



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0052960
(43) 공개일자 2022년04월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/56 (2017.01) A61K 38/05 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/56 (2017.08)
A61K 38/05 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7008957
(22) 출원일자(국제) 2020년08월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월17일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2020/050910
(87) 국제공개번호 WO 2021/035310
국제공개일자 2021년03월04일
- (30) 우선권주장
2019903152 2019년08월28일 오스트레일리아(AU)
- (71) 출원인
스타파마 피티와이 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스 2022
- (72) 발명자
오웬 데이빗
오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스 2022
체가에 새미
오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스 2022
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리엔목특허법인

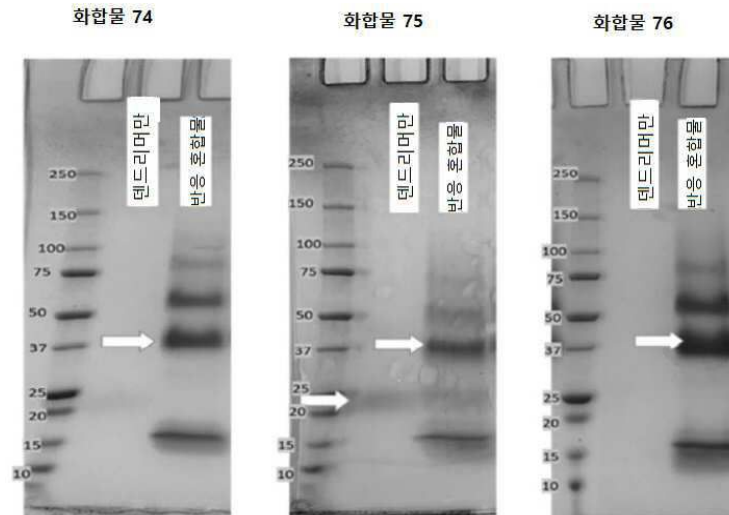
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 표적화된 덴드리머 접합체

(57) 요약

본원에는 코어 단위 및 라이신 또는 라이신 유사체 빌딩 단위를 포함하는 덴드리머, 분자량이 약 80kDa 이하이고 스페이서 그룹에 의해 공유적으로 연결된 항원-결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제, 및 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제를 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체(dendrimer-targeting agent conjugate)가 제공된다. 또한, 본원에는 상기 접합체를 포함하는 조성물, 및 특히 암을 치료하기 위한, 상기 접합체를 사용한 치료 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 47/6885 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

샌글레 수드히르

오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스
2022

레이타노 폴린

오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스
2022

포터 크리스토퍼

오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스
2022

존스턴 앵거스

오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스
2022

유엔 다니엘

오스트레일리아 빅토리아 3072 프레스톤 피오박스
2022

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체(dendrimer-targeting agent conjugate):

a) i) 코어 단위(C); 및

ii) 빌딩 단위(building unit, BU)를 포함하는 덴드리머로서, 각각의 빌딩 단위는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이고;

상기 코어 단위는 아미드 결합을 통해 적어도 2개의 빌딩 단위에 공유적으로 부착되고(covalently attached), 각각의 아미드 결합은 상기 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성되는 덴드리머;

b) 분자량이 약 80kDa 이하이고 스페이서 그룹에 의해 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된(covalently linked) 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제;

c) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제; 및

d) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 친수성 중합체성 그룹.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 중쇄 항체, Fab, Fv, scFv 또는 단일 도메인 항체로부터 선택되는 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 중쇄 가변(V_H) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진 접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 경쇄 가변(V_L) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진 접합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 30kDa인 접합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 15kDa인 접합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 10kDa 내지 약 16kDa인 접합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화제는 120개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 접합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화제는 본원에 정의된 바와 같은 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하거나 이로 이루어진 접합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 표적화제가 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 접합체.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 초과와 표적화제가 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 접합체.

청구항 12

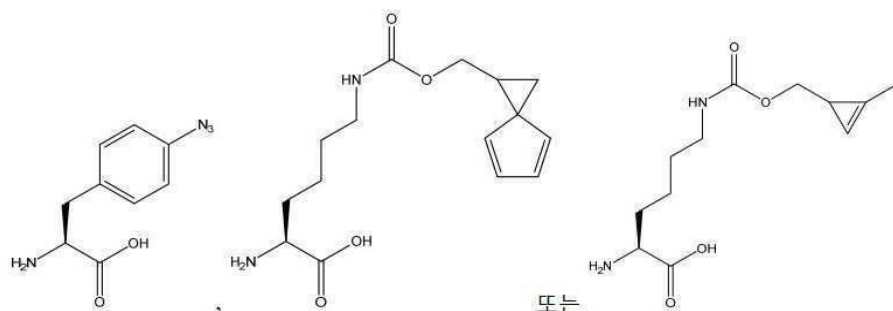
제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화제와 상기 스페이서 그룹 사이의 공유적 연결은 표적화제 전구체에 존재하는 상보적 반응성 작용기(functional group)와 스페이서 그룹 전구체 사이의 반응에 의해 형성된 것인 접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표적화제 전구체는 비천연 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 비천연 아미노산 잔기는 반응성 작용기를 포함하는 측쇄를 갖는 접합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 비천연 아미노산 잔기는



의 잔기인 접합체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화제는 상기 표적화제의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 공유적으로 연결된 접합체.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스페이서 그룹 전구체는 알킨 그룹인 반응성 작용기를 포함하는 접합체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 알킨 그룹은 디벤조사이클로옥틴 그룹인 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 화학요법제인 접합체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 세포독성제인 접합체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 초세포독성제(ultracytotoxic agent)인 접합체.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 치료제는 아우리스타틴(auristatin) 또는 메이탄시노이드(maytansinoid)인 접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 E인 접합체.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 F인 접합체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 링커를 통해 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 접합체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 절단 가능한 링커를 통해 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 접합체.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 절단 가능한 링커는 Val-Cit-PAB 그룹 또는 Val-Arg-PAB-P-트리거(Trigger) 그룹을 포함하는 접합체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친수성 중합체성 그룹은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸옥사졸린(PEOX) 또는 폴리사르코신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 PEG 그룹을 포함하는 접합체.

청구항 29

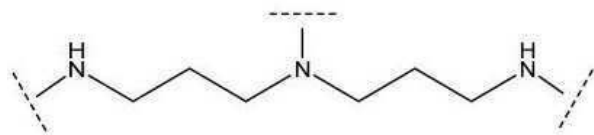
제28항에 있어서, 상기 PEG 그룹은 평균 분자량이 약 500 내지 약 2500g/mole 범위인 접합체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스페이서 그룹은 PEG 그룹을 포함하는 접합체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코어 단위는 다음 구조를 포함하는 접합체:



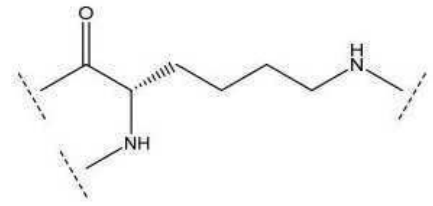
청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 덴드리머는 1세대 내지 5세대 빌딩 단위를 갖는 접합체.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 덴드리머는 3세대 빌딩 단위를 갖는 접합체.

청구항 34



제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빌딩 단위는 각각
 집합체. 인

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 추가 활성제와 조합하여 투여하기 위한 집합체.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집합체는 HER2 발현 세포 내에 내재화된 집합체.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 감소된 부작용을 초래하는 집합체.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 방출된 치료제의 최대 혈장 농도에서 적어도 50% 감소를 초래하는 집합체.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 복수의 집합체를 포함하는 조성물.

청구항 40

- i) 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 집합체; 및
- ii) 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 비경구 전달용으로 제형화된 조성물.

청구항 42

암 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 집합체 또는 제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 조성물.

청구항 43

암의 치료가 필요한 대상체에게 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 집합체 또는 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 44

암 치료용 약제의 제조에 있어서 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 집합체 또는 제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 난소암, 유방암, 위암, 자궁암 또는 ERBB2 유전자의 비정상적 발현을 특징으로 하는 다른 암인 방법, 용도, 집합체 또는 조성물.

청구항 46

HER2 발현 세포를 사멸시키는 방법으로서, 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 접합체를 HER2 발현 세포와 접촉시켜 상기 접합체가 상기 세포 내에 내재화되도록 함으로써 치료제가 상기 HER2 발현 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 HER2가 과발현되는 암을 표적화하는데 유용한 치료법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 개시내용은 HER2 항체 단편 또는 모방체(mimetic) 및 치료제 모이어티, 예컨대 초세포독성제(ultracytotoxic agent)의 잔기를 포함하는 덴드리머-표적화 모이어티 접합체(dendrimer-targeting moiety conjugate)에 의한 치료제 모이어티의 표적화된 전달에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] WHO에 따르면, 암은 전 세계적으로 두 번째로 큰 사망 원인으로 2018년에 약 960만 명이 사망한 것으로 추산된다. 가장 흔한 형태의 암은 폐암, 유방암, 결장직장암, 전립선암, 피부암 및 위암이다.

[0003] 효과적인 종양학 치료법을 개발하기 위한 많은 노력이 있었다. 그러나 우수한 안전성 프로파일과 함께 표적에서의 충분한 효능, 작용 부위에 전달될 수 있는 적절한 약동학적 특성 및 충분한 작용 지속 시간을 갖춘 새로운 치료법을 찾는 도전은 매우 어렵고 시간 소모적이고 비용이 많이 든다.

[0004] 트라스투주맙(trastuzumab)(Herceptin®) 및 리툽시맙(rituximab)(Mabthera®)과 같은 단일 클론 항체 치료법의 개발은 주목할만한 성공을 거둔 한 가지 유형의 접근 방식을 구성한다. 예를 들어, Herceptin®은 1998년에 승인되었으며 HER2-과발현 유방암 및 위암의 치료에 사용된다. 항체는 일부 형태의 암에서 과발현되는 HER2/ERBB2 수용체에 결합하고 암세포 성장을 자극하는 신호를 차단함으로써 작동한다. 그러나 Herceptin®에는 단점이 있다. 예를 들어, 알려진 부작용에는 심장 근육 손상 및 심부전이 포함된다. Herceptin®은 또한 암이 HER2 양성인 환자의 하위 집합에서도 완전히 효과적이지 않으며, 내성에 대한 몇 가지 메커니즘이 제안되었다(Pohlmann, Mayer 및 Mernaugh, 2009).

[0005] 대조되는 또 다른 치료법은 빠르게 분열하는 세포에 대해 활성인 세포독성제의 사용을 포함한다. 오래전부터 확립된 예가 시스플라틴(cisplatin)으로 난소암, 방광암, 고환암 및 편평세포암종(squamous cell carcinoma)을 포함한 다양한 암의 치료에 사용된다. 세포독성제의 추가 그룹은 모노메틸 아우리스타틴(monomethyl auristatin) E(MMAE)와 같은 아우리스타틴을 포함하는 초세포독성제로, 이는 매우 강력한 작용제이지만 동시에 일부 환자에게 심각한 독성과 유해한 부작용을 일으킬 수 있다. 결과적으로, 이러한 초세포독성제는 그 자체로 화학요법제로서 환자에게 안전하게 투여될 수 없다. 이러한 초세포독성제를 활용하는 수단을 확인하기 위한 연구가 수행되어 선형 링커를 통해 브렌톡시맙(brentuximab)(CD30 항체)에 결합된 MMAE를 함유하며 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma) 및 역형성 대세포 림프종(anaplastic large cell lymphoma)의 치료에 대해 승인된 브렌톡시맙 베도틴(brentuximab vedotin)(Adcetris®)과 같은 항체 약물 접합체의 개발로 이어졌다.

[0006] 많은 약물 후보가 낮은 치료 지수, 즉 독성에 대한 치료 효과의 비율로 인해 임상 시험에서 실패한다. 이러한 실패의 원인 중 일부는 효능 부족, 특이성 부족, 약물 흡수/생체이용률 불량, 생체분포 제어 불능, 빠른 대사 및 제거(clearance), 및 보관 불안정성을 포함한다. 실제로, 암 세포를 사멸시키는 데 필요한 치료적 세포독성을 달성하고 유해한 독성과 부작용을 환자가 견딜 수 있는 수준으로 완화하는 데 균형이 맞춰져 있다.

[0007] 차선의 특성이 있는 화합물의 치료 효능을 시도하고 개선하기 위해 다양한 접근법이 조사되었다. 예를 들어, 빠르게 제거되는 화합물의 경우 지속 방출형 제형이 개발될 수 있다. 화학요법 분야에서 그러한 예는 활성 성분 이리노테칸(irinotecan)의 리포솜 제형인 Onivyde® 제품으로, 기존 제형에 비해 혈장으로부터의 제거 속도가 크게 감소하였다(Messerer 등, 2004). 다른 기술에는 데포 주사 제제(예를 들어, Lupron Depot®)의 사용이 포함된다. 약제학적 활성제의 특성을 개선하고 제형의 어려움을 회피하기 위한 시도로 덴드리머 기술도 조사되었으며, 예를 들어, WO2012/167309는 특히 난용성 약제학적 작용제인 도세탁셀(docetaxel)을 함유하는 약물-덴드리머 접합체의 제공을 기술하고 있다.

[0008] 이들 및 당업계의 다른 진보에도 불구하고, 암과 같은 질환을 치료하는 데 안전하고 효과적인 추가 치료법을 개발할 필요가 남아 있다.

[0009] 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 자료, 장치, 물품 등에 대한 논의는 이러한 사안 중 일부 또는 전부가 선행 기

술 기반의 일부를 형성하거나 본 개시내용과 관련된 분야에서 통상의 일반 지식이었다는 것을 인정하는 것으로 간주되어서는 안된다.

발명의 내용

제1 측면에서, 다음을 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체가 제공된다:

a) i) 코어 단위(C); 및

ii) 빌딩 단위(building unit, BU)를 포함하는 덴드리머로서, 각각의 빌딩 단위는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이고;

상기 코어 단위는 아미드 결합을 통해 적어도 2개의 빌딩 단위에 공유적으로 부착되고(covalently attached), 각각의 아미드 결합은 상기 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성되는 텐드리머;

b) 분자량이 약 80kDa 이하이고 스페이스 그룹에 의해 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된(covalently linked) 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제;

c) 상기 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제; 및

d) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 친수성 중합체성 그룹.

일부 실시양태에서, 펩타이드 모이어티는 중쇄 항체, Fab, Fv, scFv 또는 단일 도메인 항체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 펩타이드 모이어티는 중쇄 가변(V_H) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 펩타이드 모이어티는 경쇄 가변(V_L) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진다.

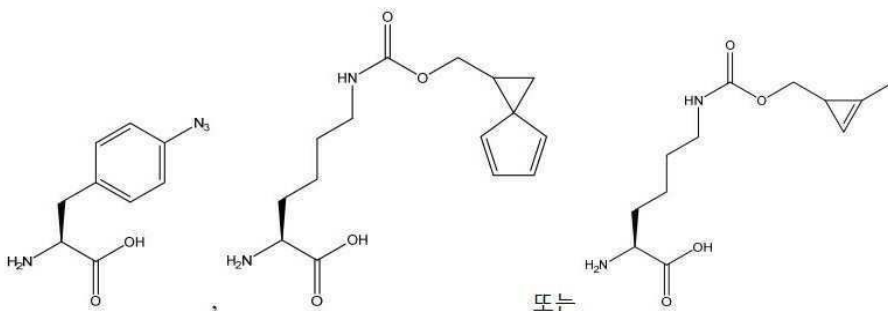
일부 실시양태에서, 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 30kDa이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 18kDa이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 15kDa이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 분자량이 약 10kDa 내지 약 16kDa이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 분자량이 약 14kDa 내지 약 18kDa이다.

일부 실시양태에서, 표적화제는 120개 미만의 아미노산 잔기를 포함한다.

일부 실시양태에서, 표적화제는 본원에 정의된 바와 같은 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하거나 이로 이루어진다.

일부 실시양태에서, 하나의 표적화제는 텐드리머에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 초과 표적화제는 텐드리머에 공유적으로 연결된다.

일부 실시양태에서, 표적화제 전구체는 반응성 작용기(functional group)를 포함하는 측쇄를 갖는 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는



의 잔기이다.

일부 실시양태에서, 표적화제는 상기 표적화 모이어티의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 공유적으로 연결된다.

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 알킨 그룹인 반응성 작용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 알킨 그룹은 디벤조사이클로옥틴 그룹이다.

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 코어 단위에 공유적으로 부착된다.

[0026] 일부 실시양태에서, 표적화제와 스페이서 그룹 사이의 공유적 연결은 표적화제 전구체에 존재하는 상보적 반응성 작용기와 스페이서 그룹 전구체 사이의 반응에 의해 형성된 것이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 알켄 그룹을 포함한다.

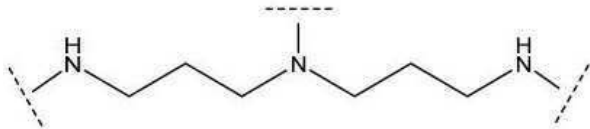
[0027] 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포독성제이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 초세포독성제이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 아우리스타틴(auristatin) 또는 메이탄시노이드(maytansinoid)이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 E이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 F이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 SN-38이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 카바지탁셀(cabazitaxel)이다.

[0028] 일부 실시양태에서, 치료제는 링커를 통해 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 절단 가능한 링커를 통해 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 Val-Cit-PAB 그룹을 포함한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 접합체는 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 친수성 중합체성 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 PEG 그룹이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 약 500 내지 약 2500 g/mole 범위이다.

