기를 나타내고;

[0030] F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자를 나타내고;

[0031] m은 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0032] Cy는 페닐, 비페닐, 트리페닐을 나타내고, 이에 따라 Cy가 비페닐 또는 트리페닐을 나타내는 경우 상기 -Y<sub>1</sub>-S<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L 기는 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있고, 상기 [F-S<sub>2</sub>-Y<sub>2</sub>]<sub>m</sub>- 기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0033] 도 1: 실시예 1-4의 환원 SDS 페이지 분석.

도 2: 실시예 5-8의 환원 SDS 페이지 분석.

도 3: 단량체 함량의 분석: 실시예 1-8에 대한 SEC.

도 4: 실시예 1-8의 화합물에 대한 M86 IgM 데이터.

도 5: 실시예 1-4의 화합물에 대한 M86 IgG 데이터.

도 6: 10nM 세톡시맙과 비교하여 10nM의 실시예 5 (도 6A), 실시예 6 (도 6B), 실시예 7 (도 6C) 및 실시예 8

(도 6D)을 사용한, 세포 표면에의 항-알파-갈락토실 IgM 항체의 포획을 입증한다.

도 7: A431 세포로 hIVIG 항-알파-갈락토실 IgG를 동원하는 실시예 18 내지 23의 화합물에 대한 용량 적정이다.

도 8: A431 세포로 항-갈락토실 M86 IgM 항체를 동원하는 실시예 9 내지 24의 화합물에 대한 용량 적정이다.

도 9: 20% 인간 혈청 (HS) 또는 열 불활성화 인간 혈청 (HI HS) + 25 µg/ml M86 IgM에 의한 A431 세포 상에서의 실시예 13 내지 17, 20, 22, 23 및 24의 화합물에 대한 C3b 침착 데이터.

도 10: 실시예 20 및 23의 화합물에 대한 식세포작용 데이터.

도 11: Raji 세포로 항-갈락토실 M86 IgM 항체를 동원하는 실시예 25 및 26의 화합물에 대한 용량 적정이다.

도 12: 세톡시맵 접합체에 대한 환원 SDS-PAGE 겔 분석 (실시예 9-17).

도 13: 세톡시맵-Fab 접합체에 대한 환원 SDS-PAGE 겔 분석 (실시예 18-24).

도 14: 실시예 20 (도 14A), 22 (도 14B) 및 23 (도 14C)에 대한 MS 분석.

도 15: 리톡시맵 및 리톡시맵-Fab 접합체에 대한 환원 SDS-PAGE (도 15A) 및 SEC 분석 (실시예 25 (도 15B) 및 26 (도 15C)).

도 16: 세톡시맵-Fab의 SDS-PAGE (도 16A), MS (도 16B) 및 SEC (도 16C) 분석.

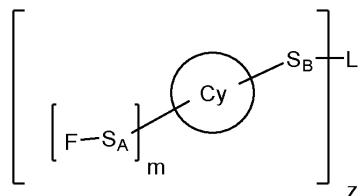
도 17: SDS-PAGE (도 17A) 및 리톡시맵의 SEC 분석 (도 17B) 및 리톡시맵-Fab의 SEC 분석 (도 17C).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자에 링커를 통해 연결된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체가 제공되며, 상기 링커는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 1개 이상의 탄수화물 에피토프를 디스플레이할 수 있는 적어도 1개의 페닐 고리를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 제1 측면의 한 실시양태에서, 상기 링커는 페닐, 비페닐 또는 트리페닐 기를 포함한다. 본 발명의 제1 측면의 추가 실시양태에서, 상기 링커는 비페닐 기를 포함한다.

[0036] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 화학식 (A)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염인 면역접합체가 제공된다:

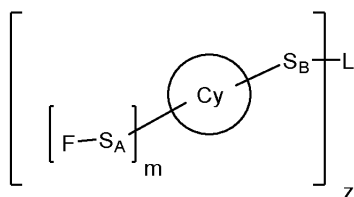


(A)

[0037]

[0038] 여기서 F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자이고; Cy는 페닐, 비페닐 또는 트리페닐이고; S<sub>A</sub> 및 S<sub>B</sub>는 F 및 L의 최적 거리를 위한 선택된 스페이서를 나타내고; m은 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고; z는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타내고; L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0039] 언급될 수 있는 본 발명의 제2 측면에 따르면, 화학식 A의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염인 면역접합체가 제공된다:

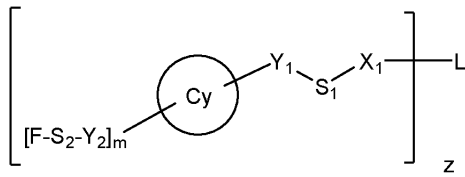


(A)

[0040]

[0041] 여기서 F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자이고; Cy는 페닐, 비페닐 또는 트리페닐이고; S<sub>A</sub> 및 S<sub>B</sub>는 F 및 L의 최적 거리를 위한 선택된 스페이서를 나타내고; m은 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고; z는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타내고; L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0042] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:



(I)

[0043]

[0044] 여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;

[0045] S<sub>1</sub>은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>c</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 10개는 -O-, -S-, =N(H)-, -C(=O)-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;

[0046] a는 1 내지 35로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0047] b는 0 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0048] c는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0049] d는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0050] S<sub>2</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개는 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;

[0051] e는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0052] f는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0053] g는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0054] h는 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0055] z는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0056] X<sub>1</sub>은 항체 또는 항원 결합 단편 부착 모이어티를 나타내고;

[0057] Y<sub>1</sub> 및 Y<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, -O-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHSO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NH- 또는 -NHC(O)NH- 기를 나타내고;

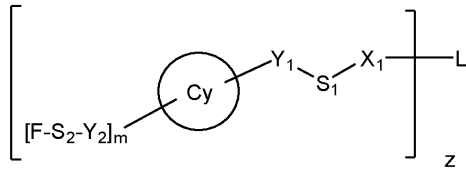
[0058] F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자를 나타내고;

[0059] m은 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0060] Cy는 페닐, 비페닐, 트리페닐을 나타내고, 이에 따라 Cy가 비페닐 또는 트리페닐을 나타내는 경우 상기 -Y<sub>1</sub>-S<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L 기는 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있고, 상기 [F-S<sub>2</sub>-Y<sub>2</sub>]<sub>m</sub> 기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있다.

[0061] 언급될 수 있는 본 발명의 추가 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:





(I)

- [0062]
- [0063] 여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;
- [0064] S<sub>1</sub>은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>c</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 10개는 -O-, -S-, =N(H)-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;
- [0065] a는 1 내지 35로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0066] b는 0 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0067] c는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0068] d는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0069] S<sub>2</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- 기로부터 선택된 스페이서를 나타내고, 여기서 상기 -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개는 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고;
- [0070] e는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0071] f는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0072] g는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0073] h는 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0074] z는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0075] X<sub>1</sub>은 항체 또는 항원 결합 단편 부착 모이어티를 나타내고;
- [0076] Y<sub>1</sub> 및 Y<sub>2</sub>는 독립적으로 결합, -O-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -NHSO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NH- 또는 -NHC(O)NH- 기를 나타내고;
- [0077] F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자를 나타내고;
- [0078] m은 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0079] Cy는 페닐, 비페닐, 트리페닐을 나타내고, 이에 따라 Cy가 비페닐 또는 트리페닐을 나타내는 경우 상기 -Y<sub>1</sub>-S<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L 기는 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있고, 상기 [F-S<sub>2</sub>-Y<sub>2</sub>]<sub>m</sub> 기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 임의의 것 상에 존재할 수 있다.
- [0080] 본 발명은 선택된 항체 또는 그의 단편 상의 단일 또는 다중 부위에 대한 접합에 더하여, 탄수화물의 하나 또는 다중 에피토프를 디스플레이하는 능력을 가능하게 함으로써, 이에 따라 표적 결합 효능은 보유하면서 천연 항체의 최적 동원을 가능하게 하는 신규 면역접합체 링커의 기재 및 용도를 포함한다. 본 발명은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 최적의 항-Gal 동원을 위해 선택된 항체 또는 그의 단편당 탄수화물의 최적 수를 미세 조정하고 표적 효능은 유지시키는 것을 제공한다.
- [0081] 모노클로날 항체는 암을 앓고 있는 환자의 결과를 크게 개선시켰지만, 특정 환자 집단은 이들 요법에 대한 고유 저항성을 입증하였고, 우수한 결과를 관찰할 수는 있지만, 이들은 수명이 짧을 수 있고, mAb 요법에 대한 획득 저항성은 여전히 이슈가 되며, 증가된 항체 효능이 바람직하다. 종양은 예컨대 증가된 수용체 발현 또는 신호 전달 경로에 대한 변화 또는 감소된 면역 반응을 통해 항체 치료에 대한 저항성 또는 감소된 반응을 야기하는 메커니즘을 나타낼 수 있거나 또는 진화시킬 수 있다 (Reslan, L. Mabs 2009, 3, 222). 예를 들어, 환자는 EGFR 신호전달에 영향을 미치는 KRAS 돌연변이의 발현으로부터 생성되는 세특시맙에 대한 고유 저항성을 나타낼

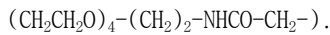
수 있다 (Lievre, A, J. Clin. Oncol. 2008, 26, 374). 또한, 환자가 초기에 세특시맵에 잘 반응한 경우에도, 대부분은 최종적으로 저항성을 획득할 것이다 (Bianco, R. Endocr. Relat. Cancer 2005, S159; Brand, TM. Cancer Biol. Ther. 2011, 11, 777).

- [0082] 치료 항체에 대한 저항성의 추가의 예는 리툽시맵 (항-CD20 모노클로날 항체)으로 치료된 비-호지킨 림프종 환자의 사례에서 관찰된다. 리툽시맵에 대한 저항성은 치료-나이브 환자의 대략 절반에서 관찰된다. 리툽시맵 요법에 대해 초기 반응을 나타내는 환자는 빈번하게 저항성을 획득할 것이다. 저항성 메카니즘은 복잡하고, 저항성을 극복하기 위한 전략은 환자에서 제한된 성공을 나타내므로 (Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2011, 203-216), 환자 반응을 증가시키고 지속시키기 위해 치료 항체의 활성을 개선하는 것이 여전히 유력하게 필요하다.
- [0083] 항체 약물 접합체 (ADC), 항체 독소 접합체 (면역독소) 및 증진된 이펙터 메카니즘, 예를 들어 증가된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 갖는 조작된 항체를 포함한, 치료 항체의 효능을 개선시키기 위한 많은 접근법이 채택되었다. 이들 노력에도 불구하고, 소수의 요법은 독성과 같은 부작용을 동반한 임상 성공을 달성하였고, 이것은 주요 문제로 남아 있다 (Beck, A. Nat. Rev. Drug. Discov. 2017). 따라서, 효능을 증진시켜 환자 결과를 개선시키기 위해 mAb를 변형시키는 새로운 전략에 대한 필요가 존재한다.
- [0084]  $\alpha$ -Gal 에피토프 ( $\text{Gal } \alpha 1,3\text{Gal } \alpha 1,4\text{GlcNAc-R}$ )는 당지질 및 당단백질 상에서 자연 생산되는, 분지형 올리고사카라이드 상에 다중 에피토프를 디스플레이하는 고유한 탄수화물이다 (J.Immunology (2007), 178 (7), 4676-87). 알파-Gal 에피토프는, 예를 들어 다중 글리코실화 부위 상에서의  $\text{Gal } \alpha-1,3\text{-Gal}$ 의 합성을 촉매하는 것으로 널리 공지된 효소인 트랜스퍼라제 알파1-,3-GT에 의해 합성된다 (WO 98/34957). 이러한 방법은 효율적이지만, 합성은 기존의 또는 조작된 글리코실화 부위에 의존하고, 접합 부위당 1개의 알파-Gal 단위만을 가능하게 한다.
- [0085] 따라서, 천연 면역계를 최적으로 동력화하기 위해 알파-Gal 트리사카라이드 단위의 하나 또는 다중-제시에 적합한 모듈 접근법에 대한 매력적인 필요가 존재한다.
- [0086] 본 발명의 화합물은 결합 모이어티 L (즉, 항체 또는 그의 단편)의 위치에 비해 F 군 (즉, 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자)의 수 및 위치를 제어하고 디스플레이하는데 최적화된 링커 분자를 포함한다. 예를 들어, 경질 시클릭 기는 L에 비해 1개 이상의 F 기의 최적 위치화를 위한 스캐폴드를 제공하는 이점을 갖는다. L에 비해 F 군의 정확한 수 및 배향은 L 기의 성질에 따라 달라질 것임이 인지될 것이다. 추가로, 단일 페닐 고리, 비페닐 고리 또는 트리페닐 고리를 함유하는 시클릭 기의 존재는 다중 F 기 (즉, 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자)를 제시하여 숙주로부터 생성되는 면역 반응을 증진시키는 유의한 이점을 제공한다. 다중 결합 기의 화학적 제시는 관련 기술분야에서 이전에 공지되었지만, 이는 1개 이상의 아미노산 기 (예를 들어 WO 2014/178878 참조) 또는 분지형 링커 기 (예를 들어 US 2014/0112975 참조)를 사용하여 달성되었고, 이는 단일 6원 고리계 (즉, 페닐), 결합에 의해 연결된 2개의 6원 고리계 (비페닐) 또는 2개의 결합에 의해 연결된 3원 고리계 (트리페닐)를 사용하는 본 발명과 대조적이다. 이러한 차이의 기술적 효과는 본 발명의 화합물이 관련 기술분야에서 이전에 공지된 링커보다 더 용이하게 제조될 수 있고, 유리하게는 키랄 중심의 존재를 피할 수 있고, 덜 프로테아제 분해되기 쉽다는 것이다. 본 발명의 화합물의 합성은 또한 수지를 사용하지 않고, 따라서 대규모 제약 제조를 위한 규모화에 적합하다는 이점을 제공한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 치료상 유효할 뿐만 아니라, 숙주로부터 면역 반응을 증진시키는 이점, 및 확장성을 갖는 고수율로의 합성의 용이성 및 효율을 제공한다. 또한, 본 발명의 링커는 불안정성이 아니므로, 전형적으로 관련 기술분야에서 이전에 공지된 많은 화합물에 의해 요구되는 바와 같은 "절단가능한 링커" 성분을 포함하지 않는다 (예를 들어, US 8,828,956 참조). 또한, 본 발명의 링커는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 항체 또는 그의 단편 접합 부위당 F 기의 최적 수를 가능하게 하기 위해 합성 용이성 및 효율을 갖는 기의 특정 좌측 및 우측 조합을 선택가능하게 한다.
- [0087] 모노클로날 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', Fab'2, Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 나노바디가 또한 종양학 분야에 공지되어 있다. 보다 작은 크기로부터 발생하는 증가된 종양 침투, 보다 용이한 생산 (이들은 이. 콜라이(E. coli) 또는 효모에서 발현될 수 있어서 증가된 편의성 및 보다 효율적인 규모화를 발생시킴) 및 감소된 면역원성을 포함한, 전장 mAb에 비해 수많은 이점이 보고되어 있다. 그러나, scFv 또는 Fab 단편과 같은 단편은 전장 mAb와 비교했을 때 감소된 효능으로 인해 불리할 수 있다. 예를 들어, Fab 단편 상의 Fc 도메인의 결여는 ADCC 구동 효능의 잠재성, 종종 항종양 반응 성분을 제거한다 (Nelson, A. L. mAbs 2009, 2, 77).
- [0088] 따라서, 항체 단편의 이익은 종종 그와 연관된 기능 상실에 의해 상쇄된다. 최적의 수의 알파-Gal 모이어티가

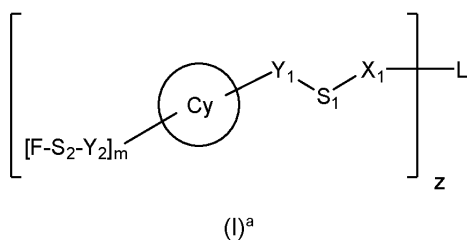
항체 단편에 접합된 새로운 구축물을 제공하기 위한 본 발명의 페닐 함유 링커의 용도는 항체 단편의 항종양 효과를 증진시키는 새로운 접근법을 제공한다.

- [0089] mAb 및 그의 단편 둘 다에 대해, 예를 들어 추가의 시스템 잔기의 혼입을 통한 제어된 부위 특이적 접합은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 접근법은 특히 표적 결합 에피토프의 파괴 없이 mAb 또는 단편의 유도체화를 가능하게 함으로써, 및 로딩이 제어되게 함으로써 즉 고정된 화학량론이 달성되게 함으로써 여러 이점을 제공한다 (Shen, B. Q. Nat. Biotechnol. 2012, 30, 184). 부위 특이적 접합의 하나의 제한은 접합 모이어티의 낮은 로딩이 효능을 제한할 수 있다는 것이다. 접합 부위당 다중 알파-Gal 모이어티의 제시를 가능하게 하는 본 발명의 페닐 함유 링커의 사용은, 심지어 접합 부위의 수가 낮은 경우에도, 높은 알파-Gal/항체 비 (높은 로딩)를 달성하는 방법을 제공한다.
- [0090] 링커 정의
- [0091] 한 실시양태에서,  $S_1$ 은 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0092] 상기  $-CH_2-$  기 중 1 내지 5개 (예컨대 2, 3 또는 5개)가  $-S-$ ,  $=N(H)-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-NHC(O)-$ , 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_a-$  (예컨대  $-(CH_2)_2-NHCO-$ 시클로헥실- $CH_2-3$ -피롤리딘-2,5-디온-,  $-(CH_2)_2-NHCO-$ 시클로헥실- $CH_2-3$ -피롤리딘-2,5-디온- $S-(CH_2)_3-C(=NH)-$  또는  $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2)_3-CO-$ ); 또는
- [0093] 상기  $-CH_2-$  기 중 1 내지 5개 (예컨대 2개)가  $-NHC(O)-$  또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$  (예컨대  $-(CH_2)_2-NHCO-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_2-3$ -피롤리딘-2,5-디온-).
- [0094] 추가 실시양태에서,  $S_1$ 은 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0095]  $-CH_2-$  기 중 1 내지 10개가  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $=N(H)-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ , 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_a-$  (예컨대  $-(CH_2)_2-NHCO-$ 시클로헥실- $CH_2$ -피롤리딘-2,5-디온- 또는  $-(CH_2)_2-NHCO-$ 시클로헥실- $CH_2$ -피롤리딘-2,5-디온- $S-(CH_2)_3-C(=NH)-$ ).
- [0096] a, b, c, d, e, f, g 및 h는 기 F 및 L 사이에 적합한 링커 길이를 유지시키기 위해 선택된다는 것이 인지될 것이다. F 및 L 사이의 적합한 링커 길이의 예는 약 5Å 내지 약 50Å 또는 그 초과 길이, 약 6Å 내지 약 45Å, 약 7Å 내지 약 40Å, 약 8Å 내지 약 35Å, 약 9Å 내지 약 30Å, 약 10Å 내지 약 25Å, 약 11Å 내지 약 20Å, 약 12Å 내지 약 15Å 범위이다. 따라서, 한 실시양태에서, a, b, c, d, e, f, g 및 h는 45 이하, 예컨대 5 및 45 사이, 예컨대 7 및 42 사이, 예컨대 30 이하, 예컨대 5 및 30 사이, 예컨대 7 및 29 사이의 전체 정수를 나타낸다.
- [0097] 한 실시양태에서, a는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 2 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 2, 4, 6, 9, 11, 18 또는 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 6 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 6, 11, 18 또는 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 5 내지 15로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 6 내지 11로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 6, 7 또는 11로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, a는 6로부터 선택된 정수를 나타낸다. 대안적 실시양태에서, a는 7로부터 선택된 정수를 나타낸다. 대안적 실시양태에서, a는 11로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0098] 한 실시양태에서, b는 0 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, b는 0 또는 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, b는 1 내지 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, b는 2 또는 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, b는 30으로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0099] 한 실시양태에서, c는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, c는 1 내지 12로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, c는 4 내지 12로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, c는 4 또는 12로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, c는 4로부터 선택된 정수를 나타낸다.

- [0100] 한 실시양태에서, d는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, d는 2 내지 13으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, d는 2, 5 또는 13으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, d는 13으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 대안적 실시양태에서, d는 3으로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0101] 한 실시양태에서, Y<sub>1</sub>은 결합, -C(O)NH- 또는 -O-를 나타낸다. 추가 실시양태에서, Y<sub>1</sub>은 -C(O)NH-를 나타낸다.
- [0102] 한 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0103] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개가 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1 또는 2개의 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-); 또는
- [0104] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개가 1 내지 3개의 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-).
- [0105] 추가 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0106] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개가 -C(O)NH- 또는 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-); 또는
- [0107] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개가 -C(O)NH- 또는 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-).
- [0108] 추가 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0109] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개가 1 또는 2개의 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-); 또는
- [0110] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개가 1 내지 3개의 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-).
- [0111] 추가 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0112] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개가 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1 또는 2개의 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-); 또는
- [0113] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 내지 3개가 1 내지 3개의 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-).
- [0114] 추가 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0115] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1 또는 2개, 예컨대 1개가 -N(H)-, -C(O)NH- 및 -NHC(O)-로부터 선택된 1 또는 2개, 예컨대 1개의 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-).
- [0116] 추가 실시양태에서, S<sub>2</sub>는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타낸다:
- [0117] -CH<sub>2</sub>- 기 중 1개가 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-); 또는
- [0118] -CH<sub>2</sub>- 기 중 2개가 -NHC(O)- 기에 의해 임의로 치환된 것인 -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>g</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>- (예컨대 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-



- [0119] 한 실시양태에서, e는 1 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 3 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 3, 5, 9 또는 10으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 5 내지 9로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 5 또는 9로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 4 내지 10으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 4, 5 또는 10으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, e는 5로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0120] 한 실시양태에서, f는 1 내지 8로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, f는 2 내지 8로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, f는 2 내지 6으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, f는 4 내지 8로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, f는 4 또는 8로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, f는 4로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0121] 한 실시양태에서, g는 1 내지 15로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, g는 4 내지 12로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, g는 4 또는 12로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, g는 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, g는 1 내지 4로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, g는 4로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0122] 한 실시양태에서, h는 1 내지 4로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, h는 4로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0123] 한 실시양태에서, Y<sub>2</sub>는 결합, -O- 또는 -NHC(O)-를 나타낸다. 추가 실시양태에서, Y<sub>2</sub>는 결합 또는 -O-를 나타낸다. 추가 실시양태에서, Y<sub>2</sub>는 -O-를 나타낸다.
- [0124] 한 실시양태에서, m은 1 내지 4로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 1 내지 3으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 1 또는 3으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 2 또는 3으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 1 또는 2로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 1로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 2로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 3으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, m은 4로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0125] 추가 실시양태에서, z는 1 내지 25로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 1 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 2 내지 20으로부터 선택된 정수 (예컨대 2, 4, 9, 5, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 17 또는 20)를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 1 내지 8로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 1 내지 5로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 2 내지 5로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 2 또는 5로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 2로부터 선택된 정수를 나타낸다. 추가 실시양태에서, z는 5로부터 선택된 정수를 나타낸다.
- [0126] 한 실시양태에서, Cy는 페닐 또는 비페닐을 나타낸다. 추가 실시양태에서, Cy는 비페닐 또는 트리페닐을 나타낸다. 추가 실시양태에서, Cy는 페닐 또는 트리페닐을 나타낸다. 추가 실시양태에서, Cy는 비페닐을 나타낸다.
- [0127] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 화학식 (I)<sup>a</sup>의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:



- [0128]
- [0129] 여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;
- [0130] S<sub>1</sub>은 하기로부터 선택된 스페이서를 나타내고:
- [0131] -CH<sub>2</sub>- 기 중 2, 3 또는 5개가 -S-, =N(H)-, -C(=O)-, -NHC(O)-, 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선



택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_a-$ ; 또는

[0132]  $-CH_2-$  기 중 2개가  $-NHC(O)-$  또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$ ;

[0133] a는 6, 7 또는 11로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0134] b는 3으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0135] c는 4로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0136] d는 3으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0137]  $S_2$ 는 하기로부터 선택된 스페이서를 나타내고:

[0138]  $-CH_2-$  기 중 1개가  $-NHC(O)-$  기에 의해 임의로 치환된 것인  $-(CH_2)_e-$ ; 또는

[0139]  $-CH_2-$  기 중 2개가  $-NHC(O)-$  기에 의해 임의로 치환된 것인  $-(CH_2)_f-(CH_2-CH_2-O)_g-(CH_2)_h-$ ;

[0140] e는 5로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0141] f는 4로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0142] g는 4로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0143] h는 4로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0144] z는 2 내지 20으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0145]  $X_1$ 은  $-S-$  또는  $-N(H)-$ 를 나타내고

[0146]  $Y_1$ 은  $-C(O)NH-$ 를 나타내고;

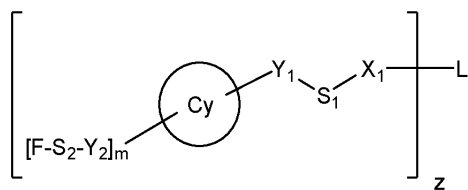
[0147]  $Y_2$ 는  $-O-$ 를 나타내고;

[0148] F는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자를 나타내고;

[0149] m은 1 또는 3으로부터 선택된 정수를 나타내고;

[0150] Cy는 비페닐을 나타내고, 이에 따라 상기  $-Y_1-S_1-X_1-L$  기는 상기 페닐 고리 중 어느 하나 상에 존재할 수 있고 상기  $[F-S_2-Y_2]_m$  기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 어느 하나 상에 존재할 수 있다.

[0151] 언급될 수 있는 본 발명의 추가 측면에 따르면, 화학식 (I)<sup>a</sup>의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다:



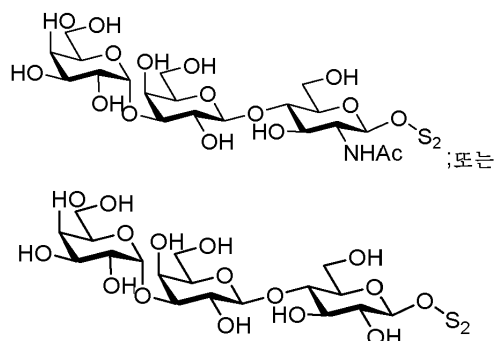
(I)<sup>a</sup>

[0152] 여기서 L은 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택된 결합 모이어티를 나타내고;

[0154]  $S_1$ 은  $-CH_2-$  기 중 1 내지 5개가  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $=N(H)-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ , 시클로헥실 또는 피롤리딘-2,5-디온으로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_a-$  기로부터 선택된 스페이서를 나타내고;

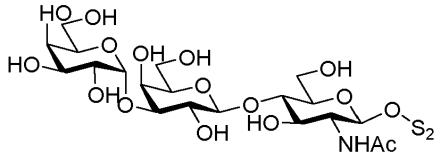
[0155] a는 6 또는 11로부터 선택된 정수를 나타내고;

- [0156]  $S_2$ 는  $-CH_2-$  기 중 1 내지 3개가  $-N(H)-$ ,  $-C(O)NH-$  및  $-NHC(O)-$ 로부터 선택된 1개 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 것인  $-(CH_2)_e-$  기로부터 선택된 스페이서를 나타내고;
- [0157]  $e$ 는 5로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0158]  $z$ 는 2 내지 5로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0159]  $X_1$ 은  $-S-$  또는  $-N(H)-$ 를 나타내고;
- [0160]  $Y_1$ 은  $-C(O)NH-$ 를 나타내고;
- [0161]  $Y_2$ 는  $-O-$ 를 나타내고;
- [0162]  $F$ 는 인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자를 나타내고;
- [0163]  $m$ 은 1 또는 3으로부터 선택된 정수를 나타내고;
- [0164]  $Cy$ 는 비페닐을 나타내고, 이에 따라 상기  $-Y_1-S_1-X_1-L$  기는 상기 페닐 고리 중 어느 하나 상에 존재할 수 있고 상기  $[F-S_2-Y_2]_m-$  기 또는 기들은 상기 페닐 고리 중 어느 하나 상에 존재할 수 있다.
- [0165] 추가 실시양태에서, 본 발명은 실시예 1-26의 화합물을 포함하는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.
- [0166] 추가 실시양태에서, 본 발명은 실시예 1-26의 화합물의 유리 염기인 화학식 (I)의 화합물을 제공한다.
- [0167] 추가 실시양태에서, 본 발명은 실시예 1-8의 화합물을 포함하는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.
- [0168] 추가 실시양태에서, 본 발명은 실시예 1-8의 화합물의 유리 염기인 화학식 (I)의 화합물을 제공한다.
- [0169] 알파 Gal
- [0170] 본원에 언급된 용어 "인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자"는 상기 인간의 면역 반응 성분 (즉 항-알파-갈락토실 항체)에 결합하고 결과적으로 인간에서 면역 반응을 도출할 수 있는 당 (즉 탄수화물) 모이어티를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 항-알파-갈락토실 항체는 항-알파-갈락토실 IgG 항체 또는 항-알파-갈락토실 IgM 항체이다. 이러한 탄수화물 분자의 예는 알파-갈락토실 화합물 및 그의 변형된 유도체를 포함한다. 적합한 탄수화물 분자의 추가의 예는 종양 세포의 선택적 표적화 및 사멸에 사용하기에 적합한 것으로서 US 2012/0003251에 열거된 알파-gal 에피토프를 포함하며, 그러한 에피토프는 본원에 참조로 포함된다. 한 실시양태에서,  $F$ 는 갈락토실-알파-1,3-갈락토실-베타-1,4-N-아세틸글루코사민, 알파1-3 갈락토비오스, 알파1-3-베타1-4-갈락토트리오스 또는 갈리리펜타사카라이드로부터 선택된다.
- [0171] 하나의 특정한 실시양태에서,  $F$ 는 하기 화학식 중 하나에 제시된 바와 같은 구조를 갖고:



- [0172]
- [0173] 여기서  $S_2$ 는  $S_2$  기에 대한 부착 지점을 지칭한다.

[0174] 하나의 특정한 실시양태에서, F는 하기 화학식에 제시된 바와 같은 구조를 갖고:



[0175]

[0176] 여기서 S<sub>2</sub>는 S<sub>2</sub> 기에 대한 부착 지점을 지칭한다.

[0177] 항체 및 그의 항원 결합 단편

[0178] 본원에 언급된 용어 "항체" 또는 "항체들"은 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편, 특히 이뮤노글로불린 분자 및 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원에 면역특이적으로 결합하는 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. 본 발명에 따른 이뮤노글로불린은 임의의 부류 (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 하위부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 이뮤노글로불린 분자의 하위부류 (이소형) (예를 들어 IgG의 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, 또는 IgA의 IgA1 및 IgA2)일 수 있다.

[0179] 본 발명의 범주 내에서, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 모노클로날, 폴리클로날, 키메라, 단일쇄, 이중특이적, 인간 및 인간화 항체 뿐만 아니라 그의 활성 단편을 포함한다. 공지된 항원에 결합하는 분자의 활성 단편의 예는 Fab 이뮤노글로불린 발현 라이브러리의 생성물 및 상기 언급된 항체 및 단편 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 포함한, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv 및 Fv 단편을 포함한다.

[0180] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실험실에서 단일 클론으로부터 대량 생산되고 단지 1종의 항원만을 인식하는 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 전형적으로 정상적으로 짧게 생존하는 항체-생산 B 세포를 빠른-성장 세포, 예컨대 암세포 (때때로 "불멸" 세포로 지칭됨)에 융합시켜 제조된다. 생성된 하이브리드 세포 또는 하이브리도마는 신속하게 증대되어, 다량의 항체를 생산하는 클론을 생성한다. 본 발명의 목적상, "모노클로날 항체"는 또한, 완전한 모노클로날성에는 아직 도달하지 못한 모 클론에 의해 생산되는 항체를 포함하는 것으로 이해된다.