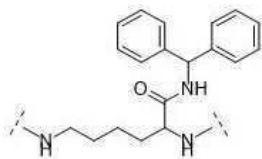
[0030] 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 PEG 그룹을 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 아래 구조를 포함한다:



[0032]

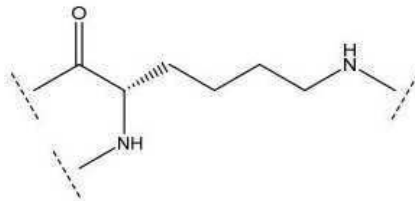
[0033] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 아래 구조를 포함한다:

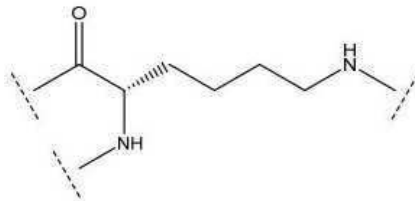


[0034]

[0035] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 BHAlys이다.

[0036] 일부 실시양태에서, 텐드리머는 1세대 내지 5세대 빌딩 단위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 3세대 내지 5세대 빌딩 단위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 3세대 빌딩 단위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 4세대 빌딩 단위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 5세대 빌딩 단위를 갖는다.



[0037] 일부 실시양태에서, 빌딩 단위는 각각  이다.

[0038] 일부 실시양태에서, 접합체는 추가 활성제와 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0039] 일부 실시양태에서, 접합체는 HER2 발현 세포 내에 내재화된다.

[0040] 일부 실시양태에서, 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 감소된 부작용을 초래한다.

[0041] 일부 실시양태에서, 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 방출된 치료제의 최대 혈장 농도에서 적어도 50% 감소를 제공한다.

[0042] 제2 측면에서, 본원에 정의된 바와 같은 복수의 접합체를 포함하는 조성물이 제공된다.

- [0043] 제3 측면에서, 다음을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다:
- [0044] i) 본원에 기술된 바와 같은 접합체; 및
- [0045] ii) 약제학적으로 허용되는 부형제.
- [0046] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 비경구 전달을 위해 제형화된다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 상기 접합체 또는 조성물은 암 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0048] 제4 측면에서, 암의 치료가 필요한 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 접합체 또는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0049] 제5 측면에서, 암 치료용 약제의 제조에 있어서 본원에 기술된 바와 같은 접합체 또는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 암은 난소암, 유방암, 위암, 자궁암 또는 ERBB2 유전자의 비정상적 발현을 특징으로 하는 다른 암이다.
- [0051] 제6 측면에서, 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 HER2 발현 세포와 접촉시켜 상기 접합체가 상기 세포 내에 재화되도록 함으로써 치료제가 HER2 발현 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, HER2 발현 세포를 사멸시키는 방법이 제공된다.
- [0052] 추가의 측면, 실시양태 및 실시예가 본원에서 기술되며, 이는 상술된 바와 같은 실시양태 또는 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 쿠마씨 블루(Coomassie blue)로 염색된 화합물 74, 75 및 76의 SDS Page 분석을 보여준다.
- 도 2는 화합물 77 및 78의 SDS Page 및 형광 영상화(imaging) 분석을 보여준다.
- 도 3은 화합물 41(레인 A: 조악한 혼합물; 레인 B: 정제된 접합체), 화합물 42(레인 C: 조악한 혼합물; 레인 D: 정제된 접합체), 화합물 43(레인 E: 조악한 혼합물; 레인 F: 정제된 접합체), 화합물 44(레인 G: 조악한 혼합물; 레인 H: 정제된 접합체) 및 화합물 45(정제된 접합체)의 SDS Page 및 형광 영상 분석을 보여준다.
- 도 4는 24시간 동안 MDA-MB-231, MDA-MB-231/HER2 및 SKOV-3 세포를 사용한 화합물 36(대조군) 및 화합물 41(표적화됨)의 평균 형광 강도 값을 보여준다. 측정당 최소 10,000개의 세포가 계산되었다. 값은 평균 $\pm$ 표준 편차(SD; $n = 3$)이다.
- 도 5는 37°C에서 24시간 동안 3.33nM에서 HER2 양성 세포(MDA-MB-231/HER2) 및 HER2 음성 세포(MDA-MB-231)와 함께 배양된 덴드리머의 유세포 분석을 보여준다. 측정당 최소 10,000개의 세포가 계산되었다. 값은 평균 $\pm$ 표준 편차(SD; $n = 3$)이다.
- 도 6은 24시간 동안 3.33nM의 농도에서 a) 화합물 36(대조군) 또는 b) 화합물 41(표적화됨)로 처리한 MDA-MB-231 세포의 공초점 현미경 이미지를 보여준다. 녹색, 파란색 및 빨간색 형광은 각각 AF-488-WGA로 염색된 세포막, DAPI로 염색된 핵 및 Cy5로 표지된 덴드리머를 나타낸다. 스케일 바 = 50 μ m.
- 도 7은 24시간 동안 3.33nM의 농도에서 a) 화합물 36(대조군) 또는 b) 화합물 41(표적화됨)로 처리한 MDA-MB-231/HER2 세포의 공초점 현미경 이미지를 보여준다. 녹색, 파란색 및 빨간색 형광은 각각 AF-488-WGA로 염색된 세포막, DAPI로 염색된 핵 및 Cy5로 표지된 덴드리머를 나타낸다. 스케일 바 = 50 μ m.
- 도 8은 24시간 동안 3.33nM의 농도에서 a) 화합물 36(대조군) 또는 b) 화합물 41(표적화됨)로 처리한 SKOV-3 세포의 공초점 현미경 이미지를 보여준다. 녹색, 파란색 및 빨간색 형광은 각각 AF-488-WGA로 염색된 세포막, DAPI로 염색된 핵 및 Cy5로 표지된 덴드리머를 나타낸다. 스케일 바 = 50 μ m.
- 도 9는 48시간에 희생 후 3H-표지된 화합물 40 및 화합물 45 덴드리머의 종양 및 혈액 분포 데이터를 보여준다. 모든 데이터는 조직 질량으로 정규화되었다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다($n = 5$). (NS = 유의하지 않음, * = p -값 < 0.05).
- 도 10은 48시간에 희생 후 화합물 36 및 41의 대표적인 생체 외 종양 분포를 보여준다. 데이터는 (a) 비표적화 덴드리머(화합물 36) 및 (b) 표적화된 덴드리머(화합물 41)에 대한 전형적인 시야를 나타낸다.

도 11은 표적화된 덴드리머(화합물 41)가 종양의 코어 및 말초 영역으로 흡수되었고 대조군 화합물 36은 그렇지 않음을 보여주는 이미지를 보여준다.

도 12는 비히클, 대조군 화합물 36, 표적화된 접합체 41, Kadcyla® 또는 Herceptin® 처리 후 SKOV3 세포로 접종된 마우스에 대한 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 플롯을 보여준다.

도 13은 비히클, 대조군 화합물 36, 표적화된 접합체 41, Kadcyla® 또는 Herceptin® 처리 후 SKOV3 세포로 접종된 마우스에 대한 시간 경과에 따른 생존율(%)을 보여준다.

도 14는 비히클, 대조군 화합물 36, 표적화된 접합체 41, Kadcyla® 또는 Herceptin® 처리 후 SKOV3 세포로 접종된 마우스에 대한 시간 경과에 따른 평균 종양 변화 %를 보여준다.

도 15는 단일(화합물 90; MFI 단일) 또는 다중(화합물 91; MFI 다중) 접합된 항-HER2 나노바디를 갖는 4세대 덴드리머의 내재화 동역학을 나타낸다.

도 16은 37°C에서 a) 1시간, b) 3시간, c) 6시간 또는 d) 24시간 동안 화합물 91(다중 2D3-덴드리머 접합체)과 함께 배양한 후 SKOV-3 세포의 공초점 현미경 이미지를 보여준다. 화합물 91은 Cy5(심홍색(magenta))로 표시되고, 세포막은 AF488-WGA(녹색)로 염색되며, 핵은 Hoechst 33342(파란색)로 표시된다. 스케일 바 = 30 μ M.

도 17은 37°C에서 a) 1시간, b) 3시간, c) 6시간 또는 d) 24시간 동안 화합물 90(단일 2D3-덴드리머 접합체)과 함께 배양한 후 SKOV-3 세포의 공초점 현미경 이미지를 보여준다. 화합물 91은 Cy5(심홍색)로 표시되고, 세포막은 AF488-WGA(녹색)로 염색되며, 핵은 Hoechst 33342(파란색)로 표시된다. 스케일 바 = 30 μ M.

도 18은 ^{89}Zr 이 덴드리머에 결합되었음을 보여주는 본 개시내용의 화합물에 대한 방사선 TLC 이미지이다.

도 19는 화합물 89, 90 및 92에 대해 9일 동안 (a) 신장, (b) 간 및 (c) 종양에서 그래당 주사된 지르코늄 용량의 백분율 그래프를 보여준다.

도 20은 4시간 내지 9일에 동물의 방사성 표지된 접합체 PET 이미지의 대표적인 최대 강도 투영을 보여준다. 데이터는 복셀(voxel)당 베크렐(Becquerel)(cm3)로 표시되며 종양 흡수를 강조하기 위해 임계값을 지정하였다.

도 21은 2일 및 9일에 본 개시내용의 화합물에 대한 그래당 주사된 지르코늄 용량의 생체 외 신호의 종양:장기 비를 제공하는 표를 보여준다.

도 22는 2일 및 9일에 본 개시내용의 화합물에 대한 생체 외 종양 및 기관에서 그래당 주사된 지르코늄 용량 백분율을 제공하는 표를 보여준다.

도 23은 24시간 동안 MDA-MB-231/HER2 세포를 사용한 화합물 70(대조군) 및 화합물 78(표적화된)의 유세포 분석 및 평균 형광 강도 값을 보여준다.

도 24는 24시간 동안 MDA-MB-231 세포를 사용한 화합물 70(대조군) 및 화합물 78(표적화된)의 유세포 분석 및 평균 형광 강도 값을 보여준다.

도 25는 24시간 동안 SKOV-3 세포를 사용한 화합물 70(대조군) 및 화합물 78(표적화된)의 유세포 분석 및 평균 형광 강도 값을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록의 키

서열번호 1: 2D3 나노바디.

서열번호 2: N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드가 있는 2D3 나노바디.

서열번호 3: C-말단 태그, TEV, 아지드가 있는 2D3 나노바디.

상세한 설명

일반 정의

달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당해 분야(예를 들어, 화학, 생화학, 의학 화학, 고분자 화학 등)의 숙련가가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주해

야 한다.

- [0061] 본 명세서 전반에 걸쳐 "포함한다(comprise)"라는 단어, 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해되지만 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 배제하는 것은 아니다. 본원에 사용된 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해해야 하며, 두 가지 의미 모두 또는 어느 쪽 의미인지에 대한 명시적인 지원을 제공하는 것으로 간주해야 한다.
- [0062] 본원에 사용된 약이라는 용어는 달리 언급되지 않는 한 지정된 값의 $\pm 10\%$, 더욱 바람직하게는 $\pm 5\%$ 를 의미한다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 단수 및 복수 측면을 모두 포함한다.
- [0064] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2) 관련 질환 또는 병태에 민감한 임의의 유기체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 대상체는 동물일 수 있다. 한 예에서, 대상체는 포유동물이다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간이 아닌 동물이다. 한 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 한 실시양태에서, 대상체는 HER2 양성 암을 갖는다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "치료하는(treating)"은 특정 장애 또는 병태와 관련된 증상의 완화를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 "암을 치료하는(treating cancer)"이라는 용어는 암과 관련된 증상을 완화하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, "암을 치료하는"이라는 용어는 암성 종양 크기의 감소를 지칭한다. 한 실시양태에서, "암을 치료하는"이라는 용어는 암의 침습성의 감소를 지칭한다. 한 실시양태에서, "암을 치료하는"이라는 용어는 무진행 생존(progression-free survival)의 증가를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "무진행 생존"은 환자가 질환, 즉 암과 함께 생존하지만 질환의 증상의 재발 또는 증가가 없는 암의 치료 중 및 치료 후의 기간을 의미한다.
- [0066] 본원에 사용된 용어 "예방(prevention)"은 특정 장애 또는 병태의 예방(prophylaxis)을 포함한다. 예를 들어, 본원에 사용된 "암을 예방하는(preventing cancer)"이라는 용어는 암과 관련된 증상의 발병 또는 지속을 예방하는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, "암을 예방하는"이라는 용어는 암의 진행을 늦추거나 중단시키는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, "암을 예방하는"이라는 용어는 전이를 늦추거나 예방하는 것을 지칭한다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "치료적 유효량"은 치료되는 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화하거나 예방하기에 충분한 양으로 투여되는 치료제를 함유하는 접합체를 지칭한다. 그 결과 질환 또는 병태의 징후, 증상 또는 원인의 감소 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 다른 원하는 변경이 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 용어 "치료적 유효량"은 암성 종양 크기를 감소시키기에 충분한 양으로 투여되는 접합체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 용어 "치료적 유효량"은 무진행 생존의 증가를 초래하기에 충분한 양으로 투여되는 접합체를 지칭한다. 본원에 사용된 "유효량"이라는 용어는 과도한 부작용 없이 원하는 약리학적 효과 또는 치료적 개선을 달성하거나 부작용 프로파일 감소된 원하는 약리학적 효과 또는 치료적 개선을 달성하는데 효과적인 접합체의 양을 의미한다. 치료적 유효량은, 예를 들어, 용량 증량 임상 시험을 포함하지만 이에 제한되지 않는 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있다. "치료적 유효량"이라는 용어는, 예를 들어, 예방적 유효량을 포함한다. 한 실시양태에서, 예방적 유효량은 전이를 예방하기에 충분한 양이다. "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 화합물의 대사 및 대상체의 연령, 체중, 일반적인 상태, 치료되는 병태, 치료 중인 병태의 심각성 및 처방 의사의 판단으로 인해 대상체마다 다를 수 있다. 임의의 개별 경우에 적절한 "유효량"은 일상적인 실험을 사용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "부착된"은 공유적 결합에 의한 화학 성분 간의 연결을 의미한다. "공유적 결합"이라는 용어는 "공유 부착"이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다.
- [0069] *덴드리머*
- [0070] 제1 측면에서, 다음을 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체가 제공된다:
- [0071] a) i) 코어 단위(C); 및
- [0072] ii) 빌딩 단위(BU)를 포함하는 덴드리머로서, 각각의 빌딩 단위는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이고,
- [0073] 상기 코어 단위는 아미드 결합을 통해 적어도 2개의 빌딩 단위에 공유적으로 부착되고, 각각의 아미드 결합은

상기 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성되는 덴드리머;

[0074] b) 분자량이 약 80kDa 이하이고 스페이서 그룹에 의해 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제;

[0075] c) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제; 및

[0076] d) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 친수성 중합체성 그룹.

[0077] 덴드리머 접합체는 시험관 내 및 생체 내 시험에서 매우 효과적인 항암제로 입증되었으며 실험 연구에서 Herceptin® 및 Kadcycla®(HER2-엠탄신(emtansine) 항체-약물 접합체)에 비해 개선된 효과를 보여준다. Herceptin® 자체와 달리 상기 접합체는 HER2 과발현 암세포로 빠르게 내재화된다. 빠른 내재화 특성은 상기 접합체를 통해 투여되는 치료제의 높은 비율을 원하는 작용 부위로 전달하는 데 도움이 될 것으로 예상된다. 신속하게 내재화되는 표적 세포에 특이적으로 치료적 모이어티를 전달하는 능력은 다른 비-암성 세포가 세포독성제에 노출되는 것과 관련된 원치 않는 부작용(즉, 독성)을 줄이는 데 도움이 된다. 이러한 접근법은 혈장 내 자유 순환이 독성 효과를 가질 수 있는 세포독성 치료 모이어티(예를 들어, 초세포독성 치료 모이어티)의 전달의 경우에 특히 유리하다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "덴드리머"는 코어 및 상기 코어에 부착된 덴드론(dendron)을 함유하는 분자를 지칭한다. 각각의 덴드론은 분지형 빌딩 단위 세대로 구성되어 빌딩 단위의 각 세대가 거듭될 때마다 분지 수가 증가하는 분지형 구조가 된다. "접합체"는 본원에 정의된 바와 같은 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 포함할 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "빌딩 단위"는 코어 또는 이전 세대 빌딩 단위에 부착하기 위한 (예를 들어, 카복실산 그룹에서 유래된) 하나의 작용기 및 (예를 들어, 차세대 빌딩 단위에 부착하거나 덴드리머 분자의 표면을 형성하기 위해 아민에서 유도된) 적어도 2개의 작용기인 3개의 작용기를 갖는 라이신 잔기 또는 이의 유사체인 분지형 분자를 지칭한다.

[0080] 당업자는 상기 접합체가 염 형태(예를 들어, 접합체에 이온화 가능한 그룹이 존재하는 경우) 및, 예를 들어, 상이한 용매화물을 비롯한 다양한 형태로 생성될 수 있음을 이해할 것이다. 본 개시내용은 이러한 모든 형태의 덴드리머-표적화 모이어티 접합체에 관한 것으로 이해될 것이다.

[0081] 접합체의 적합한 염은 유기 또는 무기 산 또는 염기로 형성된 염을 포함한다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 염"이라는 문구는 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 산 부가염은 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 석시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트 및 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트) 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 염기 부가염은 암모늄염, 알칼리 금속염, 예를 들어, 칼륨 및 나트륨의 염, 알칼리 토금속염, 예를 들어, 칼슘 및 마그네슘의 염, 및 유기 염기와 염, 예를 들어, 디사이클로헥실아민, N-메틸-D-글루코민, 모르폴린, 티오모르폴린, 피페리딘, 피롤리딘, 모노-, 디- 또는 트리-저급 알킬아민, 예를 들어, 에틸-, tert-부틸-, 디에틸-, 디이소프로필-, 트리에틸-, 트리부틸- 또는 디메틸-프로필아민, 또는 모노-, 디- 또는 트리하이드록시 저급 알킬아민, 예를 들어, 모노-, 디- 또는 트리에탄올아민과의 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 아세테이트 이온, 석시네이트 이온 또는 기타 카운터이온과 같은 다른 분자의 포함을 포함할 수 있다. 카운터이온은 모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 더욱이, 약제학적으로 허용되는 염은 그 구조에 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 여러 개의 하전된 원자가 약제학적으로 허용되는 염의 일부인 경우에는 여러 개의 카운터이온이 있을 수 있다. 따라서, 약제학적으로 허용되는 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 카운터이온을 가질 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되지 않는 염도 본 개시내용의 범위에 속하는 것으로 이해될 것이다. 이는 이들이 약제학적으로 허용되는 염의 제조에서 중간체로서 유용할 수 있거나 저장 또는 수송 동안 유용할 수 있기 때문이다.