[0181] 본원에 사용된 용어 "키메라 항체"는 통상적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는, 마우스로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역 및 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다. 마우스 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 예시적인 실시양태이다. 이러한 마우스/인간 키메라 항체는 마우스 이뮤노글로불린 가변 영역을 코딩하는 DNA 절편 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역을 코딩하는 DNA 절편을 포함하는 발현된 이뮤노글로불린 유전자의 생성물이다. 본 개시내용에 포괄되는 다른 형태의 "키메라 항체"는 부류 또는 하위부류가 본래의 항체로부터 변형되거나 변화된 것이다. 이러한 "키메라" 항체는 또한 "부류-전환 항체"로 지칭된다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 현재 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기술을 수반한다. 예를 들어 문헌 [Morrison, S. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]; 미국 특허 번호 5,202,238 및 미국 특허 번호 5,204,244를 참조한다.

[0182] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체" 또는 "항체의 인간화 버전"은 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역" (CDR)이 모 이뮤노글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 이뮤노글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 일부 예시적인 실시양태에서, VH 및 VL의 CDR은 "인간화 항체"를 제조하기 위해 인간 항체의 프레임워크 영역 내로 그래프팅된다. 예를 들어 문헌 [Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; 및 Neuberger, M. S., et al., Nature 314 (1985) 268-270]을 참조한다. 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역은 동일하거나 상이한 인간 항체 서열로부터 유래될 수 있다. 인간 항체 서열은 자연 발생 인간 항체의 서열일 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역은 예를 들어 문헌 [Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology (2000)-Appendix 1P A.1P.1-A.1P.37]에 열거되어 있고, 이는 예를 들어 IMGT, 국제 면역유전학 정보 시스템(international ImMunoGeneTics information System)® (<http://imgt.cines.fr>)을 통해 또는 <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>를 통해 접근가능하다. 임의로, 프레임워크 영역은 추가의 돌연변이에 의해 변형될 수 있다. 예시적인 CDR은 키메라 항체에 대해 상기 언급된 항원을 인식하는 서열을 나타낸 것에 상응한다. 일부 실시양태에서, 이러한 인간화 버전은 인간 불변 영역에 의해 키메라화된다. 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는 또한 예를 들어 "부류 전환" 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이 (예를 들어 IgG1로부터 IgG4 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이)에 의해, 특히 Clq 결합 및/또는 FcR 결합과 관련하여, 개시내용에 따른 특성을 생

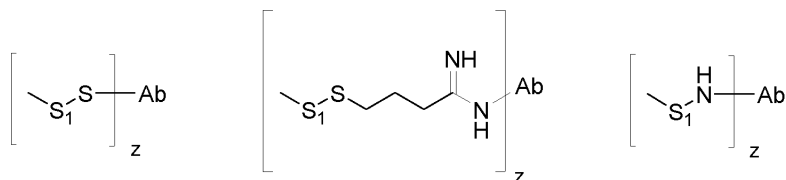


성하기 위해 불변 영역에서 변형된 이러한 항체를 포함한다.

- [0183] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (van Dijk, M. A., and van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). 또한, 인간 항체는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)에서 생산될 수 있고, 이는 면역화 시, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생산하거나 이를 선택할 수 있다. 이러한 배선 돌연변이체 마우스로의 인간 배선 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 챌린지 시 인간 항체의 생산을 발생시킨다 (예를 들어 문헌 [Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M. D., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40] 참조). 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생산될 수 있다 (Hoogenboom, H. R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). 또한, 콜, 에이.(Cole, A.) 등 및 보너, 피.(Boerner, P.) 등의 기술은 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다 (Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A. R. (1985) p. 77; 및 Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). 이미 언급된 바와 같이, 본 개시내용에 따르면, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또한 예를 들어 "부류 전환" 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이 (예를 들어 IgG1로부터 IgG4 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이)에 의해, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 FcR 결합과 관련하여, 개시내용에 따른 특성을 생성하기 위해 불변 영역에서 변형된 이러한 항체를 포함한다.
- [0184] 본원에 사용된 "단일 쇠 항체"는 단일 쇠 Fv 분자 (scFv)를 지칭하며, 여기서 VH 도메인 및 VL 도메인은 2개의 도메인이 회합되어 항원 결합 부위를 형성하도록 하는 펩티드 링커에 의해 연결된다 (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883 또는 이중특이적 단일 쇠 Fv (WO 03/11161)).
- [0185] 본원에 사용된 용어 "이중특이적 항체"는 2개 (또는 그 초과)의 상이한 항원에 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0186] 본원에 사용된 용어 "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 예를 들어 가능하게는 그의 가변 도메인, 또는 적어도 그의 항원 결합 부위를 지칭한다. 항체 단편의 예는 디아바디, 단일 쇠 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. scFv 항체는 예를 들어 문헌 [Huston, J. S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88]에 기재되어 있다. 항체 단편은 다수의 관련 기술분야에 공지된 기술에 의해 본 발명의 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 정제된 모노클로날 항체는 펩신과 같은 효소로 절단되고, HPLC 겔 여과에 적용될 수 있다. 이어서, Fab 단편을 함유하는 적절한 분획은 막 여과 등에 의해 수집되고 농축될 수 있다. 항체의 활성 단편의 단리를 위한 일반적 기술에 대한 추가의 설명에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986]을 참조한다.
- [0187] 본원에 사용된 용어 "특이적" 및 "특이적으로"는 다른 생체분자가 관심 생체분자에 특이적으로 결합하는 항체에 유의하게 결합하지 않는다는 것을 나타내는 것으로 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 내의 에피토프를 포함하는 펩티드 이외의 생체분자에 결합하는 수준은 ELISA 또는 친화도 결정에 의해 무시할 만한 (예를 들어, 결정가능하지 않은) 결합 친화도를 발생시킨다.
- [0188] "무시할 만한 결합"은 펩티드 내의 에피토프를 포함하는 펩티드에 대한 결합보다 적어도 약 85%, 특히 적어도 약 90%, 보다 특히 적어도 약 95%, 보다 더 특히 적어도 약 98%, 그러나 특히 적어도 약 99% 및 최대 100% 낮은 결합을 의미한다.
- [0189] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항원-결합 분자 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)가 결합하는 표적 분자 (예를 들어, 항원, 예컨대 단백질) 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 표적 분자의 인접하거나 또는 근접한 비인접 잔기 (예를 들어, 아미노산 잔기) 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접한 잔기 (예를 들어, 아미노산 잔기)로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 또한 선형 에피토프로도 불린다. 에피토프는 전형적으로 적어도 5 내지 최대 약 12개의 잔기, 대부분 6 내지 10개의 잔기 (예를 들어, 아미노산 잔기)를 포함한다.
- [0190] 본원에 사용된 용어 "CDR"은 항체의 초가변 영역을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열이 초가변이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 다수의 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포괄된다. 카바트(Kabat) 상보성 결정 영역은 서열 가변성에

기초하고, 가장 통상적으로 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 용어 "CDR" 앞의 단어 "HC" 및 "LC"는 각각 중쇄 및 경쇄의 CDR을 지칭한다.

- [0191] 본원에 사용된 용어 "상동성" 및 "동일성"은 상호교환가능하게 사용된다. 서열 사이의 서열 상동성 또는 동일성의 계산은 다음과 같이 수행된다.
- [0192] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 퍼센트 (%) 동일성을 결정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다 (예를 들어, 갭은 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에 도입될 수 있고, 비-상동 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있음). 바람직한 실시양태에서, 비교 목적으로 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 더 바람직하게는 적어도 60%, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다. 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우에 분자는 그 위치에서 동일하다 (본원에 사용된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등함). 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수, 및 각각의 갭의 길이를 고려한, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다.
- [0193] 2개 서열 사이의 서열의 비교 및 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 블로섬 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4, 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램 내로 혼입된 문헌 [Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453] 알고리즘을 사용하여 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 퍼센트 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스, 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70 또는 80, 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 결정된다. 특히 바람직한 파라미터 세트 (및 분자가 본 발명의 서열 동일성 또는 상동성 제한 내의 것인지 결정하는데 어떠한 파라미터가 적용되어야 하는지 진료의에게 불확실한 경우에 사용되어야 하는 것)는 갭 페널티 12, 갭 연장 페널티 4, 및 프레임시프트 갭 페널티 5를 사용하는 블로섬 62 점수화 매트릭스이다.
- [0194] 대안적으로, PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된 문헌 [Meyers et al. (1989) CABIOS 4:11-17]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 퍼센트 동일성을 결정할 수 있다.
- [0195] 본원에 사용된 용어 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.
- [0196] 한 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간화 항체, 인간 항체, 무린 항체 또는 키메라 항체이다.
- [0197] 한 실시양태에서, 그의 항원 결합 단편은 항원-결합 단편 (Fab) 또는 단일-쇄 가변 단편 (scFv)이다. 추가 실시양태에서, 상기 단편은 Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, 및 scFv로 이루어진 군으로부터 선택된다. X<sub>1</sub>은 임의의 적합한 항체 또는 항원 결합 단편 부착 모이어티를 나타낼 수 있고, 상기 군의 선택은 항체 내의 부착 지점으로서 선택된 아미노산 잔기에 좌우될 것임이 인지될 것이다.
- [0198] 한 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 -S- 또는 -N(H)-를 나타낸다. 이러한 실시양태에서, L은 하기 3가지 구조 중 1가지에 따라 화학식 (I)의 화합물에 접합된다:



[0199]

[0200]

여기서, S<sub>1</sub> 및 z는 본원에 정의된 바와 같고, Ab는 반응성 티올 또는 리신 기로 종결된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 나타낸다. 이러한 반응 티올 또는 시스테인 기는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 상에서 이용가능할 수 있거나, 또는 부위 특이적 변형을 통해 펩티드 쉘에 도입되어 조작된 아미노산 잔기를 통해 추가의 접합 지점을 전달할 수 있다 (Nat. Biotechnol. 2008, 925; Nat. Biotechnol. 2012, 184). 대안적으로, 부위 특이적 아미노산을 표적하는 펩티드 쉘 내로 혼입하여 부위 특이적 접합을 위한 직교 화학적 반응을 가능하게 할 수 있다 (OPRD (2016), 20, 852-866). 직교 반응성을 갖는 아미노산의 예는 p-아세틸페닐알라닌 (pAcPhe, J. Mol. Biol. 2011, 595), 파라-아지도메틸-L-페닐알라닌 (pAMF, Bioconjug. Chem 2014, 351), N6-((2-아지도에톡시) 카르보닐)-L-리신 (Bioconjug. Chem. 2015, 2249)을 포함한다.

[0201]

본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 암 세포 또는 특이적 병원체인 치료 표적에 결합하도록 구성될 것임이 인지될 것이다.

[0202]

한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 암 세포에 결합하도록 구성된다. 추가 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 종양-연관 항원에 특이적으로 결합하며, 종양 세포 상에서의 그의 세포 표면 발현은 건강한 세포 상에서의 그의 발현과 상이하다.

[0203]

바람직한 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 암 세포 또는 병원체 상의 표적에 결합한다. 바람직한 표적은 EGFR, HER2, HER3, CD22, EpCAM, PSMA, PSCA, FLT-3, CD30, CD20, CD33, CD23, CD2, CD37, CD25, CD73, CD47, LGR-5, CD80, CD86, CD70, CD74, CD40, CD19, CD79b, CA-125, c-met, CXCR4, DR5, PD-1, PD1L, LeY, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MIP-1A, MIP-1B, KIT, TRAIL 수용체 (R1 및 R2), CXCR4, CEACAM, IGF-1R, 탄산 안하이드라제 IX, PDGFRα, CD137, CD276, 메소텔린, VEGFR, P-카드헤린, CD56, 박테리아 Psl, 박테리아 리포폴리사카라이드, 박테리아 LPS의 갈락탄-III 에피토프, 박테리아 PcrV, RSV F 단백질을 포함한다.

[0204]

항-EGFR 항체

[0205]

추가 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 결합 에피토프이다. EGFR은 여러 인간 암 유형에서 과다발현되는 것으로 널리 공지되어 있다. 특정 암 세포에서의 높은 발현은 EGFR을 신규 요법에 대한 매력적인 표적으로 만든다. 한 실시양태에서, EGFR 결합 항체 또는 항원 결합 단편은 EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) 및 Her 4 (ErbB-4)로부터 선택된 EGFR 서브패밀리 중 임의의 것에 결합하는 에피토프이다. 적합한 EGFR 결합 항체의 예는 세툽시맙, 니모투주맙, 마투주맙, 잘루투무맙, 및 파니투무맙을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

서열 ID NO	서열
세특시맵 중쇄 (SEQ ID NO: 1)	<p>QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWWSGGNTDYN</p> <p>TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYD YEFAYWGQGTLLVTVSAA</p> <p>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSG</p> <p>LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGP</p> <p>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNS</p> <p>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL</p> <p>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ</p> <p>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
세특시맵 경쇄 (SEQ ID NO: 2)	<p>DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGS PRLLIKYASESISGIPS</p> <p>RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT KLELKRTVAAPSVFIFPP</p> <p>SDEQLKSGTASVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLT</p> <p>LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>

[0206]

[0207]

추가 실시양태에서, EGFR 항체는 (a) Li et al. (2005) Cancer Cell 7, 301-11; (b) Dubois et al. (2008) Anal. Chem. 80, 1737-45; 및 (c) [www.imgt.org](http://www.imgt.org); [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) 또는 WO 2016/196682에서 이용가능한 IMGT 데이터베이스에 개시된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 서열 둘 다를 포함하는 하이브리드 마우스/인간 키메라 항체인 세특시맵이다.

[0208]

추가 실시양태에서, 세특시맵 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 EGFR을 인식하고 이에 특이적으로 결합하며, 서열식별번호: 1 및 2에 대해 적어도 80%, 82%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다.

[0209]

추가 실시양태에서, EGFR 결합 항체의 단편은 L의 예로서 선택될 수 있다. 전형적인 예는 세특시맵 Fab (Li, S. et al. (2005) Cancer Cell 7, 301-311); 세특시맵 scFv (US 7,060,808); 파니투무맵 Fab (Sickmier E. A. et al. (2016) PLoSone 11, 9, e0163366); 파니투무맵 scFv (US 6,235,883) 및 D2C7 scFv (US 2013/0022598; Clin Cancer Res 2013, 19(17), 4717-4727)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0210]

항-CD20 항체

[0211]

추가 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD20 결합 에피토프이다. CD20 발현 세포 (예를 들어 B 세포)의 제거는 혈액암, 예컨대 백혈병 및 림프종의 치료에서 치료 이익을 갖는 것으로 널리 공지되어 있다. 적합한 CD20 결합 항체의 예는 리툭시맵, 오크렐리주맵, 오파투무맵 및 오비누투주맵을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

리톡시맵 중쇄 (SEQ ID NO: 3)	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPG NGDTSY</p> <p>NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGT TVTVS</p> <p>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAV LQS</p> <p>SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELL G</p> <p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQY</p> <p>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RD</p> <p>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SR</p> <p>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
리톡시맵 경쇄 (SEQ ID NO: 4)	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWYATSNLASGVP VR</p> <p>FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP S</p> <p>DEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS TLTL</p> <p>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

[0212]

[0213]

추가 실시양태에서, CD20 항체는 (a) US 5,736,137, (b) Wang, B. et al. (2013) Analyst 138, 3058-3065 및 (c) [www.imgt.org](http://www.imgt.org); [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)에서 이용가능한 IMGT 데이터베이스에 개시된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 서열들 다를 포함하는 하이브리드 마우스/인간 키메라 항체인 리톡시맵이다.

[0214]

추가 실시양태에서, 리톡시맵 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD20을 인식하고, 이에 특이적으로 결합하며, 서열식별번호: 3 및 4에 대해 적어도 80%, 82%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다.

[0215]

추가 실시양태에서, CD20 결합 항체의 단편은 L의 예로서 선택될 수 있다. 전형적인 예는 리톡시맵 Fab (Du, J. et al. (2007) J. Biological Chem. 282, 15073-15080)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0216]

추가 실시양태에서, CD20 항체 또는 그의 단편은 리톡시맵 또는 리톡시맵 Fab로부터 선택된다.

[0217]

병원체 특이적 항체 표적

[0218]

대안적 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 특정 병원체에 결합하도록 구성된다. 추가 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 박테리아에 결합하도록 구성된다. 적합한 항체의 예는 WO 2015/ 196011, WO 2012/170807 및 WO 2014/074528에 보고된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0219]

접합체

[0220]

본원에 개시된 임의의 항체 또는 그의 단편은 1개 이상의 알파-Gal을 함유하는 본원에 기재된 시클릭 스페이서 링커에 접합될 수 있다. 본 발명은 항체 또는 그의 단편의 효능은 보유하면서 접합 부위당 링커당 최적의 수의 알파-Gal 단위를 선택하는 능력에 관한 것이다. 접합의 유형은, 링커의 말단 관능기 및 항체 또는 그의 단편의 표면 반응성 또는 선택된 반응성 부위에 기초하여 단리되는 물질의 최고 수율 및 순도가 가능하도록, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합은 말레이미드 모이어티에의 티올 부가에 의해 용이해진다. 대안적으로 접합은 아미노기와 활성화된 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르 사이의 아미드 결합 형성에 의해 용이해질 수 있다.

[0221]

접합체가 다중 접합 반응으로 이어지는 여러 반응성 부위를 포함하는 경우에, 상기 언급된 범위는 항체 또는 그



의 단편당 링커 분자의 실제 또는 평균 수를 지칭할 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

- [0222] 본원에 사용된 용어 'LAR' (링커:항체 비)는 항체 또는 그의 단편에 성공적으로 접합된 링커 분자의 실제 수 또는 평균 수를 지칭한다. LAR은 본원에서 "z" 로 정의된 정수의 값과 등가이다. 링커 로딩을 결정하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, LAR은 링커에 대한 대용물 페이로드로서 Mal-vc-PAB-MMAE의 반응에 의해 결정되고, HIC를 사용하여 분석된다.
- [0223] 접합체 특성
- [0224] 본원에 기재된 다양한 실시양태 중 임의의 것에서, 항체 또는 그의 단편은 그의 표적에 대한 그의 결합 효능은 보유하면서 항-Gal의 최적 동원을 가능하게 할 것이다. 한 실시양태에서, 세특시맵은 평균 최대 5개, 예컨대 최대 20개, 특히 최대 30개의 링커 분자에 접합되어 있으면서 EGFR에 결합하는 그의 능력을 보유한다.
- [0225] 일부 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 하기 특성 중 1개 이상을 나타낼 수 있다:
- [0226] a) 항체 또는 그의 단편에의 링커의 접합은 미접합 대용물을 초과하는 표적에 대한 결합 효능을 유의하게 변경할 수 없음;
- [0227] b) 알파-Gal 함유 링커의 접합은 올리고사카라이드의 친수성 특성으로 인한 병행하는 높은 수준의 응집 없이 높은 수준의 LAR을 가능하게 할 수 있음;
- [0228] c) 알파-Gal 함유 링커의 부가는 항체 또는 그의 단편을 보다 안정하게 할 수 있음;
- [0229] d) 중쇄 또는 경쇄 접합에 대한 선호도는 선택된 링커 및/또는 접합 접근법에 따름;
- [0230] e) 높은 다중도의 알파-Gal 단위를 포함하는 하나의 선택된 링커의 접합은 알파-Gal이 동등하게 로딩된 여러 접합 부위에 걸쳐 최적의 특성을 나타낼 수 있음;
- [0231] f) 항체 또는 그의 단편에의 링커의 접합은 증진된 약동학적 프로파일로 이어질 수 있음.
- [0232] 그의 염 및 유도체
- [0233] 화학식 (I)의 화합물 및 그의 하위군에 대한 언급은 또한 예를 들어 하기 논의된 바와 같은 그의 이온 형태, 염, 용매화물, 이성질체 (기하 및 입체화학적 이성질체 포함), 호변이성질체, N-옥시드, 에스테르, 동위원소 및 보호된 형태; 바람직하게는, 그의 염 또는 호변이성질체 또는 이성질체 또는 N-옥시드 또는 용매화물; 및 보다 바람직하게는, 그의 염 또는 호변이성질체 또는 N-옥시드 또는 용매화물, 보다 더 바람직하게는 그의 염 또는 호변이성질체 또는 용매화물을 포함한다. 이하에서, 본 발명의 임의의 측면에서 정의되는 바와 같은 화합물 및 그의 이온 형태, 염, 용매화물, 이성질체 (기하 및 입체화학적 이성질체 포함), 호변이성질체, N-옥시드, 에스테르, 동위원소 및 보호된 형태 (화학적 공정에서의 중간체 화합물 제외)는 "본 발명의 화합물"로서 지칭된다.
- [0234] 화학식 (I)의 화합물은 염, 예를 들어 산 부가염, 또는 특정 경우에 유기 및 무기 염기의 염, 예컨대 카르복실레이트, 술포네이트 및 포스페이트 염의 형태로 존재할 수 있다. 모든 이러한 염은 본 발명의 범주 내에 있으며, 화학식 (I)의 화합물에 대한 언급은 화합물의 염 형태를 포함한다. 한 실시양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 포스페이트 염으로서 존재한다.
- [0235] 본 발명의 염은 염기성 모이어티를 함유하는 모 화합물로부터 통상적인 화학적 방법, 예컨대 문헌 [Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002]에 기재된 방법에 의해 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이들 화합물의 염기 형태를 물 중에서 또는 유기 용매 중에서 또는 2개의 혼합물 중에서 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있으며; 일반적으로, 비수성 매질, 예컨대 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴이 사용된다.
- [0236] 산 부가염 (모노- 또는 디-염)은 무기 및 유기 둘 다인 매우 다양한 산에 의해 형성될 수 있다. 산 부가염의 예는 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산 (예를 들어 L-아스코르브산), L-아스파르트산, 벤젠술포산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 부탄산, (+) 캄포르산, 캄포르-술포산, (+)-(1S)-캄포르-10-술포산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 시클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디술포산, 에탄술포산, 2-히드록시에탄술포산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 젠티스산, 글루코헵톤산, D-글루론산, 글루쿠론산 (예를 들어 D-글루쿠론산), 글루탐산 (예를 들어 L-글루탐산), α-옥소글루타르산, 글리콜산, 히푸르산, 할로겐화수소산 (예를 들어 브로민화수소산, 염산, 아이오딘화수소산), 이세티온산, 락트산 (예를 들어 (+)-L-락

트산, (±)-DL-락트산), 락토비온산, 말레산, 말산, (-)-L-말산, 말론산, (±)-DL-만델산, 메탄술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 1-히드록시-2-나프토산, 니코틴산, 질산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 인산, 프로피온산, 피루브산, L-피로글루탐산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바스산, 스테아르산, 숙신산, 황산, 탄닌산, (+)-L-타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔술폰산, 운데실렌산 및 발레르산, 뿐만 아니라 아실화 아미노산 및 양이온 교환 수지로 이루어진 군으로부터 선택된 산에 의해 형성된 모노- 또는 디-염을 포함한다.

[0237] 염의 하나의 특정한 군은 아세트산, 염산, 아이오딘화수소산, 인산, 질산, 황산, 시트르산, 락트산, 숙신산, 말레산, 말산, 이세티논산, 푸마르산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 메탄술폰산 (메실레이트), 에탄술폰산, 나프탈렌술폰산, 발레르산, 아세트산, 프로판산, 부탄산, 말론산, 글루쿠론산 및 락토비온산으로부터 형성된 염으로 이루어진다. 하나의 특정한 염은 히드로클로라이드 염이다. 또 다른 특정한 염은 헤미술폰레이트 염으로서 또한 공지되어 있는 히드로젠술폰레이트 염이다.

[0238] 염은 추가로, 단지 예로서, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등을 포함한다.

[0239] 화학식 (I)의 화합물이 아민 관능기를 함유하는 경우에, 이는 예를 들어 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있는 방법에 따라 알킬화제와의 반응에 의해 4급 암모늄 염을 형성할 수 있다. 이러한 4급 암모늄 화합물은 화학식 (I)의 범주 내에 있다.

[0240] 본 발명의 화합물은 염이 형성되는 산의 pKa에 따라 모노- 또는 디-염으로서 존재할 수 있다.

[0241] 본 발명의 화합물의 염 형태는 전형적으로 제약상 허용되는 염이고, 제약상 허용되는 염의 예는 문헌 [Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19]에 논의되어 있다. 그러나, 제약상 허용되지 않는 염이 또한 중간체 형태로써 제조될 수 있으며, 이는 이어서 제약상 허용되는 염으로 전환될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물의 정제 또는 분리에 유용할 수 있는 이러한 비-제약상 허용되는 염 형태는 또한 본 발명의 일부를 형성한다.

[0242] 유기 화학 기술분야의 통상의 기술자는 많은 유기 화합물이, 이들이 반응하거나 또는 이들이 침전 또는 결정화되는 용매와 복합체를 형성할 수 있음을 인지할 것이다. 이들 복합체는 "용매화물"로서 공지되어 있다. 예를 들어, 물과의 복합체는 "수화물"로서 공지되어 있다. 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 용매화물은 본 발명의 범주 내에 있다.

[0243] 아민 관능기를 함유하는 화학식 (I)의 화합물은 또한 N-옥시드를 형성할 수 있다. 아민 관능기를 함유하는 화학식 (I)의 화합물에 대한 본원에서의 언급은 또한 N-옥시드를 포함한다.

[0244] 화합물이 여러 개의 아민 관능기를 함유하는 경우에, 1개 또는 1개 초과와 질소 원자는 산화되어 N-옥시드를 형성할 수 있다. N-옥시드의 특정한 예는 3급 아민 또는 질소-함유 헤테로사이클의 질소 원자의 N-옥시드이다.

[0245] N-옥시드는 상응하는 아민을 산화제 예컨대 과산화수소 또는 과산 (예를 들어 퍼옥시카르복실산)으로 처리하여 형성될 수 있으며, 예를 들어 문헌 [Advanced Organic Chemistry, by Jerry March, 4<sup>th</sup> Edition, Wiley Interscience, pages]을 참조한다. 보다 특히, N-옥시드는 아민 화합물을, 예를 들어 불활성 용매 예컨대 디클로로메탄 중에서 m-클로로퍼옥시벤조산 (mCPBA)과 반응시키는 문헌 [L. W. Deady (Syn. Comm. 1977, 7, 509-514)]의 절차에 의해 제조될 수 있다.

[0246] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 최종 탈보호 단계 전에 제조될 수 있는 화학식 (I)의 화합물의 특정 보호된 유도체가 그 자체로는 약리학적 활성을 보유하지 않을 수 있지만, 특정 경우에, 경구로 또는 비경구로 투여된 후 신체에서 대사되어 약리학적으로 활성인 본 발명의 화합물을 형성할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이러한 유도체는 따라서 "전구약물"로서 기재될 수 있다. 본 발명의 화합물의 모든 이러한 전구약물은 본 발명의 범주 내에 포함된다. 본 발명의 화합물에 적합한 전구약물 관능기의 예는 문헌 [Drugs of Today, Volume 19, Number 9, 1983, pp 499 - 538 및 Topics in Chemistry, Chapter 31, pp 306 - 316 및 "Design of Prodrugs" by H. Bundgaard, Elsevier, 1985, Chapter 1] (문헌의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 추가로, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 적절한 관능기가 본 발명의 화합물 내에 존재하는 경우에, 예를 들어 문헌 [H. Bundgaard in "Design of Prodrugs"] (문헌의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 "전구-모이어티"로서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 특정 모이어티가 이러한 관능기 상에 위치할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0247] 또한 본 발명의 화합물 및 다양한 염의 범주 내에는 그의 다형체가 포함된다.

- [0248] 화학식 (I)의 화합물은 다수의 상이한 기하 이성질체 및 호변이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 화학식 (I)의 화합물에 대한 언급은 모든 이러한 형태를 포함한다. 의심을 피하기 위해, 화합물이 여러 기하 이성질체 또는 호변이성질체 형태 중 하나로 존재할 수 있고, 단지 하나만이 구체적으로 기재되거나 제시된 경우에, 그럼에도 불구하고 모든 다른 것들이 화학식 (I)에 포괄된다.
- [0249] 본 발명은 모든 제약상 허용되는 동위원소-표지된 본 발명의 화합물, 즉 화학식 (I)의 화합물을 포함하며, 여기서 1개 이상의 원자는, 동일한 원자 번호를 갖지만 원자 질량 또는 질량수가 자연에서 통상적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자에 의해 대체된다.
- [0250] 본 발명의 화합물에 포함되기에 적합한 동위원소의 예는 수소의 동위원소, 예컨대  $^2\text{H}$  (D) 및  $^3\text{H}$  (T), 탄소의 동위원소, 예컨대  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  및  $^{14}\text{C}$ , 플루오린의 동위원소, 예컨대  $^{18}\text{F}$ , 질소의 동위원소, 예컨대  $^{13}\text{N}$  및  $^{15}\text{N}$ , 산소의 동위원소, 예컨대  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  및  $^{18}\text{O}$ 를 포함한다.
- [0251] 특정 동위원소-표지된 화학식 (I)의 화합물, 예를 들어 방사성 동위원소가 혼입된 것은 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 유용하다. 화학식 (I)의 화합물은 또한, 이들이 표지된 화합물 및 다른 분자, 펩티드, 단백질, 효소 또는 수용체 사이의 복합체 형성을 검출하거나 또는 확인하는데 사용될 수 있다는 점에서 가치있는 진단 특성을 가질 수 있다. 검출 또는 확인 방법은 표지화제, 예컨대 방사성동위원소, 효소, 형광 물질, 발광 물질 (예를 들어, 루미놀, 루미놀 유도체, 루시페린, 에퀴린 및 루시페라제) 등으로 표지된 화합물을 사용할 수 있다. 방사성 동위원소 삼중수소, 즉  $^3\text{H}$  (T), 및 탄소-14, 즉  $^{14}\text{C}$ 가, 이들의 혼입의 용이성 및 즉시 검출 수단의 관점에서 이러한 목적에 특히 유용하다.
- [0252] 보다 무거운 동위원소, 예컨대 중수소, 즉  $^2\text{H}$  (D)로의 치환은 보다 큰 대사 안정성, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요건으로부터 생성된 특징의 치료 이점을 제공할 수 있으며, 따라서 일부 상황에서 바람직할 수 있다.
- [0253] 양전자 방출 동위원소, 예컨대  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  및  $^{13}\text{N}$ 으로의 치환은 표적 점유율을 조사하기 위한 양전자 방출 단층촬영 (PET) 연구에 유용할 수 있다.
- [0254] 동위원소-표지된 화학식 (I)의 화합물은 일반적으로, 이전에 사용된 비-표지된 시약 대신에 적절한 동위원소-표지된 시약을 사용하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술에 의해 또는 첨부된 실시예 및 제조예에 기재된 것과 유사한 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0255] 화학식 (I)의 화합물의 제조 방법
- [0256] 본 섹션에서, 본 출원의 모든 다른 섹션에서와 같이, 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 화학식 (I)에 대한 언급은 또한 본원에 정의된 바와 같은 그의 모든 다른 하위군 및 예를 포함한다.
- [0257] 본원에 기재된 본 발명에 관한 화합물은 하기 방법 및 반응식에 예시된 바와 같은 단계적 합성 순서로 제조될 수 있다. 합성은 다양한 중심 구축물의 제조를 수반하고, 이는 이어서 분지화 및 2개의 결합 모이어티를 연결하는 링커 길이의 선택을 가능하게 한다. 화학식 (I)의 화합물은 통상의 기술자에게 널리 공지된 합성 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 합성 성공을 가능하게 하기 위해 화학적 단계 및 보호기의 선택이 임의의 순서로 관리될 수 있다는 것을 인지할 것이다.
- [0258] 일부 실시양태에서, 화학식 (A)의 화합물은 1개 이상의 링커 성분을 포함하는 링커 ( $S_b$ )를 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 (MC), 말레이미도프로파노일 (MP), 발린-시트룰린 (vc) 알라닌-페닐알라닌 (ala-phe), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 (SPP) 및 4-(n-말레이미도메틸)시클로헥산 1-카르복실레이트 (SMCC)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 화학식 (A)의 화합물은 항체 상의 유리 티올과 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 링커 ( $S_b$ )를 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물은 링커 시약: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 술포-SMPB 및 SVSB를 사용하여 제조된 항체 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다. 항체 상의 티올기와 반응하는 피롤리딘-2,5-디온 (말레이미드) 이외의 다른 관능기는 아이오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 비닐 피리딘 디설피드, 피리딜 디설피드, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 활성화된 에스테르, 술포



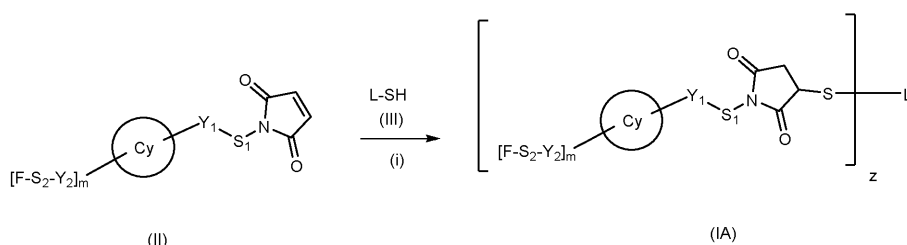
닐 클로라이드 및 산 클로라이드를 포함한다.