[0082] 유기 및/또는 의약 화학 분야의 숙련가는 많은 유기 화합물이, 이들 화합물이 반응하거나 침전 또는 결정화될 수 있는 용매와 복합체를 형성할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 복합체는 "용매화물"로 알려져 있다. 예를

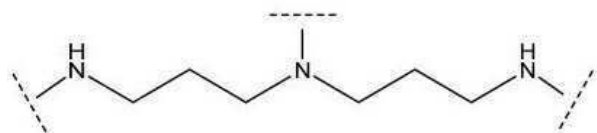
들어, 물과의 복합체는 "수화물"로 알려져 있다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 용매화물" 또는 "용매 화물"이라는 문구는 하나 이상의 용매 분자와 본 개시내용의 화합물의 회합을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 용매화물을 형성하는 용매의 예는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0083] 코어 단위

[0084] 덴드리머의 코어 단위(C)는 아마이드 결합을 통해 빌딩 단위에 공유적으로 부착되며, 각각의 아마이드 결합은 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성된다. 따라서, 코어 단위는, 예를 들어, 아미노 그룹을 포함하는 코어 단위 전구체로부터 형성될 수 있다. 임의의 적합한 아미노 함유 분자가 코어 단위 전구체로서 사용될 수 있다.

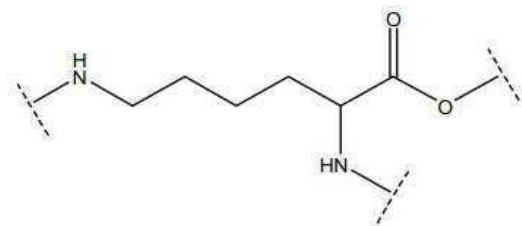
[0085] 전형적으로, 코어 단위는 빌딩 단위의 공유 부착에 사용되는 질소 원자에 추가 작용기를 제공하며, 예를 들어, 스페이서 그룹을 통한 표적화 모이어티의 부착을 위한 작용기를 포함할 수 있다. 다시 말해서, HER2 표적화제는 전형적으로 스페이서 그룹에 의해 덴드리머의 코어 단위에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 코어 단위는 3개의 반응성 질소 원자를 갖는 전구체로부터 유도될 수 있으며, 그 중 2개는 빌딩 단위의 부착에 사용될 수 있고 그 중 하나는 스페이서 그룹의 부착에 사용될 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 아래 구조를 갖는다:



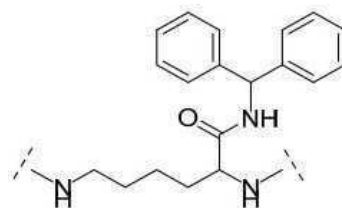
[0087]

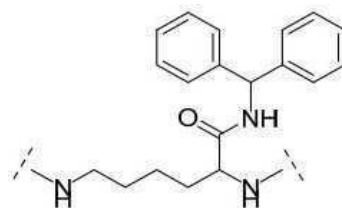
[0088] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 아래 구조를 갖는, 3개의 부착점을 갖는 라이신 분자이다:



[0089]

[0090] 일부 실시양태에서, 코어 단위는 빌딩 단위의 부착에 사용될 수 있는, 2개의 반응성 질소 원자를 갖는 전구체로부터 유도 가능하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 코어 단위는 에틸렌디아민, 1,4-디아미노부탄 또는 1,6-디



아미노헥산으로부터 유도될 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 단위는 구조  를 갖는데, 즉 이에 따라 코어 단위는 산 모이어티가 벤즈하이드릴아민(BHA-Lys)으로 캡핑되어 상응하는 아마이드를 형성한 라이신 잔기를 포함하고, 예를 들어, 2개의 반응성(아미노) 질소를 갖는 코어 단위 전구체



로부터 형성될 수 있다.

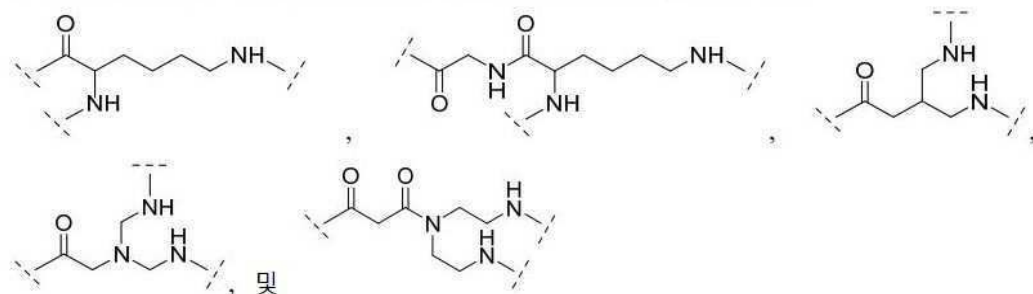
[0091]

BHA-Lys와 같이 2개의 반응성 질소 원자만을 갖는 코어 단위 전구체가 사용되는 경우, 2개의 아미노 그룹은 전형적으로 빌딩 단위로 작용화되고 스페이서 그룹(따라서 표적화제)은 전형적으로 표면 빌딩 단위를 통해 부착된다. 본 발명의 덴드리머-표적화제 접합체는 다중 말단 그룹이 제어된 방식으로 덴드리머-표적화제 접합체의 표

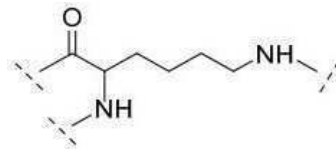
면에 존재하도록 한다. 특히, 라이신 빌딩 단위가 사용되는 경우, 이 빌딩 단위의 알파 또는 엡실론 질소 원자의 표적화제 및/또는 친수성 중합체성 그룹 및/또는 치료제의 배치는 아래에 기재된 바와 같이 미리 결정될 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹, 치료제 및 표적화제는 빌딩 단위를 통한 부착을 통해 덴드리머의 표면에 제공된다. 다시 말해서, 이러한 실시양태에서, 코어 단위는 빌딩 단위를 통하는 것 외에는 표적화제에 대한 부착 지점을 제공하지 않는다. 이러한 실시양태에서, 빌딩 단위에 대한 공유 부착을 위해 사용되지 않은 코어 단위에 존재하는 임의의 작용기는 미반응(즉, 접합체가 노출된 조건에서 미반응)일 것이거나 추가 반응을 방지하기 위해 적절한 캡핑 그룹으로 캡핑되었음이 이해될 것이다. 이러한 코어 단위의 예는 상기 논의한 BHA-Lys 그룹이다.

[0092] 빌딩 단위

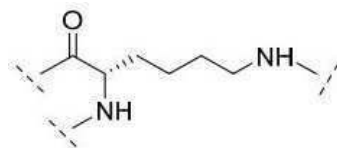
[0093] 빌딩 단위(BU)는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이며 적절한 빌딩 단위 전구체, 예를 들어, 적절한 보호 그룹을 포함하는 라이신 또는 라이신 유사체로부터 형성될 수 있다. 라이신 유사체에는 후속 세대 빌딩 단위에 결합하기 위한 2개의 아미노 질소 원자와 이전 세대 빌딩 단위 또는 코어 단위에 결합하기 위한 아실 그룹을 갖는다. 적합한 빌딩 단위의 예는



를 포함하고, 각각의 빌딩 단위의 아실 그룹은 코어 또는 이전 세대 빌딩 단위에 부착하기 위한 공유 부착 지점을 제공하고; 각각의 질소 원자는 후속 세대 빌딩 단위, 또는 연결된 치료제와 같은 말단 그룹에 공유 부착을 위한 공유 부착 지점을 제공한다.



[0094] 일부 바람직한 실시양태에서, 빌딩 단위는 각각 이고, 각각의 빌딩 단위의 아실 그룹은 코어 단위 또는 이전 세대 빌딩 단위에 부착하기 위한 공유 부착 지점을 제공하고; 각각의 질소 원자는 후속 세대 빌딩 단위, 또는 연결된 치료제와 같은 말단 그룹에 공유 부착을 위한 공유 부착 지점을 제공한다.



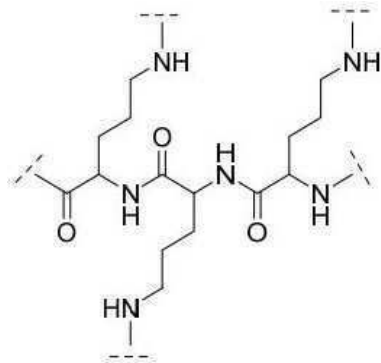
[0095] 일부 바람직한 실시예에서, 빌딩 단위는 각각 이고, 각각의 빌딩 단위의 아실 그룹은 코어 또는 이전 세대 빌딩 단위에 부착하기 위한 공유 부착 지점을 제공하고; 각각의 질소 원자는 후속 세대 빌딩 단위, 또는 연결된 치료제와 같은 말단 그룹에 공유 부착을 위한 공유 부착 지점을 제공한다.

[0096] 빌딩 단위의 최외곽 세대(outermost generation)(BU_{outer})는 전술한 바와 같이 빌딩 단위(BU)의 다른 세대에서 사용된 바와 같은 라이신 또는 라이신 유사체 빌딩 단위에 의해 형성될 수 있다. 빌딩 단위의 최외곽 세대(BU_{outer})는 덴드리머의 코어 단위에서 가장 바깥쪽에 있는 빌딩 단위의 세대이며, 즉 빌딩 단위의 최외곽 세대(BU_{outer})에 더 이상 빌딩 단위 세대가 연결되지 않는다.

[0097] 덴드리머의 덴드론은, 예를 들어, 빌딩 단위(BU)의 부착을 통해 그에 따라 필요한 수의 세대로 합성될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 일부 실시양태에서 빌딩 단위(BU)의 각 세대는 동일한 빌딩 단위로 형성될 수 있으며, 예를 들어, 빌딩 단위의 모든 세대는 라이신 빌딩 단위일 수 있다. 일부 다른 실시양태에서, 빌딩 단위의 하나 이상의 세대는 빌딩 단위의 다른 세대와는 다른 빌딩 단위로 형성될 수 있다.

[0098] 덴드리머 모이어티는 전형적으로 1세대 내지 5세대 빌딩 단위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 덴드리머는 1세대

빌딩 단위 텐드리머이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 2세대 빌딩 단위 텐드리머이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 3세대 빌딩 단위 텐드리머이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 4세대 빌딩 단위 텐드리머이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 5세대 빌딩 단위 텐드리머이다. 예를 들어, 3세대 빌딩 단위 텐드리머는, 예를 들어, 빌딩 단위가 라이신인 경우에, 서로 공유적으로 연결된 3개의 빌딩 단위를 포함하는 구조를 갖는 텐드리머이고, 이는 아래 하부구조를 포함할 수 있다:



[0099]

[0100] 일부 실시양태에서, 텐드리머는 완전한(complete) 세대의 빌딩 단위를 갖는다. 예를 들어, 3세대 텐드리머에는 3세대의 완전한 빌딩 단위를 갖는다. 2개의 반응성 아민 그룹을 갖는 코어의 경우, 이러한 3세대 텐드리머는 14개의 빌딩 단위(즉, 코어 단위 + 2 BU + 4 BU + 8 BU)를 포함할 것이다. 그러나 텐드리머를 생성하기 위한 합성 공정의 특성으로 인해, 텐드리머를 생성하기 위해 수행된 하나 이상의 반응이 완전히 완료되지 않을 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서 텐드리머는 불완전한(incomplete) 세대의 빌딩 단위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 텐드리머 집단이 수득될 수 있으며, 여기서 텐드리머는 텐드리머당 빌딩 단위의 수 분포를 갖는다. 일부 실시양태에서, 텐드리머당 빌딩 단위의 평균 수가 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13인 텐드리머 집단이 수득된다. 일부 실시양태에서, 텐드리머의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 10개 이상의 빌딩 단위를 갖는 텐드리머 집단이 수득된다. 일부 실시양태에서, 텐드리머의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 12개 이상의 빌딩 단위를 갖는 텐드리머 집단이 수득된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 각각의 텐드론(X)에서 빌딩 단위의 각 세대는 식 $[BU]_2^{(b-1)}$ 로 표시될 수 있으며, 여기서 b는 세대 수이다. 3세대의 완전한 빌딩 단위를 갖는 텐드론(X)은 $[BU]_1-[BU]_2-[BU]_4$ 로 표시된다.

[0102] 표적화제

[0103] 본원에 기술된 텐드리머-표적화제 접합체는 HER2 표적화제를 포함하며, 즉 표적화제는 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2, ERBB2로도 공지됨; 유전자 ID 번호 2064, NCBI)에 결합할 수 있다. 본원에 기술된 HER2 표적화제는 종양 및 암 세포에 대한 기술된 텐드리머 접합체의 표적화에 유용하다.

[0104] 표적화제는 분자량이 약 80kDa 이하이고 분자(즉, HER2)에 특이적으로 결합하고/하거나 친화성을 갖는 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 공유 결합, 이온 결합 및 수소 결합, 반데르발스 힘을 포함한 모든 유형의 결합 또는 회합을 통해 상호작용이 발생할 수 있다.

[0105] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 80kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 60kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 50kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 40kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 30kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 20kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 15kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 13kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 15kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 12kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 10kDa이다.

[0106] 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 80kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 60kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 50kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 40kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 30kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 20kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 15kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 3kDa 내지 약 13kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 15kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 12kDa이다. 한 실시양태에서, HER2 표적화제는 분

자량이 약 5kDa 내지 약 10kDa이다.

- [0107] 본 명세서에 기술된 바와 같이 "kDa" 또는 "킬로달톤"은 1000달톤으로 이루어진 분자 질량 단위를 지칭한다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 표적화제는 항체 단편이다. 본원에 사용된 용어 "항체 단편"은, 예를 들어, 본원에 정의된 F_v , V_H , V_L 또는 가변 영역을 포함하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부 또는 단편을 의미하는 것으로 간주해야 한다. 이 용어는 항체로부터 직접적으로 유래된 단편뿐만 아니라 재조합 수단을 사용하여 생성된 단백질을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 Fab, F_v , scFv, 중쇄 항체, 도메인 항체, 중쇄 항체, 디아바디 또는 트리아바디로부터 선택된다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 " F_v "는 다중 폴리펩타이드 또는 단일 폴리펩타이드(scFv)로 구성되는 V_L 및 V_H 가 회합하여 항원 결합 도메인을 갖는, 즉 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성하는 임의의 단백질을 의미하는 것으로 간주된다. 항원 결합 도메인을 형성하는 V_H 및 V_L 은 단일 폴리펩타이드 쇄 또는 다른 폴리펩타이드 쇄에 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 F_v (및 본 개시내용의 임의의 단백질)는 동일한 항원에 결합할 수 있거나 결합하지 않을 수 있는 다중 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 이 용어는 항체로부터 직접적으로 유래된 단편뿐만 아니라 재조합 수단을 사용하여 생성된 단백질을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 일부 예에서, V_H 는 중쇄 불변 도메인 CH1에 연결되지 않고/않거나 V_L 은 경쇄 불변 도메인(CL), 예를 들어, 도메인 항체에 연결되지 않는다. 폴리펩타이드 또는 단백질을 함유하는 예시적인 F_v 는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 디아바디, 트리아바디를 포함한다. "Fab 단편"은 면역글로불린의 1가 항원 결합 단편으로 이루어지며, 전항체(whole antibody)를 효소 파파인(papain)으로 분해하여 생성되어 온전한 경쇄와 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 생성할 수 있거나 재조합 수단을 사용하여 생성될 수 있다. Fab 단편은 일반적으로 V_H 및 C_{H1} 과 V_L 및 C_L 을 포함하거나 이로 이루어진다. 항체의 "Fab' 단편"은 전항체를 펩신으로 처리한 후 환원하여 V_H 및 단일 불변 도메인을 포함하는 중쇄의 일부 및 온전한 경쇄로 이루어진 분자를 생성함으로써 획득될 수 있다. 이러한 방식으로 처리된 항체당 2개의 Fab' 단편이 획득된다. Fab' 단편은 또한 재조합 수단에 의해 생성될 수 있다. "단일 쇄 F_v " 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역과 중쇄의 가변 영역이 적절하고 유연한 폴리펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결된 항체의 가변 영역 단편(F_v)을 함유하는 재조합 분자이다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 항체 단편은 중쇄 항체, Fab, F_v , scFv 또는 단일 도메인 항체로부터 선택된다.
- [0111] 본원에 사용된 바와 같이, "도메인 항체(dAb)" 또는 "나노바디"로도 지칭되는 "단일-도메인 항체(sdAb)"는 중쇄 V_H 또는 경쇄 V_L 의 단일 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 가변 영역은 카멜리드(camelid) 유래된다. 한 실시양태에서, 가변 영역은 상어로부터 유래된다. 한 실시양태에서, V_H 는 카멜리드 유래된 V_H 이다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 표적화제는 단일 도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 V_H 단일 도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 V_L 단일 도메인 항체이다.
- [0113] 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는, 예를 들어, EP2215125A1, US20110028695, Hussack 등 (2018) 또는 Arezumand 등 (2017)에 기술된 바와 같은 단일 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 US20110028695에 기술된 바와 같은 단일 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 Vaneycken 등(Vaneycken 등, (2011))에 기술된 나노바디이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 2Rs15d이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 2Rb17c이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 1R59b이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 2R5a이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 1R136d이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 1R143c이다(Vaneycken 등, (2011)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 C3이다(Wu 등, (2018)). 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 5F7GGC이다(Pruszyński 등, (2013)). 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 US20110028695에 제시된 것과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 5F7이다.
- [0114] 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 실시예 7에 개시된 바와 같은 단일 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 US20110028695의 서열번호 1986에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 2D3이다.
- [0115] 한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 아미노산 서열 EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHDITADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRD

AGTTWFEKSGSAGQGTQTVSS를 포함한다.