[0260] 일부 실시양태에서, 링커는 항체 상의 친전자성 기와 반응할 수 있는 관능기를 갖는다. 예시적인 친전자성 기는 알데히드, 케톤 및 카르보닐 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가적으로, 링커의 반응성 관능기의 헤테로원자는 항체 상의 친전자성 기와 반응할 수 있다. 전형적인 예는 히드라진, 옥심, 아미노, 히드라지드, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트 및 아릴 히드라지드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0261] 일부 실시양태에서, 화학식 (A)의 화합물은 항체 상의 유리 아민과 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 링커 ( $S_B$ )를 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물은 카르복실산 활성화제, 예컨대 N-히드록시숙신이미드 (NHS), 2-숙신이미도-1,1,3,3-테트라-메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TSTU), 및 벤조트리아졸-1-일-옥시트리페놀리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP)를 사용하여 제조된 항체 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다.

[0262] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 하기를 포함하는, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물을 제조하는 방법이 제공된다.

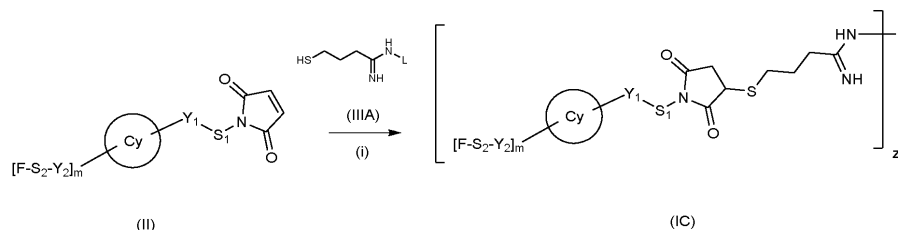
[0263] (a) 화학식 (III)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 티올 기를 함유함)을 화학식 (II)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 말레이미드로 종결됨)과 반응시켜 화학식 (IA)의 화합물 (여기서  $X_1$ 은  $-S-$ 를 나타냄)을 제조하는 단계:



[0264] (여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, z, Cy,  $Y_1$  및  $S_1$ 은 상기 정의된 바와 같음); 또는

[0265] (여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, z, Cy,  $Y_1$  및  $S_1$ 은 상기 정의된 바와 같음); 또는

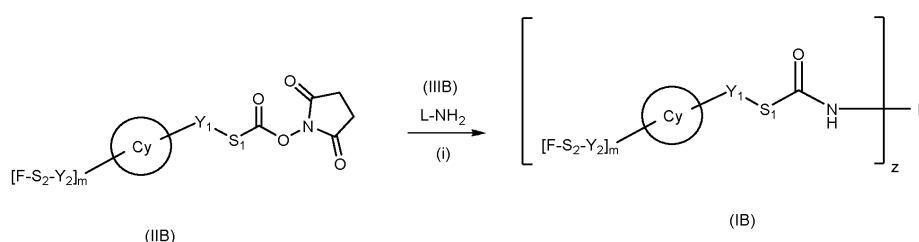
[0266] (b) 화학식 (IIIA)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 티올 기를 함유함)을 화학식 (II)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 말레이미드로 종결됨)과 반응시켜 화학식 (IC)의 화합물 (여기서  $X_1$ 은  $-NH_2$ 를 나타내고,  $S_1$ 은  $-S-CH_2-CH_2-CH_2-C(=NH)-$ 를 함유함)을 제조하는 단계:



[0267] (여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, z, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 상기 정의된 바와 같음); 또는

[0268] (여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, z, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 상기 정의된 바와 같음); 또는

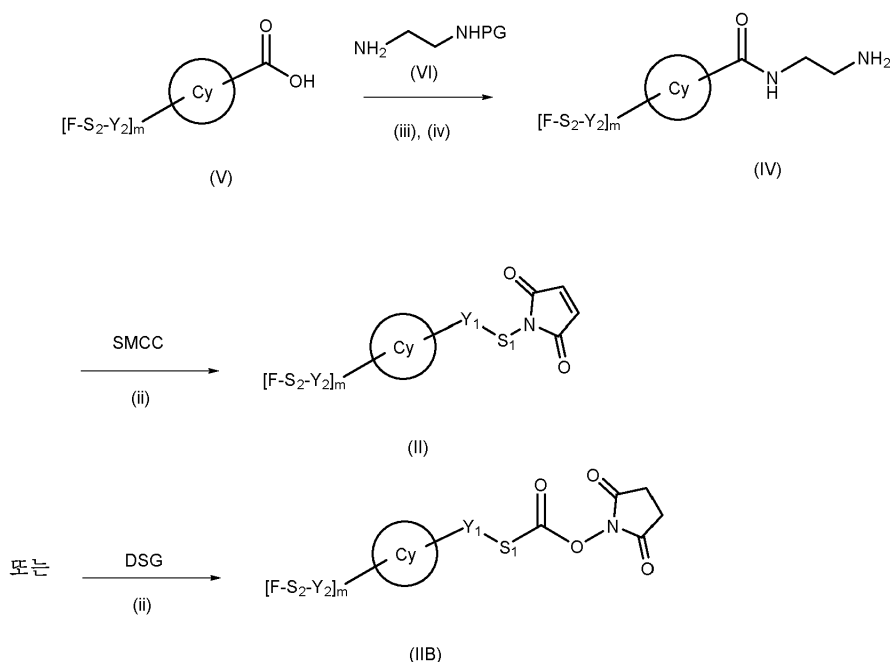
[0269] (c) 화학식 (IIB)의 화합물 (여기서  $S_1$ 은 N-히드록시숙신이미드 기로 종결됨)을 화학식 (IIB)의 화합물 (여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 1개의 반응성 아미노 기를 함유함)과 반응시켜 화학식 (IB)의 화합물 (여기서  $X_1$ 은  $-NH_2$ 를 나타냄)을 제조하는 단계:



[0270] (여기서 F,  $S_2$ ,  $Y_2$ , m, z, Cy,  $Y_1$ ,  $S_1$  및 L은 상기 정의된 바와 같음); 또는

- [0271] (여기서 F, S<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, m, z, Cy, Y<sub>1</sub>, S<sub>1</sub> 및 L은 상기 정의된 바와 같음); 및/또는
- [0272] (d) 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 보호된 유도체를 추가의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 보호된 유도체와 상호전환시키는 단계.
- [0273] 방법 (a) 및 (b)는 전형적으로 티올-말레이미드 반응; 반응성 티올 기와  $\alpha, \beta$ -불포화 케톤 예컨대 말레이미드의 마이클 첨가 반응을 포함한다.
- [0274] 바람직한 조건은 실온에서 본원에 기재된 바와 같은 적합한 완충제 중에서 링커-말레이미드 중간체를 반응성 티올을 함유하는 항체 또는 그의 단편과 인큐베이션하는 것을 포함한다. 전형적인 링커:항체 비 (LAR)는 항체 또는 그의 단편 상에 존재하는 유리 티올 기의 수에 좌우되지만, 전형적으로 2-8의 범위이다.
- [0275] 방법 (c)는 전형적으로 활성화된 에스테르의 존재 하에서의 아미드 결합 형성 반응을 포함한다. 전형적인 조건은 실온에서 적합한 완충제 중에서 링커-NHS 에스테르를 반응성 아미노를 함유하는 항체 또는 그의 단편과 인큐베이션하는 것을 포함한다. 전형적인 링커:항체 비 (LAR)는 항체 또는 그의 단편 상에 존재하는 유리 아미노 기의 수에 좌우되지만, 전형적으로 2-20의 범위이다.
- [0276] 방법 (d)은 전형적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상호전환 절차를 포함한다. 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물에서, 제1 치환기는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 제2의, 대안적 치환기로 전환될 수 있다. 전구체 화합물의 화학식 (I)의 화합물로의 전환을 위한, 광범위한 널리 공지된 관능기 상호전환이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 문헌 [Advanced Organic Chemistry by Jerry March, 4<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, 1992]에 기재되어 있다. 예를 들어, 예컨대 유기-주석 시약 (스틸 반응), 그리냐르 시약을 사용한 가능한 금속 촉매화된 관능화, 및 질소 친핵체와의 반응이 문헌 ['Palladium Reagents and Catalysts' [Jiro Tsuji, Wiley, ISBN 0-470-85032-9] and Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis [Volume 1, Edited by Ei-ichi Negishi, Wiley, ISBN 0-471-31506-0]]에 기재되어 있다.
- [0277] 적절한 경우에, 방법 (a) (b) 및 (c)에서 이전에 기재된 반응은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 1개 이상의 반응이 그에 후속하거나 또는 선행하고, 이는 화학식 (I)의 다른 화합물을 수득하기 위해 상기 정의된 필요한 치환을 달성하도록 적절한 순서로 수행된다. 조건을 문헌에서 찾아볼 수 있는 이러한 반응의 비제한적 예는 하기를 포함한다:
- [0278] 반응성 관능기의 보호,
- [0279] 반응성 관능기의 탈보호,
- [0280] 할로겐화,
- [0281] 탈할로겐화,
- [0282] 탈알킬화,
- [0283] 아민, 아닐린, 알콜 및 페놀의 알킬화 및 아릴화,
- [0284] 히드록실 기에 대한 미츠노부 반응,
- [0285] 적절한 기에 대한 고리화첨가 반응,
- [0286] 니트로, 에스테르, 시아노, 알데히드의 환원,
- [0287] 전이 금속-촉매화 커플링 반응,
- [0288] 아실화,
- [0289] 술폰닐 기의 술폰닐화/도입,
- [0290] 에스테르 기의 비누화/가수분해,
- [0291] 에스테르 기의 아미드화 또는 에스테르교환,
- [0292] 카르복실 기의 에스테르화 또는 아미드화,

- [0293] 할로겐 교환,
- [0294] 아민, 티올 또는 알콜에 의한 친핵성 치환,
- [0295] 환원성 아미노화,
- [0296] 카르보닐 및 히드록실아민 기에 대한 옥심 형성,
- [0297] S-산화,
- [0298] N-산화,
- [0299] 염화.
- [0300] 화학식 (III)의 화합물은 반응에 이용가능한 적어도 1개의 반응성 티올 기를 함유할 수 있다. 반응성 티올 기의 생성은 TCEP에 의한 항체 또는 항원 결합 단편의 환원을 통해 달성될 수 있다.
- [0301] 바람직한 조건은 1.1 eq TCEP:Ab, 4.2 eq TCEP:Ab 또는 8 eq TCEP:Ab를 포함한다.
- [0302] 대안적으로, 반응성 티올 기의 생성은 항체 또는 항원 결합 단편 상의 적어도 1개의 리신 잔기와 티올화제, 예컨대 트라우트 시약 (2-이미노티올란)의 반응을 통해 달성될 수 있다.
- [0303] 바람직한 조건은 낮은 LAR의 경우 12.2 eq의 2-이미노티올란:Ab 및 높은 LAR의 경우 30.5 eq 2-이미노티올란:Ab를 포함한다.
- [0304] 화학식 (II) 및 (IIB)의 화합물은 화학식 (V) 및 (VI)의 화합물로부터 반응식 1에 기재된 방법에 이어, 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC) 또는 디(N-숙신이미딜)글루타레이트 (DSG)와 반응시키는 것에 따라 제조할 수 있다:



- [0305]
- [0306] 반응식 1
- [0307] 상기 식에서, PG는 보호기, 예컨대 모노메톡시 트리틸이고; S<sub>1</sub>은 말레이미드 또는 NHS로 종결되고, Y<sub>1</sub>은 CONH이고, S<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, m, Cy, 및 F는 상기 정의된 바와 같다.
- [0308] 화학식 (II)의 화합물은 화학식 (IV)의 화합물로부터 말단 아미노 기를 반응성 말레이미드 기로 상호전환시켜 제조할 수 있다. 바람직한 조건은 실온에서 DMSO 중에서 말단 아미노 기를 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC)와 반응시키는 것을 포함한다. 대안적으로, 화학식 (IIB)의 화합물은 화학식 (IV)의 화합물로부터 말단 아미노 기의 반응성 NHS 기로의 상호전환에 의해 제조할 수 있다. 바람직한 조건은 적합한 무수 유기 용매, 예컨대 DMF 및 DMSO 또는 그의 조합 중에서 가교제 디-(N-숙신이미딜)글루타레이트와

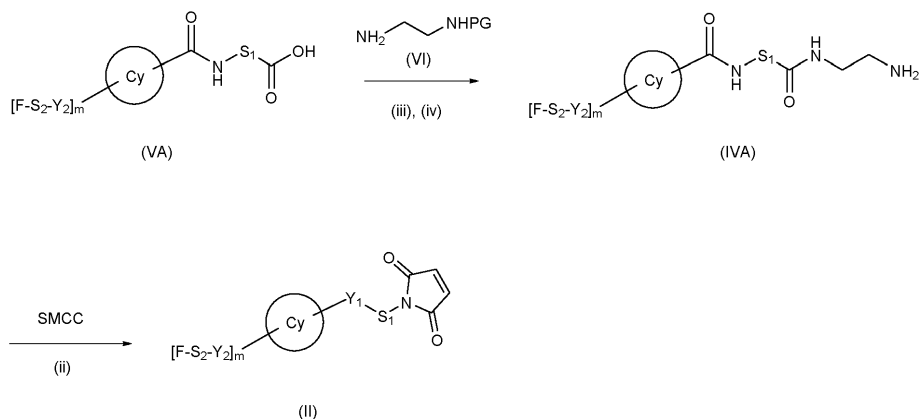
반응시키는 것을 포함한다.

[0309]

화학식 (IV)의 화합물은 화학식 (V) 및 (VI)의 화합물로부터 공정 단계 (iii) 및 (iv)에 따라, 및 아마이드 결합 형성 단계에 이어서 적합한 탈보호 단계에 의해 제조할 수 있다. 전형적인 아마이드 결합 형성 단계는 유기 용매 중에서 유기 염기의 존재 하에 포스페이트 함유 시약, 트리아진계 시약 또는 카르보디이미드 함유 시약을 사용한 카르복실산의 활성화를 포함한다. 바람직한 조건은 DMF 또는 DMF 및 DMSO의 혼합물 중 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 함께 HATU ((1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘-3-옥시드 헥사플루오로포스페이트)를 포함한다. 여기서 PG는 모노메톡시트리틸을 포함하고, 탈보호 반응은 산에 의해 매개된다. 바람직한 조건은 0.2M 수성 HCl, 실온을 포함한다.

[0310]

대안적으로, 화학식 (II)의 화합물은 화학식 (VA)의 화합물로부터 반응식 1A에 기재된 방법에 따라, 이어서 속 신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC)와의 반응에 의해 제조할 수 있다.



[0311]

[0312]

반응식 1A

[0313]

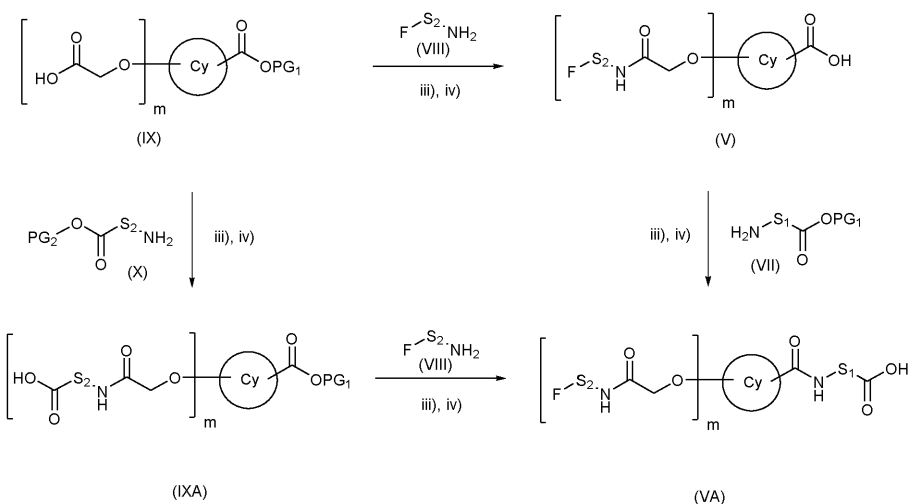
상기 식에서, PG는 보호기, 예컨대 모노메톡시 트리틸이고; S<sub>1</sub>은 말레이미드로 중결되고, Y<sub>1</sub>은 CONH이고, S<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, m, Cy, 및 F는 상기 정의된 바와 같다.

[0314]

화학식 (II)의 화합물은 화학식 (VA) 및 (VI)의 화합물로부터 이전에 반응식 1에 기재된 바와 같은 공정 단계 (iii) 및 (iv)에 따라 제조될 수 있다. 말단 아미노기의 반응성 말레이미드기로의 상호전환은 SMCC를 사용하여 반응식 1에서 공정 단계 (ii)에 대해 기재된 바와 같이 달성될 수 있다.

[0315]

화학식 (V) 및 (VA)의 화합물 (여기서, S<sub>2</sub>는 -NHCO-CH<sub>2</sub>-로 중결됨)은 화학식 (VIII), (IX) 및 (IXA)의 화합물로부터 반응식 2에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.



[0316]

[0317]

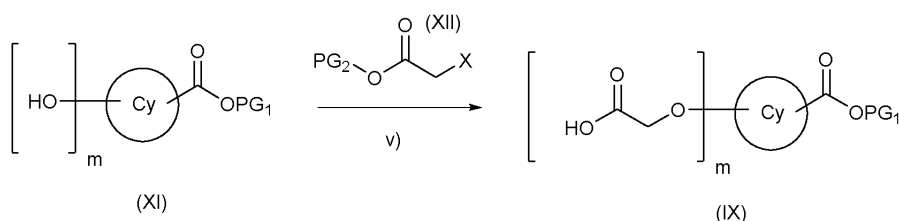
반응식 2

[0318] 상기 식에서, m, Cy, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> 및 F는 상기 정의된 바와 같고, PG<sub>1</sub>은 tert-부틸, 메틸, 에틸 또는 벤질을 포함하는 보호기이고, PG<sub>2</sub>는 메틸, 에틸 또는 tert-부틸을 포함하는 직교 보호기이다.

[0319] 화학식 (V), (IXA) 및 (VA)의 화합물은 화학식 (IX)의 화합물로부터 공정 단계 (iii) 및 (iv)에 따라, 아미드 결합 형성 단계에 이어 적합한 탈보호 반응에 의해 제조할 수 있다. 여기서 PG는 벤질을 포함하고, 탈보호 반응은 촉매적 수소화에 의해 매개된다. 바람직한 조건은 MeOH/EtOH 또는 물 또는 그의 임의의 조합 중 10% Pd/C, 수소 분위기 (15-70 psi 사이) 하를 포함한다. 대안적으로, 탈보호는 상 전달 반응에 의해 매개될 수 있다. 바람직한 조건은 TEA 및 물, 실온, 16시간을 포함한다.

[0320] 여기서 PG는 메틸, 에틸 또는 tert-부틸을 포함하고, 보호기에 의해 요구되는 바와 같은 산 또는 염기 매개 탈보호 반응이 사용된다. 산 매개 탈보호 조건이 요구되는 경우, 바람직한 조건은 TFA, 디옥산 중의 4M HCl, 또는 물 중의 37% HCl을 필요에 따라 DCM 또는 물의 공용매와 함께 포함한다. 염기 매개 조건이 요구되는 경우, 바람직한 조건은 수성 매질, 예컨대 물과 함께 메탄올 또는 THF 중 수산화나트륨 또는 수산화리튬을 포함한다.

[0321] 화학식 (IX)의 화합물은 화학식 (XI) 및 (XII)의 화합물로부터 반응식 3에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.



[0322]

[0323] 반응식 3

[0324] 상기 식에서, m 및 Cy는 상기 정의된 바와 같고, PG<sub>1</sub>은 tert-부틸, 메틸, 에틸 또는 벤질을 포함하는 보호기이고, PG<sub>2</sub>는 메틸, 에틸 또는 tert-부틸을 포함하는 직교 보호기이고, X는 Cl, Br 또는 I이다.

[0325] 화학식 (IX)의 화합물은 화학식 (XI) 및 (XII)의 화합물로부터 공정 단계 (v), 알킬화 반응에 따라 제조할 수 있다. 전형적인 조건은 극성 유기 용매 중 무기 염기, 실온을 포함한다. 바람직한 조건은 DMF 중 탄산칼륨을 포함한다.

[0326] Cy가 비-페닐 또는 트리페닐인 경우, 화학식 (XI)의 화합물은 비/트리-페닐 단위를 구축하기 위한 스즈키 반응의 사용에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 조건은 100-110°C에서 디옥산 및 물 중 탄산나트륨, 아세트산칼륨 또는 중탄산나트륨과 함께 디클로로메탄과 테트라키스트리페닐 포스핀 팔라듐 (0) 또는 [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐 (II) 착물을 포함한다. 적합한 필요한 보호기, 예컨대 TBS가 사용되는 경우, 이러한 보호기는 플루오라이드 매개 탈보호를 사용하여 탈보호될 수 있다. 바람직한 조건은 THF 중 TBAF, 실온을 포함한다.

[0327] 대안적으로, Cy가 비/트리-페닐인 경우, 화학식 (XI)의 화합물은 상기 및 본원에 기재된 바와 같은 조건을 사용하여 비/트리-페닐 단위를 구축하기 위한 스즈키 반응의 사용에 의해 직접 제조할 수 있다.

[0328] 화학식 (III), (IIIA), (IIIB), (VI), (VIII), (XII), (VII), 및 (X)의 화합물은 상업적으로 입수가능하거나, 또는 본원에 기재된 방법에 따라 제조된다.

[0329] 본원에 기재된 특정 중간체는 관련 기술분야에서 이전에 공지되지 않은 신규 화합물을 나타낸다는 것이 인지될 것이다. 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따라, 상기 정의된 바와 같은 화학식 (II), (IIB), (V), (VA), (IX) 또는 (XI)의 화합물로부터 선택된 중간체 화합물이 제공된다.

[0330] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 실시예 및 제조예에 대한 최고 수율을 생성하기 위해 상기 기재된 단계의 적절한 조합을 선택할 수 있음을 인지할 것이다.

[0331] 제약 조성물

[0332] 화학식 (I)의 화합물을 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 이는 제약 조성물 (예를 들어, 제제)로서 존재하는 것이 바람직하다.

- [0333] 따라서, 추가 측면에 따르면, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은, 제약 조성물, 및 본 발명의 적어도 1종의 화합물을 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 및 임의로 다른 치료제 또는 예방제와 함께 포함하는 (예를 들어 혼합한) 제약 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 제약 조성물이 1종 이상의 추가의 치료제를 포함하는 경우에, 상기 작용제는 화학식 (I)의 추가의 상이한 화합물을 포함할 수 있다는 것이 인지될 것이다.
- [0334] 제약상 허용되는 부형제(들)는, 예를 들어 담체 (예를 들어 고체, 액체 또는 반-고체 담체), 아주반트, 희석제, 충전제 또는 벌크제, 과립화제, 코팅제, 방출-제어제, 결합제, 봉해제, 윤활제, 보존제, 향산화제, 완충제, 현탁화제, 증점제, 향미제, 감미제, 맛 차폐제, 안정화제 또는 제약 조성물에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 부형제로부터 선택될 수 있다. 다양한 유형의 제약 조성물을 위한 부형제의 예가 하기에서 보다 상세하게 제시된다.
- [0335] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서, 과도한 독성 (즉 일반적으로 안전한 것으로 인정됨 (GRAS)), 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 대상체 (예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 합리적 이익/위험 비에 부합하는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태에 관한 것이다. 각각의 담체, 부형제 등은 또한 제제의 다른 성분과 상용성이라는 점에서 "허용되는" 것 이어야 한다.
- [0336] 본 발명의 화합물을 함유하는 제약 조성물은 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있고, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA]을 참조한다.
- [0337] 제약 조성물은 비경구, 비강내, 기관지내, 설하, 눈, 귀, 직장, 질내, 또는 경피 투여에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 조성물이 비경구 투여를 위해 의도되는 경우에, 이는 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 투여를 위해, 또는 주사, 주입 또는 다른 전달 수단에 의한 표적 기관 또는 조직 내로의 직접 전달을 위해 제제화될 수 있다. 전달은 볼루스 주사, 단기 주입 또는 보다 장기 주입에 의할 수 있고, 수동적 전달을 통하거나, 또는 적합한 주입 펌프 또는 시린지 드라이버의 사용을 통할 수 있다.
- [0338] 비경구 투여에 적합한 제약 제제는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액을 포함하며, 이는 향산화제, 완충제, 정박 테리아제, 공-용매, 표면 활성제, 유기 용매 혼합물, 시클로텍스트린 착물화제, 유화제 (에멀전 제제의 형성 및 안정화를 위한), 리포솜의 형성을 위한 리포솜 성분, 중합체 겔의 형성을 위한 겔화가능한 중합체, 동결건조 보호제, 및 특히 활성 성분을 가용성 형태로 안정화하고 제제를 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하기 위한 작용제들의 조합물을 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제약 제제는 또한 현탁화제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액의 형태를 취할 수 있다 (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, p 201-230).
- [0339] 제제는 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플, 바이알 및 사전충전된 시린지 내에 제공될 수 있으며, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어 주사용수를 첨가하는 것만을 필요로 하는 냉동-건조된 (동결건조된) 상태로 저장될 수 있다.
- [0340] 제약 제제는 본 발명의 화합물을 동결건조시킴으로써 제조될 수 있다. 동결건조는 조성물을 냉동-건조하는 절차를 지칭한다. 냉동-건조 및 동결건조는 따라서 본원에서 동의어로 사용된다.
- [0341] 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0342] 비경구 주사를 위한 본 발명의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 뿐만 아니라 사용 직전에 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액 내로 재구성하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다.
- [0343] 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 카르복시메틸셀룰로스 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일 (예컨대 해바라기 오일, 홍화 오일, 옥수수 오일 또는 올리브 오일), 및 주사가 가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 증점 또는 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0344] 본 발명의 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함시키는 것에 의해 보장될 수 있다. 또한 장성을 조정하는 작용제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가 가능한 제약 형태의 지속 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수물



지연시키는 작용제를 포함시키는 것에 의해 달성될 수 있다.

- [0345] 본 발명의 하나의 바람직한 실시양태에서, 제약 조성물은, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 i.v. 투여에 적합한 형태로 존재한다. 정맥내 또는 피하 투여의 경우에, 용액은 그 자체로 투여될 수 있거나, 또는 투여 전에 주입 백 (제약상 허용되는 부형제, 예컨대 0.9% 염수 또는 5% 덱스트로스를 함유함) 내로 주사될 수 있다.
- [0346] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제약 조성물은 피하 (s.c.) 투여에 적합한 형태로 존재한다.
- [0347] 본 발명의 화합물은 담체와 함께 제제화되고, 나노입자의 형태로 투여될 수 있으며, 나노입자의 증가된 표면적은 그의 흡수를 보조한다. 또한, 나노입자는 세포로의 직접 침투의 가능성을 제공한다. 나노입자 약물 전달 시스템은 문헌 ["Nanoparticle Technology for Drug Delivery", edited by Ram B Gupta and Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, published 13<sup>th</sup> March 2006]에 기재되어 있다. 약물 전달을 위한 나노입자는 또한 문헌 [J. Control. Release, 2003, 91 (1-2), 167-172, 및 Sinha et al., Mol. Cancer Ther. August 1, (2006) 5, 1909]에 기재되어 있다.
- [0348] 제약 조성물은 전형적으로 대략 1% (w/w) 내지 대략 95% (w/w) 활성 성분 및 99% (w/w) 내지 5% (w/w)의 제약상 허용되는 부형제 또는 부형제의 조합물을 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 대략 20% (w/w) 내지 대략 90% (w/w) 활성 성분 및 80% (w/w) 내지 10% (w/w)의 제약상 허용되는 부형제 또는 부형제의 조합물을 포함한다. 제약 조성물은 대략 1% 내지 대략 95%, 바람직하게는 대략 20% 내지 대략 90%의 활성 성분을 포함한다. 본 발명에 따른 제약 조성물은, 예를 들어 단위 투여 형태, 예컨대 앰플, 바이알, 좌제, 사전충전된 시린지, 당의정, 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있다.
- [0349] 제약상 허용되는 부형제(들)는 제제의 목적하는 물리적 형태에 따라 선택될 수 있고, 예를 들어 회석제 (예를 들어, 고체 회석제, 예컨대 충전제 또는 벌크제; 및 액체 회석제, 예컨대 용매 및 공-용매), 봉해제, 완충제, 윤활제, 유동 보조제, 방출 제어제 (예를 들어, 방출 지연 또는 지체 중합체 또는 왁스), 결합제, 과립화제, 안료, 가소제, 향산화제, 보존제, 향미제, 맛 차폐제, 장성 조정제 및 코팅제로부터 선택될 수 있다.
- [0350] 통상의 기술자는 제제에 사용하기에 적절한 양의 성분을 선택하도록 전문지식을 가지고 있을 것이다. 예를 들어, 정제 및 캡슐은 전형적으로 (약물 용량에 따라서) 0-20% 봉해제, 0-5% 윤활제, 0-5% 유동 보조제 및/또는 0-99% (w/w) 충전제/ 또는 벌크제를 함유한다. 이는 또한 0-10% (w/w) 중합체 결합제, 0-5% (w/w) 향산화제, 0-5% (w/w) 안료를 함유할 수 있다. 느린 방출 정제는 또한 (용량에 따라) 0-99% (w/w) 방출-제어 (예를 들어, 지연) 중합체를 함유할 것이다. 정제 또는 캡슐의 필름 코트는 전형적으로 0-10% (w/w) 중합체, 0-3% (w/w) 안료, 및/또는 0-2% (w/w) 가소제를 함유한다.
- [0351] 비경구 또는 피하 제제는 전형적으로 (용량에 따라, 및 냉동 건조되는 경우) 0-20% (w/w) 완충제, 0-50% (w/w) 공용매, 및/또는 0-99% (w/w) 주사용수 (WFI)를 함유한다. 근육내 데포를 위한 제제는 또한 0-99% (w/w) 오일을 함유할 수 있다.
- [0352] 본 발명의 화합물은 또한 고체 분산물로서 제제화될 수 있다. 고체 분산물은 2종 이상의 고체의 균질한 극도로 미세한 분산 상이다. 고체 분산물의 한 유형인 고체 용액 (분자상 분산계)은 제약 기술에서의 용도에 대해 널리 공지되어 있고 (문헌 [Chiou and Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)] 참조), 용해 속도를 증가시키고 난수용성 약물의 생체이용률을 증가시키는데 유용하다.
- [0353] 제약 제제는 환자에게 전체 과정의 치료제를 단일 패키지 내에 함유하는 "환자 팩", 통상적으로는 블리스터 팩으로 제공될 수 있다. 환자 팩은 환자가, 통상적으로는 환자 처방에서 누락되어 있는, 환자 팩에 함유된 패키지 삽입물에 항상 접근한다는 점에서, 약사가 대량 공급물로부터 환자의 제약 공급물을 나누는 종래 처방에 비해 이점을 갖는다. 패키지 삽입물의 포함은 의사의 지시에 대한 환자의 순응도를 개선시키는 것으로 나타났다. 환자 팩의 한 예는 사전충전된 시린지를 포함한다. 이러한 사전충전된 시린지는 이미 약물 물질을 함유하고 있다. 바늘이 부착된 사전충전된 시린지의 전방 단부는 노즐 캡으로 밀봉된다. 주사 전에, 노즐 캡이 전방 단부에서 제거되고, 바늘이 그곳에 부착된다. 이어서 플런저 로드를 전방 단부쪽으로 밀어 가스켓을 슬라이딩시킴으로써 약물이 배출된다.
- [0354] 비강 전달을 위한 조성물은 연고, 크림, 스프레이, 패치, 겔, 액체 점적제 및 삽입제 (예를 들어 안내 삽입제)를 포함한다. 이러한 조성물은 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있다.
- [0355] 직장 또는 질내 투여를 위한 제제의 예는 폐사리 및 좌제를 포함하며, 이는 예를 들어 활성 화합물을 함유하는 형상화된 성형가능 또는 왁스성 물질로부터 형성될 수 있다. 활성 화합물의 용액이 또한 직장 투여에 사용될

수 있다.

- [0356] 흡입에 의한 투여를 위한 조성물은 흡입가능한 분말 조성물 또는 액체 또는 분말 스프레이의 형태를 취할 수 있고, 분말 흡입기 장치 또는 에어로졸 분배 장치를 사용하여 표준 형태로 투여될 수 있다. 이러한 장치는 널리 공지되어 있다. 흡입에 의한 투여의 경우, 분말화된 제제는 전형적으로 활성 화합물을 불활성 고체 분말화된 희석제, 예컨대 락토스와 함께 포함한다.
- [0357] 본 발명의 화합물은 일반적으로 단위 투여 형태로 제공될 것이고, 그에 따라, 전형적으로 목적하는 수준의 생물학적 활성을 제공하기에 충분한 화합물을 함유할 것이다. 예를 들어, 제제는 1 나노그램 내지 2 그램의 활성 성분, 예를 들어 1 나노그램 내지 2 밀리그램의 활성 성분을 함유할 수 있다. 이들 범위 내에서, 화합물의 특정한 하위 범위는 0.1 밀리그램 내지 2 그램의 활성 성분 (보다 통상적으로는 10 밀리그램 내지 1 그램, 예를 들어 50 밀리그램 내지 500 밀리그램), 또는 1 마이크로그램 내지 20 밀리그램 (예를 들어, 1 마이크로그램 내지 10 밀리그램, 예를 들어 0.1 밀리그램 내지 2 밀리그램의 활성 성분)이다.
- [0358] 활성 화합물은 그를 필요로 하는 환자 (예를 들어, 인간 또는 동물 환자)에게 목적하는 치료 효과를 달성하기에 충분한 양으로 투여될 것이다.
- [0359] 치료 용도
- [0360] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 요법에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.
- [0361] 본 발명의 화합물의 치료 용도는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 선택에 의해 결정된다는 것이 인지될 것이다.
- [0362] 예를 들어, 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 EGFR 항체 (예를 들어, 세톡시맙 또는 니모투주맙) 또는 그의 단편인 경우에, 화학식 (I)의 화합물은 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0363] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 암의 치료에 사용하기 위한 EGFR 항체 (예를 들어, 세톡시맙 또는 니모투주맙) 또는 그의 단편인 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.
- [0364] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료를 필요로 하는 개체에게 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 EGFR 항체 (예를 들어, 세톡시맙 또는 니모투주맙) 또는 그의 단편인 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0365] 또한, 실시양태에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 병원체 특이적 항체 또는 그의 단편인 경우, 화학식 (I)의 화합물은 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0366] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위한 병원체 특이적 항체 또는 그의 단편인 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.
- [0367] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 박테리아 감염의 치료를 필요로 하는 개체에게 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 병원체 특이적 항체 또는 그의 단편인 본원에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 박테리아 감염을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0368] 본 발명의 화합물은 일반적으로 이러한 투여를 필요로 하는 대상체, 예를 들어 인간 또는 동물 환자, 바람직하게는 인간에게 투여된다.
- [0369] 본 발명의 화합물은 전형적으로, 치료상 또는 예방상 유용하고 일반적으로 비-독성인 양으로 투여될 것이다. 그러나, 특정 상황에서 (예를 들어, 생명을 위협하는 질환의 경우에서), 본 발명의 화합물을 투여하는 것의 이익은 임의의 독성 효과 또는 부작용의 단점을 능가할 수 있고, 그러한 경우 본 발명의 화합물을 독성 정도와 연관된 양으로 투여하는 것이 바람직한 것으로 고려될 수 있다.
- [0370] 본 발명의 화합물은 유익한 치료 효과를 유지하기 위해 장기간에 걸쳐 투여될 수 있거나 (즉, 만성 투여), 또는 단지 단기간 동안 투여될 수 있다 (즉 급성 투여). 대안적으로 이는 연속 방식으로 또는 간헐적 투여를 제공하는 방식 (예를 들어, 펄스형 방식)으로 투여될 수 있다.
- [0371] 본 발명의 화합물의 전형적 1일 용량은 체중 킬로그램당 100 피코그램 내지 100 밀리그램, 보다 전형적으로 체중 킬로그램당 5 나노그램 내지 25 밀리그램, 및 보다 통상적으로 체중 킬로그램당 10 나노그램 내지 15 밀리그램



램 (예를 들어 10 나노그램 내지 10 밀리그램, 및 보다 전형적으로 킬로그램당 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 20 밀리그램, 예를 들어 킬로그램당 1 마이크로그램 내지 10 밀리그램)의 범위일 수 있지만, 필요한 경우에 보다 높은 또는 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 매일 기준으로, 또는 예를 들어 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6, 또는 7, 또는 10 또는 14, 또는 21, 또는 28일마다의 반복 기준으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 화합물은 주입에 의해, 1일에 다수회 투여될 수 있다.

- [0372] 본 발명의 화합물은, 예를 들어 1 내지 1500 mg, 2 내지 800 mg, 또는 5 내지 500 mg, 예를 들어 2 내지 200 mg 또는 10 내지 1000 mg 용량의 범위로 투여될 수 있고, 용량의 특정한 예는 10, 20, 50 및 80 mg을 포함한다. 본 발명의 화합물은 매일 1회 또는 1회 초과로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 연속적으로 투여될 수 있다 (즉, 치료 요법 기간 동안 중단 없이 매일 이루어짐). 대안적으로, 본 발명의 화합물은 간헐적으로 투여될 수 있다 (즉, 치료 요법 기간에 걸쳐 주어진 기간, 예컨대 1주 동안 연속적으로 이루어진 다음, 소정의 기간, 예컨대 1주 동안 중단되고, 이어서 또 다른 기간, 예컨대 1주 동안 연속적으로 이루어지는 등임). 간헐적 투여를 수반하는 치료 요법의 예는, 투여가 1회 이상의 주기, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 또는 그 초과인 주기 동안 - 1주 온, 1주 오프; 또는 2주 온, 1주 오프; 또는 3주 온, 1주 오프; 또는 2주 온, 2주 오프; 또는 4주 온, 2주 오프; 또는 1주 온, 3주 오프의 주기로 이루어지는 요법을 포함한다.
- [0373] 하나의 특정한 투여 스케줄에서, 환자는 최대 10일, 특히 1주 중 최대 5일 동안 매일 1시간의 기간 동안 본 발명의 화합물의 주입을 제공받을 것이고, 치료는 목적하는 간격, 예컨대 2 내지 4주, 특히 3주마다 반복된다.
- [0374] 보다 특히, 환자는 5일 동안 매일 1시간의 기간 동안 본 발명의 화합물의 주입을 제공받을 수 있고, 치료는 3주마다 반복된다.
- [0375] 또 다른 특정한 투여 스케줄에서, 환자는 30분 내지 1시간에 걸쳐 주입을 제공받은 다음, 가변 기간, 예를 들어 1 내지 5시간, 예를 들어 3시간의 주입을 유지한다.
- [0376] 추가의 특정한 투여 스케줄에서, 환자는 12시간 내지 5일의 기간 동안 연속 주입, 및 특히 24시간 내지 72시간의 연속 주입을 제공받는다.
- [0377] 그러나, 궁극적으로, 투여되는 본 발명의 화합물의 양 및 사용되는 조성물의 유형은 치료될 질환 또는 생리학적 상태의 속성에 부합할 것이고, 의사의 재량에 달려있을 것이다.
- [0378] 본 발명의 화합물은 단일 작용제로서 또는 다른 치료제와 조합되어 사용될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 조합 실험은, 예를 들어 문헌 [Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regulat 1984;22: 27-55]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0379] 본 발명의 화합물이 1, 2, 3, 4종 또는 그 초과인 다른 치료제 (바람직하게는 1 또는 2종, 보다 바람직하게는 1종)와 함께 조합 요법으로 투여되는 경우에, 작용제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 후자의 경우에, 2종 이상의 작용제는 유리하거나 상승작용적인 효과가 달성되는 것을 보장하기 위해 충분한 기간 내에, 충분한 양 및 방식으로 투여될 것이다. 순차적으로 투여되는 경우에, 이는 가까이 이격된 간격으로 (예를 들어, 5-10분의 기간에 걸쳐) 또는 보다 긴 간격으로 (예를 들어, 1, 2, 3, 4시간 또는 그 초과로 떨어져, 또는 필요한 경우에 심지어 더 긴 기간 떨어져) 투여될 수 있고, 정확한 투여량 요법은 치료제(들)의 특성에 부합할 수 있다. 이들 투여량은 예를 들어 치료 과정당 1회, 2회 또는 그 초과로 투여될 수 있고, 이는 예를 들어 7, 14, 21 또는 28일마다 반복될 수 있다.
- [0380] 조합물의 각 성분에 대한 바람직한 투여 방법 및 순서, 및 각각의 투여량 및 요법은 투여되는 특정한 다른 의약 작용제 및 본 발명의 화합물, 그의 투여 경로, 치료되는 특정한 종양 및 치료되는 특정한 숙주에 따라 달라질 것임이 인지될 것이다. 최적의 투여 방법 및 순서, 및 투여량 및 요법은 통상적인 방법을 사용하여 및 본원에 제시된 정보를 고려하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0381] 조합물로서 주어지는 경우에 본 발명에 따른 화합물 및 1종 이상의 다른 치료제(들)의 중량비는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 상기 비 및 정확한 투여량 및 투여 빈도는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있는 바와 같이, 사용되는 본 발명의 특정한 화합물 및 다른 치료제(들), 치료될 특정한 상태, 치료될 상태의 중증도, 특정한 환자의 연령, 체중, 성별, 식이, 투여 시간 및 일반적 신체 상태, 투여 방식 뿐만 아니라 개체가 복용할 수 있는 다른 의약에 따라 달라진다. 게다가, 1일 유효량은 치료된 대상체의 반응에 따라 및/또는 본 발명의 화합물을 처방하는 의사의 평가에 따라 감소 또는 증가될 수 있음이 명백하다. 본 발명의 화합물 및 또 다른 치료제에 대한 특정한 중량비는 1/10 내지 10/1, 보다 특히 1/5 내지 5/1,

보다 특히 1/3 내지 3/1의 범위일 수 있다.

[0382] 항암 요법

[0383] 치료 (또는 억제)될 수 있는 암 (및 그의 양성 대응물)의 예는 상피 기원의 종양 (선암종, 편평세포 암종, 이행 세포 암종 및 다른 암종을 포함한 다양한 유형의 선종 및 암종) 예컨대 방광 및 요로, 유방, 위장관 (식도, 위 (위장), 소장, 결장, 직장 및 항문 포함), 간 (간세포성 암종), 담낭 및 담도계, 외분비 췌장, 신장, 폐 (예를 들어, 선암종, 소세포 폐 암종, 비소세포 폐 암종, 기관지폐포 암종 및 중피종), 두경부 (예를 들어 설, 협강, 후두, 인두, 비인두, 편도, 타액선, 비강 및 부비동의 암), 난소, 난관, 복막, 질, 외음부, 음경, 자궁경부, 자궁근층, 자궁내막, 갑상선 (예를 들어 갑상선 여포성 암종), 부신, 전립선, 피부 및 부속기 (예를 들어 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 각화극세포종, 이형성 모반)의 암종; 림프계의 혈액 악성종양 및 관련 상태 (예를 들어 급성 림프구성 백혈병 [ALL], 만성 림프구성 백혈병 [CLL], B-세포 림프종 예컨대 미만성 대 B-세포 림프종 [DLBCL], 여포성 림프종, 버킷 림프종, 외투 세포 림프종, T-세포 림프종 및 백혈병, 자연 킬러 [NK] 세포 림프종, 호지킨 림프종, 모발상 세포 백혈병, 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증, 형질세포종, 다발성 골수종, 및 이식후 림프증식성 장애), 및 골수계의 혈액 악성종양 및 관련 상태 (예를 들어 급성 골수 백혈병 [AML], 만성 골수 백혈병 [CML], 만성 골수단핵구성 백혈병 [CMML], 과다호산구성 증후군, 골수증식성 장애 예컨대 진성 다혈구혈증, 본태성 혈소판혈증 및 원발성 골수섬유증, 골수증식성 증후군, 골수이형성 증후군, 및 전골수구성 백혈병)을 포함한 혈액 악성종양 (즉 백혈병, 림프종) 및 전암성 혈액 장애 및 경계선 악성종양의 장애; 중간엽 기원의 종양, 예를 들어 연부 조직, 골 또는 연골의 육종, 예컨대 골육종, 섬유육종, 연골육종, 횡문근육종, 평활근육종, 지방육종, 혈관육종, 카포시 육종, 유잉 육종, 활막 육종, 상피양 육종, 위장 기질 종양, 양성 및 악성 조직구종, 및 용기성 피부섬유육종; 종양 또는 말초 신경계의 종양 (예를 들어 성상세포종, 신경교종 및 교모세포종, 수막종, 상의세포종, 송과체 종양 및 슈반세포종); 내분비 종양 (예를 들어 뇌하수체 종양, 부신 종양, 도세포 종양, 부갑상선 종양, 카르시노이드 종양 및 갑상선의 수질 암종); 안구 및 부속기 종양 (예를 들어 망막모세포종); 배세포 및 영양막 종양 (예를 들어 기형종, 정상피종, 미분화배세포종, 포상 기태 및 융모막암종); 및 소아 및 배아성 종양 (예를 들어 수모세포종, 신경모세포종, 윌름스 종양, 및 원시 신경외배엽 종양); 또는 선천성 증후군 또는 다르게는 환자가 악성종양에 감수성이 되게 하는 증후군 (예를 들어, 색소성 건피증)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0384] 한 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 추가 실시양태에서, 암은 유방암, 난소암, 자궁경부암, 결장직장암, 간암, 전립선암 또는 폐암이다.

[0385] 한 실시양태에서, 암은 혈액 악성종양을 포함한다. 추가 실시양태에서, 혈액 악성종양은 골수종, 비-호지킨 림프종 또는 만성 림프구성 백혈병 중 하나이다.

[0386] 본 발명의 화합물과 함께 (공동으로 또는 상이한 시간 간격으로) 투여될 수 있는 다른 항암 치료제 또는 치료의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

[0387] • 토포이소머라제 I 억제제;

[0388] • 항대사물;

[0389] • 튜블린 표적화제;

[0390] • DNA 결합제 및 토포이소머라제 II 억제제;

[0391] • 알킬화제;

[0392] • 모노클로날 항체;

[0393] • 항-호르몬;

[0394] • 신호 전달 억제제;

[0395] • 프로테아솜 억제제;

[0396] • DNA 메틸 트랜스퍼라제;

- [0397] ● 시토카인 및 레티노이드;
- [0398] ● 염색질 표적화 요법;
- [0399] ● 방사선요법; 및
- [0400] ● 다른 치료제 또는 예방제, 예컨대 면역요법제.
- [0401] 본 발명의 화합물은 또한 비-화학요법 치료, 예컨대 방사선요법, 광역학 요법, 유전자 요법; 수술 및 제어된 식이와 함께 투여될 수 있다.
- [0402] 또 다른 화학요법제와의 조합 요법에 사용하기 위해, 본 발명의 화합물 및 1, 2, 3, 4종 또는 그 초과와 다른 치료제는, 예를 들어 2, 3, 4종 또는 그 초과와 치료제를 함유하는 투여 형태로, 즉 모든 성분을 함유하는 단일 제약 조성물로 함께 제제화될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 개별 치료제는 개별적으로 제제화되고, 임의로 그의 사용에 대한 지침서를 포함하는 키트의 형태로 함께 제공될 수 있다.
- [0403] 항감염 요법
- [0404] 감염원의 예는 임의의 병원체 예컨대 박테리아, 진균, 기생충 또는 바이러스를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 감염원에 의해 매개되고/거나 유발된 질환 또는 장애는 박테리아 감염이다.
- [0405] 예컨대 박테리아 감염의 예는 하기 박테리아에 의해 감염을 포함한다: 스태필로코쿠스 종 예컨대 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) (메티실린 저항성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA) 포함), 클로스트리디아 종 (예를 들어 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*) 및 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)), 엔테로박터(*Enterobacter*) 종, 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 시겔라 종, 예컨대 시겔라디센테리아에(*Shigelladysenteriae*), 캄필로박터 종 예컨대 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 엔테로코쿠스 종 예컨대 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 스트렙토코쿠스 종, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 클라미디아(*Chlamydia*) 종, 트레포네마팔리둠(*Treponemapallidum*), 네이세리아 고노레아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 보렐리아부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 그람-음성 병원체, 예컨대 아시네토박터 바우만니이(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 및 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) (및 1종 이상의 부류의 항생제에 저항성인 균주, 특히 다중-약물 저항성 (MDR) 균주 포함).
- [0406] 백신 요법
- [0407] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 면역접합체를 포함하는 백신이 제공된다.
- [0408] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 면역접합체를 포함하는 아주반트가 제공된다.
- [0409] 실시예
- [0410] 이제 본 발명을 하기 실시예에 기재된 구체적 실시양태를 참조하여 예시할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 화합물은 자동화된 명명 패키지 (예컨대 오토눔 (MDL) 또는 켐드로우(ChemDraw))를 사용하여 명명되거나, 또는 화학물질 공급업체에 의해 명명된다.
- [0411] 하기 합성 절차는 사용된 방법의 예시로 제공되고; 주어진 제조에 또는 단계의 경우에서, 사용된 전구체가 반드시 주어진 설명의 단계에 따라 합성된 개별 배치로부터 유래된 것은 아닐 수 있다.
- [0412] 분석 방법
- [0413] LCMS
- [0414] 시스템 1
- [0415] LCMS 애질런트 1100(Agilent 1100) (사원 펌프); 질량 분광계: 워터스 마이크로매스 ZQ(Waters Micromass ZQ)

[0416] 칼럼: 엑스브리지 C18(XBridge C18) 4.6 x 50 mm, 5  $\mu$ m.

[0417] 용매: A = 물; B = 아세토니트릴, C = 물 중 10 mm 포름산암모늄; D = 아세토니트릴 중 0.05% 포름산

[0418] 칼럼 온도: 25℃, 주입 부피: 5  $\mu$ L

[0419] LCMS 방법 A: 4.5분 산성 구동

시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	유속 (mL/분)
0	95	0	0	5	2.0
3.5	0	95	0	5	2.0
4.5	0	95	0	5	2.0
4.6	95	0	0	5	2.0

[0420]

[0421] LCMS 방법 B: 4.5분 완충 구동

시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	유속 (mL/분)
0	0	5	95	0	2.0
3.5	0	95	5	0	2.0
4.5	0	95	5	0	2.0
4.6	0	5	95	0	2.0

[0422]

[0423] LCMS 방법 C: 8분 산성 구동

시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	유속 (mL/분)
0	95	0	0	5	2.0
3.5	5	90	0	5	2.0
8.0	5	90	0	5	2.0
8.10	95	0	0	5	2.0

[0424]

[0425] 시스템 2

[0426] LCMS 애질런트 1100 (사원 펌프); 질량 분광계: PE 사이엑스 API 2000 MS/MS

[0427] 칼럼: 애질런트 포로셀 120 칼럼, SB-C18, 4.6mm x 30mm, 2.7  $\mu$ m

[0428] 용매: A = 물; B = 아세토니트릴 중 0.1% 포름산

[0429] 칼럼 온도: 20℃, 주입 부피: 5  $\mu$ L

[0430] LCMS 방법 D: 4.5분 산성 구동

시간 (분)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	유속 (mL/분)
0.5	95	5	0	5	2.0
1.5	0	100	0	5	2.0
4.0	0	100	0	5	2.0
4.3	95	5			
4.5	95	5	0	5	2.0

[0431]

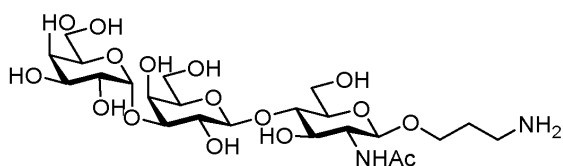
[0432] NMR

- [0433] NMR 세부사항은 옥스포드 인스트루먼츠 AS400(Oxford Instruments AS400)에 기록되었다.
- [0434] 약어
- [0435] 여기서 하기 약어가 사용되었고, 하기 의미가 적용된다:
- [0436] AcOH는 아세트산이고;
- [0437] aq.는 수성이고;
- [0438] br s는 넓은 단일선이고;
- [0439]  $\delta$ 은 ppm 단위의 화학적 이동이고;
- [0440] d는 이중선이고;
- [0441] dd는 이중선의 이중선이고;
- [0442] ddd는 이중선의 이중선의 이중선이고;
- [0443] DCM은 디클로로메탄이고;
- [0444] DIPEA는 디이소프로필에틸아민이고;
- [0445] DMF는 디메틸포름아미드이고;
- [0446] DMSO는 디메틸설폭시드이고;
- [0447] DMSO-d<sub>6</sub>은 과수소화 디메틸설폭시드 NMR 용매이고;
- [0448] DSG는 디-(N-숙신이미딜)글루타레이트이고;
- [0449] EtOH는 에탄올이고;
- [0450] EtOAc는 에틸 아세테이트이고;
- [0451] HATU는 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트이고;
- [0452] HPLC는 고압 액체 크로마토그래피이고;
- [0453] IMS는 산업용 메틸화 스피릿 (전형적으로 EtOH 중 5%-10% MeOH)이고;
- [0454]  $\mu$ 는 마이크로이고;
- [0455] m은 다중선이고;
- [0456] Mal은 말레이미드이고;
- [0457] MeCN은 아세토니트릴이고;
- [0458] MeOH는 메탄올이고;
- [0459] min은 분이고;
- [0460] mL은 밀리리터이고;
- [0461] MMTTr은 모노메톡시트리틸이고;
- [0462] MS는 질량 분광측정법이고;
- [0463] NH<sub>3</sub>은 암모니아 또는 수산화암모늄 (28% 수용액)이고;
- [0464] NHS는 N-히드록시숙신이미드; 또는 N-히드록시숙신이미딜이고;
- [0465] NMR은 핵 자기 공명이고;
- [0466] Pd/C는 (전형적으로 5%-10%) 목탄 상 팔라듐 수소화 촉매 (물-습성)이고;
- [0467] Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>는 테트라키스 트리페닐포스핀 팔라듐 (0)이고;

- [0468] ppm은 백만분율이고;
- [0469] q는 사중선이고;
- [0470] Rt는 체류 시간이고;
- [0471] s는 단일선이고;
- [0472] SMCC는 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로hexan-1-카르복실레이트이고;
- [0473] t는 삼중선이고;
- [0474] TBAF는 테트라-n-부틸암모늄 플루오라이드이고;
- [0475] TBME는 tert-부틸 메틸 에테르이고;
- [0476] TEA는 트리에틸아민이고;
- [0477] TBS는 tert-부틸디메틸실릴옥시이고;
- [0478] TFA는 트리플루오로아세트산이고;
- [0479] THF는 테트라히드로푸란이다.

[0480] 여기서 알파-Gal이 언급되는 경우에, 하기 중간체가 적용된다:

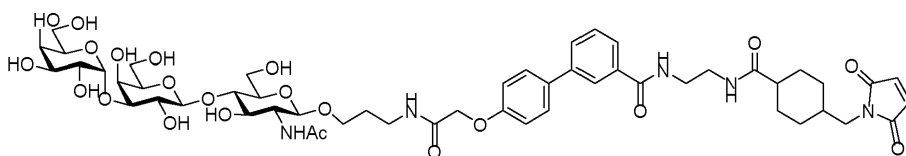
- [0481] 3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아민



- [0482]
- [0483] 이러한 중간체는 문헌 [Bovin et al. (Mendeleev Communications (2002), (4), 143-145)]에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0484] 제조예 1-19는 상기 기재된 바와 같은 방법 (a)-(d) 및 반응식 1, 1A, 2 및 3에 기재된 바와 같이, 실시예에의 접합에 필요한 주요 링커 분자로부터 중간체를 제조하기 위해 사용되는 방법을 기재한다.

[0485] 제조예 1

- [0486] 4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-(4-((2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)메틸)시클로hexan-1-카르복스아미도)에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미드



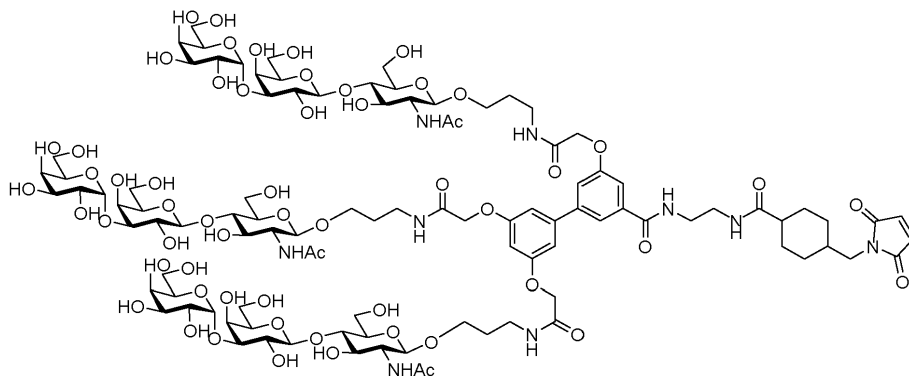
- [0487]
- [0488] DMSO (400  $\mu$ L) 중 4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-아미노에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미드 (제조예 3, 5.0 mg, 2.26  $\mu$ mol)의 용액에 DMSO (100  $\mu$ L) 중 SMCC (2.2 mg, 6.57  $\mu$ mol)의 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 18시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 건조시켰다. 조 잔류물을 직접 후속 단계에 사용하였다.



[0489] LCMS 방법 B: Rt = 1.97분, ES<sup>+</sup> MS m/z 1118.5 [M+H]<sup>+</sup>

[0490] 제조예 2

[0491] 2,2',2''-((5'-((2-(4-((2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복사미도)에틸)카르바모일)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리스(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아세트아미드)



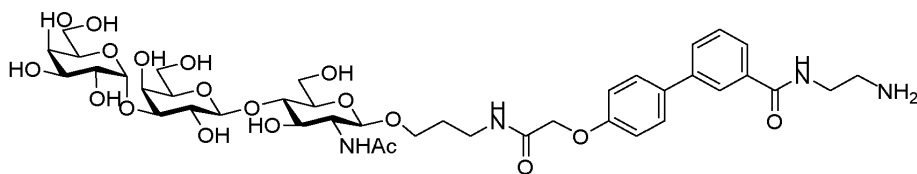
[0492]

[0493] DMSO (400 μL) 중 2,2',2''-((5'-((2-아미노에틸)카르바모일)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리스(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아세트아미드) (제조예 4, 5.0 mg, 2.26 μmol)의 용액에 DMSO (100 μL) 중 SMCC (0.69 mg, 2.05 μmol)의 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 18시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 건조시켰다. 조 잔류물을 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0494] LCMS 방법 B: Rt = 1.57분, ES<sup>+</sup> MS m/z 1218.5 [M+2H]<sup>+</sup>/2, 이론적 질량: 2435.4

[0495] 제조예 3

[0496] 4'-(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-아미노에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드



[0497]

[0498] 단계 1

[0499] DMF (0.5 mL) 중 4'-(2-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산 (제조예 6, 38.3 mg, 44.7 μmol)의 용액에 DMF (0.5 mL) 중 Et<sub>3</sub>N (21.8 μL, 156.4 μmol)에 이어서 N<sup>1</sup>-((4-메톡시페닐)디페닐메틸)에탄-1,2-디아민 (제조예 19, 19.3 mg, 58.1 μmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다.

[0500] 단계 2

[0501] 0.2 M HCl (aq)을 pH 3-4까지 적가하고, 용액을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시

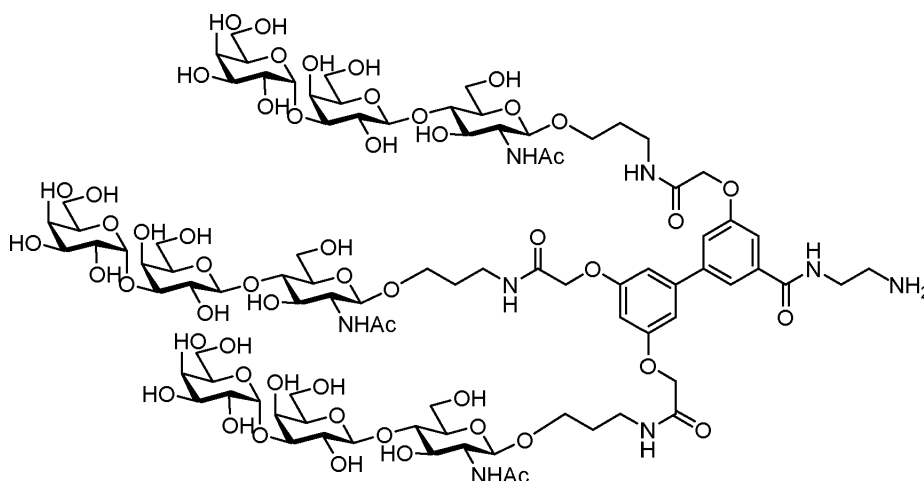


키고, 0.1% 암모니아를 함유하는 물 중 5-40% MeCN으로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (12.4 mg, 28%)로서 수득하였다.

[0502] LCMS 방법 B: Rt = 1.32분, ES<sup>+</sup> MS m/z 899.3 [M+H]<sup>+</sup>

[0503] 제조예 4

[0504] 2,2',2''-((5'-((2-아미노에틸)카르바모일)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리스(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아세트아미드)



[0505]

[0506] 단계 1

[0507] DMF (0.5 mL) 중 3',5,5'-트리스(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산 (제조예 5, 66.0 mg, 30.4 μmol)의 용액에 Et<sub>3</sub>N (14.8 μL, 106.4 μmol)에 이어서 DMF (0.5 mL) 중 N<sup>1</sup>-((4-메톡시페닐)디페닐메틸)에탄-1,2-디아민 (제조예 19, 13.1 mg, 39.5 μmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다.

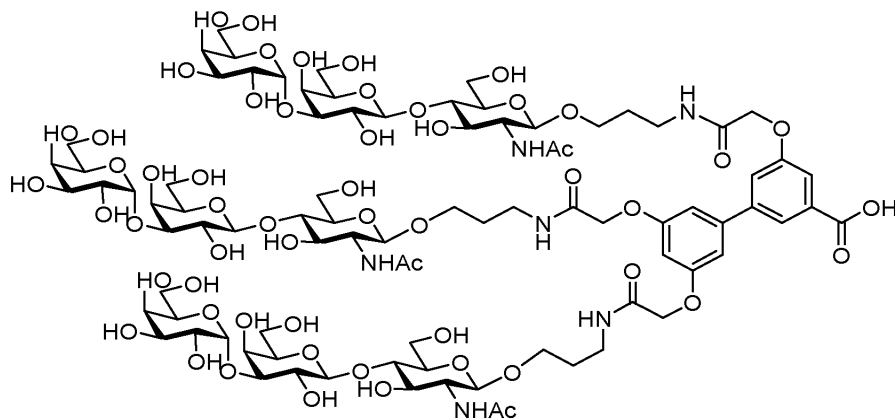
[0508] 단계 2

[0509] 0.2 M HCl (aq)을 pH 3-4까지 적가하고, 용액을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 0.1% 암모니아를 함유하는 물 중 5-40% MeCN으로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (47.0 mg, 70%)로서 수득하였다.