- [0116] 일부 실시양태에서, 표적화제는 HER2 결합에 대해 트라스투주맙 및/또는 퍼투주맙(pertuzumab)과 경쟁하지 않는다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 HER2 결합에 대해 트라스투주맙 및/또는 퍼투주맙과 경쟁한다. 한 실시양태에서, 표적화제는 2D3이고, 표적화제는 HER2 결합에 대해 트라스투주맙 및/또는 퍼투주맙과 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 HER2의 세포 외 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 HER2 세포 외 도메인 I, II, III 및/또는 IV에 결합한다. 한 실시양태에서, 표적화제는 HER2 세포 외 도메인 III에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 ErbB2의 이량체화 암(arm)에 결합한다. 표적화제가 ErbB2의 이량체화 암에 결합하는 경우, 표적화제는 HER2 결합에 대해 퍼투주맙과 경쟁할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 SPR 연구에 의해 결정된 바와 같이 적어도 1nM, 적어도 2nM, 적어도 5nM, 적어도 10nM의 결합 친화도로 HER2에 결합한다.
- [0117] 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 단일 도메인 항체이고 분자량이 약 4kDa 내지 약 80kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 80kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 60kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 50kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 40kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 30kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 20kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 15kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 12kDa, 또는 약 10kDa 내지 약 16kDa이다.
- [0118] 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 약 500개 미만, 약 400개 미만, 약 300개 미만, 약 200개 미만, 약 150개 미만, 약 140개 미만, 약 130개 미만, 약 120개 미만, 약 110개 미만, 약 100개 미만의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 약 50개 초과, 약 75개 초과, 약 100개 초과 또는 약 120개 초과 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 120개 미만의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 약 100개 내지 약 120개의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0119] 일부 실시양태에서, HER2 표적화제는 항체 또는 항체 단편의 모방체이다. 본원에 사용된 용어 "모방체(mimetic)" 또는 "모방체(mimetics)"는 항체 또는 항체 단편처럼 항원에 결합할 수 있지만 항체와 구조적으로 관련되지 않은 화합물을 지칭한다. 이 용어는 본원에 기술된 바와 같은 항체 또는 항체 단편을 포함하지 않는 것으로 이해해야 한다. 이 용어는 합성 모방체(시험관 내에서 생산됨) 및 재조합 수단을 사용하여 생산된 모방체를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 이 용어는 단백질 모방체를 포함하는 것으로 이해해야 한다.
- [0120] 한 실시양태에서, 모방체는 애피바디(affibody), aptamer, 아필린(affilin), 아프머(affimer), 아프틴(affitin), 안티칼린(anticalin), 아비머(avimer), 알파 바디(alpha body), 모노바디(monobody), DARPIn, Fyomer, 피브로넥틴 유형 III 유래 단백질 스캐폴드, 파이토시스타틴(phytolectin) 유래 단백질 스캐폴드 및 파라토프(paratope) 모방체 펩타이드로부터 선택된다. 항체와 마찬가지로 모방체를 표적화 모이어티로 사용할 수 있다.
- [0121] 한 실시양태에서, 모방체는 다음 단백질 스캐폴드 중 하나로부터 유래된다: 단백질 A의 z 도메인, 감마-B 크리스탈린(crystallin), 유비퀴틴(ubiquitin), 시스타틴(cystatin), sac7d, 삼중 나선(triple helix), 코일형 코일(coiled coil), 리포칼린(lipocalin), 사이클로타이드(cyclotide), 막 수용체의 A 도메인, 안키린 반복 모티프(ankyrin repeat motif), Fyn의 sh3 도메인, 프로테아제 억제제의 Kunitz 도메인, 피브로넥틴의 유형 III 도메인 및 *Clostridium perfringens*로부터의 IgG-유사 열안정성 탄수화물 결합 모듈 패밀리 32(CBM32).
- [0122] 한 실시양태에서, 모방체는 약 3kDa 내지 약 20kDa, 또는 약 4kDa 내지 약 18kDa, 또는 약 6kDa 내지 약 16kDa, 또는 약 6kDa 내지 약 14kDa, 또는 약 6kDa 내지 약 12kDa, 또는 약 6kDa 내지 약 10kDa, 또는 약 6kDa 내지 약 8kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 3kDa 내지 약 20kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 3kDa 내지 약 20kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 4kDa 내지 약 18kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 6kDa 내지 약 16kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 6kDa 내지 약 14kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 6kDa 내지 약 12kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 6kDa 내지 약 10kDa이다. 한 실시양태에서, 모방체는 약 6kDa 내지 약 8kDa이다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 표적화제는 애피바디이다. 본원에 사용된 용어 "애피바디"는 "Z 도메인"으로 알려진 길이가 약 58개의 아미노산인 3개의 알파 나선 번들 도메인을 기반으로 하는 매우 작은(약 6kDa) 폴리펩타이드 항체 모방체 부류 중 임의의 것을 지칭한다. 전형적으로 애피바디에 대한 스캐폴드는 단백질 A의 B-도메인의 수정된 버전을 기반으로 한다. 애피바디는 매우 높은 안정성(90℃의 높은 온도 및 나노몰에서 피코몰 범위의 표적 친화도를 견뎌냄)을 특징으로 한다. 예를 들어 Nord 등 (1995), *Protein Eng.*, 8:601-608 참조. 공지된 애피바디의 예는, 예를 들어, HER2에 대한 애피바디(예를 들어, Anti-HER2 Affibody®, Affibody AB, Bromma, Sweden; 미국 특허 제7,993,650호)를 포함한다.

- [0124] 일부 실시양태에서, 표적화제는 에피바디이고 분자량이 약 3kDa 내지 약 10kDa, 또는 약 3kDa 내지 약 8kDa, 또는 약 4kDa 내지 약 8kDa, 또는 약 4kDa 내지 약 7kDa, 또는 약 5kDa 내지 약 7kDa, 또는 약 6kDa이다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 표적화제는 에피바디이고 80개 미만의 아미노산 잔기, 또는 70개 미만의 아미노산 잔기, 또는 65개 미만의 아미노산 잔기, 또는 60개 미만의 아미노산 잔기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 40개 내지 80개의 아미노산 잔기, 또는 50개 내지 70개의 아미노산 잔기, 또는 55개 내지 65개의 아미노산 잔기, 또는 56개 내지 60개의 아미노산 잔기, 또는 약 58개의 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0126] 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 "항체"는, 예를 들어, Fv에 의해 하나 또는 몇 개의 밀접하게 관련된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 또는 변형된 항체(예를 들어, 키메라(chimeric) 항체, 인간화(humanized) 항체, 영장류화(primatized) 항체, 탈면역화(deimmunized) 항체 및 반 항체(half antibody), 이중특이성 항체)를 포함한 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는 4개의 쇠 단백질을 포함한다. 항체는 일반적으로 불변 영역 또는 불변 단편 또는 결정화 가능한 단편(Fc)으로 배열될 수 있는 불변 도메인을 포함한다. 항체의 예시적인 형태는 기본 단위로서 4-쇄 구조를 포함한다. 전장 항체(full-length antibody)는 공유적으로 연결된 2개의 중쇄(~50-70kDa)와 2개의 경쇄(각각 ~23kDa)를 포함한다. 경쇄는 일반적으로 가변 영역 및 불변 도메인을 포함하고 포유동물에서는 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이다. 중쇄는 일반적으로 가변 영역, 및 힌지 영역에 의해 추가 불변 도메인(들)에 연결된 1개 또는 2개의 불변 도메인(들)을 포함한다. 포유동물의 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 또는 μ 유형 중 하나이다. 각각의 경쇄는 또한 중쇄 중 하나에 공유적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 2개의 중쇄와 중쇄 및 경쇄는 쇠간 디설파이드 결합(inter-chain disulfide bond) 및 비공유 상호작용에 의해 함께 유지된다. 쇠간 디설파이드 결합의 수는 상이한 유형의 항체에 따라 다를 수 있다. 각각의 쇠는 N-말단 가변 영역(각각 ~110개의 아미노산 길이인 VH 또는 VL)을 갖고 C-말단에 하나 이상의 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인(~110개의 아미노산 길이인 CL)은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인(~330-440개의 아미노산 길이인 CH)과 정렬되고 디설파이드 결합된다. 경쇄 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 항체 중쇄는 2개 이상의 추가 CH 도메인(예컨대 CH2, CH3 등)을 포함할 수 있고 CH1 불변 도메인과 CH2 불변 도메인 사이의 힌지 영역을 포함할 수 있다. 항체는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다. 한 예에서, 항체는 인간 항체 또는 이의 탈면역화 또는 생식선 버전(germlined version), 또는 이의 친화성 성숙 버전(affinity matured version)이다.
- [0127] 용어 "전장 항체" 또는 "전항체"는 항체의 항원 결합 단편과는 대조적으로 실질적으로 온전한 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 구체적으로, 전항체는 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 포함한다. 불변 영역은 야생형 서열 불변 영역(예를 들어, 인간 야생형 서열 불변 영역) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "가변 영역"은 본원에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 일부, 또는 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 상보적 결정 영역 "CDR", 즉 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 프레임워크 영역 "FR"의 아미노산 서열을 포함하는 항체(예를 들어, 카멜리드 항체 또는 연골 어류 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR))의 중쇄 단독의 일부를 지칭한다. FR은 CDR 잔기 이외의 가변 영역 잔기이다. 예를 들어, 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3개 또는 4개의 FR(예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)을 포함한다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L 은 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.
- [0129] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역"(동의어 CDR, 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)은 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭하는데 존재하는 잔기가 특이적 항원 결합에 대한 주요 기여자이다. 각각의 가변 영역은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다. 각각의 상보성 결정 영역은 Kabat 등 (1987 및/또는 1991)에 의해 정의된 바와 같은 "상보성 결정 영역"의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 영역에서 CDRH1은 잔기 31-35 사이에 있고 CDRH2는 잔기 50-65 사이에 있으며 CDRH3은 잔기 95-102 사이에 있다. 경쇄에서 CDRL1은 잔기 24-34 사이에 있고 CDRL2는 잔기 50-56 사이에 있고 CDRL3은 잔기 89-97 사이에 있다. 이들 CDR은 또한, 예를 들어, Kabat(1987 및/또는 1991)에 기술된 바와 같이 다수의 삽입(insertion)을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 FR 및 CDR에 제한되지 않고, 정식 넘버링 시스템 또는 Chothia 및 Lesk(1987); Chothia 등 (1989); 및/또는 Al-Lazikani 등 (1997)의 넘버링 시스템; Honneger와 Plukthun(2001)의 넘버링 시스템; Giudicelli 등, (1997)에서 논의된 IMGT 시스템; 또는 Enhanced Chothia Numbering Scheme(<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)을 포함한 모든 넘버링 시스템을 포함한다. 한 예에서, CDR 및/또는 FR은, 예를 들어, 도 9a 내지 9d에 굵은 글씨로 표시된 바와 같이 Kabat 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 선택적으로, Kabat 넘버링 시스템에 따른 중쇄 CDR2는 본원에 열거된 5개의 C-말

단 아미노산을 포함하지 않거나 이들 아미노산 중 임의의 하나 이상이 또 다른 천연 발생 아미노산으로 치환된다. 추가의 또는 대안적인 옵션에서, 경쇄 CDR1은 본원에 열거된 4개의 N-말단 아미노산을 포함하지 않거나 이들 아미노산 중 임의의 하나 이상이 또 다른 천연 발생 아미노산으로 치환된다. 이와 관련하여, Padlan 등, 1995는 중쇄 CDR2의 5개의 C-말단 아미노산 및/또는 경쇄 CDR1의 4개의 N-말단 아미노산이 일반적으로 항원 결합에 관여하지 않는다는 것을 확립하였다. 한 예에서, CDR 및/또는 FR은, 예를 들어, 도 9a 내지 9d에 밑줄 친 글씨로 도시된 바와 같이 Chothia 넘버링 시스템에 따라 정의된다.

[0130] 본원에 사용된 용어 "Kabat 넘버링 시스템"은 Kabat(Kabat 등, 1987 및/또는 1991)에 명시된 바와 같이 항체 가변 영역을 넘버링하고 CDR(초가변 영역)을 식별하기 위한 스킴을 지칭한다.

[0131] 본원에 사용된 용어 "Chothia 넘버링 시스템"은 Chothia 및 Lesk(Chothia 및 Lesk, 1987) 또는 Al-Lazikani(Al-Lazikani 등, 1997)에 제시된 바와 같이 항체 가변 영역을 넘버링하고 CDR(구조적 루프)을 식별하기 위한 스킴을 지칭한다.

[0132] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 도메인"은 항원(예를 들어, HER2)에 특이적으로 결합할 수 있는 화합물의 영역을 의미하는 것으로 간주해야 한다. 한 실시양태에서, 상기 화합물은 단백질이다. 한 실시양태에서, 상기 단백질은 항체 또는 이의 단편이다. 한 실시양태에서, 상기 항체 단편은 본원에 기술된 바와 같은 F_v , V_H 또는 V_L 중 하나 이상을 포함한다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질 또는 이의 항원 결합 도메인과 항원의 상호작용과 관련하여 언급된 "결합한다" 또는 "결합"이라는 용어는 상기 상호작용이 항원에 특정 구조(예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 좌우됨을 의미한다. 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A"와 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 "A"(또는 표지되지 않은 유리 "A")를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합되어 있는 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0134] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하다", "특이적으로 결합한다" 또는 유사한 문구는 본 개시내용의 단백질이 대체 항원 또는 세포에서보다 특정 항원(예컨대 HER2) 또는 이를 발현하는 세포와 더욱 빈번하게, 더욱 신속하게, 더 긴 지속시간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 회합함을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하는 단백질은 다른 항원에 결합하는 것보다 더 큰 친화도(예를 들어, 20배 또는 40배 또는 60배 또는 80배 내지 100배 또는 150배 또는 200배 더 큰 친화도)와 결합력으로 더욱 용이하게 및/또는 더 오래 그 항원에 결합한다. 예를 들어, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 단백질이 제2 항원에 특이적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있다는 것은 이 정의를 읽음으로써 또한 이해된다. 이러한 "특이적 결합"이 반드시 다른 항원의 배타적 결합 또는 비검출 결합이 필요한 것은 아니므로, 이는 용어 "선택적 결합"을 의미한다.

[0135] 일부 실시양태에서, 하나의 표적화제가 덴드리머에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 초과 표적화제가 덴드리머에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 2개의 표적화제가 덴드리머에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 3개의 표적화제가 덴드리머에 공유적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 4개의 표적화제가 덴드리머에 공유적으로 연결된다.

[0136] 표적화제는 스페이서를 통해 접합체의 나머지 부분에 부착된다. 일부 실시양태에서, 표적화제와 스페이서 그룹 사이의 공유 부착 또는 연결은 표적화제 전구체에 존재하는 상보적 반응성 작용기와 스페이서 그룹 전구체 사이의 반응에 의해 형성되었으며, 이는 접합체 제조에 사용된 공정에 따라 스페이서 그룹 전구체가 HER2 표적화 모이어티 전구체와 반응할 때 접합체의 나머지 부분에 부착되거나 부착되지 않을 수 있다.

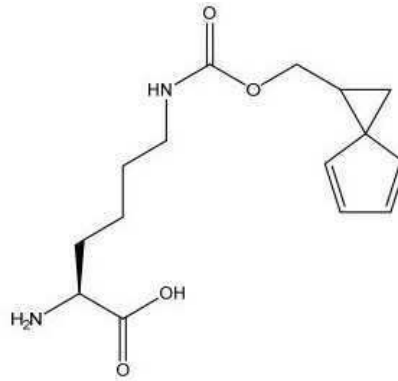
[0137] 일부 실시양태에서, 표적화제는 표적화 모이어티의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 공유적으로 연결된다.