[0510] LCMS 방법 B: Rt = 1.57분, ES<sup>+</sup> MS m/z 1106.9 [M+2H]<sup>+</sup>/2, 이론적 질량: 2216.1

[0511] 제조예 5

[0512] 3',5,5'-트리스(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산



[0513]

[0514]

방법 A

[0515]

MeOH/물 (1:1 v/v, 7.1 mL) 중에 용해시킨 벤질 3',5,5'-트리스(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 7, 71.2 mg, 31.4  $\mu\text{mol}$ )에 10% Pd/C (7.1 mg)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하면서 50 psi에서 수소화시켰다. 반응물을 디칼라이트를 통해 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 물 (2 mL) 중에 용해시키고, 실리사이클 DMT 수지 (50 mg)와 함께 30분 동안 교반하고, 여과하여 무색 용액을 수득하였다. 용액을 진공 하에 농축시켜 표제 화합물을 무색 고체 (61.2 mg, 89%)로서 수득하였다.

[0516]

LCMS 방법 B:  $R_t = 1.27$ 분,  $ES^+ MS m/z 1088.4 [M+2H]^+/2$ , 이론적 질량: 2174.4

[0517]

MALDI-ToF 2195.8  $[M-H+Na]^+$

[0518]

제조예 3은 또한 하기 방법에 따라 제조할 수 있다:

[0519]

방법 B

[0520]

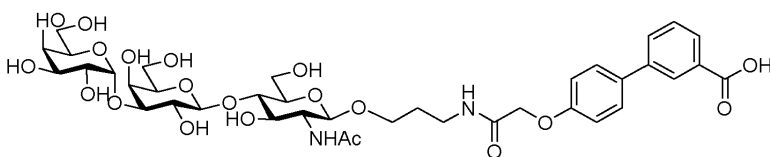
물 (7 mL) 중에 용해시킨 벤질 3',5,5'-트리스(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 7, 278 mg, 123  $\mu\text{mol}$ )에 TEA (7 mL)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 16시간 동안 격렬히 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 0.1%  $NH_3$ 을 함유하는 5-40% MeCN/물로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (224 mg, 83%)로서 수득하였다.

[0521]

제조예 6

[0522]

4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산



[0523]

[0524]

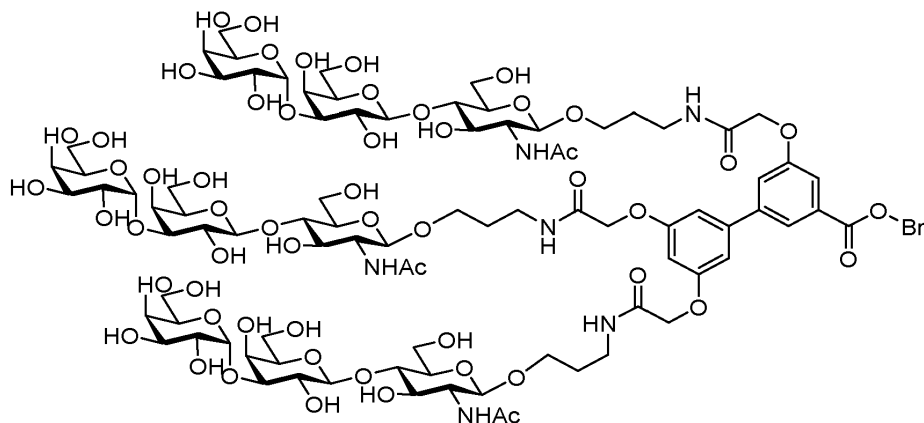
MeOH/물 (1:1 v/v, 5 mL) 중에 용해시킨 벤질 4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히

드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 8, 93.5 mg, 98.7  $\mu\text{mol}$ )에 Pd/C (10%, 10 mg)를 첨가하였다. 반응물을 수소 분위기 (50 psi) 하에 두고, 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 촉매를 시린지 필터를 통한 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 제거하여 조 생성물을 수득하였으며, 이를 0.1%  $\text{NH}_3$ 을 함유하는 5-40% MeCN/물로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (71.6 mg, 84%)로서 수득하였다.

[0525] LCMS 방법 A:  $R_t = 1.83$ 분,  $\text{ES}^+$  MS  $m/z$  857.57  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0526] 제조예 7

[0527] 벤질 3',5,5'-트리스(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



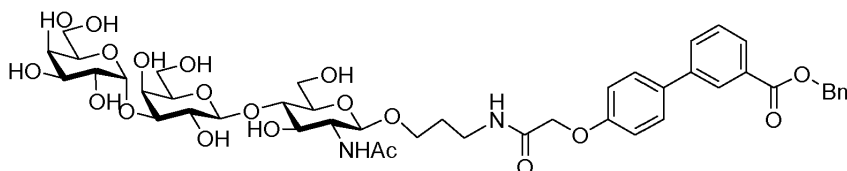
[0528]

[0529] DMSO (1.25 mL) 및 DMF (3.75 mL) 중에 용해시킨 알파-Gal (100 mg, 166  $\mu\text{mol}$ )에 트리에틸아민 (52.1  $\mu\text{L}$ , 374  $\mu\text{mol}$ ) 및 2,2',2''-((5'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리아세트산 (제조예 9, 21.2 mg, 41.5  $\mu\text{mol}$ )을 첨가하였다. HATU의 용액 (63.1 mg, 166  $\mu\text{mol}$ )을 DMF 중 용액 (1.25 mL)으로서 첨가하고, 반응물을 질소 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 0.1%  $\text{NH}_3$ 을 함유하는 물 중 10-40% MeCN으로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (71.2 mg, 76%)로서 수득하였다.

[0530] LCMS 방법 B:  $R_t = 1.80$ 분,  $\text{ES}^+$  MS  $m/z$  1313.3  $[\text{M}+2\text{H}]^+/2$ , 이론적 질량: 2624.3

[0531] 제조예 8

[0532] 벤질 4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



[0533]

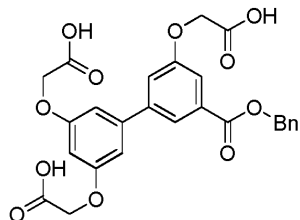
[0534] DMF (7.5 mL) 중 2-((3'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-4-일)옥시)아세트산 (제조예 10, 55.0 mg, 152  $\mu\text{mol}$ )에 TEA (63.4  $\mu\text{L}$ , 455  $\mu\text{mol}$ )에 이어서 DMSO (500  $\mu\text{L}$ ) 중 알파-Gal (119 mg, 197  $\mu\text{mol}$ )을 첨가하였다. HATU (86.6 mg, 228  $\mu\text{mol}$ )를 DMF 중 용액 (500  $\mu\text{L}$ )으로서 첨가하고, 반응물이 실온에서 질소 하에 16시간 동안 교반되도록 하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 0.1%  $\text{NH}_3$ 을 함유하는 7-60% MeCN/물로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (93.5 mg, 65%)로서 수

특하였다.

[0535] LCMS 방법 B: Rt = 2.54분, ES<sup>+</sup> MS m/z 947.62 [M+H]<sup>+</sup>

[0536] 제조예 9

[0537] 2,2',2''-((5'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리아세트산



[0538]

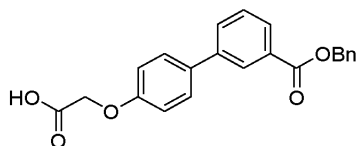
[0539] DCM/TFA/물 (10/10/1 v/v/v, 5 mL) 중에 용해시킨 트리-tert-부틸 2,2',2''-((5'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리아세테이트 (제조예 11, 100 mg, 147 μmol)의 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, MeOH (1 mL) 중에 용해시키고, 물 (10 mL)로 침전시켰다. 침전물을 여과에 의해 수집하고, 물로 세척하고, 진공 하에 건조시켜 표제 화합물을 무색 고체 (57.8 mg, 77%)로서 수득하였다.

[0540] LCMS 방법 A: Rt = 2.48분, ES<sup>-</sup> MS m/z 509.3 [M-H]<sup>-</sup>

[0541] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ ppm 13.05 (3H, br s), 7.90 (1H, s), 7.55-7.45 (3H, m), 7.45-7.30 (4H, m), 6.80 (2H, d), 6.50 (1H, t), 5.40 (2H, s), 4.85 (2H, s), 4.75 (4H, s).

[0542] 제조예 10

[0543] 2-((3'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-4-일)옥시)아세트산



[0544]

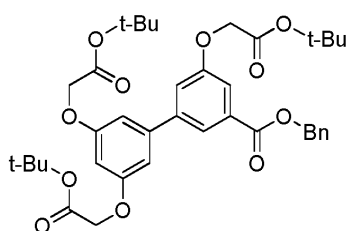
[0545] 표제 화합물을 제조예 12를 사용하여 제조예 9에 대해 기재된 방법에 따라 제조하고, 0.1% NH<sub>3</sub>을 함유하는 5-40% MeCN/물로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다

[0546] LCMS 방법 B: Rt = 2.43분, ES<sup>+</sup> MS m/z 363.2 [M+H]<sup>+</sup>

[0547] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ ppm 13.00 (1H, s), 8.15 (1H, t), 7.90-7.85 (2H, m), 7.65-7.55 (3H, m), 7.50-7.45 (2H, m), 7.45-7.30 (3H, m), 7.00-6.95 (2H, m), 5.40 (2H, s), 4.70 (2H, s).

[0548] 제조예 11

[0549] 트리-tert-부틸 2,2',2''-((5'-((벤질옥시)카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리아세테이트



[0550]

[0551] DMF (10 mL) 중에 용해시킨 벤질 3',5,5'-트리히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 13, 356 mg, 1.06 mmol)에 tert-부틸 브로모아세테이트 (625 μL, 4.23 mmol) 및 탄산칼륨 (1.17 g, 8.47 mmol)을 첨가하였

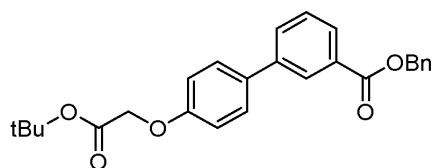
다. 생성된 현탁액을 질소 하에 16시간 동안 교반한 후 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 물 (10 mL) 중에 용해시키고, EtOAc (2 x 10 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (10 mL), 2M 수성 NaOH (10 mL)로 세척하고, MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄 중 7-60% EtOAc로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 투명한 무색 검 (618 mg, 86%)으로서 수득하였다.

[0552] LCMS 방법 C: Rt = 4.34분, 질량 이온은 관찰되지 않음

[0553] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 7.85 (1H, s), 7.55-7.50 (1H, m), 7.45-7.25 (6H, m), 6.70 (2H, d), 6.45-6.40 (1H, m), 5.35 (2H, s), 4.55 (2H, s), 4.50 (4H, s), 1.45 (27H, s)

[0554] 제조예 12

[0555] 벤질 4'-(2-(tert-부톡시)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



[0556]

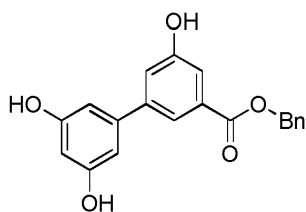
[0557] DMF (5 mL) 중 벤질 4'-히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 14, 368 mg, 1.21 mmol) 및 tert-부틸 브로모아세테이트 (178 μL, 1.21 mmol)의 용액에 탄산칼륨 (200 mg, 1.45 mmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 20시간에 이어서 50℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 생성된 잔류물을 물 (20 mL)과 DCM (20 mL) 사이에 분배하였다. 유기 층을 분리하고, 수성 층을 DCM (20 mL)으로 다시 추출하였다. 합한 유기 추출물을 물 (10 mL)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄 중 0-15% EtOAc로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 오일 (510 mg, 100%)로서 수득하였다.

[0558] LCMS 방법 D: Rt = 3.85분, 질량 이온은 관찰되지 않음

[0559] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 8.25 (1H, t), 8.01-7.99 (1H, dt), 7.76-7.71 (1H, m), 7.58-7.31 (8H, m), 7.06-6.95 (2H, m), 5.39 (2H, s), 4.56 (2H, s), 1.50 (9H, s)

[0560] 제조예 13

[0561] 벤질 3',5,5'-트리히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



[0562]

[0563] THF (12 mL) 중에 용해시킨 조 벤질 3',5'-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-5-히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트 (제조예 16, 1.27 g, 2.46 mmol)의 용액에 TBAF 용액 (THF 중 1M, 6.15 mL, 6.15 mmol)을 적가하였다. 반응물을 실온에서 질소 하에 90분 동안 교반한 후 EtOAc (100 mL)로 희석하였다. 유기 상을 물 (2 x 50 mL)로 세척하고, MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중 5% MeOH로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 연갈색 고체 (3 단계에 걸쳐 356 mg, 43%)로서 수득하였다.

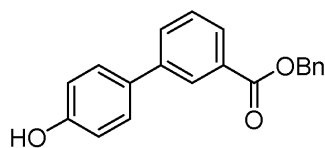
[0564] LCMS 방법 A: Rt = 2.66분, ES<sup>-</sup> MS m/z 335.3 [M-H]<sup>-</sup>

[0565] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ ppm 7.60 (1H, t), 7.45-7.40 (2H, m), 7.40-7.20 (4H, m), 7.15-7.10 (1H, m),

6.45 (2H, d), 6.20 (1H, t), 5.30 (2H, s).

[0566] 제조예 14

[0567] 벤질 4'-히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



[0568]

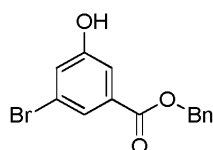
[0569] DMF (5 mL) 중 벤질 클로라이드 (295  $\mu$ L, 2.56 mmol)의 용액에 4'-히드록시비페닐-3-카르복실산 (500 mg, 2.33 mmol) 및 탄산칼륨 (322 mg, 2.33 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반한 후 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 물 (20 mL)과 디에틸 에테르 (20 mL) 사이에 분배하였다. 유기 층을 분리하고, 수성 층을 디에틸 에테르 (20 mL)로 다시 추출하였다. 합한 유기 추출물을 물 (10 mL)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헥산 중 0-30% EtOAc로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 백색 고체 (378 mg, 53%)로서 수득하였다.

[0570] LCMS 방법 D:  $R_t$  = 3.48분,  $ES^+$  MS  $m/z$  305.0  $[M+H]^+$

[0571]  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm 8.26-8.24 (1H, m), 8.03-7.98 (1H, m), 7.75-7.71 (1H, m), 7.51-7.43 (5H, m), 7.42-7.31 (3H, m), 6.95-6.90 (2H, m), 5.40 (2H, s).

[0572] 제조예 15

[0573] 벤질 3-브로모-5-히드록시벤조에이트



[0574]

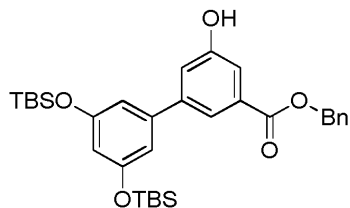
[0575] DMF (25 mL) 중에 용해시킨 3-브로모-5-히드록시벤조산 (4.08 g, 18.8 mmol)의 용액에  $K_2CO_3$  (2.60 g, 18.8 mmol)을 첨가하고, 5분 후 벤질 브로마이드 (2.24 mL, 18.8 mmol)를 10분에 걸쳐 적가하였다. 반응물을 질소 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 추가의  $K_2CO_3$  (520 mg, 3.76 mmol) 및 벤질 브로마이드 (450  $\mu$ L, 3.79 mmol)를 첨가하고, 반응물을 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 EtOAc (30 mL)와 물 (30 mL) 사이에 분배하였다. 수성 층을 EtOAc (2 x 20 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (30 mL)로 세척하였다. 유기 층을  $MgSO_4$  상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄 중 5% EtOAc로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 무색 고체 (3.88 g, 67%)로서 수득하였다.

[0576] LCMS 방법 A:  $R_t$  = 3.36분,  $ES^-$  MS  $m/z$  307.2  $[M-H]^-$

[0577]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm 7.75 (1H, t), 7.50-7.45 (1H, m), 7.45-7.30 (5H, m), 7.20 (1H, t), 5.30 (2H, s), 5.30 (1H, br s).

[0578] 제조예 16

[0579] 벤질 3',5'-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-5-히드록시-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트



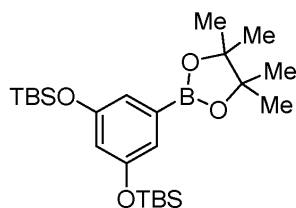
[0580]

[0581] 디옥산/물 (30 mL, 5:1 v/v) 중에 용해시킨 벤질 3-브로모-5-히드록시벤조에이트 (제조예 15, 755 mg, 2.46 mmol), 탄산나트륨 (912 mg, 8.60 mmol) 및 ((5-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(tert-부틸디메틸실란) (제조예 17, 1.87 g, 2.95 mmol)의 혼합물을 질소로 30분 동안 탈기하였다. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (284 mg, 246 μmol)를 첨가하고, 반응물을 질소 하에 100℃로 90분 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, EtOAc (100 mL) 및 물 (50 mL)을 첨가하였다. 층을 분리하고, 수성 상을 EtOAc (2 x 25 mL)로 역세척하였다. 합한 유기 상을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄 (100 mL)으로 처리하고, 생성된 혼합물을 5분 동안 초음파처리한 후, 여과하여 고체를 제거하였다. 여과물을 진공 하에 농축시켜 조 표제 화합물을 투명한 갈색 오일 (1.27 g)로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0582] LCMS 방법 C: Rt = 5.47분, ES<sup>+</sup> MS m/z 565.4 [M+H]<sup>+</sup>

[0583] 제조예 17

[0584] ((5-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(tert-부틸디메틸실란)



[0585]

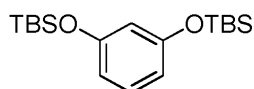
[0586] 이소헥산 (15 mL) 중에 용해시킨 1,3-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)벤젠 (제조예 18, 1.00 g, 2.95 mmol) 및 비스(피나콜레이트)디보론 (750 mg, 2.95 mmol)의 용액을 질소를 사용하여 1시간 동안 탈기하였다. [Ir(OMe)(COD)]<sub>2</sub> (19.6 mg, 59.1 μmol) 및 4,4'-디-tert-부틸-2,2'-비피리딘 (15.9 mg, 59.0 μmol)을 첨가하고, 반응물을 밀봉하고, 110℃로 16시간 동안 가열하였다. 반응물을 냉각시키고, 진공 하에 농축시키고, 직접 후속 단계에 사용하였다 (1.87 g).

[0587] LCMS 방법 C: Rt = 6.19분, ES<sup>+</sup> MS m/z 465.4 [M+H]<sup>+</sup>

[0588] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 6.85 (2H, d), 6.40 (1H, t), 1.25 (12H, s), 0.95 (18H, s), 0.15 (12H, s).

[0589] 제조예 18

[0590] 1,3-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)벤젠



[0591]

[0592] DCM (40 mL) 중에 용해시킨 레조르시놀 (2.00 g, 18.2 mmol) 및 이미다졸 (3.71 g, 54.5 mmol)에 tert-부틸디메틸클로로실란 (8.21 g, 54.5 mmol)을 첨가하였다. 침전물이 형성되었고, 추가의 DCM (40 mL)을 첨가하고, 실온에서 질소 하에 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고, 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄 중 0-10% EtOAc로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 무색 오



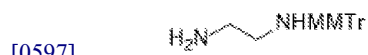
일 (6.18 g, >99%)로서 수득하였다.

[0593] LCMS 방법 C: Rt = 5.39분, ES<sup>+</sup> MS m/z 339.3 [M+H]<sup>+</sup>

[0594] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 6.95 (1H, t), 6.35 (2H, dd), 6.25 (1H, t), 1.85 (18H, s), 0.10 (12H, s).

[0595] 제조예 19

[0596] N<sup>1</sup>-((4-메톡시페닐)디페닐메틸)에탄-1,2-디아민



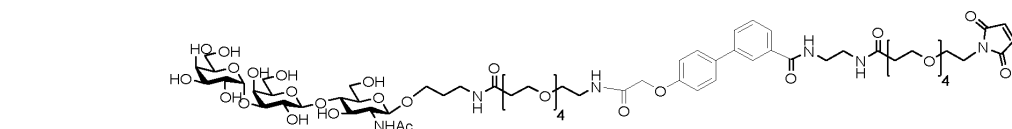
[0598] DCM (175 mL) 중 에틸렌 디아민 (54.0 mL, 809.6 mmol)의 용액에 DCM (175 mL) 중 MMT 클로라이드 (25.0 g, 81.0 mmol)의 용액을 교반하면서 1시간에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 10% 수성 탄산칼륨 용액 (400 mL) 및 염수 (400 mL)로 세척하였다. 유기 층을 수집하고, 황 산마그네슘 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켜 표제 화합물을 점성 연황색 오일 (26.1 g, 97%)로서 수득하였다.

[0599] LCMS 방법 B: Rt = 2.73분, 이온화는 관찰되지 않음

[0600] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 7.52-7.42 (4H, m), 7.40-7.34 (2H, m), 7.31-7.22 (4H, m), 7.20-7.15 (2H, m), 6.84-6.77 (2H, m), 3.80 (3H, s), 2.84-2.78 (2H, m), 2.27-2.18 (2H, m).

[0601] 제조예 20

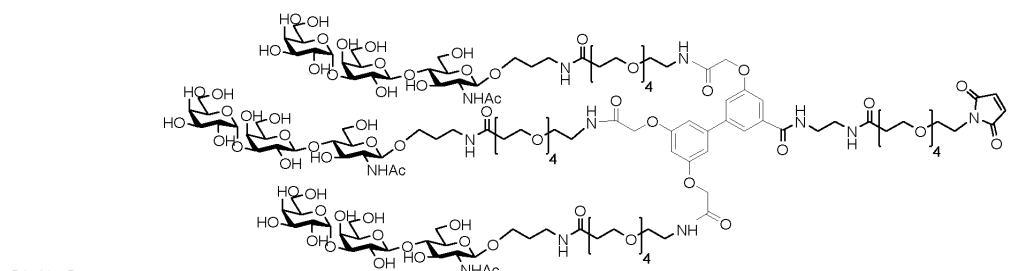
[0602] 4'-((2-((3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-3-옥소프로폭시)에틸)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-(3-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에톡시)프로판아미도)에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아מיד



[0604] DMF (100 mM) 중 제조예 24의 용액을 동등 부피의 DMF 중 Mal-PEG4-NHS (80 mM, 0.8 당량)에 첨가하고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 정지하였다. 반응물을 50 mM의 최종 농도로 저장하고, 접합 단계에 직접 사용하였다.

[0605] 제조예 21

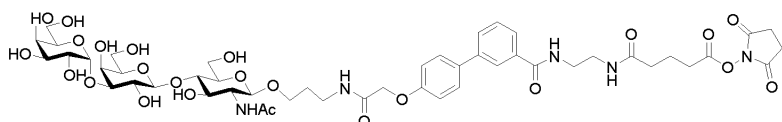
[0606] 3,3',3"-(((2,2',2"-((5'-((2-(3-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에톡시)프로판아미도)에틸)카르바모일)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리스(아세트))트리스(아잔디일))트리스(에탄-2,1-디일))트리스(옥시))트리스(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)프로판아מיד)



[0608] DMF:DMSO (3:1, 25 mM) 중 제조예 25의 용액을 동등 부피의 DMF 중 Mal-PEG4-NHS (80 mM, 0.8 당량)에 첨가하고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 정치하였다. 반응물을 20 mM의 최종 농도로 저장하고, 접합 단계에 직접 사용하였다.

[0609] 제조예 22

[0610] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5-((2-(4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미도)에틸)아미노)-5-옥소펜타노에이트



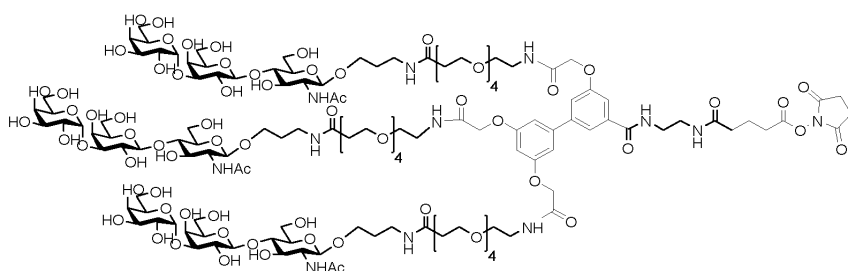
[0611]

[0612] 4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-아미노에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미드 (제조예 3, 21.76 mg, 24 mmol)을 1:1 무수 DMF:DMSO (1062  $\mu$ L) 중에 교반하면서 용해시켰다. 디-(N-숙신이미딜)글루타레이트 (39.49 mg, 120 mmol)를 1:1 무수 DMF:DMSO (400  $\mu$ L) 중 300 mM 용액으로서 첨가하였다. 반응물을 양성 질소 분위기 하에 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 물 중 1% TFA 중 1-50% MeCN으로 용리시키면서 역상 칼럼 크로마토그래피 (10 x 250 mm 하이크롬(Hichrom) ACE 10)를 사용하여 정제하였다. 목적 분획을 24시간에 걸쳐 동결 건조시켜 표제 화합물을 무색 유리 (23 mg, 88%)로서 수득하였다.

[0613] MS m/z 1110.3 [M+H]<sup>+</sup>

[0614] 제조예 23

[0615] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5-옥소-5-((2-(3'-(5,5'-트리스(2-((2-3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-3-옥소프로폭시)에틸)아미노)-2-옥소에톡시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미도)에틸)아미노)펜타노에이트

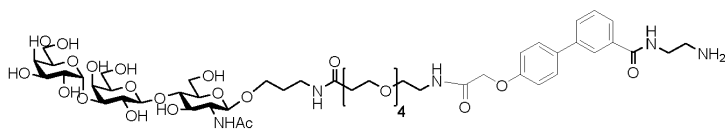


[0616]

[0617] 표제 화합물을 제조예 25를 사용하여 제조예 22에 대해 기재된 방법에 따라 제조하고, 접합 단계에 직접 사용하였다.

[0618] 제조예 24

[0619] 4'-(2-((2-3-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)아미노)-3-옥소프로폭시)에틸)아미노)-2-옥소에톡시)-N-(2-아미노에틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복스아미드



[0620]

[0621]

표제 화합물을 4'((2,2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-2-18-디옥소-6,9,12,15-테트라옥사-3,19-디아자도코실)옥시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산 (W02017060729)을 사용하여 제조예 3에 대해 기재된 방법에 따라 제조하였다.

[0622]

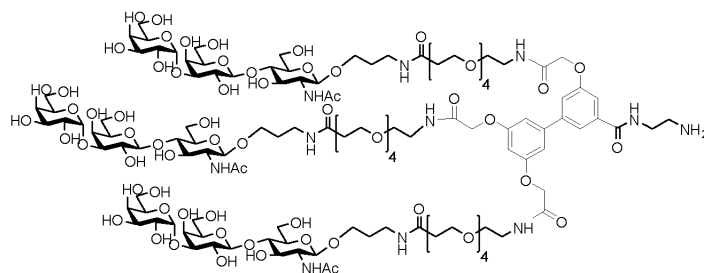
LCMS (방법 B):  $R_t = 1.66$ 분;  $ES^+ MS m/z 1145.4 [M+H]^+$

[0623]

제조예 25

[0624]

3,3',3"-(((2,2',2"-((5'-((2-아미노에틸)카르바모일)-[1,1'-비페닐]-3,3',5-트리일)트리스(옥시))트리스(아세틸))트리스(아잔디일))트리스(에탄-2,1-디일))트리스(옥시))트리스(N-(3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)프로필)프로판아미드)



[0625]

[0626]

표제 화합물을 3',5,5'-트리스((2,2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-아세트아미도-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-디히드록시-6-(히드록시메틸)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)-4-히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)2,18-디옥소-6,9,12,15-테트라옥사-3,19-디아자도코실)옥시)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산 (W02017060729)을 사용하여 제조예 3에 대해 기재된 방법에 따라 제조하였다.

[0627]

LCMS (방법 B):  $R_t = 1.52$ 분;  $ES^+ MS m/z 1479.0 [M+2H]^+/2$ ; 이론적 질량: 2958.0

[0628]

실시예

[0629]

물질 및 방법:

[0630]

vcMAE (vcE): ADCB TOX001, DMA 중 10 mM

[0631]

TCEP - 바이오벡트라(Biovectra) Cat 1300 로트: 42359

[0632]

N-아세틸 시스테인 - 시그마 A7250 로트: WXBC3104V

[0633]

디메틸아세트아미드 - 시그마-알드리치 271012 로트: STBF9638V

[0634]

KNE 완충제: 50mM KPI, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5

[0635]

PBS: 시그마, P5368 #SLBQ7495, WFI: 시그마 W3500 #RNBF6963을 사용하여 재구성됨

[0636]

1.76 M HEPES, pH 10.8

[0637]

2-이미노티올란 HCl: 시그마 I6256 #SLBS1775V

[0638]

폴리소르베이트 80: 시그마-알드리치 P8074 #BCBG4547V

[0639]

LAR은 링커:항체 비이다

[0640] DAR은 약물:항체 비이다

[0641] SEC는 크기 배제 크로마토그래피이다

[0642] 크기 배제 HPLC (SEC)에 의한 단량체 함량

[0643] 각각의 접합체의 응집체 함량을 10% IPA, 0.2M 인산칼륨, 0.25M 염화칼륨, pH 6.95 중 0.5 mL/분으로의 도소 (TOSOH) TSKgel G3000SWXL 7.8 mm x 30 cm, 5  $\mu$ m 칼럼 상에서의 크로마토그래피에 의해 평가하였다. 샘플을 순수 상태로 로딩하고, 214, 252 및 280 nm에서 데이터를 수집하였다. 모든 보고된 데이터는 280 nm에서의 것이다.

[0644] 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)

[0645] 도소 부틸-NPR 4.6 mm x 3.5 cm, 2.5  $\mu$ m 칼럼 상에서 0.8 mL/분으로, 이동상 A - 1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25mM NaPi, pH 6.95 $\pm$ 0.05 및 이동상 B - 75% 25mM NaPi, pH 6.95 $\pm$  0.05, 25% IPA 사이의 12-분 선형 구배로 HIC를 수행하였다. 샘플을 10  $\mu$ L까지의 최대 로딩으로 순수 상태로 로딩하고, 280, 252 및 214 nm에서 데이터를 수집하였고; 모든 보고된 데이터는 214 nm였다.

[0646] 중합체 역상 크로마토그래피 (PLRP)

[0647] 폴리머 랩스(Polymer Labs) PLRP-S 2.1 mm x 50 mm, 5  $\mu$ m, 1000 Å 칼럼 상에서 0.25 mL/분/80°C에서 0.1% TFA 25% MeCN 및 0.1% TFA 50% MeCN 사이의 25-분 선형 구배로 역상을 수행하였다. 샘플을 10 ug을 5 uL 0.1M DTT와 혼합하고, 0.5 M 트리스/Cl, pH 8.0으로 50 uL가 되게 하고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션함으로써 환원시켰다. 환원된 샘플을 49% 아세토니트릴, 49% 물, 2% 포름산으로 1:1 희석하여 환원을 정지시키고 PLRP 분석에 계류 중인 샘플을 안정화시켰다. 이러한 샘플 20 uL를 분석을 위해 칼럼 상에 로딩하고, 모든 데이터를 214 nm에서 보고하였다.

[0648] 주: HIC 및 PLRP는 알파-Gal의 친수성으로 인해 개별 링커 로딩을 분해할 수 없음. 링커:Ab 비 (LAR)를 초기 티올-반응성 항체 및 완성된 반응 혼합물의 분취물의 vcE 체이싱에 의해 결정하였다.