[0138] 표적화제 전구체의 공유 부착 부위는, 예를 들어, 시스테인, 라이신, N-말단 아민, 티로신, 탄수화물, 비천연 아미노산, 또는 트랜스아미나제(예를 들어, 트랜스글루타미나제(transglutaminase) 또는 소르타제(sortase) A) 또는 인식 서열일 수 있다. 단백질로의 공유 부착을 위한 결합 부위는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Milla P. 등, 2012). 인실리코(in silico) 결정 구조 예측은 접합에 구조적으로 적절한 공유 부착 부위(예를 들어, 파타토프, CDR, 올바른 폴딩(folding) 및 형태에 중요한 특징, 및/또는 고도로 하전된 극성의 또는 부피가 큰 측쇄 그룹이 있는 잔기에서 멀리 떨어져 있음)를 찾기 위해 표적화제 폴리펩타이드 서열 내의 위치를 확인하는 데 사용할 수 있다. 이들 후보 위치로부터, 강력한 접합을 허용하면서 기능을 가장 잘 보존하는 치환 부위를 결정하기 위해 경험적 스크리닝이 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 2D3 위치는 위치 13, 16, 42 및 126(c-말단)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 표적화제 전구체는 스페이서로의 부착을 위한 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 비천연 아미노산 잔기는 스페이서 그룹 전구체의 반응성 작용기에 상보적인 반응

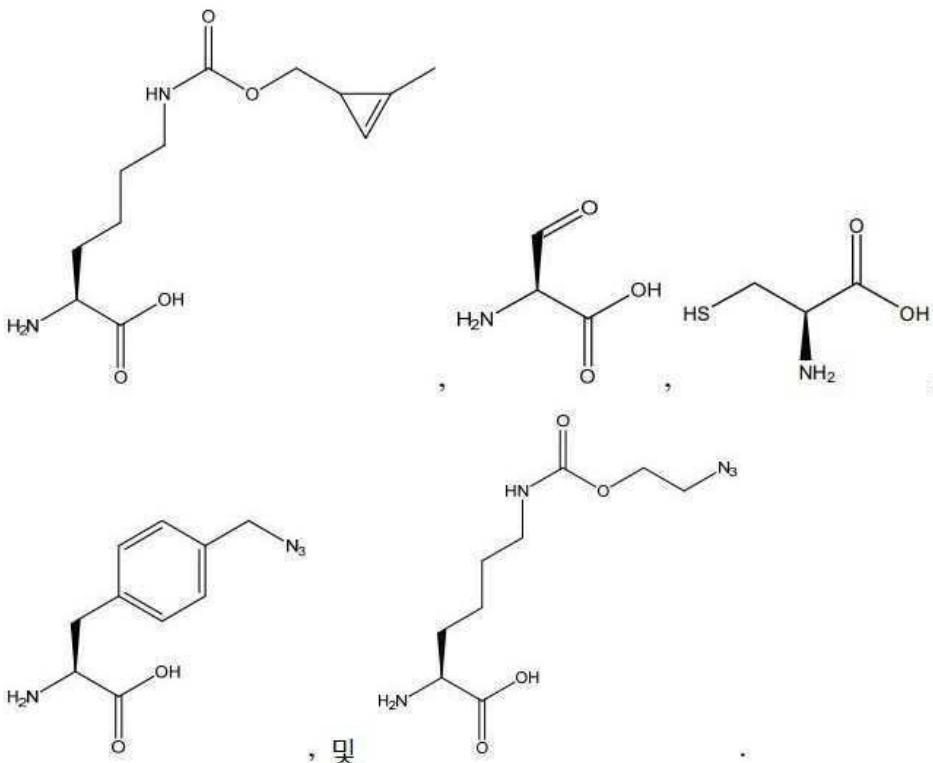
성 작용기를 갖는 측쇄를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 아지드 그룹을 함유하는



잔기, 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌 잔기, 예를 들어, 일 수 있다. 아지드 그룹은 스
페이스 전구체 그룹에 존재할 수 있는 알킨 그룹과 고리화 첨가 반응될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비천연 아



미노산은 디엔 함유 아미노산, 예를 들어, 과 같은 스피로사이클로펜타디
엔 함유 아미노산이다. 디엔 그룹은 말레이미드에 존재하는 것과 같은 알켄 그룹과 고리화 첨가(예를 들어,
Diels-Alder) 반응될 수 있다. 스페이스로의 부착을 위해 사용될 수 있는 비천연 아미노산의 추가 예는 케톤과
같은 카보닐 그룹을 함유하는 것 및 메틸사이클로프로필렌 그룹을 함유하는 것을 포함한다. 비천연 아미노산의
추가 예는 다음을 포함한다:



[0139]

[0140] 일부 실시양태에서, 표적화제는 본원에 정의된 바와 같은 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0141] 스페이스 그룹

[0142] 본원에 사용된 용어 "스페이스 그룹"은 덴드리머에 표적화제를 부착시키는 역할을 하는 화학 물질을 의미한다.

즉, 스페이서 그룹은 (예를 들어, 공유 부착을 통해) 텐드리머에 표적화제를 결합한다. 스페이서 그룹은 텐드리머의 다른 구성성분으로부터 과도한 유해 간섭 없이 HER2 수용체에 결합할 수 있도록 표적화제를 위치시키기 위한 것이다.

[0143] 상기 논의한 바와 같이, 표적화제는, 예를 들어, 텐드리머의 코어를 통해 텐드리머에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 코어 단위에 공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 텐드리머의 코어를 통해 텐드리머에 공유적으로 부착된다. 즉, 항체 단편과 같은 표적화제는 스페이서 그룹에 의해 텐드리머의 코어에 공유적으로 부착된다. 텐드리머의 코어에 부착된 스페이서를 통한 텐드리머로의 표적화제의 공유 부착은 텐드리머가 입체적으로 밀집되어 있으면 유리할 수 있으며, 여기서 스페이서 그룹은 텐드리머의 표면 너머로 돌출하기에 충분한 길이일 수 있어서 이의 수용체 또는 유사체로의 표적화제의 생체 내 결합을 허용할 수 있다.

[0144] 일부 다른 실시양태에서, 표적화제는 텐드리머의 표면 빌딩 단위를 통해 텐드리머에 공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 표면 빌딩 단위에 공유적으로 부착된다. 예를 들어, 표적화제는 스페이서 그룹을 통해, 예를 들어, 라이신 잔기의 아민 그룹과 표적화제 및 스페이서 그룹을 포함하는 중간체에 존재하는 카복실산 그룹 사이에 형성된 아미드 결합에 의해 라이신 잔기의 표면 질소에 연결될 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화제는 스페이서 그룹을 통해 라이신 잔기의 표면 질소에 공유적으로 부착되고, 이에 의해 아미드 결합은 라이신 잔기의 아민 그룹과 표적화제 및 스페이서 그룹을 포함하는 중간체에 존재하는 카복실산 그룹 사이에 형성된다.

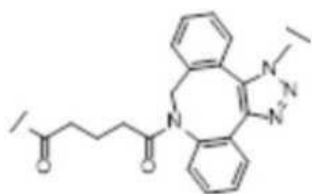
[0145] 예시적인 스페이서 그룹은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리알릴, 펩타이드, 아미노산, 알킬 및 알케닐 쇠, 및 사카라이드(모노, 올리고 및 폴리), 또는 이들의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 예컨대 2개 내지 60개의 에틸렌옥시 반복 단위, 예를 들어, 2개 내지 20개 또는 20개 내지 48개의 반복 단위의 PEG 쇠를 포함한다. 한 실시양태에서, PEG는 8개 내지 36개의 반복 단위이다. 추가 실시양태에서, PEG는 12개, 16개, 20개, 24개 또는 36개의 반복 단위이다.

[0146] 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 다른 작용기가 산재된 다중 PEG 그룹을 포함한다. 예를 들어, 스페이서 그룹은, 예를 들어, 해당 스페이서 그룹의 일부를 연결하는 데 유용한 아미드 그룹 또는 기타 작용기를 통해 연결된 PEG 그룹을 포함한다.

[0147] 표적화제 및/또는 텐드리머로의 스페이서 그룹의 부착을 위해, 스페이서 그룹 전구체는 하나 이상의 반응성 작용기를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 반응성 작용기는 하이드록시, 카복시, NHS 또는 펜타플루오로페놀 에스테르와 같은 활성 에스테르, 아미노, 아지드, 말레이미드(설폰-말레이미드 포함), 디엔(예컨대 사이클로펜타디엔, 예를 들어, 스피로[2.4]헵타-4,6-디엔 그룹), 테트라진, 시트라코니미드, BCN(바이사이클[6.1.0]논-4-인-9-일), DBCO(디벤조사이클로옥신-아민)을 포함한 알킨 함유 그룹, 메틸-사이클로프로필렌 함유 모이어티와 같은 활성화 알켄, 티올, 알데히드 및 케톤과 같은 카보닐 그룹, 알콕시아민, 할로아세테이트, 비오틴, 테트라진, TCO(트랜스-사이클로옥텐)를 포함하는 알켄 함유 그룹, 메틸-사이클로프로필렌 그룹, 및 PTAD 또는 기타 티로신 반응성 그룹과 같은 그룹을 포함한다.

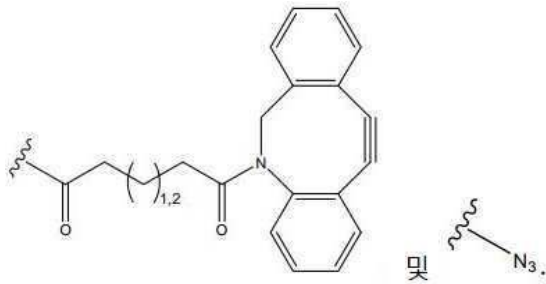
[0148] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 중간체는 2개의 반응성 그룹을, 예를 들어, 직교하는 각 말단에 하나씩 포함할 수 있는데, 즉 반응성 그룹 중 적어도 하나는 표적화제를 포함하는 중간체 또는 텐드리머를 포함하는 중간체에 존재하는 상보적 그룹과 반응하여 스페이서 그룹을 다른 반응성 그룹이 안정하고 실질적으로 반응하지 않는 조건하에서 접합체의 구성요소에 부착할 수 있다. 이것은 스페이서가 텐드리머 또는 표적화제에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)되도록 한 다음, 표적화제를 텐드리머에 연결하기 위해 나머지 구성요소에 존재하는 상보적 그룹과 다른 반응성 그룹의 반응을 통해 부착되도록 한다.

[0149] 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 알킨 및 아지드 그룹을 각각 함유하는 전구체(예를 들어, 표적 그룹을 함유하는 중간체는 아지드 그룹을 함유할 수 있고, 스페이서 그룹을 함유하는 중간체는 알킨 그룹을 함유할 수 있음)의 반응에 의해 표적화제에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)된다. 이러한 반응은 트리아졸 함유 그룹, 예

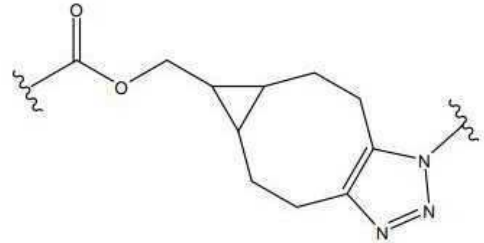


를 들어,

를 형성하고 아래 구조를 갖는 전구체의 반응에 의해 형성될 수 있다:

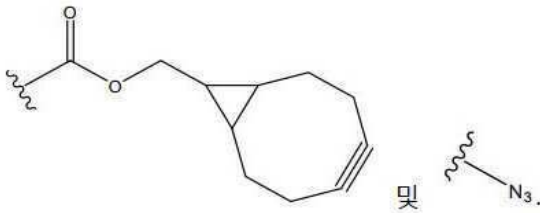


[0150]



[0151]

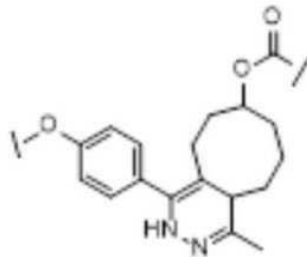
다른 예로서, 스페이서 그룹은 트리아졸 함유 그룹, 예를 들어, 형성을 통해 부착될 수 있으며, 아래 구조를 갖는 전구체의 반응에 의해 형성될 수 있다:



[0152]

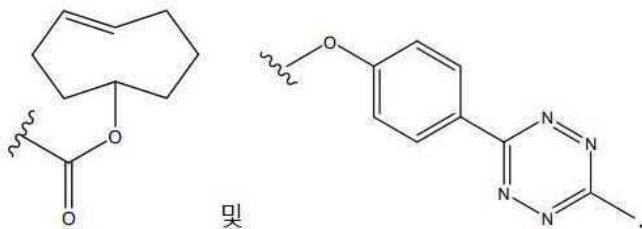
[0153]

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 알켄(예를 들어, 변형된 알켄, 예컨대 트랜스-사이클로옥텐) 및 테트라진 그룹을 각각 함유하는 전구체의 반응에 의해 표적화제에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)된다. 이러한 반응은



질소의 압출과 함께 피리다진 함유 그룹, 예를 들어, 는 전구체의 반응에 의해 형성될 수 있다:

을 형성하고 아래 구조를 갖



[0154]

[0155]

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 알켄(예를 들어, 변형된 알켄, 예컨대 메틸사이클로프로펜) 및 테트라진 그룹을 각각 함유하는 전구체의 반응에 의해 표적화제에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)된다. 이러한 반응은 질소의 압출과 함께 피리다진 함유 그룹의 형성으로 이어진다.

[0156]

덴드리머의 스페이서 그룹의 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)을 위해, 스페이서 그룹 전구체는 추가의 작용기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 스페이서 그룹 전구체는 코어 단위 전구체의 일부를 형성하는(예를 들어, 아미드 결합 형성) 아미노 그룹과 반응할 수 있는 카복실산 그룹을 포함할 수 있다.

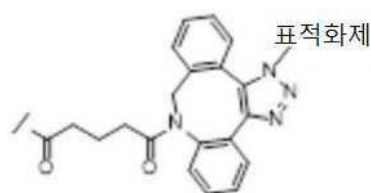
[0157]

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹은 카복실산 및 아민 그룹을 포함하는 전구체의 반응에 의해 덴드리머에 부착

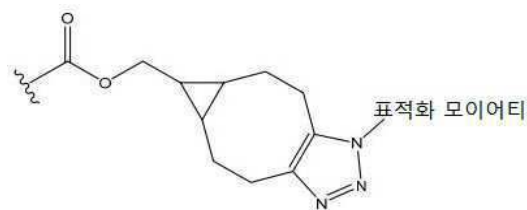
(예를 들어, 공유적으로 부착)되는데, 예를 들어, 스페이서 그룹 중간체는 코어 단위의 일부로서 존재하거나 코어 단위로부터 연장되는, 예를 들어, 아마이드 결합을 형성하는 아민 그룹과 반응할 수 있는 카복실산 그룹을 함유할 수 있고 알킨 및 아지드 그룹을 각각 함유하는 전구체(예를 들어, 표적 그룹을 함유하는 중간체는 아지드 그룹을 함유할 수 있고, 스페이서 그룹을 함유하는 중간체는 알킨 그룹을 함유할 수 있음)의 반응에 의해 표적 화제에 부착된다.

[0158]

상기 논의한 바와 같이, 표적화제 전구체는 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 화제는 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 이러한 비천연 아미노산 잔기는, 예를 들어, 반응성 측쇄를 제공할 수 있는 임의의 비천연 아미노산일 수 있으며, 상기 반응성 측쇄는 스페이서 그룹 전구체에 존재하는 작용기에 상보적인 작용기를 보유한다. 이러한 방식으로, 상보적 작용기가 반응할 수 있고, 따라서 스페이서 그룹 전구체로의 표적화 모이어티 전구체의 부착이 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 4-아지도페닐알라닌 잔기이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 비천연 아미노산 잔기를 함유하는 표적화 모이어티 전구체에 접합하기 위한 알킨 그룹을 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 4-아지도페닐알라닌 잔기를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 알킨 그룹을 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 4-아지도페닐알라닌 잔기를 함유하는 표적화 모이어티 전구체에 접합하기 위한 디벤질사이클로옥탄 그룹인 알킨 그룹을 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹의 한쪽 말단은, 예를 들어,



와 같은 트리아졸 함유 그룹을 형성하는, 표적 모이어티의 일부를 형성하는 4-페닐알라닌 잔기의 아지도 모이어티와 DBCO 그룹의 고리첨가 반응에 의해 또는, 예를 들어,



와 같은 트리아졸 함유 그룹을 형성하는, 표적 모이어티의 일부를 형성하는 4-페닐알라닌 잔기의 아지도 모이어티와 BCN((바이사이클[6.1.0]논-4-인-9-일)) 그룹의 반응에 의해 표적화 모이어티에 부착된다.

[0159]

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹의 한쪽 말단은 코어에 존재하거나 표면 빌딩 단위에 존재하는 아미노 그룹과 스페이서 그룹에 존재하는 카복실 그룹 사이 아마이드화 반응에 의해(예를 들어, 활성화된 에스테르의 반응에 의해) 덴드리머에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)된다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 테트라진 그룹을 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는, 예를 들어, 디엔(예컨대 사이클로펜타디엔, 예를 들어, 스피로[2.4]헵타-4,6-디엔 그룹)에 접합하기 위한 말레이미드 그룹을 포함한다.

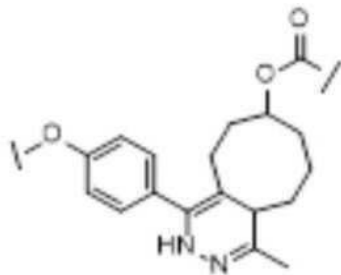
[0160]

일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 아민에 결합하기 위한 반응성 카복실 그룹 및 반응성 알킨 모이어티를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 아지드 그룹을 갖는 PEG 쇄를 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 카복실 그룹에 결합하기 위한 반응성 아민 그룹 및 반응성 알킨 모이어티를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 아지드 그룹을 갖는 PEG 쇄로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 아민에 결합하기 위한 반응성 카복실 그룹 및 반응성 티올 모이어티를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 말레이미드 그룹을 갖는 PEG 쇄로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 카복실 그룹에 결합하기 위한 반응성 아민 그룹 및 반응성 말레이미드 모이어티를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 티올 또는 차폐된 티올 그룹을 갖는 PEG 쇄로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 아민에 결합하기 위한 반응성 카복실 그룹 및 반응성 알켄 모이어티를 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 테트라진 그룹을 갖는 PEG 쇄를 함유한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 그룹 전구체는 덴드리머의 코어에서 아민에 결합하기 위한 반응성 카복실 그룹 및 반응성 디엔(예컨대 사이클로펜타디엔, 예를 들어, 스피로[2.4]헵타-4,6-디엔 그룹)을 함유하는 표적화제 전구체에 접합하기 위한 말레이미드 그룹을 갖는 PEG 쇄를 함유한다.

[0161]

일부 실시양태에서, 덴드리머로의 표적화제의 연결은 제1 스페이서 그룹을 표적화제 중간체에, 제2 스페이서 그

를 덴드리머(예를 들어, 덴드리머의 코어)에 부착(예를 들어, 공유적으로 부착)한 다음, 표적화제와 덴드리머를 연결하기 위해 제1 스페이서 그룹 및 제2 스페이서 그룹에 존재하는 상보적 작용기를 함께 반응시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 접근법은 덴드리머를 표적화제에 쉽게 연결할 수 있도록 할 수 있다. 예를 들어, 제1 스페이서 그룹 중간체는 표적화제의 반응성 그룹에 상보적인 제1 반응성 그룹(예를 들어, 아지드 그룹과 상보적이며 함께 반응하여 트리아졸 그룹을 형성할 수 있는 알킨 그룹)을 한쪽 말단에 포함할 수 있고, 제2 스페이서 그룹의 반응성 그룹에 상보적인 제2 반응성 그룹(예를 들어, 트랜스-사이클로옥텐 함유 그룹과의 반응에 상보적인 테트라진 함유 그룹)을 포함할 수 있다. 제2 스페이서 그룹 중간체는, 예를 들어, 덴드리머의 반응성 그룹과의 반응에 상보적인 제3 반응성 그룹(예를 들어, 아민 그룹과의 반응에 상보적인 카복실산 그룹)을 한쪽 말단에 포함할 수 있고, 제1 스페이서 그룹 중간체의 반응성 그룹과의 반응에 상보적인 제4 반응성 그룹(예를 들어, 테트라진 그룹과의 반응에 상보적인 트랜스-사이클로옥텐 함유 그룹)을 다른 쪽 말단에 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 및 스페이서 그룹은 트랜스-사이클로옥텐 그룹과 테트라진 그룹의 반응에 의해 생성된, 아래 구조를 포함하는 그룹을 통해 부착될 수 있다:



[0162]

[0163]

일부 실시양태에서, 표적화 모이어티는 표적화제에 존재하는 아지드-모이어티와 스페이서 그룹(예를 들어, DBCO, BCN)의 한쪽 말단에 있는 알킨 함유 그룹과의 반응 및 덴드리머에 부착된 테트라진 모이어티와 스페이서 그룹(예를 들어, 트랜스 사이클로옥텐)의 다른 쪽 말단에 있는 변형된 알켄 그룹과의 반응에 의해 형성되는 스페이서 그룹을 통해 덴드리머에 연결될 수 있다.

[0164]

표적화제 전구체는 스페이서 그룹으로의 표적화제의 부착을 형성하기 위해 스페이서 그룹 전구체와 반응한다. 표적화제 전구체에 스페이서 그룹 전구체를 부착하는 수단은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 표적화제 전구체로의 공유 부착 부위는 시스테인 잔기, 라이신 잔기, C-말단 아미노산 잔기, N-말단 아민, 티로신 잔기, 탄수화물, 적합한 비천연 아미노산 잔기, 또는 트랜스아미나제 또는 인식 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 표적화제 전구체와 같은 단백질로의 공유 부착을 위한 결합 부위는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Milla P., 등, 2012). 예를 들어, 스페이서 그룹 전구체는 표적화제의 C-말단에서 표적화제 전구체와 반응하여 스페이서 그룹이 상기 C-말단을 통해 표적화제에 부착되도록 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 표적화제의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 부착된다. 한 실시양태에서, 표적화제는 표적화제의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 공유적으로 부착되거나 연결된다.

[0165]

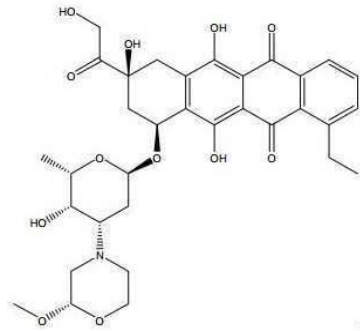
치료제

[0166]

본원에 사용된 용어 "치료제"는 생체 내에서, 예를 들어, HER-2 발현 암세포에 대해 치료 효과를 발휘하는 작용제를 지칭한다. 치료제의 예는 화학요법제로도 지칭되는 항암제, 항종양제(anti-neoplastic agent) 및 세포독성제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포독성제이다. 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 화학요법 특성을 나타내는 작용제를 지칭한다. 항암제의 예는 DNA 알킬화제 및 가교제(예를 들어, 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin)과 같은 백금 함유 제제), PARP(폴리 ADP 리보스 폴리머라제) 억제제와 같은 DNA 손상 작용제(예를 들어, 올라파립(olaparib), 루카파립(rucaparib), 니라파립(niraparib), 탈라조파립(talazoparib)), 항미세소관제(예를 들어, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 카바지탁셀(cabazitaxel)), 토포이소머라제 억제제(예를 들어, 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), SN-38, 네모루비신(nemorubicin)), 프로테아좀(proteasome) 억제제(예를 들어, 보르테조미(bortezomib)), 티로신 단백질 키나제 억제제(예를 들어, 이마티닙(imatinib), 닐로티닙(nilotinib)), EGF 수용체 억제제(예를 들어, 게피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib)), 세포독성 항생제(예를 들어, 안트라사이클린(anthracycline), 블레오마이신(bleomycin)), 리보뉴클레오타이드 환원효소 억제제(예를 들어, 겐시타빈(gemcitabine)), 항대사물질(예를 들어, 메토크세이트(methotrexate), 페메트렉세이트(pemetrexate) 및 항유사분열제(anti-mitotic agents)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 항암제는 치료 목적으로(즉, 암 환자의 고통을 없애기 위해) 암을 치료하거나 환자에게 더 나은 질과 연장된 수명을 제공

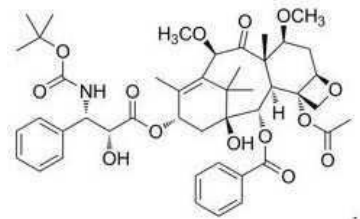
하기 위해 증상을 감소/완화하기 위해 사용될 수 있다. 항암제는 암의 다른 비화학요법적 치료(즉, 방사선 요법, 수술/생검)와 함께 사용될 수 있다.

[0167] 한 실시양태에서, 세포독성제는 네모루비신이다. 네모루비신의 구조는 다음과 같다:



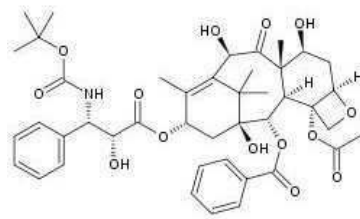
[0168]

[0169] 한 실시양태에서, 세포독성제는 카바지탁셀이다. 카바지탁셀의 구조는 다음과 같다:



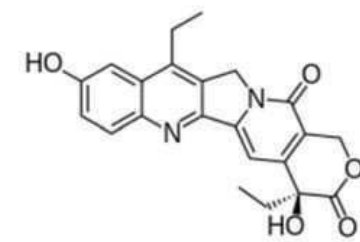
[0170]

[0171] 한 실시양태에서, 세포독성제는 도세탁셀이다. 도세탁셀의 구조는 다음과 같다:



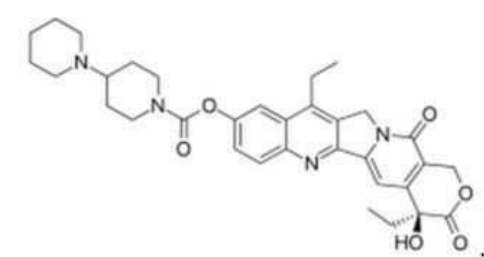
[0172]

[0173] 한 실시양태에서, 세포독성제는 SN-38이다. SN-38의 구조는 다음과 같다:



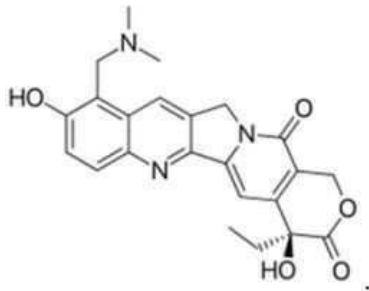
[0174]

[0175] 한 실시양태에서, 세포독성제는 이리노테칸이다. 이리노테칸의 구조는 다음과 같다:



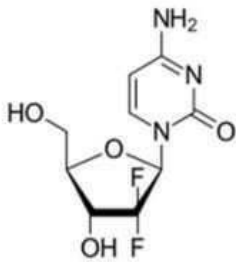
[0176]

[0177] 한 실시양태에서, 세포독성제는 토포테칸이다. 토포테칸의 구조는 다음과 같다:



[0178]

[0179] 한 실시양태에서, 세포독성제는 켄시타빈이다. 켄시타빈의 구조는 다음과 같다:



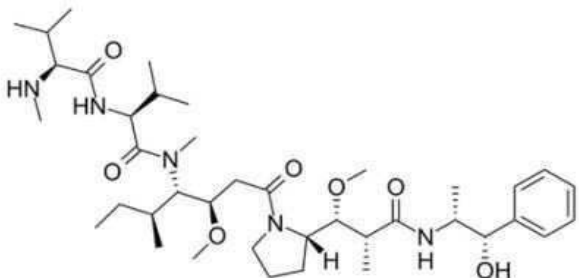
[0180]

[0181] 일부 실시양태에서, 치료제는 초세포독성제이다. 본원에 사용된 용어 "초세포독성제"는 매우 강력한 화학요법 특성을 나타내지만 그 자체가 항암제로서 단독으로 투여하기에는 너무 독성이 있는 제제를 지칭한다. 즉, 초세포독성제는 화학요법적 특성을 나타내지만 일반적으로 유해한 독성 부작용이 화학요법적 이점보다 크기 때문에 대상체에게 안전하게 투여될 수 없다.

[0182] 초세포독성제는 특히, 예를 들어, 네모루비신, 돌라스타틴(dolastatin)(예를 들어, 돌라스타틴-10, 돌라스타틴-15), 아우리스타틴(예를 들어, 모노메틸 아우리스타틴-E, 모노메틸 아우리스타틴-F), 메이탄시노이드(예를 들어, 메이탄신(maytansine), 메르탄신/엠탄신(mertansine/emtansine)(DM1), 라브탄신(ravtansine)(DM4)), 칼리키아마이신(calicheamicin)(예를 들어, 칼리키아마이신 γ1), 에스페라마이신(esperamicin)(예를 들어, 에스페라마이신 A1) 및 피롤로벤조디아제핀(PDB)을 포함한다.

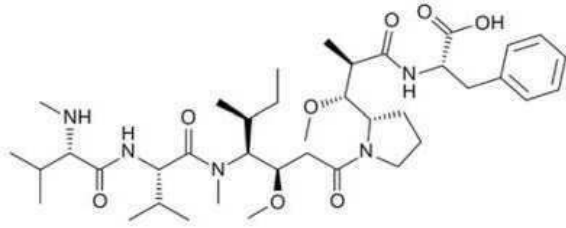
[0183] 일부 실시양태에서, 치료제는 아우리스타틴이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 모노메틸 아우리스타틴이다. 한 실시양태에서, 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 한 실시양태에서, 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)이다. MMAE와 MMAF는 모두 튜불린(tubulin)의 중합을 차단하여 세포 분열을 억제하는 것으로 이해된다.

[0184] MMAE의 화학 구조는 다음과 같다:



[0185]

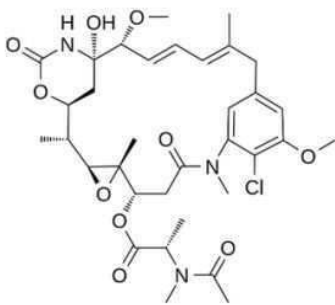
[0186] MMAF의 화학 구조는 다음과 같다:



[0187]

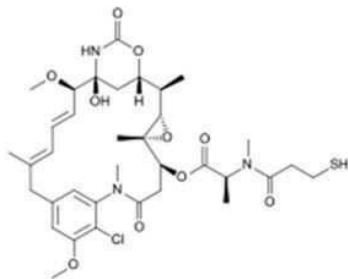
[0188] 일부 실시양태에서, 초세포독성제는 메이탄시노이드이다. 한 실시양태에서, 초세포독성제는 메이탄신이다. 한 실시양태에서, 초세포독성제는 안사미토신(ansamitocin)이다. 한 실시양태에서, 초세포독성제는 엠탄신/메르탄신(DM1)이다. 한 실시양태에서, 초세포독성제는 라브탄신(DM4)이다. 메이탄시노이드는 튜불린에 결합하여 미세소관의 조립을 억제하는 것으로 이해된다.

[0189] 메이탄신의 화학 구조는 다음과 같다:



[0190]

[0191] 엠탄신/메르탄신의 화학 구조는 다음과 같다:



[0192]

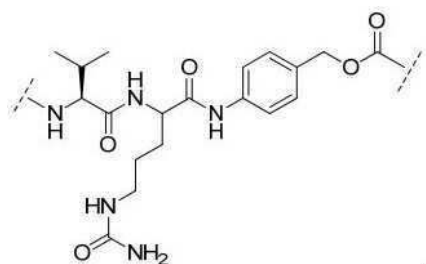
[0193] 일부 실시양태에서, 초세포독성은 암 세포주(예를 들어, SKBR3 및/또는 HEK293 세포 및/또는 MCF7 세포)에 대한 시험관 내 IC_{50} 이 100nM 미만, 또는 10nM 미만, 또는 5nM 미만, 또는 3nM 미만, 또는 2nM 미만, 또는 1nM 미만, 또는 0.5nM 미만이다. MMAE 및 엠탄신의 시험관 내 활성은 각각 Abdollahpour-Alitappeh 등 (2017) 및 Oroudjev 등 (2010)에 논의되어 있다.

[0194] 덴드리머-표적화제 접합체는 표적화제당 치료제의 분포를 가질 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 덴드리머-표적화제 접합체는 표적화제당 최대 약 8개의 치료제, 또는 그 이상도 가질 수 있다.

[0195] 이것으로부터, 각각의 덴드리머-표적화제 접합 종에 대한 치료제 대 표적화제 비율(DTR)은 집단에 걸쳐 변할 수 있음이 이해될 것이다. 전형적으로, DTR이 높은 덴드리머-표적화제 접합체를 생성하는 것이 바람직하다. 일반적으로 이것은 더 효과적인 치료를 초래한다. 그러나, 예를 들어, 치료제가 초세포독성제인 경우와 같이 너무 높은 DTR은 바람직하지 않은 독성을 초래할 수 있다.

[0196] 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 DTR이 2 초과이다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 DTR이 4 초과이다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 DTR이 8 초과이다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 DTR이 14 초과이다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 DTR이 26 초과이다.

- [0197] 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 DTR이 약 1 내지 약 32이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 DTR이 약 7 내지 약 32이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G5 텐드리머이고 DTR이 약 26 내지 약 32이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G4 텐드리머이고 DTR이 약 14 내지 약 16이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G3 텐드리머이고 DTR이 약 6 내지 약 8이다.
- [0198] 하나 초과 표적화제가 텐드리머에 접합되는 경우, DTR은 표적화제만을 갖는 텐드리머-표적화제 접합체에 비해 감소될 것이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 DTR이 약 2 내지 약 16이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 DTR이 약 8 내지 약 16이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G5 텐드리머이고 DTR이 약 4 내지 약 16이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G5 텐드리머이고 DTR이 약 6 내지 약 16이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G4 텐드리머이고 DTR이 약 4 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G4 텐드리머이고 DTR이 약 4 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 G3 텐드리머이고 DTR이 약 2 내지 약 4이다.
- [0199] 하나 초과 치료제를 운반할 수 있는 텐드리머-치료제의 능력 때문에 초세포독성제의 필요성을 없애는 것이 가능할 수 있다. 예를 들어, 단일 텐드리머에 도세탁셀과 같은 다중 세포독성제의 전달을 표적화하는 능력은, 예를 들어, MMAE와 같은 단일 초세포독성제의 전달과 비교할 때 그만큼 치료적으로 효과적일 수 있거나 그 이상일 수 있다. 초세포독성 물질을 피하는 것이 유리할 수 있다.
- [0200] 링커
- [0201] 일부 실시양태에서, 치료제는 링커를 통해 텐드리머에 부착된다. 링커는 바람직하게는 치료제의 유리한 특성을 유지해야 하고, 전신 순환에서 실질적으로 온전하고 무독성으로 남아 있어야 한다. 링커 그룹은, 예를 들어, 약 제학적 활성제에서 사용 가능한 작용기가 빌딩 단위에 직접 부착하기에 적합하지 않은 경우, 예를 들어 약제학적 활성제를 텐드리머에 부착하기에 적합한 그룹을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 링커 그룹은 또한 텐드리머 스캐폴드로부터 약제학적 활성제의 제어 방출을 촉진하여 적절한(예를 들어, 연장된) 기간 동안 약제학적 활성제의 치료적 유효 농도 및 바람직한 약동학적 프로파일을 제공할 수 있거나 또는 대신에 제공하는 데 사용할 수 있다.
- [0202] 링커의 한쪽 말단은 치료제에 부착되고 링커의 다른 쪽 말단은 텐드리머에 부착된다. 텐드리머로의 링커의 부착 지점은, 예를 들어, 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 대한 것일 수 있다.
- [0203] 당해 분야의 숙련가는 다양한 적합한 링커 중 임의의 하나가 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 링커는 전신 순환 동안 충분한 안정성을 제공해야 하지만 작용 부위에서 활성 형태의 세포독성 약물의 신속하고 효율적인 방출을 허용하는데, 예를 들어, 일단 암세포로 내재화된다.
- [0204] 링커는 절단 불가능한 또는 절단 가능한 링커일 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 절단 불가능한 링커이다. 한 실시양태에서, 링커는 절단 가능한 링커이다. 절단 가능한 링커는 그 자체로 또는 약제학적 활성제와의 연결된 것으로 다음 절단 가능한 모이어티 중 하나 이상을 포함한다: 에스테르 그룹, 하이드라존 그룹, 옥심 그룹, 이민 그룹 또는 디설파이드 그룹. 일부 실시양태에서, 링커는 중앙 환경 절단 가능하거나, 산 불안정하거나, 환원 환경 불안정하거나, 가수분해 불안정하거나 프로테아제 민감성이다.
- [0205] 화학적으로 불안정한 링커는 산 불안정 링커(즉, 하이드라존) 및 디설파이드 링커를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 효소적으로 절단 가능한 링커는 펩타이드 링커 및 β -글루쿠로나이드 링커를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 펩타이드 링커의 예는 Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Phe-Cit, Val-Arg, Val-Cit, Ala-Arg 및 Ala-Cit을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 펩타이드 링커 및 이들의 펩타이드 결합은 리소좀 단백질분해 효소가 혈액에서 활성이 매우 낮기 때문에 유리하게 양호한 혈청 안정성을 가질 것으로 예상된다. Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Phe-Cit, Val-Arg, Val-Cit, Ala-Arg 및 Ala-Cit 링커는 카텝신(Cathepsin) B에 의해 빠르게 가수분해된다. 일부 실시양태에서, 링커는 효소적으로 절단 가능한 링커이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 링커는 효소에 의해 인식되고 절단될 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0206] 일부 실시양태에서, 링커는 펩타이드 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는, 예를 들어, 아래 구조를 갖는 발린-시트룰린-파라아미노벤질 알코올 함유 그룹(Val-Cit-PAB)을 포함한다:



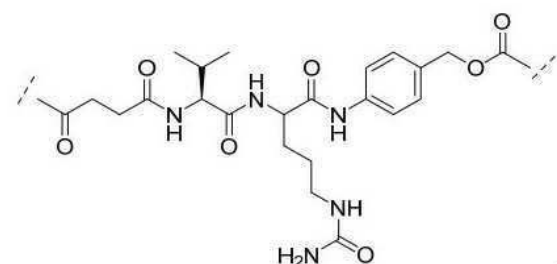
[0207]

[0208]

예를 들어, PAB 그룹은 카보닐 그룹을 통해 치료제 모이어티에 존재하는 아민 그룹에 공유적으로 부착되어 카바메이트 결합을 형성할 수 있고, 발린 아미노 그룹 및 외부 빌딩 단위에 존재하는 아민 그룹과의 아마이드 결합을 형성하는 디아실 링커를 통해 외부 빌딩 단위에 존재하는 아민 그룹에 부착될 수 있다.