[0649] 각각의 실시예에 대한 데이터는 도 1-3 및 12-17에 예시된다.

[0650]           항체 접합체 (세특시맵)

[0651] 세록시마 (머크 세로노(Merck Serono); 로트 번호: 223155, exp: 09/2020, 152,000 Da의 분자량을 가짐)을 하기 접합에 사용하였다. 계산은  $\text{Abs}_{0.1\%} 280 \text{ nm}$ ,  $1.45 \text{ cm}^{-1} \text{ mg/mL}^{-1}$ , UV 분석 4.7 mg/mL 및 214 nm에서의 SEC에 의한 보정 곡선에 기초하였다.

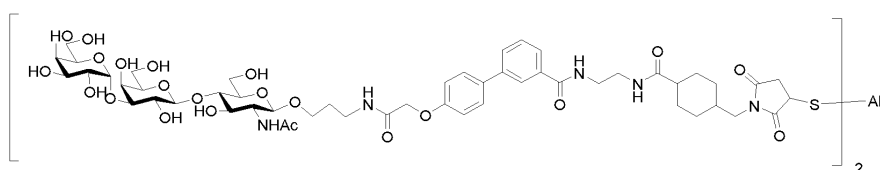
[0652] 세톡시말의 환원에 이은 말레이미드 함유 링커에의 접합을 위한 일반적 방법 (실시예 1-4)

[0653] 세록시맵 (4.7 mg/mL)을 6% 0.5 M 트리스-Cl, 0.025 M EDTA, pH 8.5로 보충하고, 1.1 eq TCEP:mAb (평균 LAR=2) 또는 4.2 TCEP:mAb (평균 LAR=5)와 함께 실온에서 각각 90분 및 120분 동안 인큐베이션하였다.

[0654] 환원 정도를 분석하기 위해, 환원된 샘플의 분취물을 몰 과량의 대용물 페이로드 Mal-vc-PAB-MMAE와 접합시켜 DAR을 결정하였다 (HIC 분석 사용).

[0655] 환원된 샘플에 8 eq의 링커-말레이미드를 첨가하고, 반응물을 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, N-아세틸 시스테인 (10 mM 수용액)을 30분 동안 첨가하여 반응물을 켄칭하였다. 샘플을 G25 수지를 사용하여 PBS로 정제하고, 나머지 미결합 링커를 비바스핀6(Vivaspin6) 장치를 사용한 10 DIA 부피의 막 투석여과에 의해 제거하였다.

[0656] 실시예 1



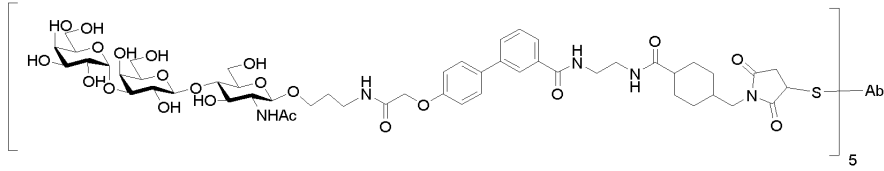
[0657]

[0658] 평균 LAR: 2; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 2

[0659] % 단량체 [SEC]: 98.8% (도 3 참조)

[0660] 전구체: 제조예 1

[0661] 실시예 2



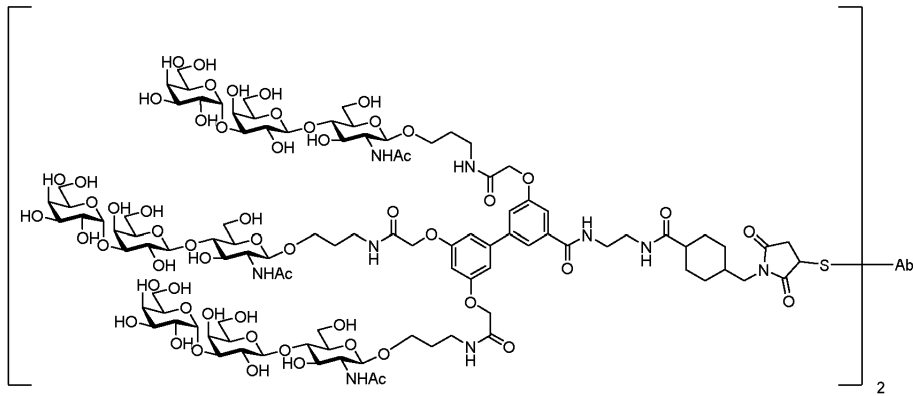
[0662]

[0663] 평균 LAR: 5; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 5

[0664] % 단량체 [SEC]: 99.4% (도 3 참조)

[0665] 전구체: 제조예 1

[0666] 실시예 3



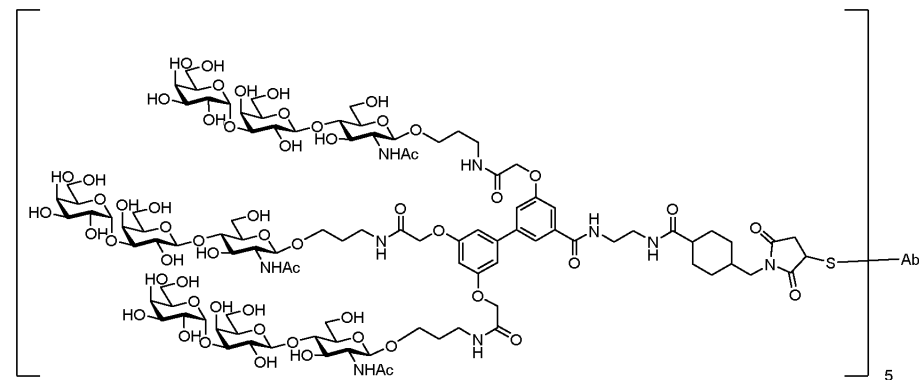
[0667]

[0668] 평균 LAR: 2; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 6

[0669] % 단량체 [SEC]: 99.5% (도 3 참조)

[0670] 전구체: 제조예 2

[0671] 실시예 4



[0672]

[0673] 평균 LAR: 5; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 15

[0674] % 단량체 [SEC]: 99.0% (도 3 참조)

[0675] 전구체: 제조예 2

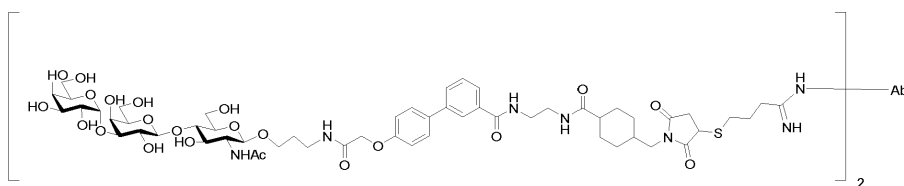
[0676] 세록시맵 리신과 티올의 상호전환 후 말레이미드-함유 링커의 접합을 위한 일반적 방법 (실시예 5-8)

[0677] 세록시맵 (4.7 mg/mL)을 단백질 A 수지 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 하이트랩 맵셀렉트 슈어 1mL)에 결합시킨 다음, 칼럼을 50mM KPI, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5로 세척하고, mAb를 4CV 0.1M 글리신 pH 3으로 용리시켰다. 표적 단백질을 함유하는 용리된 분획 (UV280 흡광도에 의해 폴링)을 20% 1.76M HEPES, pH 10.8로 보충하였다. 이어서 세록시맵을 12.2 eq 2-이미노티올란:mAb (낮은 LAR 샘플의 경우) 또는 30.5 eq 2-이미노티올란:mAb (높은 LAR 샘플의 경우)와 함께 120분 동안 23℃에서 인큐베이션하였다.

[0678] 샘플의 분취물을 5mM His, 50mM 트레할로스 pH 6.0 중에서 완충제 교환하고, 물 과량의 대용물 페이로드 Mal-vc-PAB-MMAE와 접합시켜 DAR을 결정하였다. 나머지 티올화 혼합물을 NAP25 완충제 교환을 통해 5mM His, 50mM 트레할로스, pH 6.0 내로 컨칭한 후 커플링시켰다. 4 eq 링커-말레이미드:최종 5% DMA를 포함하는 티올을 사용하여 23℃에서 120분 동안 링커-말레이미드 접합을 수행하였다. 인큐베이션 시, 샘플을 G25 수지를 통해 PBS 내로 완충제 교환하였다. 과량의 링커를 10DV 막 투석여과 (비바스핀6)를 통해 제거하였다.

[0679] 유리 티올의 양은 엘만 검정을 사용하여 실험 전반에 걸쳐 모니터링할 수 있다.

[0680] 실시예 5



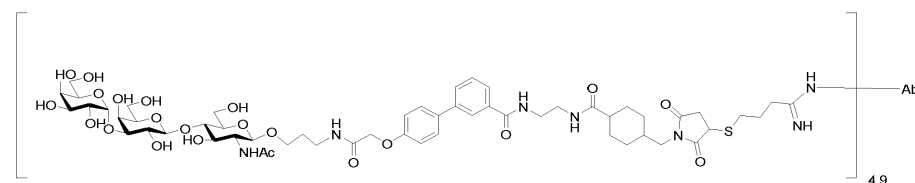
[0681]

[0682] 평균 LAR: 2; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 2

[0683] % 단량체 [SEC]: 95.0% (도 3 참조)

[0684] 전구체: 제조예 1

[0685] 실시예 6



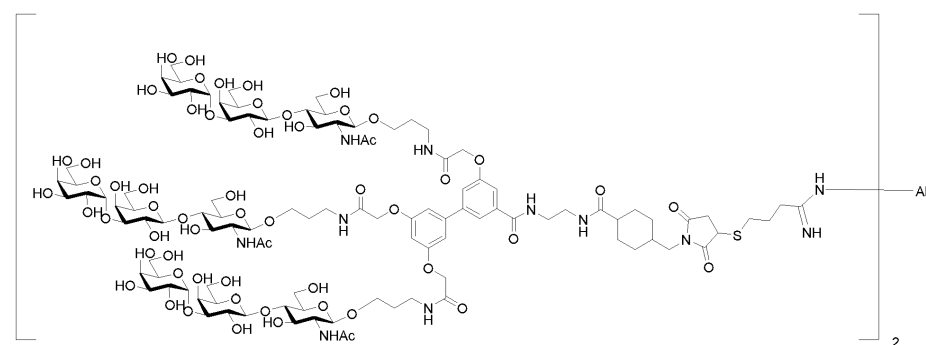
[0686]

[0687] 평균 LAR: 4.9; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 4.9

[0688] % 단량체 [SEC]: 90.3% (도 3 참조)

[0689] 전구체: 제조예 1

[0690] 실시예 7



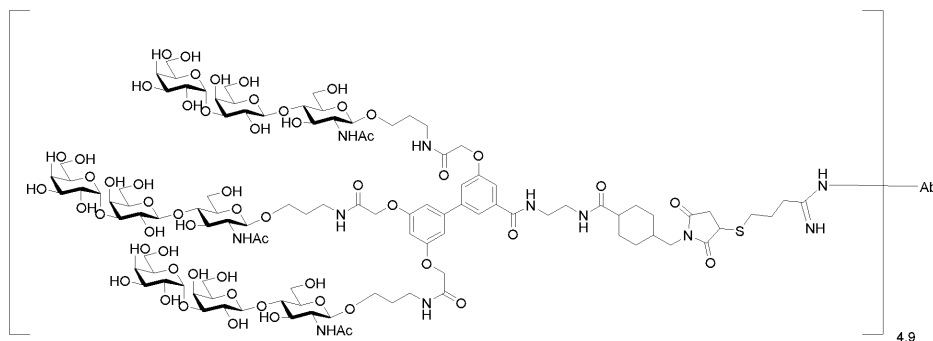
[0691]

[0692] 평균 LAR: 2; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 6

[0693] % 단량체 [SEC]: 90.4% (도 3 참조)

[0694] 전구체: 제조예 2

[0695] 실시예 8



[0696]

[0697] 평균 LAR: 4.9; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 14.7

[0698] % 단량체 [SEC]: 80.8% (도 3 참조)

[0699] 전구체: 제조예 2

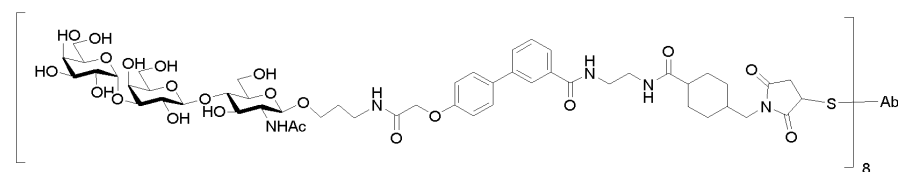
[0700] 평균 LAR=8을 수득하기 위한 세톡시마의 환원에 이은 말레이미드-함유 링커에의 접합을 위한 일반적 방법 (실시예 9-11)

[0701] 세특시맵 (4.7 mg/mL)을 6% 0.5 M 트리스-C1, 0.025 M EDTA (pH 8.5)로 대략 pH=7.5로 보충하고, 8 eq TCEP:mAb와 함께 실온에서 90분 동안 인큐베이션하였다.

[0702] 환원 정도를 분석하기 위해, 환원된 샘플의 분취물을 물 과량의 대용물 페이로드 Mal-vc-PAB-MMAE와 접합시켜 DAR을 결정하였다 (HIC 분석 사용).

[0703] 환원된 샘플에 16 또는 32 eq의 링커-말레이미드를 첨가하고, 반응물을 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, N-아세틸 시스테인 (10 mM 수용액)을 30분 동안 첨가하여 반응물을 켄칭하고, 샘플을 G25 수지를 사용하여 PBS로 정제하고, 나머지 미결합 링커를 비바스핀6 30 kDa PES 장치를 사용한 10 DIA 부피의 막 투과여과에 의해 제거하였다.

[0704] 실시예 9



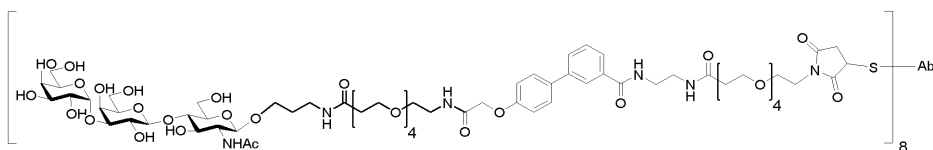
[0705]

[0706] 평균 LAR: 8; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 8

[0707] SEC 분석: Rt = 15.3분, 98.3% 단량체 함량

[0708] 전구체: 제조예 1

[0709] 실시예 10



[0710]

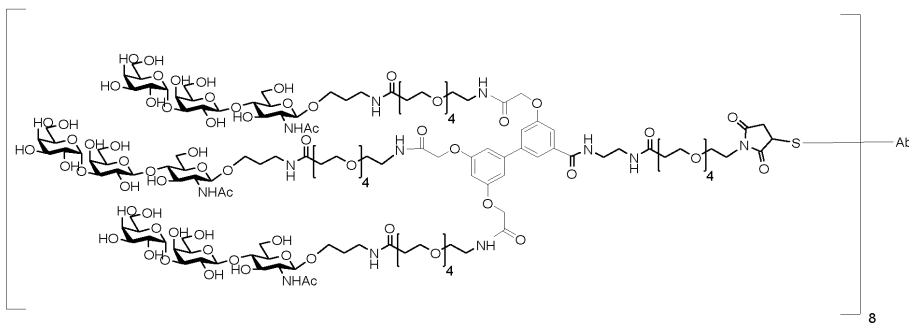
[0711] 평균 LAR: 8; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 8

[0712] SEC 분석: Rt = 14.8분, 98.5% 단량체 함량



[0713] 전구체: 제조예 20

[0714] 실시예 11



[0715]

[0716] 평균 LAR: 8; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 8

[0717] SEC 분석:  $R_t = 14.1$ 분, 97.0% 단량체 함량

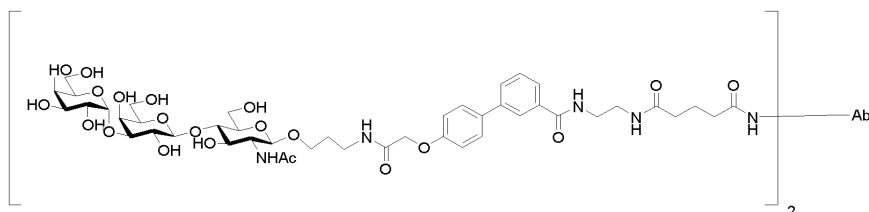
[0718] 전구체: 제조예 21

[0719] 세특시막의 N-히드록시숙신이미드 함유 링커에의 직접 리신 접합을 위한 일반적 방법 (실시예 12-16)

[0720] 세특시막 (20 mg)을 단백질 A 수지 (지이 헬스케어, 하이트랩 맵셀렉트 슈어, 1 mL)에 결합시키고, 칼럼을 50 mM KPi, 50 mM NaCl 및 2 mM EDTA, pH=8의 용액으로 세척하였다. 항체를 100 mM 시트레이트 완충제, pH=3으로 용리시키고, 리신 접합 완충제 (50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH=8)로 대략 6 mg/mL까지의 농도로 완충제 교환하였다. 용액을 SEC에 의해 분석하여 리신 접합에 적합한 용액 중 세특시막을 수득하였다 (18.2 mg, 91% 수율, 6.4 mg/mL, 100% 단량체 함량).

[0721] 상기 세특시막의 용액을 5, 10, 15, 20 또는 38 몰 당량의 제조예 22와, 6% v/v DMF 공용매와 함께 2시간 동안 30°C에서 인큐베이션하였다. 글리신을 1 mM로 첨가하여 반응물을 쉐킹하고, 접합체를 PBS로 완충제 교환하고, 투석여과하여 과량의 링커를 제거하였다.

[0722] 실시예 12



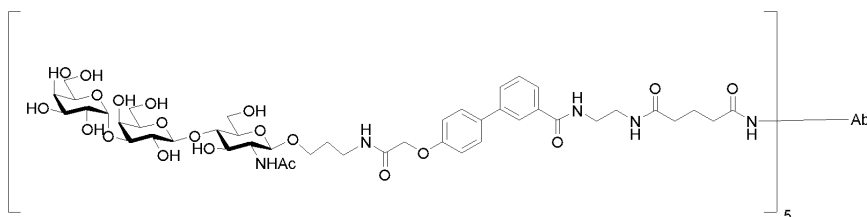
[0723]

[0724] 평균 LAR: 2; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 2

[0725] SEC 분석:  $R_t = 15.0$ 분. 단량체 함량은 결정되지 않음.

[0726] 전구체: 제조예 22 (5 eq)

[0727] 실시예 13



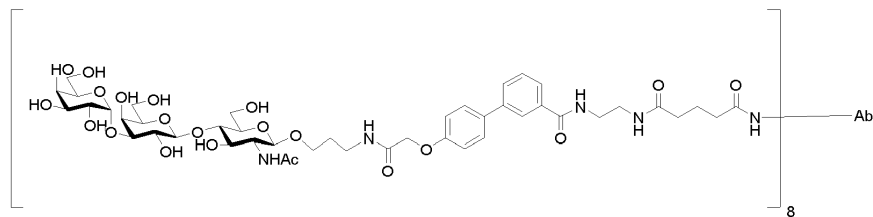
[0728]

[0729] 평균 LAR: 5; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 5

[0730] SEC 분석:  $R_t = 14.9$ 분. 단량체 함량은 결정되지 않음.

[0731] 전구체: 제조예 22 (10 eq)

[0732] 실시예 14



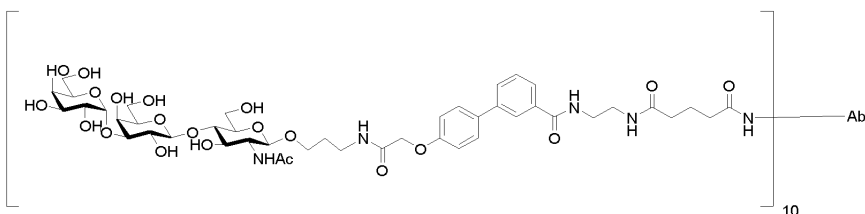
[0733]

[0734] 평균 LAR: 8; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 8

[0735] SEC 분석: Rt = 14.8분. 단량체 함량은 결정되지 않음.

[0736] 전구체: 제조예 22 (15 eq)

[0737] 실시예 15



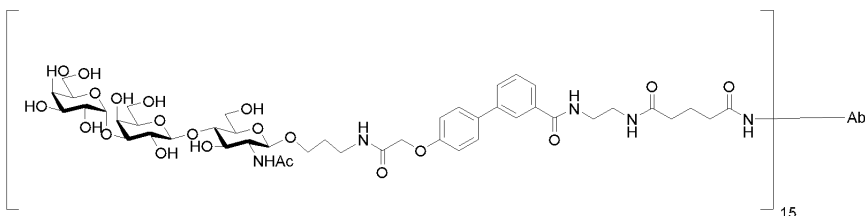
[0738]

[0739] 평균 LAR: 10; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 10

[0740] SEC 분석: Rt = 14.7분. 단량체 함량은 결정되지 않음.

[0741] 전구체: 제조예 22 (20 eq)

[0742] 실시예 16



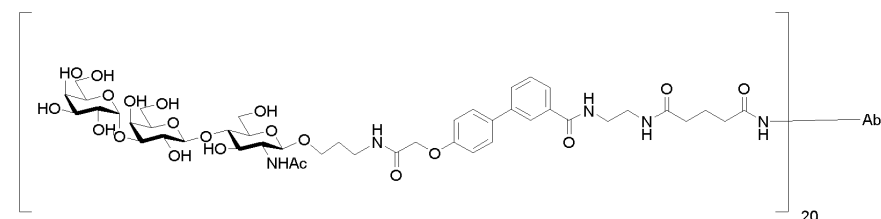
[0743]

[0744] 평균 LAR: 15; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 15

[0745] SEC 분석: Rt = 14.2분, 94.3% 단량체 함량

[0746] 전구체: 제조예 22 (38 eq)

[0747] 실시예 17



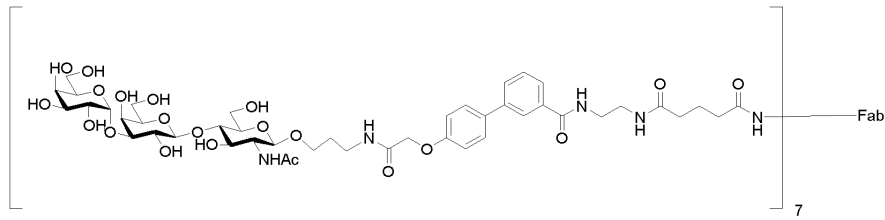
[0748]

[0749] 실시예 17을 일반적 방법 3에 따라 60 당량의 제조예 22 (10% v/v DMF 포함)를 사용하여 2시간 동안, 이어서 추가의 40 당량의 제조예 22 (4% v/v DMF 포함)를 사용하여 2시간 동안 제조하였다.



30 및 40 당량) 및 제조예 23 (20 당량)과 함께 9% v/v DMF 공용매와 함께 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 글리신을 1 mM 농도로 첨가하여 반응물을 켄칭하고, 접합체를 PBS로 완충제 교환하고, 투석여과하여 과량의 링커를 제거하였다.

[0770] 실시예 20



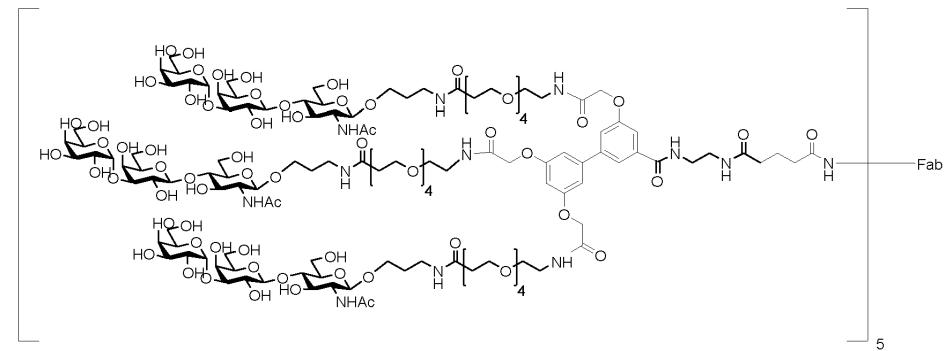
[0771]

[0772] 평균 LAR: 7; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 7

[0773] SEC 분석: Rt = 18.0분, 99% 단량체 함량

[0774] 전구체: 제조예 22 (15 eq)

[0775] 실시예 21



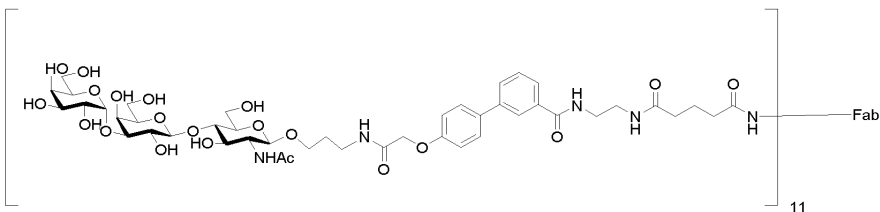
[0776]

[0777] 평균 LAR: 5; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 15

[0778] SEC 분석: Rt = 17.4분, 99% 단량체 함량

[0779] 전구체: 제조예 23 (20 eq)

[0780] 실시예 22



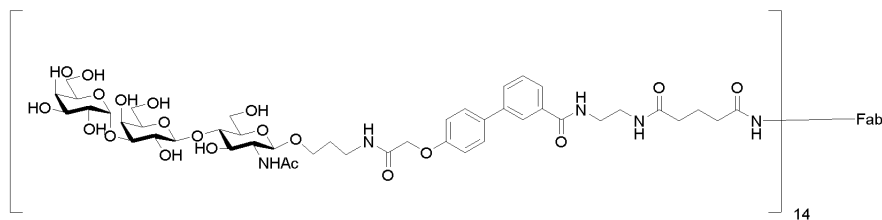
[0781]

[0782] 평균 LAR: 11; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 11

[0783] SEC 분석: Rt = 17.3분, 96.9% 단량체 함량

[0784] 전구체: 제조예 22 (30 eq)

[0785] 실시예 23



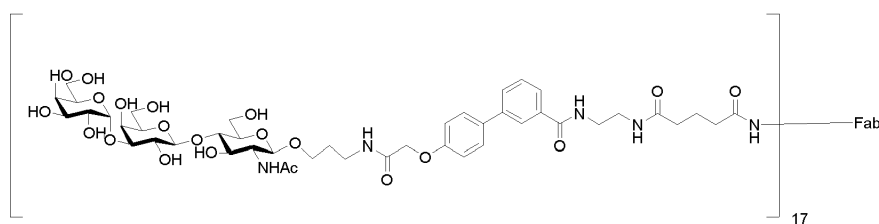
[0786]

[0787] 평균 LAR: 14; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 14

[0788] SEC 분석: Rt = 17.1분, 95.7% 단량체 함량

[0789] 전구체: 제조예 22 (40 eq)

[0790] 실시예 24



[0791]

[0792] 실시예 24를 일반적 방법 4에 따라 60 당량의 제조예 22 (20% v/v DMF 포함)를 사용하여 2시간 동안, 이어서 추가의 40 당량의 제조예 22 (4% v/v DMF 포함)를 사용하여 2시간 동안 제조하였다.

[0793] 평균 LAR: 17; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 17

[0794] SEC 분석: Rt = 15.9분, 90.2% 단량체 함량

[0795] 전구체 : 제조예 22 (60+40 eq)

[0796] 항체 접합체 (리툽시맵)

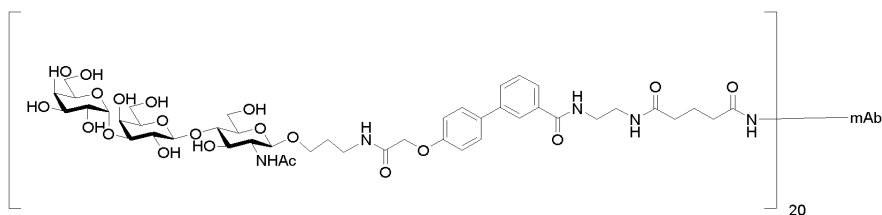
[0797] 시트르산나트륨 탈수화물 (7.35 mg/mL) 염화나트륨 (9 mg/mL) 및 물을 함유하는 폴리소르베이트 80 (0.7 mg/mL) 중에 제제화된 리툽시맵 (로슈-리툽산(Roche-Rituxan), 로트 번호: B6105B92UI).

[0798] 리툽시맵의 N-히드록시숙신이미드 함유 링커에의 직접 리신 접합을 위한 일반적 방법 (실시예 25)

[0799] 리툽시맵을 500 mM 포스페이트 완충제 (50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH=8)를 사용하여 pH=7.9로 pH 조정하였다.

[0800] 상기 리툽시맵 용액을 40 몰 당량의 제조예 22와, 10% v/v DMF 공용매와 함께 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션 한 후, 40 몰 당량의 제조예 22 (4% v/v DMF 포함)를 제2 첨가하였다. 글리신을 1 mM로 첨가하여 반응물을 켄칭하고, 접합체를 PBS로 완충제 교환하고, 투석여과하여 과량의 링커를 제거하였다.

[0801] 실시예 25



[0802]

[0803] 평균 LAR: 20; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 20

[0804] SEC 분석: Rt = 14.4분, 98.5% 단량체 함량

[0805] 전구체: 제조예 22

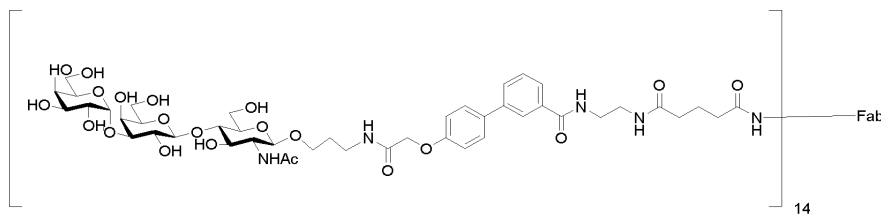
[0806] Fab 단편 접합체 (리톡시맵)

[0807] 리톡시맵의 리톡시맵-Fab로의 소화

[0808] 리톡시맵 (60 mg, 4.7 mg/mL)을 소화 완충제 (20 mM NaPi, 20 mM 시스테인, 10 mM EDTA, pH=7) 내로 완충제 교환하고, 20 mg/mL로 농축시켰다. 고정된 파파인 (w/w 1/160, 썬도 피셔 # 20341, 로딩: 250 ug/mL 수지, 활성: 16-40 BAEE/mg 파파인)을 소화 완충제 중에 평형화하고, 농축된 리톡시맵과 함께 37°C에서 5-18시간 동안 인큐베이션하였다. 소화 생성물을 여과에 의해 수집하고, 단백질 A 칼럼을 통해 용리시켰다. 비-결합 Fab 단편을 칼럼을 통해 통과시키고, 통과물을 수집하였다. Fab 단편을 비바스핀 원심분리 (10 kDa MWCO 필터)를 통한 50 mM NaPi, 150 mM NaCl 및 2 mM EDTA, pH=8로의 불연속 투석여과에 적용하였다. 달성된 최종 농도는 11.7 mg/mL였다.

[0809] 상기 리톡시맵-Fab 용액을 40 몰 당량의 제조예 22와, 25% v/v DMF 공용매와 함께 30°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 40 몰 당량의 제조예 22 (9% v/v DMF 포함)를 제2 첨가하였다. 글리신을 1 mM로 첨가하여 반응물을 켄칭하고, 접합체를 PBS로 완충제 교환하고, 투석여과하여 과량의 링커를 제거하였다.