[0209]

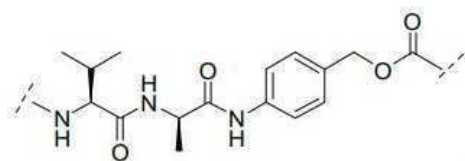
일부 실시양태에서, 링커는, 예를 들어, 아래 구조를 갖는 글루타르산-발린-시트룰린-파라아미노벤질 알코올 그룹을 포함하거나 이로 이루어진다:



[0210]

[0211]

일부 실시양태에서, 링커는, 예를 들어, 아래 구조를 갖는 발린-알라닌-파라아미노벤질 알코올 그룹을 포함하거나 이로 이루어진다:



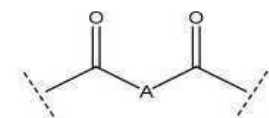
[0212]

[0213]

일부 실시양태에서, 약제학적 활성제는 하이드록실 그룹을 포함하고, 약제학적 활성제의 잔기는 하이드록실 그룹의 산소 원자를 통해 링커에 부착된다. 이 접근법은 에스테르 그룹을 통해 링커에 부착할 수 있게 하고, 이러한 에스테르 그룹은 생체 내에서 절단 가능하여 원하는 속도로 약제학적 활성제를 방출할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0214]

일부 실시양태에서, 코어 단위는 아미노 그룹을 포함하는 코어 단위 전구체로부터 형성되고, 빌딩 단위는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이고, 약제학적 활성제는 하이드록실 그룹을 포함하고, 약제학적 활성제의 잔기는 하이드록실 그룹의 산소 원자를 통해 부착되고, 절단 가능한 링커는 디아실 링커로, 약제학적 활성제의 잔기와 링커 사이에 에스테르 결합이 있고, 링커와 최외곽 빌딩 단위에 존재하는 질소 원자 사이에 아마이드 결합이 존재한다. 일부 실시양태에서, 약제학적 활성제는 하이드록실 그룹을 포함하고, 약제학적 활성제의 잔기는 하이드록실 그룹의 산소 원자를 통해 부착되고, 절단 가능한 링커는 아래 화학식의 디아실 링커 그룹이다:



[0215]

, 여기서 A는 O, S, S-S, NH 또는 N(Me)가 개재된 C_2-C_{10} 알킬렌 그룹이거나, A는 테트라하이드로푸란, 테트라하이드로티오펜, 피롤리딘 및 N-메틸피롤리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로사이클이다.

[0216]

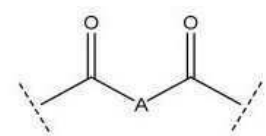
본원에 사용된 용어 "알킬"은 1가 직쇄(즉, 선형) 또는 분지형 포화 탄화수소 그룹을 지칭한다. 한 예에서, 알킬 그룹은 1 내지 10개의 탄소 원자를 포함한다(즉, C_{1-10} 알킬). 한 예에서, 알킬 그룹은 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다(즉, C_{1-6} 알킬). 알킬 그룹의 예는 메틸, 에틸, 프로필(예를 들어, n-프로필, 이소프로필), 부틸

(예를 들어, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸), 펜틸 및 헥실 그룹을 포함한다.

[0217] 본원에 사용된 용어 "알킬렌"은 2가 직쇄(즉, 선형) 또는 분지형 포화 탄화수소 그룹을 지칭한다. 한 예에서, 알킬렌 그룹은 2 내지 10개의 탄소 원자를 포함한다(즉, C₂₋₁₀ 알킬렌). 한 예에서, 알킬렌 그룹은 2 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다(즉, C₂₋₆ 알킬렌). 알킬렌 그룹의 예는, 예를 들어, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂- 등을 포함한다.

[0218] 이러한 링커는 치료제에 존재하는 하이드록실 그룹을 통해 치료제에 연결하는 데 특히 적합하다. 이러한 경우에, 접합체는 링커와 치료제 모이어티 사이에 에스테르 결합을 함유하고, 링커와 텐드리머 모이어티 사이에 아마이드 결합을 함유한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 약제학적 활성제는 하이드록실 그룹을 포함하고, 약제학적 활성제의 잔기는 하이드록실 그룹의 산소 원자를 통해 부착되고, 절단 가능한 링커는 아래 화학식의 디아실 링커 그룹이다:



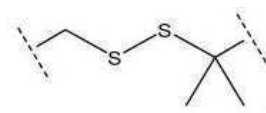
[0220] , 여기서 A는 O, S, NH 또는 N(Me)가 개재된 C₂₋₁₀ 알킬렌 그룹이다.

[0221] 일부 실시양태에서, 약제학적 활성제는 하이드록실 그룹을 포함하고, 약제학적 활성제의 잔기는 하이드록실 그룹의 산소 원자를 통해 부착되고, 디아실 링커는



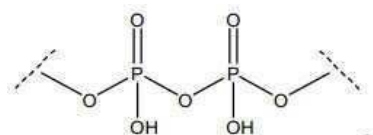
[0222] 절단 가능한 링커의 특정 유형은 디설파이드 모이어티를 포함하는 것이다. 이러한 링커는 글루타티온에 의해 절단되기 쉽다. 예를 들어, 이러한 유형의 링커는 디설파이드 모이어티에 의해 방해된 알킬 쇄를 통해 연결된 2개의 아실 그룹을 포함할 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 링커는 디설파이드 모이어티에 의해 방해된 알킬 쇄를 포함하고, 여기서 디설파이드 그룹 옆에 있는 탄소 원자 중 하나 또는 둘 모두가 하나 이상의 메틸 그룹으로 치환된다. 예를 들어, 디설파이드 모이어티 옆에 있는 탄소 원자 중 하나는 gem-디메틸 그룹으로 치환될 수 있는데, 예를 들어, 링커는 아래 그룹을 포함할 수 있다:



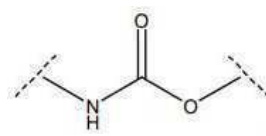
[0224]

[0225] 절단 가능한 링커의 또 다른 특정 유형은 디포스페이트 모이어티를 함유하는 것이다. 이러한 링커는 리소좀 산 피로포스파타제 및 산 포스파타제 효소에 의해 가수분해되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 링커는 아래 피로포스페이트 모이어티라고도 하는 디포스페이트 모이어티에 의해 방해된 알킬 쇄를 포함한다:



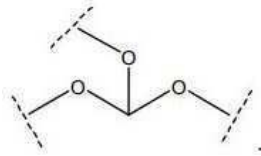
[0226]

[0227] 절단 가능한 링커의 또 다른 특정 유형은 카바메이트 모이어티를 함유하는 것이다. 이러한 링커는 활성화 이전에 가수분해 안정성이 높고 상이한 분자 내 메커니즘에 의해 효율적으로 절단된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아래 카바메이트 모이어티에 의해 방해된 알킬 쇄를 포함한다:



[0228]

[0229] 절단 가능한 링커의 또 다른 특정 유형은 아래 오르토에스테르 모이어티를 함유하는 것이다:



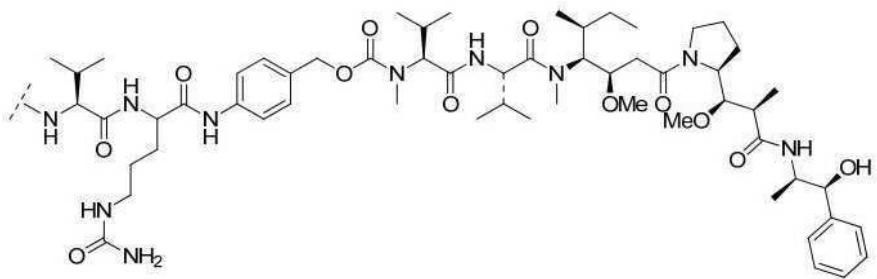
[0230]

[0231] 절단 불가능한 링커는 필요한 기간 동안 생체 내 조건에 노출 시 절단에 대해 불활성이거나 실질적으로 불활성인 연결 그룹이다. 절단 불가능한 링커는 생물학적 조건에서 절단되지 않는다.

[0232] 예로는 알킬렌 또는 사이클로알킬렌 그룹, 예를 들어, C_{1-10} 알킬렌 그룹 또는 C_{3-10} 사이클로알킬렌 그룹에 의해 가교된 디아실 링커가 포함된다. 절단 불가능한 링커의 추가 예는 티오에테르 링커를 포함한다. 절단 불가능한 링커의 구체적인 예는 SMCC(석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트)를 사용하여 형성된 것이다. SMCC는 말레이미드 작용기를 치료제 모이어티에 존재하는 티올 그룹과 반응시키는 데 사용할 수 있거나 치료제 모이어티에 부착되어 티오에테르 결합을 형성한다. 카복실산 작용기는 외부 빌딩 단위에 존재하는 아미노 그룹과 반응하는 데 사용될 수 있다.

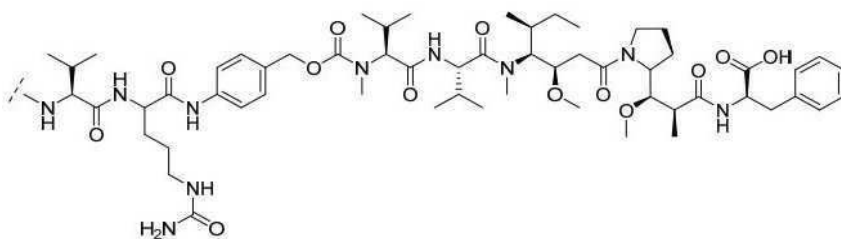
[0233] 일부 실시양태에서, 링커는 Val-Cit-PAB 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 Val-Arg-PAB 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 Val-Arg-트리거 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 Val-Ala-PAB-P-트리거 그룹이다. 일부 실시양태에서, 링커는 Val-Ala-PNB-P 그룹이다.

[0234] 한 실시양태에서, 링커는 Val-Cit-PAB 그룹을 포함하고, 치료제 모이어티는 MMAE이고, Val-Cit-PAB 그룹은 다음과 같이 치료제 모이어티에 부착된다(즉, Val-Cit-PAB-MMAE):



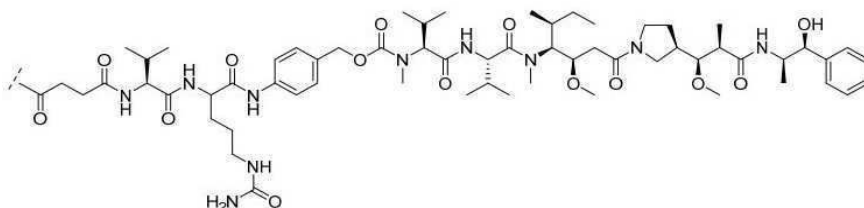
[0235]

[0236] 한 실시양태에서, 링커는 Val-Cit-PAB 그룹이고, 치료제 모이어티는 MMAF이고, Val-Cit-PAB 그룹은 다음과 같이 치료제 모이어티에 부착된다(즉, Val-Cit-PAB-MMAF):



[0237]

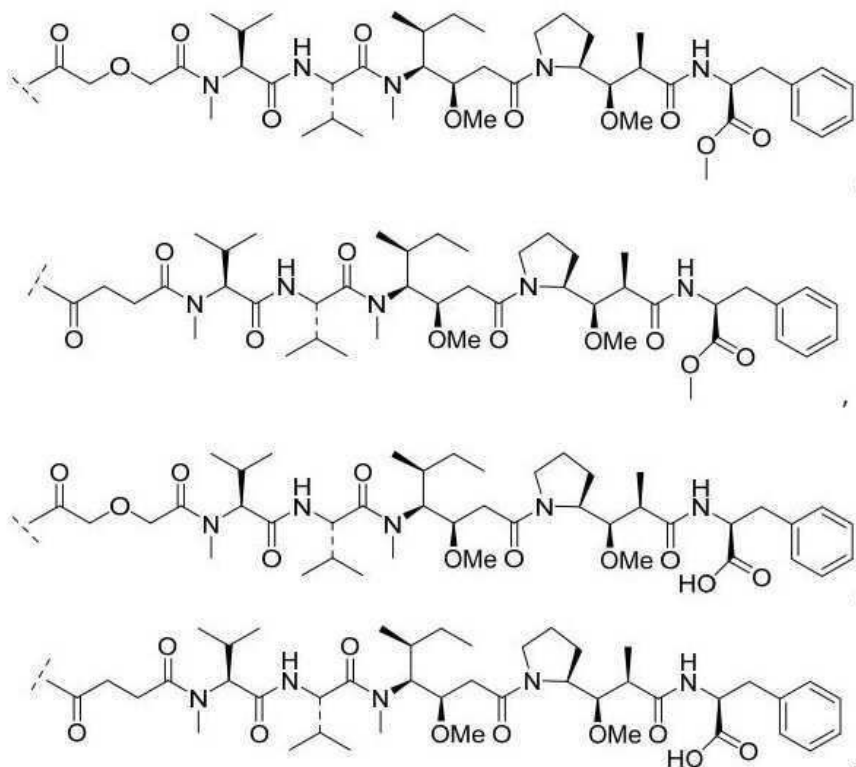
[0238] 한 실시양태에서, 링커는 글루타르산-Val-Cit-PAB 그룹을 포함하고, 치료제 모이어티는 MMAE이고, 글루타르산-Val-Cit-PAB 그룹은 다음과 같이 치료제 모이어티에 부착된다(즉, 글루타르산-Val-Cit-PAB-MMAE):



[0239]

[0240] 한 실시양태에서, 링커는 DGA(디글리콜산) 또는 글루타르산 그룹이고, 치료제 모이어티는 MMAF 또는 이의 에스

테르이며, 예를 들어, 다음과 같다:



[0241]

[0242]

일부 실시양태에서, 치료제는 커넥터 그룹을 통해 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된다. 예를 들어, 치료제는 링커 그룹 외에도 커넥터 그룹을 통해 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결될 수 있다. 커넥터 그룹은 치료제가 덴드리머의 표면으로부터 상이한 길이로 묶이도록 한다. 예를 들어, 커넥터 그룹은 덴드리머의 표면으로부터 치료제의 거리를 연장하기 위해 이용될 수 있다. 이것은 절단 가능한 링커에 대한 접근을 방지할 수 있고 표적과 상호작용하는 치료제의 능력을 감소시킬 수 있는 입체 장애와 관련된 모든 잠재적인 문제를 피할 수 있다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 링커 그룹 및 커넥터 그룹을 통해 덴드리머의 표면에 공유 연결된 치료제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 연결 순서는 덴드리머-커넥터-링커-치료제이다. 일부 실시양태에서, 연결 순서는 덴드리머-링커-커넥터-치료제이다.