[0810] 실시예 26



[0811]

[0812] 평균 LAR: 14; 평균 알파-Gal 단위의 총수: 14

[0813] SEC 분석: Rt = 16.9분, 87.5% 단량체 함량

[0814] 전구체: 제조예 22

[0815] 알파-갈락토실 IgM 항체를 사용한 유동 세포측정 검증

[0816] 유동 세포측정법을 사용하여, 인간 세포주 상의 수용체 및 F (인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자로서)에 대한 L (세톡시맵으로서)의 결합을 입증하였다. A431 세포가 EGFR 수용체를 유의하게 과다 발현하는 것으로 널리 공지되어 있기 때문에, EGFR 결합 mAb (세톡시맵)를 포획하기 위해 이를 사용하였다. 2 차 피코에리트린 (PE) 표지된 항-인간 IgM 항체를 사용하여 화합물에 대한 알파-갈락토실 IgM 항체의 결합을 검출하였다.

[0817] A431 세포 (ATCC CRL-1555)를 수거하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) (시그마 D8662) + 0.1 % BSA (소 혈청 알부민 - 시그마 A2153) 중에  $5 \times 10^6$  개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서,  $5 \times 10^5$  개 세포를 하기 기재된 바와 같은 다양한 농도의 화합물 또는 완충제 단독과 함께 실온에서, 450 rpm에서 1시간 동안 진탕시키면서 인큐베이션하였다.

[0818] 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA로 세척한 후, PBS + 0.1% BSA 중의  $32 \mu\text{g/mL}$ 의 항-알파 갈락토실 IgM 항체 (절대 항체 Ab00532-15.0)  $50 \mu\text{L}$ 를 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 추가로  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA로 세척한 후,  $100 \mu\text{L}$ 의 항-인간 IgM-PE (바이오레전드 314508)의 1:40 희석물로 4°C에서 1시간 동안 처리하였다.  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA의 최종 세척 후, 세포를  $200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정기 (FC500 베크만 쿨터(Beckman Coulter)) 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 데이터를 칼루자(Kaluzza) 소프트웨어 패키지 (베크만 쿨터)에서 분석하였다.

[0819] 도 4는 10nM의 실시예 1 (도 4A), 실시예 2 (도 4B), 실시예 3 (도 4C), 실시예 4 (도 4D), 실시예 5 (도 4E), 실시예 6 (도 4F), 실시예 7 (도 4G) 및 실시예 8 (도 4H)을 사용한, 세포 표면의 항-알파 갈락토실 IgM 항체의 포획을 입증한다. 형광 강도 (PE)에서의 이동은 분자의 각각의 말단에서의 결합 사건으로 인해 발생한다.

[0820] 알파-갈락토실 IgG 항체를 사용한 유동 세포측정 검증

- [0821] 유동 세포측정법을 사용하여, 인간 세포주 상의 수용체 및 F (인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자로서)에 대한 L (세탁시맙으로서)의 결합을 입증하였다. A431 세포가 EGFR 수용체를 유의하게 과다 발현하는 것으로 널리 공지되어 있기 때문에, EGFR 결합 mAb (세탁시맙)을 포획하기 위해 이를 사용하였다. 피코에리트린 (PE) 표지된 알파-갈락토실 IgG 항체를 사용하여 화합물의 결합을 검출하였다.
- [0822] A431 세포 (ATCC CRL-1555)를 수거하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) (시그마 D8662) + 0.1 % BSA (소 혈청 알부민 - 시그마 A2153) 중에  $5 \times 10^6$  개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서,  $5 \times 10^5$  개 세포를 10nM의 화합물, 완충제 단독 또는 10nM 세탁시맙과 함께 실온에서, 450 rpm에서 1시간 동안 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA로 세척한 후, PBS + 0.1 % BSA 중의 575  $\mu\text{g/mL}$ 의 PE 표지된 항-알파 갈락토실 IgG 항체 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항-알파 갈락토실 IgG 항체 (절대 항체 Ab00532.10.0)는 캄브리지 리서치 바이오케미칼스(Cambridge Research Biochemicals)에 의해 PE로 맞춤 표지되었다.  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA의 최종 세척 후, 세포를  $200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정기 (FC500 베크만 쿨터) 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 데이터를 칼루자 소프트웨어 패키지 (베크만 쿨터)에서 분석하였다.
- [0823] 도 5는 완충제 단독과 비교하여, 10nM의 실시예 1 (도 5A), 실시예 2 (도 5B), 실시예 3 (도 5C) 및 실시예 4 (도 5D)를 사용한, 세포 표면의 항-알파 갈락토실 IgG 항체의 포획을 입증한다. 형광 강도 (PE)에서의 이동은 분자의 각각의 말단에서의 결합 사건으로 인해 발생한다.
- [0824] 도 6은 10nM 세탁시맙과 비교하여, 10nM의 실시예 5 (도 6A), 실시예 6 (도 6B), 실시예 7 (도 6C) 및 실시예 8 (도 6D)을 사용한, 세포 표면의 항-알파 갈락토실 IgG 항체의 포획을 입증한다. 형광 강도 (PE)에서의 이동은 분자의 각각의 말단에서의 결합 사건으로 인해 발생한다.
- [0825] hIVIG 및 A431 세포로부터 알파-갈락토실 IgG 항체를 사용한 유동 세포측정 검정
- [0826] 유동 세포측정법을 사용하여, 인간 세포주 (A431) 상에서 발현된 EGFR 및 F (인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자로서)에 대한 L (Fab 단편으로서)의 결합을 입증하였다. 2차 피코에리트린 (PE) 표지된 항-인간 IgG 항체를 사용하여 화합물에 대한 알파-갈락토실 IgG 항체의 결합을 검출하였다.
- [0827] A431 세포 (ATCC CRL-1555)를 수거하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) (시그마 D8662) + 0.1 % BSA (소 혈청 알부민 - 시그마 A2153) 중에  $5 \times 10^6$  개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서,  $5 \times 10^5$  개 세포를 최대 1000 nM까지의 소정 범위의 화합물 농도, 완충제 단독 또는 1000 nM 미접합 Fab 단편과 함께 실온에서, 450 rpm에서 1시간 동안 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA로 세척한 후, PBS + 0.1% BSA 중의 hIVIG 항-Gal IgG (70  $\mu\text{g/ml}$ ) (인간 IVIG로부터 맞춤 정제) 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0828] 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA로 세척한 후, 2차 항-IgG-PE (클론 HP6017, 바이오레전드 409393) 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 세포를 4°C에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다.
- [0829]  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA의 최종 세척 후, 세포를  $200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정기 (FC500 베크만 쿨터) 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 데이터를 칼루자 소프트웨어 패키지 (버전 1.5a, 베크만 쿨터)에서 분석하였다.
- [0830] 도 7은 최소 동원이 관찰된 미접합 Fab 단편과 비교하여 실시예 18-23의 경우 hIVIG로부터의 항-Gal IgG 항체의 A431 세포로의 용량 관련 화합물 구동된 동원을 입증한다.
- [0831] 알파-갈락토실 IgM 항체 및 A431 세포를 사용한 유동 세포측정 검정
- [0832] 화합물을 세탁시맙 및/또는 미접합 Fab 단편과 비교하여, 상기 유동 세포측정 검정 프로토콜에 따라 최대 1000 nM의 범위의 농도에서 시험하였다.
- [0833] 도 8은 미접합 Fab 단편 및/또는 세탁시맙과 비교하여, 알파-갈락토실 IgM 항체의 A431 세포로의 용량 관련 화합물 구동된 동원을 입증한다.
- [0834] C3b 항체를 사용한 유동 세포측정 검정
- [0835] 유동 세포측정법을 사용하여 관심 세포주에 대한 화합물의 결합 및 C3b 보체 성분의 세포로의 동원을 입증하였다.

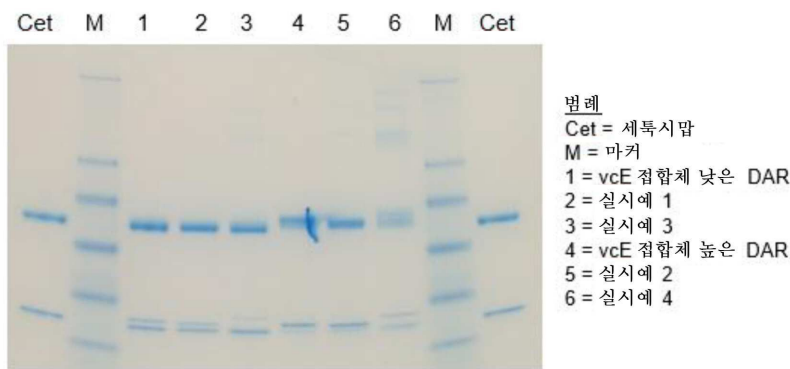


- [0836] A431 세포가 EGFR 수용체를 유의하게 과다발현하는 것으로 널리 공지되어 있기 때문에, EGFR 결합 항체 또는 항체 단편을 포획하기 위해 이를 사용하였다.
- [0837] 피코에리트린 (PE)에 접합된 항-C3b 항체를 사용하여, 다양한 농도의 화합물의 첨가 후 C3b 분자의 혈청으로부터 세포로의 동원을 검출하였다.
- [0838] A431 세포 (ATCC CRL-1555)를 수거하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) (시그마 D8662) + 0.1 % BSA (소 혈청 알부민 - 시그마 A2153) 중에  $5 \times 10^6$  개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서,  $5 \times 10^5$  개 세포를 최대 10000 ng/ml까지의 소정 범위의 화합물 농도, 완충제 단독 또는 다양한 농도의 세톡시맵 Fab 단편 및/또는 세톡시맵과 함께 실온에서, 450 rpm에서 1시간 동안 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA로 세척한 후,  $100 \mu\text{L}$  PBS 및  $100 \mu\text{L}$  20% 인간 혈청 (HS) (파트리셀(Patricell) 23590) 또는 열 불활성화 인간 혈청 (HIHS)을  $25 \mu\text{g/ml}$  M86 IgM (절대 항체)과 함께 첨가하고 37°C에서 25분 동안 인큐베이션하였다.
- [0839] 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA로 세척한 후,  $100 \mu\text{L}$ 의 항-C3b-PE (3E7/C3b, 바이오레전드 846104)를 첨가하였다. 세포를 4°C에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다.  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA의 최종 세척 후, 세포를  $200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정기 (FC500 베크만 쿨터) 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 데이터를 칼루자 소프트웨어 패키지 (버전 1.5a, 베크만 쿨터)에서 분석하였다.
- [0840] 도 9는 세톡시맵 Fab 단편 및/또는 세톡시맵과 비교하여, 다양한 농도의 실시예 13-17, 20, 22, 23 및 24에 의한 A431 세포 상에서의 C3b 침착의 수준을 입증한다. 열 불활성화 인간 혈청을 사용한 경우 모든 실시예에 대해 배경에 비해 <5배 이동이 관찰되었다 (대표적인 HI HS 데이터를 여기에 제시함).
- [0841] 대식세포에 의한 표적 세포의 식세포작용
- [0842] 식세포작용을 사용하여, 세포주 상의 수용체 및 F (인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자로서)에 대한 L (세톡시맵의 Fab 단편으로서)의 결합의 기능적 효과를 입증하였다. EGFR을 발현하는 것으로 보고된 A431 세포를 표적 세포로서 사용하였다. 단핵구 유래 대식세포를 이펙터 세포로서 사용하였다. 정제된 hIVIG를 항-Gal 항체의 공급원으로 사용하였다. 통합 강도에서의 측정된 증가는 표적 세포의 식세포작용으로 인해 발생한다. 대조군 조건 하 (세포 단독 또는 미접합 Fab 단편의 존재 하)에서는 이러한 증가가 관찰되지 않았다. 이펙터 세포를 96-웰-플레이트 (코닝 3603)에서 계내 분화시켰다. 간략하게, 백혈구제거 시스템 챔버 내에 보유된 각각의 건강한 공여자로부터의 혈액을 국가 건강 서비스 (영국 캠브리지 소재의 애든브룩스 병원)로부터 구입하였다. 제조업체의 지침에 따라 림포프렙(Lymphoprep)<sup>TM</sup> 시스템을 사용하여 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다 (스텝셀 테크놀로지스(STEMCELL Technologies) 07861). 단핵구를 이지셉(EasySep)<sup>TM</sup> 인간 CD14 양성 선택 키트 II (스텝셀 테크놀로지스 17858)를 사용하여 양성 선택에 의해 PBMC로부터 분리하고, 재조합 인간 GM-CSF (페프로테크(Peprotech) 300-03)가 보충된 이뮤노컬트(ImmunoCult)<sup>TM</sup>-SF 대식세포 배지 (스텝셀 테크놀로지스 10961)에  $100 \text{ ng/ml}$ 로 재현탁시키고, 세포 배양 인큐베이터 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 20,000개 세포/웰로 플레이트팅하였다. 분화 5일 후, 대식세포를 추가로 2일 동안  $100 \text{ ng/ml}$  IFN- $\gamma$  (페프로테크 300-02) 및  $1 \text{ ng/ml}$  리포폴리사카라이드 (인비트로젠(Invitrogen) tlrl-eblps)를 사용하여 M1 표현형으로 분극화하였다. A431 세포 (ATCC CRL-1555)를 10% 태아 소 혈청 (김코(Gibco)® 10500-064)으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (김코® 61965-026)에서 배양하고, 표적 세포로서 사용하였다. 표적 세포를 세포 해리 완충제 (김코® 13151014)를 사용하여 수거하고, 카운팅하고,  $1.0 \times 10^6$  개 세포당  $1 \mu\text{l}$ 의 10 mM 프로도 그린(pHrodo Green) STP 에스테르 (써모 피셔 사이언티픽 P35369)를 사용하여 37°C에서 30분 동안 표지하였다. 세포를 완전 배지에서 세척하고, 카운팅한 다음, 소정 범위의 농도의 실시예 23, 실시예 20 또는 세톡시맵-Fab로 RT에서 1시간 동안 진탕시키면서 처리하였다. 이어서, 세포를 배지 무함유 배지에서 세척하고,  $70 \mu\text{g/ml}$  hIVIG (인간 IVIG로부터의 맞춤 정제)와 함께 병상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 돌베코 포스페이트 용액 (김코® 14190-094)에서 세척하고, 인큐사이트(Incucyte)® (사르토리우스(Sartorius))에서 37°C에서 최대 12시간 동안 이펙터 세포 (표적:이펙터 비 5:1)와 함께 공동-배양하였다. 영상을 2시간마다 획득하였다. 데이터를 인큐사이트®줌 소프트웨어 (버전 2016A, 사르토리우스)를 사용하여 분석하였다. 그래프를 그래프패드 프리즘 (버전 6)으로 생성하였다.
- [0843] 도 10: 미접합 Fab 단편과 비교하여 1 nM 실시예 20 및 실시예 23의 존재 하에서의 대표적인 화합물 매개 식세포작용을 입증한다. 표적 세포 (EGFR 발현 A431 세포)는 이펙터 세포 (대식세포)에 의해 포식되었다. 통합 강도에서의 증가는 표적 세포의 화합물 구동 식세포작용으로 인해 발생한다.

- [0844] Raji 세포에 대한 알파-갈락토실 IgM 항체를 사용한 유동 세포측정 검정
- [0845] 유동 세포측정법을 사용하여, 인간 세포주 상의 수용체 및 F (인간 항-알파-갈락토실 항체에 결합할 수 있는 탄수화물 분자로서)에 대한 L (리톡시맵 또는 리톡시맵 Fab로서)의 결합을 입증하였다. Raji 세포가 CD20 수용체를 유의하게 과다발현하는 것으로 널리 공지되어 있기 때문에, CD20 결합 mAb 또는 Fab를 포획하기 위해 이를 사용하였다. 2차 피코에리트린 (PE) 표지된 항-인간 IgM 항체를 사용하여 화합물에 대한 알파-갈락토실 IgM 항체의 결합을 검출하였다.
- [0846] Raji 세포 (ATCC® CCL-86™)를 수거하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) (김코® 14190-094) + 0.1% BSA (소 혈청 알부민 - 시그마 A2153) 중  $5 \times 10^6$  개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서,  $5 \times 10^5$  개 세포를 하기 기재된 바와 같은 다양한 농도의 화합물 또는 완충제 단독과 함께 실온에서, 450 rpm에서 1시간 동안 진탕시키면서 인큐베이션하였다.
- [0847] 세포를  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA로 세척한 후, PBS + 0.1% BSA 중의  $32 \mu\text{g/mL}$ 의 항-알파 갈락토실 IgM 항체 (절대 항체 Ab00532-15.0)  $50 \mu\text{L}$ 를 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 추가로  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA로 세척한 후,  $100 \mu\text{L}$ 의 항-인간 IgM-PE (바이오레전드 314508)의 1:40 희석물로 4℃에서 1시간 동안 처리하였다.  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1% BSA의 최종 세척 후, 세포를  $200 \mu\text{L}$  PBS + 0.1 % BSA 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정기 (BD FACSVerser™, BD) 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 데이터를 플로우조(FlowJo)®, LLC 소프트웨어 패키지에서 분석하였다. 그래프를 그래프패드 프리즘 (버전 6)으로 생성하였다.
- [0848] 도 11은 리톡시맵 및 그의 Fab 단편과 비교하여, 알파-갈락토실 IgM 항체의 Raji 세포로의 용량 관련 화합물 구동 동원을 입증한다.

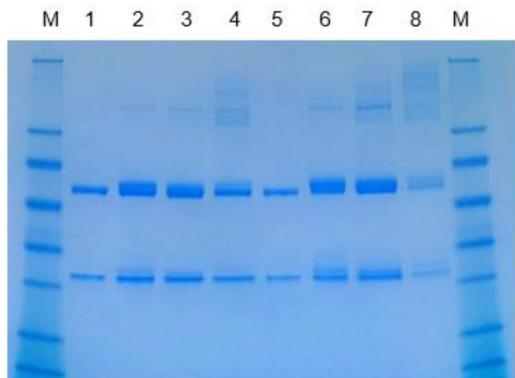
도면

도면1



실시예 1-4의 환원 SDS 페이지 분석

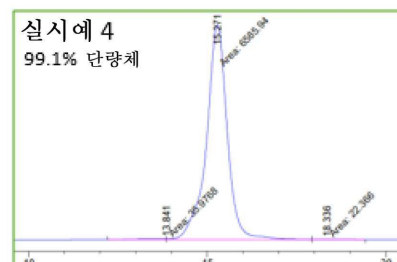
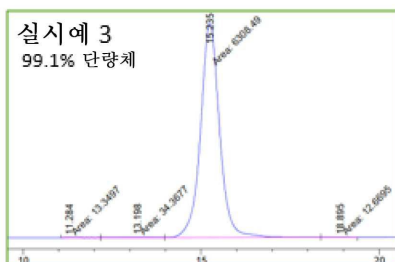
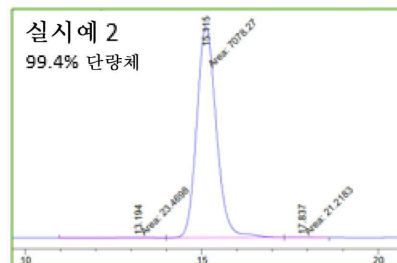
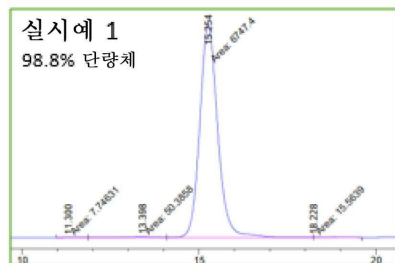
## 도면2



범례  
M = 마커  
1 = Lys과 SH의 상호전환 낮은 DAR  
2 = vcE 접합체 낮은 DAR  
3 = 실시예 5  
4 = 실시예 7  
5 = vcE 접합체 높은 DAR  
6 = 실시예 6  
7 = 실시예 8  
8 = Lys과 SH의 상호전환 높은 DAR

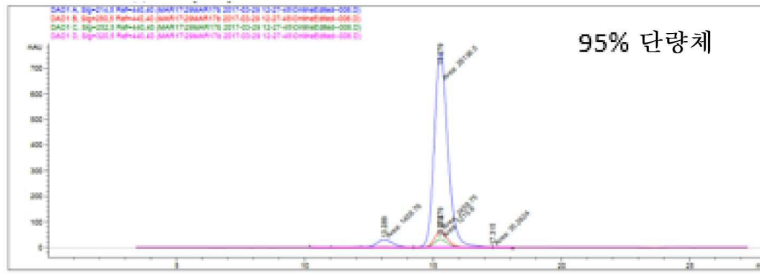
실시예 5-8의 환원 SDS 페이지 분석

## 도면3i

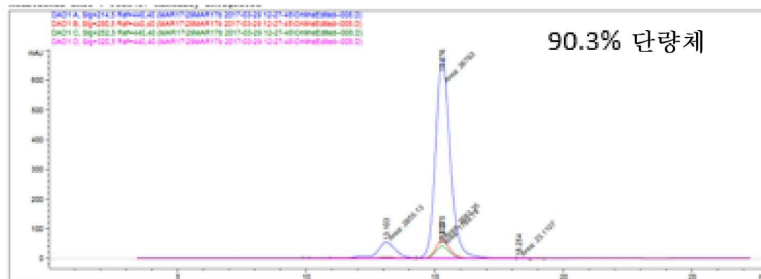


도면3ii

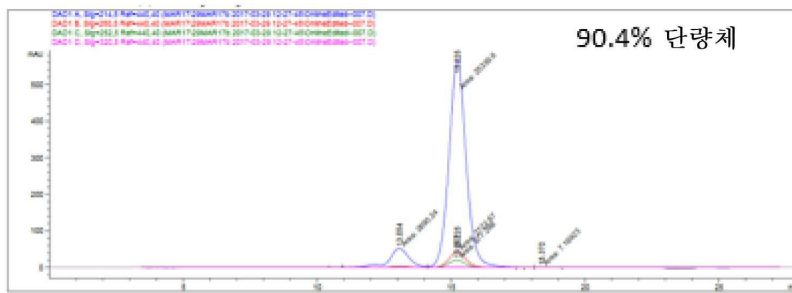
실시예 5



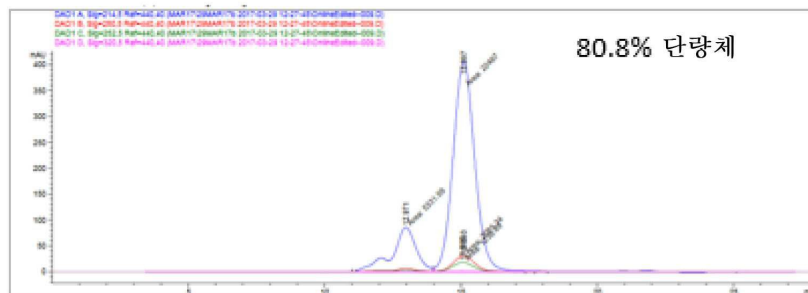
실시예 6



실시예 7

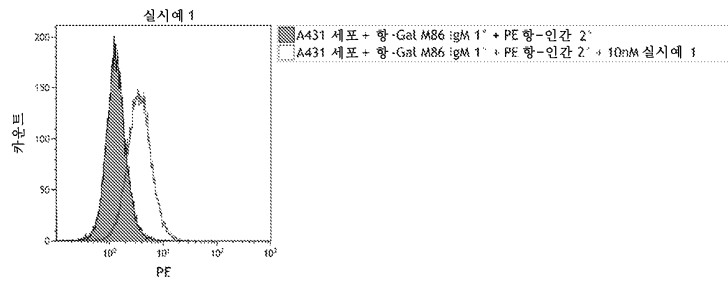


실시예 8

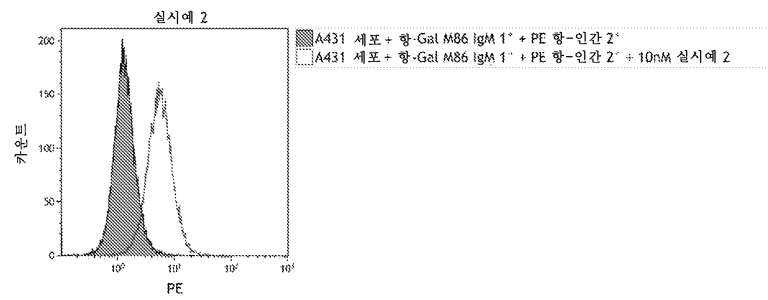


도면4i

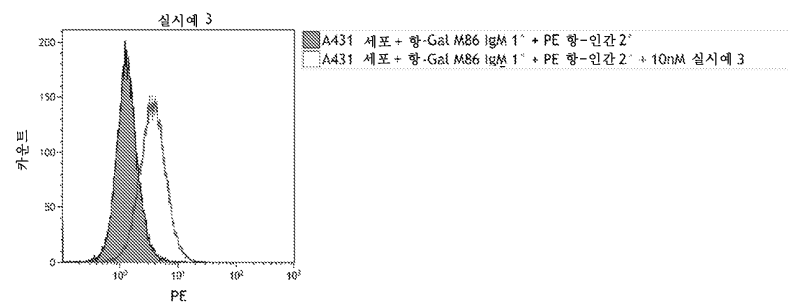
A



B

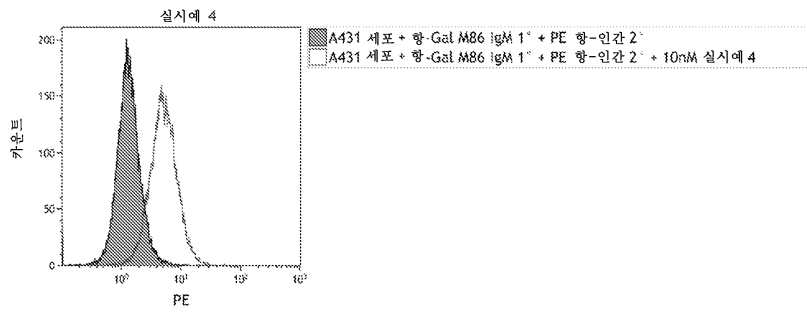


C

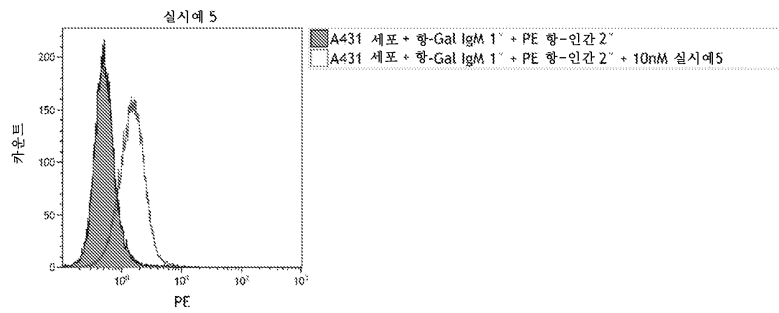


도면4ii

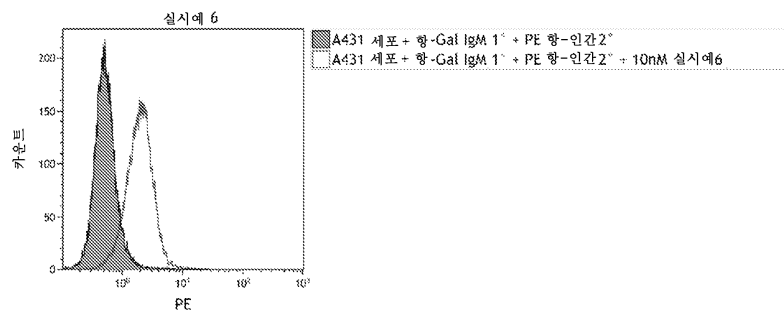
D



E

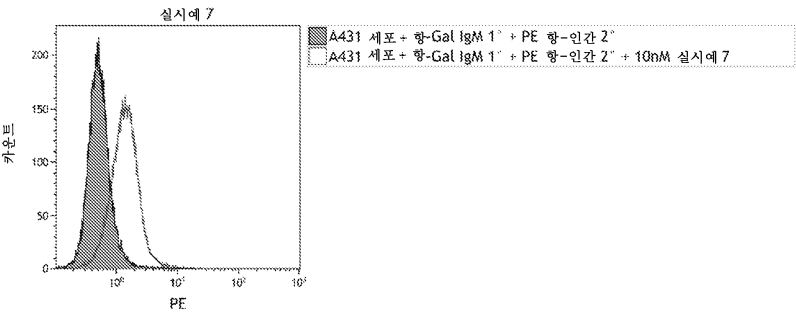


F

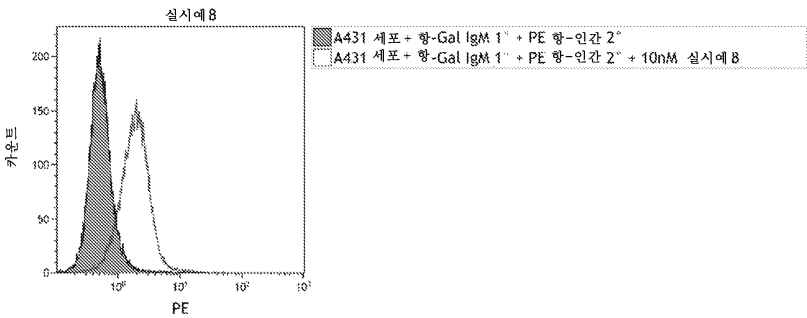


도면4iii

G



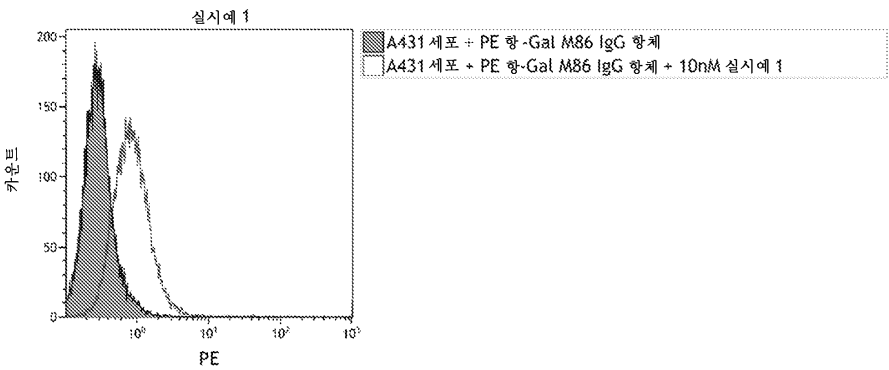
H



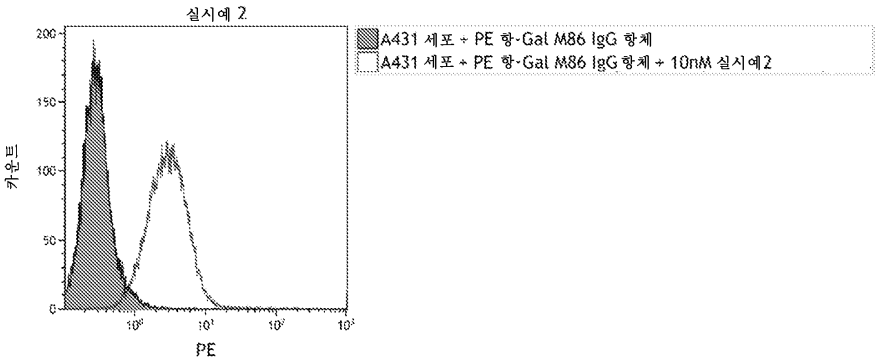


도면5i

A

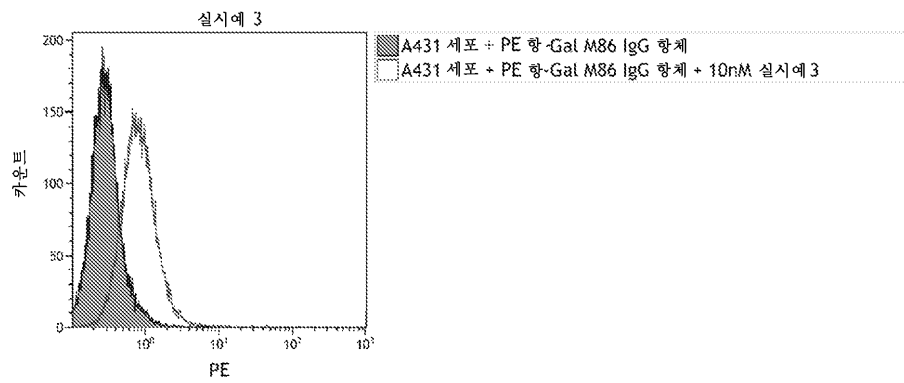


B

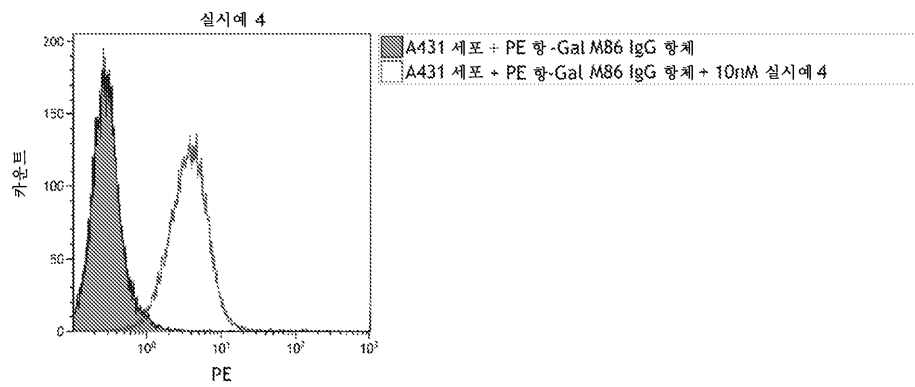


도면5ii

C

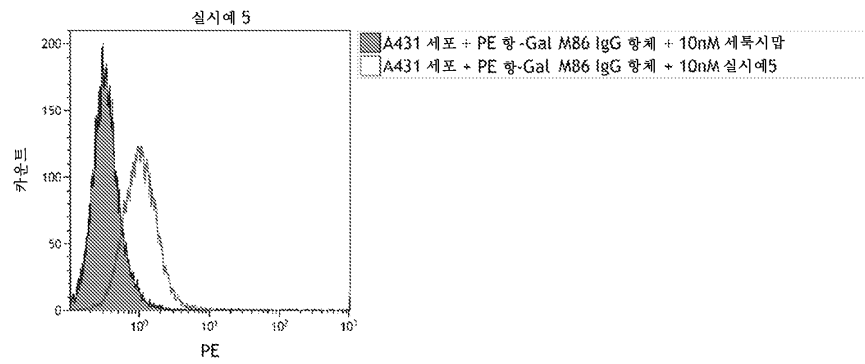


D

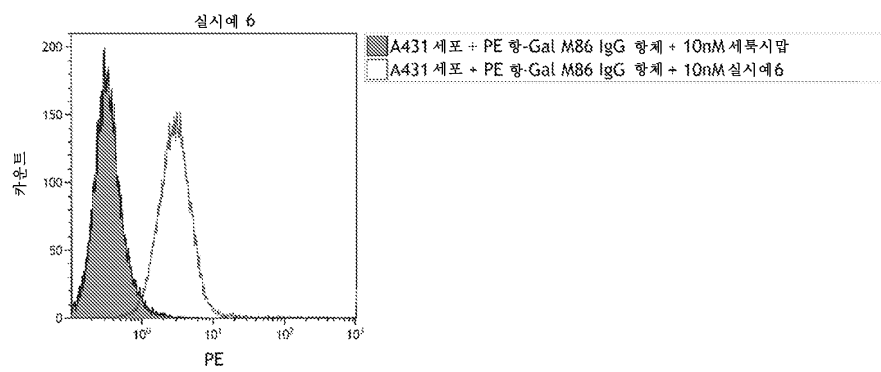


도면6i

A

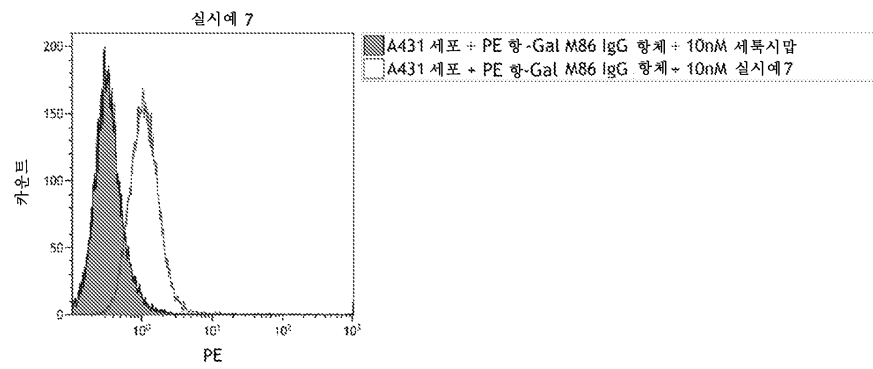


B

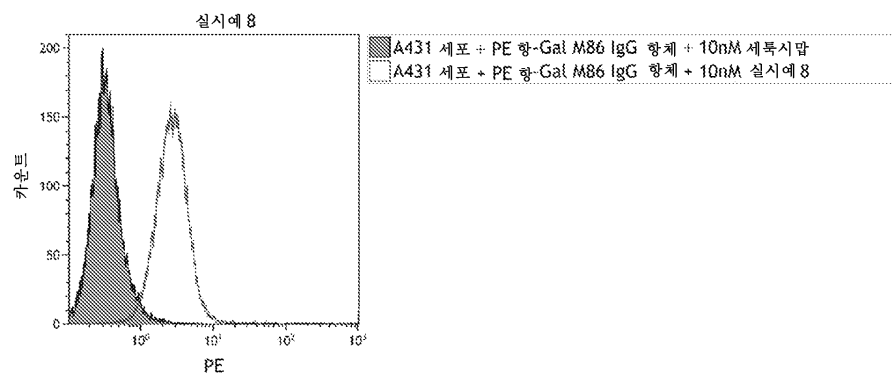


도면6ii

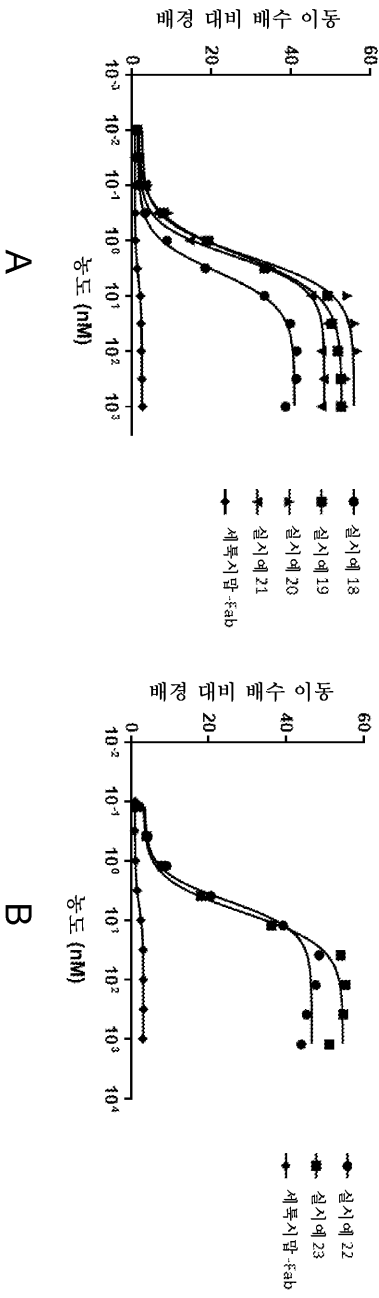
C



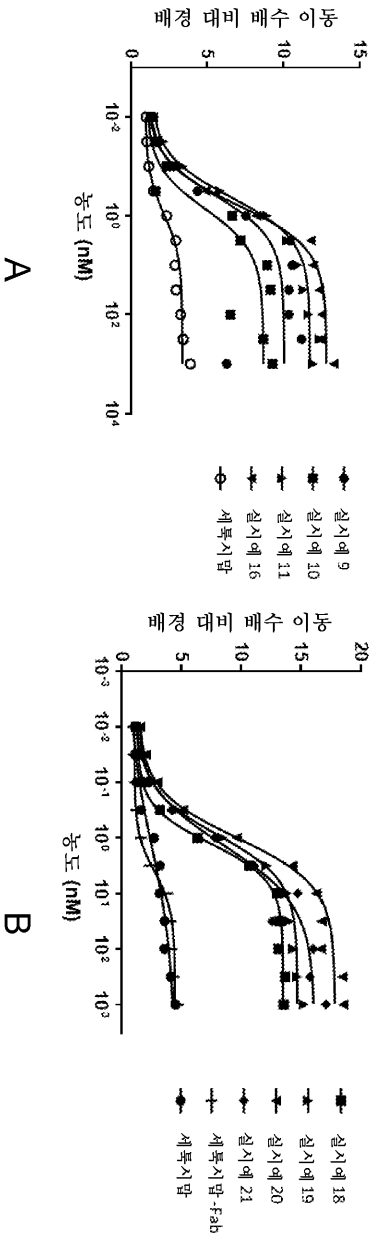
D



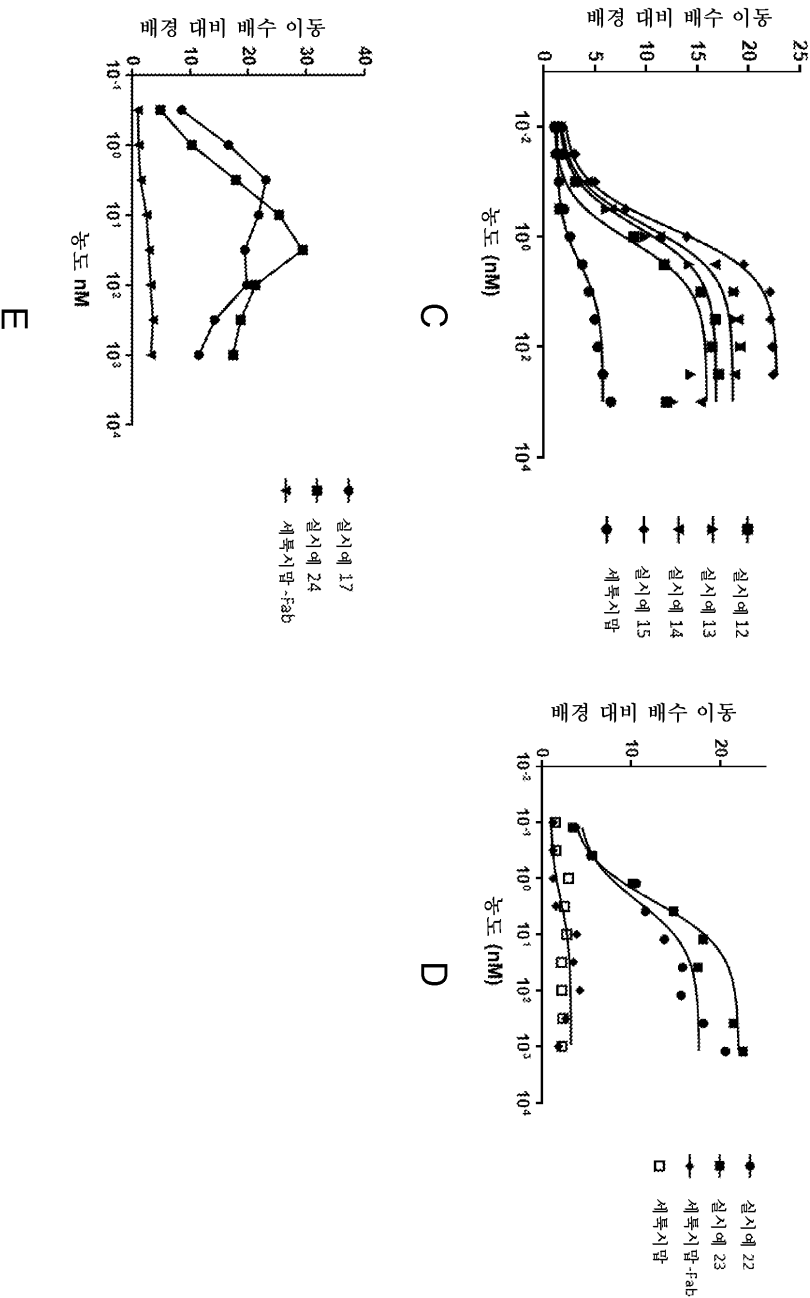
도면7



도면8i

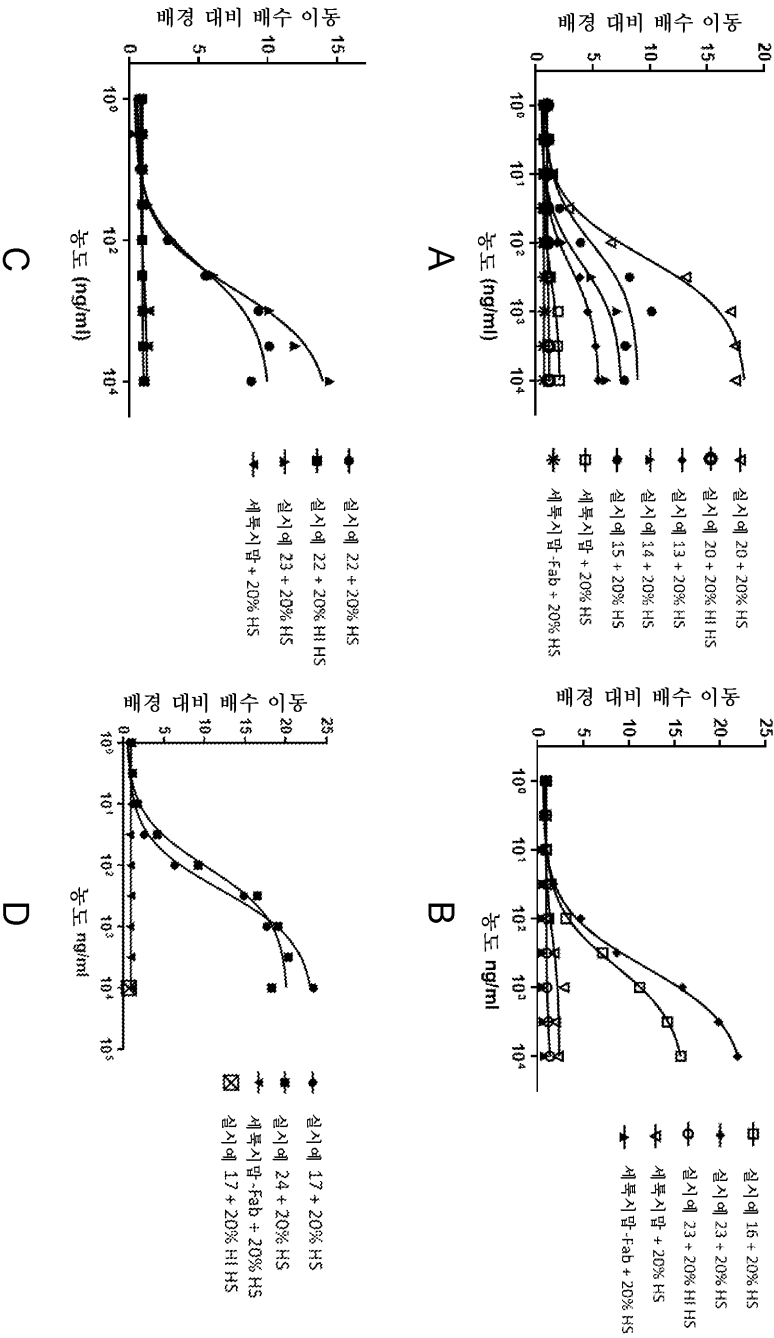


도면8ii

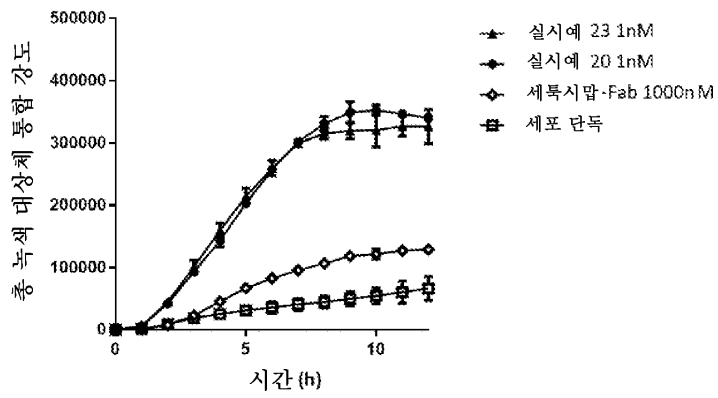




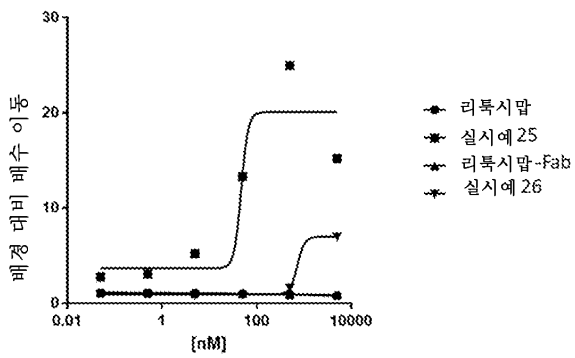
도면9



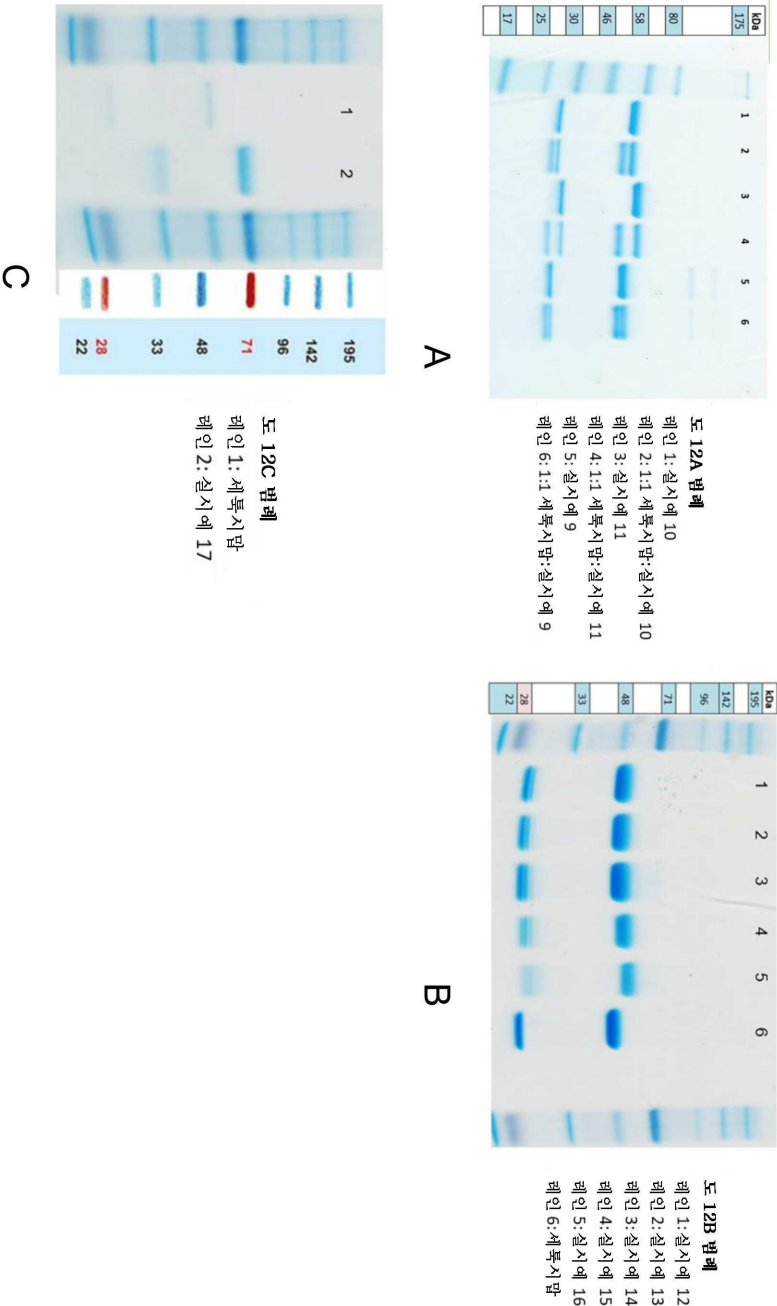
도면10

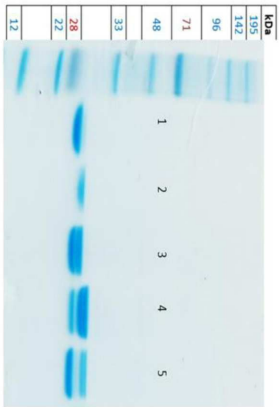


도면11

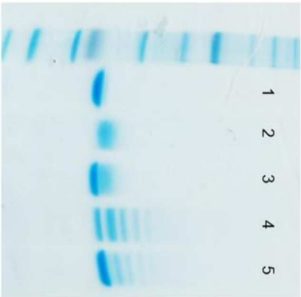


도면12

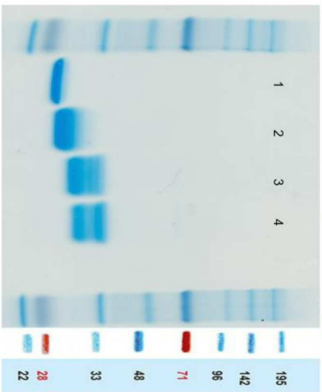




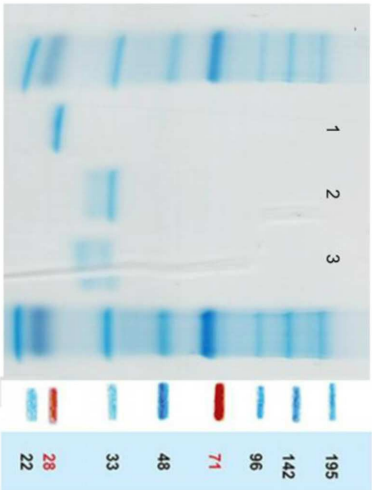
**도 13A 방법**  
레인 1: 세독시말-Fab  
레인 2: 실시에 18  
레인 3: 1:1 세독시말-Fab:실시에 18  
레인 4: 실시에 19  
레인 5: 1:1 세독시말-Fab:실시에 19



**도 13B 방법**  
레인 1: 세독시말-Fab  
레인 2: 실시에 20  
레인 3: 1:1 세독시말-Fab:실시에 20  
레인 4: 실시에 21  
레인 5: 1:1 세독시말-Fab:실시에 21

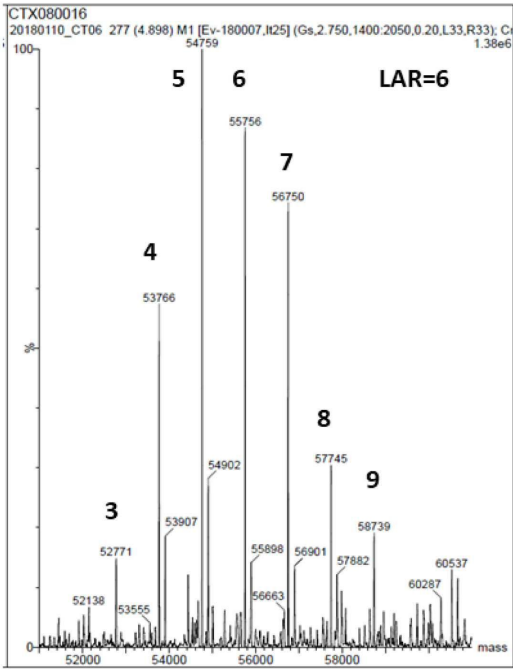


**도 13C 방법**  
레인 1: 세독시말-Fab  
레인 2: 실시에 20  
레인 3: 실시에 22  
레인 4: 실시에 23



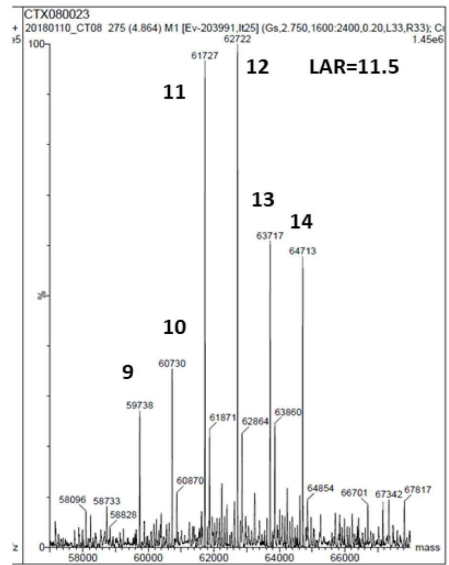
**도 13D 방법**  
레인 1: 세독시말-Fab  
레인 2: 실시에 24  
레인 3: 실시에 20

도면14i

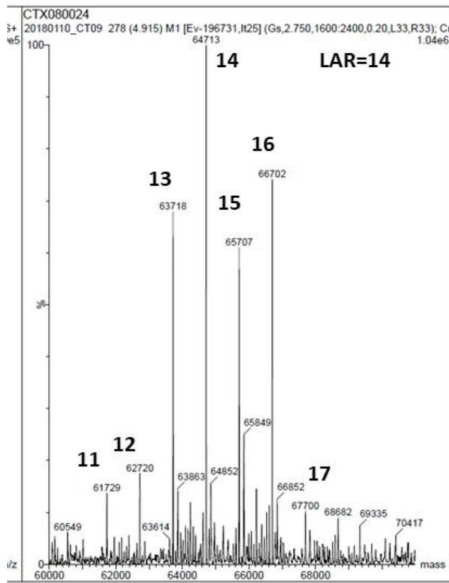


A

도면14ii

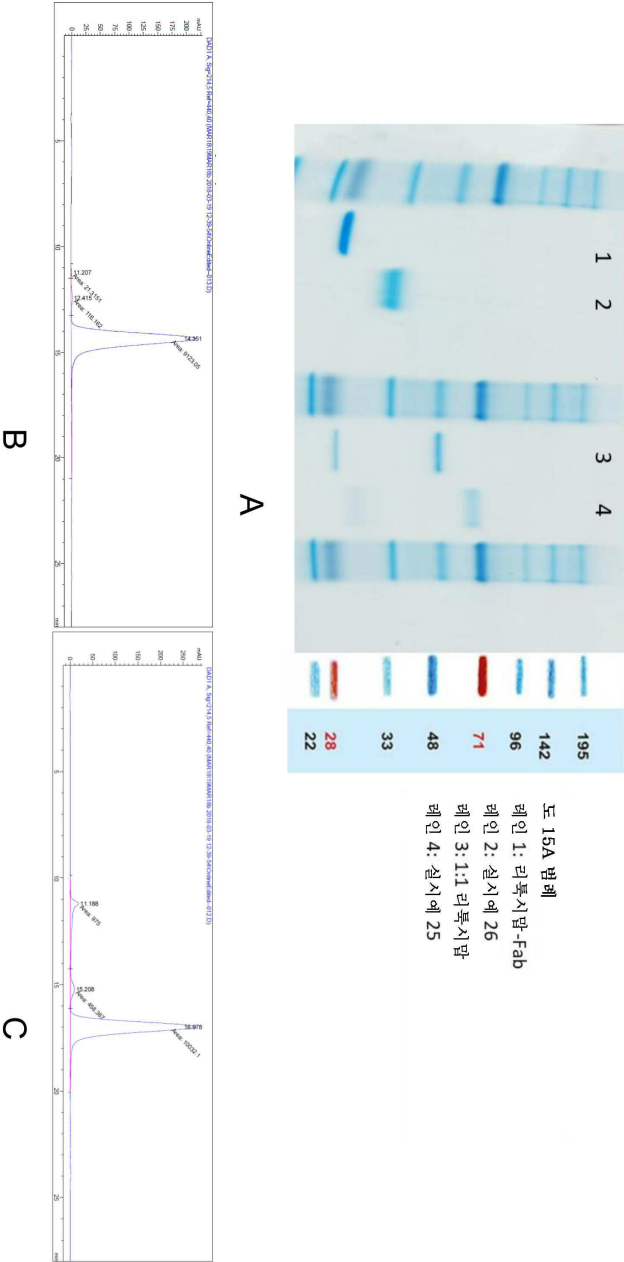


B



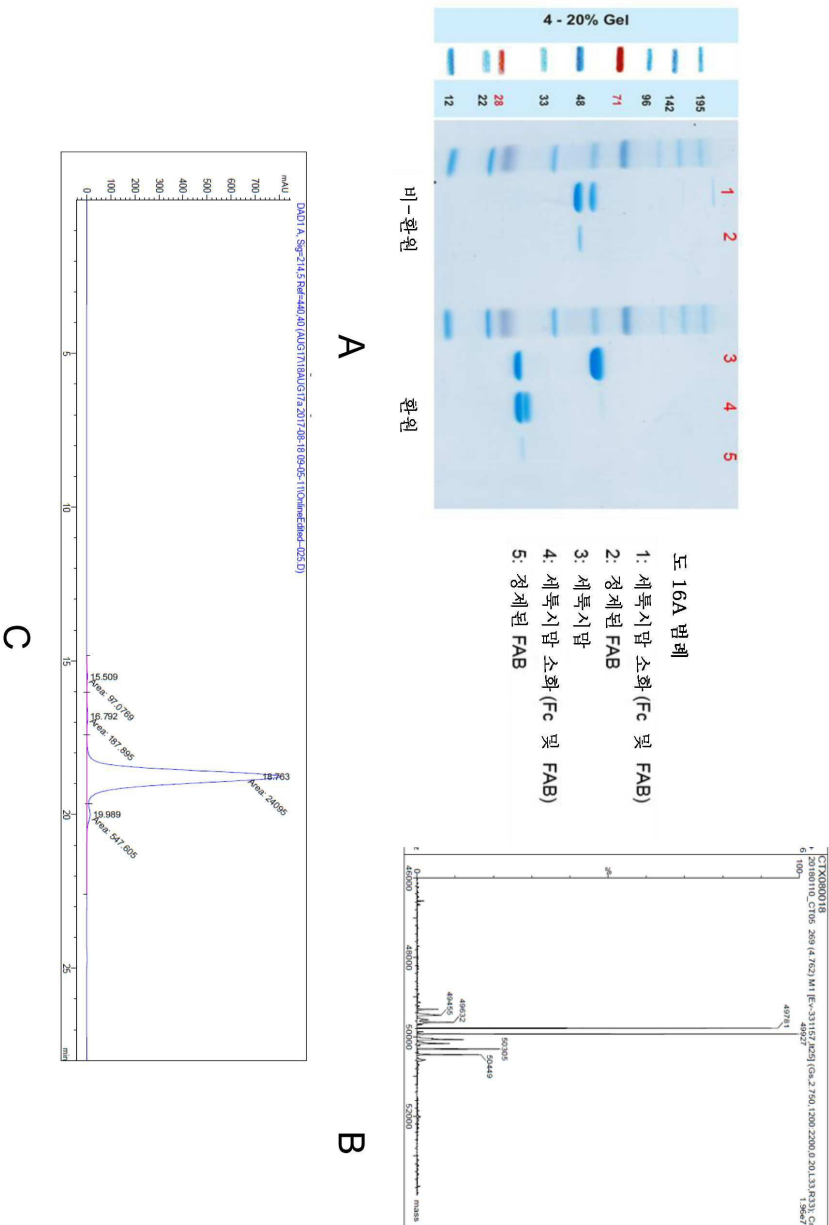
C

도면15





도면16





<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hybrid Mouse/Human

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Asp Glu Leu 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> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hybrid Mouse/Human

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 3

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hybrid Mouse/Human

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln 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 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala 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 Ala 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> 4

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hybrid Mouse/Human

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30  
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145                      150                      155                      160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
                                  165                      170                      175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
                                  180                      185                      190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
                                  195                      200                      205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210