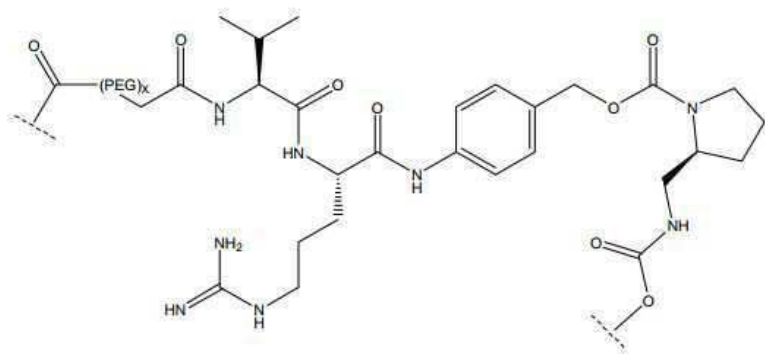
[0243]

커넥터 그룹은 덴드리머의 표면으로부터 치료제의 거리를 연장시키는 역할을 하는 임의의 화학적 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 하나 이상의 친수성 중합체성 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 약 1개 내지 약 50개의 친수성 중합체성 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 PEG 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 PEOX 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 폴리스arco신 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 커넥터 그룹은 1개 초과, 2개 초과, 4개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 300개 초과, 400개 초과, 500개 초과, 600개 초과, 700개 초과, 800개 초과, 900개 초과, 1000개 초과, 1500개 초과, 2000개 초과, 2500개 초과, 3000개 초과, 3500개 초과, 4000개 초과, 4500개 초과, 5000개 초과, 5500개 초과, 6000개 초과, 6500개 초과, 7000개 초과, 7500개 초과, 8000개 초과, 8500개 초과, 9000개 초과, 9500개 초과, 10000개 초과, 15000개 초과, 20000개 초과, 25000개 초과, 30000개 초과, 35000개 초과, 40000개 초과, 45000개 초과, 50000개 초과, 55000개 초과, 60000개 초과, 65000개 초과, 70000개 초과, 75000개 초과, 80000개 초과, 85000개 초과, 90000개 초과, 95000개 초과, 100000개 초과, 150000개 초과, 200000개 초과, 250000개 초과, 300000개 초과, 350000개 초과, 400000개 초과, 450000개 초과, 500000개 초과, 550000개 초과, 600000개 초과, 650000개 초과, 700000개 초과, 750000개 초과, 800000개 초과, 850000개 초과, 900000개 초과, 950000개 초과, 1000000개 초과, 1500000개 초과, 2000000개 초과, 2500000개 초과, 3000000개 초과, 3500000개 초과, 4000000개 초과, 4500000개 초과, 5000000개 초과, 5500000개 초과, 6000000개 초과, 6500000개 초과, 7000000개 초과, 7500000개 초과, 8000000개 초과, 8500000개 초과, 9000000개 초과, 9500000개 초과, 10000000개 초과, 15000000개 초과, 20000000개 초과, 25000000개 초과, 30000000개 초과, 35000000개 초과, 40000000개 초과, 45000000개 초과, 50000000개 초과, 55000000개 초과, 60000000개 초과, 65000000개 초과, 70000000개 초과, 75000000개 초과, 80000000개 초과, 85000000개 초과, 90000000개 초과, 95000000개 초과, 100000000개 초과, 150000000개 초과, 200000000개 초과, 250000000개 초과, 300000000개 초과, 350000000개 초과, 400000000개 초과, 450000000개 초과, 500000000개 초과, 550000000개 초과, 600000000개 초과, 650000000개 초과, 700000000개 초과, 750000000개 초과, 800000000개 초과, 850000000개 초과, 900000000개 초과, 950000000개 초과, 1000000000개 초과, 1500000000개 초과, 2000000000개 초과, 2500000000개 초과, 3000000000개 초과, 3500000000개 초과, 4000000000개 초과, 4500000000개 초과, 5000000000개 초과, 5500000000개 초과, 6000000000개 초과, 6500000000개 초과, 7000000000개 초과, 7500000000개 초과, 8000000000개 초과, 8500000000개 초과, 9000000000개 초과, 9500000000개 초과, 10000000000개 초과, 15000000000개 초과, 20000000000개 초과, 25000000000개 초과, 30000000000개 초과, 35000000000개 초과, 40000000000개 초과, 45000000000개 초과, 50000000000개 초과, 55000000000개 초과, 60000000000개 초과, 65000000000개 초과, 70000000000개 초과, 75000000000개 초과, 80000000000개 초과, 85000000000개 초과, 90000000000개 초과, 95000000000개 초과, 100000000000개 초과, 150000000000개 초과, 200000000000개 초과, 250000000000개 초과, 300000000000개 초과, 350000000000개 초과, 400000000000개 초과, 450000000000개 초과, 500000000000개 초과, 550000000000개 초과, 600000000000개 초과, 650000000000개 초과, 700000000000개 초과, 750000000000개 초과, 800000000000개 초과, 850000000000개 초과, 900000000000개 초과, 950000000000개 초과, 1000000000000개 초과, 1500000000000개 초과, 2000000000000개 초과, 2500000000000개 초과, 3000000000000개 초과, 3500000000000개 초과, 4000000000000개 초과, 4500000000000개 초과, 5000000000000개 초과, 5500000000000개 초과, 6000000000000개 초과, 6500000000000개 초과, 7000000000000개 초과, 7500000000000개 초과, 8000000000000개 초과, 8500000000000개 초과, 9000000000000개 초과, 9500000000000개 초과, 10000000000000개 초과, 15000000000000개 초과, 20000000000000개 초과, 25000000000000개 초과, 30000000000000개 초과, 35000000000000개 초과, 40000000000000개 초과, 45000000000000개 초과, 50000000000000개 초과, 55000000000000개 초과, 60000000000000개 초과, 65000000000000개 초과, 70000000000000개 초과, 75000000000000개 초과, 80000000000000개 초과, 85000000000000개 초과, 90000000000000개 초과, 95000000000000개 초과, 100000000000000개 초과, 150000000000000개 초과, 200000000000000개 초과, 250000000000000개 초과, 300000000000000개 초과, 350000000000000개 초과, 400000000000000개 초과, 450000000000000개 초과, 500000000000000개 초과, 550000000000000개 초과, 600000000000000개 초과, 650000000000000개 초과, 700000000000000개 초과, 750000000000000개 초과, 800000000000000개 초과, 850000000000000개 초과, 900000000000000개 초과, 950000000000000개 초과, 1000000000000000개 초과, 1500000000000000개 초과, 2000000000000000개 초과, 2500000000000000개 초과, 3000000000000000개 초과, 3500000000000000개 초과, 4000000000000000개 초과, 4500000000000000개 초과, 5000000000000000개 초과, 5500000000000000개 초과, 6000000000000000개 초과, 6500000000000000개 초과, 7000000000000000개 초과, 7500000000000000개 초과, 8000000000000000개 초과, 8500000000000000개 초과, 9000000000000000개 초과, 9500000000000000개 초과, 10000000000000000개 초과, 15000000000000000개 초과, 20000000000000000개 초과, 25000000000000000개 초과, 30000000000000000개 초과, 35000000000000000개 초과, 40000000000000000개 초과, 45000000000000000개 초과, 50000000000000000개 초과, 55000000000000000개 초과, 60000000000000000개 초과, 65000000000000000개 초과, 70000000000000000개 초과, 75000000000000000개 초과, 80000000000000000개 초과, 85000000000000000개 초과, 90000000000000000개 초과, 95000000000000000개 초과, 100000000000000000개 초과, 150000000000000000개 초과, 200000000000000000개 초과, 250000000000000000개 초과, 300000000000000000개 초과, 350000000000000000개 초과, 400000000000000000개 초과, 45000000000000000

[0244]

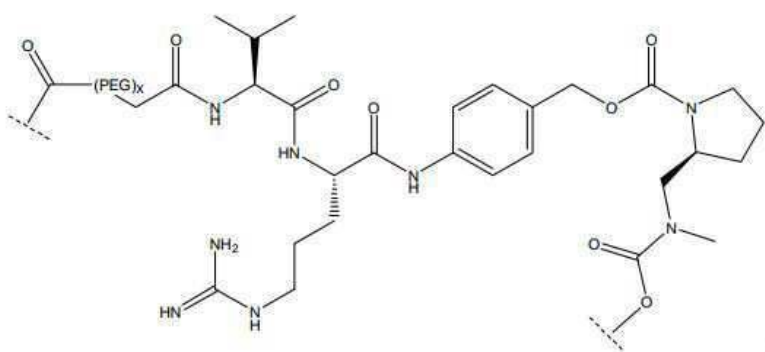
일부 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고 (PEG)_x-Val-Arg-PAB-P-트리거- 모이어티이다. X는 상술한 바와 같이 약 1과 약 50 사이의 수일 수 있다.

[0245] 한 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고, $(\text{PEG})_9\text{-Val-Arg-PAB-P-트리거-NHCO}$ 모이어티이다:



[0246]

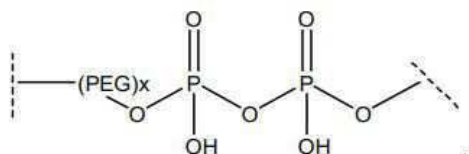
[0247] 한 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고, $(\text{PEG})_9\text{-Val-Arg-PAB-P-트리거-N(CH}_3\text{)CO}$ 모이어티이다:



[0248]

[0249] 일부 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고, $(\text{PEG})_x\text{-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-}$ 모이어티이다. 다시, X는 상술한 바와 같이 약 1과 약 50 사이의 수일 수 있다.

[0250] 한 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고, $(\text{PEG})_x\text{-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-}$ 모이어티이다:



[0251]

[0252] 일부 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고 $(\text{PEG})_x\text{-Val-Ala-PAB-P-트리거-}$ 모이어티이다. X는 상술한 바와 같이 약 1과 약 50 사이의 수일 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 커넥터 그룹을 포함하고 $(\text{PEG})_9\text{-Val-Ala-PAB-P-트리거-NHCO}$ 모이어티이다.

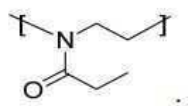
[0253] 예를 들어, $(\text{PEG})_x\text{-Val-Arg-PAB-P-트리거-}$ 또는 $(\text{PEG})_x\text{-OP(O)OH-OP(O)OH-O-}$ 와 같은 특정 링커의 사용은 치료제의 방출을 제공할 수 있다.

[0254] $(\text{PEG})_x\text{-Val-Arg-PAB-P-트리거-NHCO}$, 예를 들어 $(\text{PEG})_x\text{-Val-Arg-PAB-P-트리거-N(CH}_3\text{)CO}$ 의 경우, 링커는 초기에 자가 희생(self immolative) 2-(아미노메틸)피롤리딘 커넥터를 드러내는 카텝신 B와 같은 세포 효소에 의한 디펩타이드 부분의 절단에 의해 활성화된다. 분자내 고리화 후 하이드록실 함유 치료제의 제거가 발생한다. 예시적인 하이드록실 함유 치료제는 카바지탁셀, 도세탁셀 및 SN-38을 포함한다.

[0255] $(\text{PEG})_x\text{-OP(O)OH-OP(O)OH-O-}$ 모이어티의 경우, 링커는 카바지탁셀, 도세탁셀 및 SN-38과 같은 하이드록실 함유 약물을 제공하기 위해 특이적이고 깨끗하게 절단되지만 또한, 예를 들어, 젬시타빈과 같은 뉴클레오타이드 억제제의 활성 중인 약물 모노포스페이트를 제공하는 추가 이점이 있다.

[0256] 약동학적 변형 그룹

- [0257] 접합체는 접합체의 약동학적 특성을 개선할 수 있는 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 복수의 친수성 중합체성 그룹을 포함한다. 친수성 중합체성 그룹은, 예를 들어, 개선된 약동학적 특성을 제공할 수 있다.
- [0258] 일부 실시양태에서, 텐드리머는 텐드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 복수의 친수성 중합체성 그룹을 포함한다. 용어 "친수성 중합체성 그룹"은 전형적으로 25℃에서 수 중 용해도가 적어도 25 mg/mL, 더욱 바람직하게는 적어도 50 mg/mL, 더욱 더 바람직하게는 적어도 100 mg/mL인 중합체성 그룹을 지칭한다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 아미노산, 알킬옥시 또는 알킬(아실)아미노 그룹의 반복 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 사르코신과 같은 아미노산의 반복 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 알킬옥시 그룹의 반복 단위를 포함한다(예를 들어, 상기 친수성 중합체는 PEG 그룹임). 일부 실시양태에서 친수성 중합체는 알킬(아실)아미노 그룹의 반복 단위를 포함한다(예를 들어, 상기 친수성 중합체는 PEOX 그룹임).
- [0260] 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 적어도 10개의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 100개 이하의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 10개 내지 100개, 또는 10개 내지 50개의 단량체 단위를 포함한다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 PEG 그룹이다. PEG 그룹은 폴리에틸렌 글리콜 그룹, 즉 화학식 $-CH_2CH_2O-$ 의 반복 단위를 포함하는 그룹이다. 본 개시내용의 텐드리머를 생성하는 데 사용되는 PEG 물질은 전형적으로 분자량에 약간의 변동(즉, $\pm 10\%$)이 있는 PEG의 혼합물을 함유하므로, 분자량이 명시되는 경우 전형적으로 PEG 조성물의 평균 분자량의 근사치이다. 예를 들어, 용어 "PEG-₂₁₀₀"은 평균 분자량이 약 2100달톤, 즉 $\pm$ 약 10%인 폴리에틸렌 글리콜을 지칭한다(PEG₁₈₉₀ 내지 PEG₂₃₁₀). 용어 "PEG-₂₃₀₀"은 평균 분자량이 약 2300달톤, 즉 $\pm$ 약 10%인 폴리에틸렌 글리콜을 지칭한다(PEG₂₀₇₀ 내지 PEG₂₅₃₀). MW 평균을 계산하는 데 통상 수 평균, 중량 평균 및 z-평균 분자량의 세 가지 방법이 사용된다. 본원에 사용된 "분자량"이라는 문구는 NMR, 질량 분석법, MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight), 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 액체 크로마토그래피 기술, 광산란 기술, 초원심분리(ultracentrifugation) 및 점도측정법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 측정할 수 있는 중량 평균 분자량을 지칭한다.
- [0262] 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 500 내지 2500달톤 범위이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 800 내지 1200달톤 범위이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 900 내지 1100달톤 범위이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 1500 내지 2500달톤 범위이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 1900 내지 2300달톤 범위이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 2100 내지 2500달톤 범위이다.
- [0263] 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 약 1100달톤이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 약 2000달톤이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 평균 분자량이 약 800, 약 900, 약 1000, 약 1100, 약 1200, 약 1300, 약 1400, 약 1500, 약 1600, 약 1700, 약 1800, 약 1900, 약 2000, 약 2100, 약 2200, 약 2300, 약 2400 또는 약 2500달톤이다.
- [0264] 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 다분산 지수(polydispersity index, PDI)가 약 1.00 내지 약 1.50, 약 1.00 내지 약 1.25, 또는 약 1.00 내지 약 1.10이다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 다분산 지수(PDI)가 약 1.05이다. 용어 "다분산 지수"는 주어진 중합체 샘플에서 분자 질량 분포의 척도를 지칭한다. 다분산 지수(PDI)는 중량 평균 분자량(Mw)을 수평균 분자량(Mn)으로 나눈 값과 같으며 중합체 배치에서 개별 분자 질량의 분포를 나타낸다. 다분산 지수(PDI)는 1 이상의 값이지만 중합체가 균일한 변화 길이와 평균 분자량에 가까워질수록 다분산 지수(PDI)는 1에 가까워질 것이다.
- [0265] PEG 그룹은 선형 또는 분지형일 수 있다. 원하는 경우 말단 캡핑된 PEG 그룹을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG 그룹은 메톡시 말단 PEG이다.
- [0266] 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 PEOX 그룹이다. 일부 실시양태에서, 텐드리머는 텐드리머 모이어티의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 복수의 PEOX 그룹을 포함한다. PEOX 그룹은 폴리에틸옥사졸린 그룹, 즉 아래 화학식의 반복 단위를 포함하는 그룹이다:



[0267]

[0268]

PEOX 그룹은 에틸옥사졸린의 중합에 의해 생성될 수 있기 때문에 그렇게 명명되었다. 본 발명의 덴드리머를 생산하는 데 사용되는 PEOX 물질은 전형적으로 분자량에 약간의 변동(즉, $\pm 10\%$)이 있는 PEOX의 혼합물을 함유하므로, 분자량이 지정되는 경우 전형적으로 PEOX 조성물의 평균 분자량의 근사치이다. 일부 실시양태에서, 제2 말단 그룹은 평균 분자량이 적어도 750달톤, 적어도 1000달톤, 또는 적어도 1500달톤인 PEOX 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 말단 그룹은 평균 분자량이 750달톤 내지 2500달톤, 또는 1000달톤 내지 2000달톤 범위인 PEOX 그룹을 포함한다. 원하는 경우 말단 캡핑된 PEOX 그룹을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, PEOX 그룹은 메톡시 말단 PEOX이다.

[0269]

일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 폴리스arco신 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리스arco신 그룹은 평균 분자량이 적어도 750달톤, 적어도 1000달톤, 또는 적어도 1500달톤이다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 평균 분자량이 750달톤 내지 2500달톤, 또는 1000달톤 내지 2000달톤 범위인 폴리스arco신 그룹을 포함한다.

[0270]

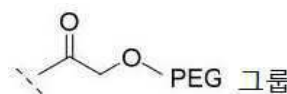
친수성 중합체성 그룹은 임의의 적합한 수단을 통해 외부 빌딩 단위에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 그룹이 친수성 중합체성 그룹을 외부 빌딩 단위에 부착하는 데 사용된다.

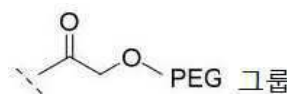
[0271]

친수성 중합체성 그룹은 전형적으로 반응성 아실 그룹(아미드 결합을 형성할 수 있음) 또는 알데히드(환원성 아민화 조건하에 아민 그룹을 형성할 수 있음)와 같은 아민 그룹과 반응성인 반응성 그룹을 함유하는 전구체의 사용을 통해 부착된다.

[0272]

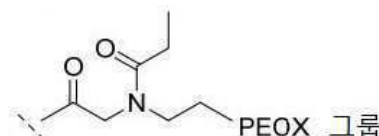
일부 실시양태에서, PEG 그룹은 PEG 그룹에 존재하는 탄소 원자와 PEG 연결 그룹에 존재하는 산소 원자 사이에 형성된 에테르 연결을 통해 PEG 연결 그룹(L1)에 공유적으로 부착되고, 각각의 PEG 그룹은 빌딩 단위에 존재하는 질소 원자와 PEG 연결 그룹에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 빌딩 단위

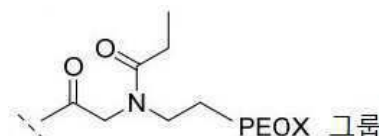


에 공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, L1-PEG 그룹은 각각  이고, 여기서 PEG 그룹은 평균 분자량이 약 500 내지 2500달톤 범위인 메톡시 말단 PEG이다.

[0273]

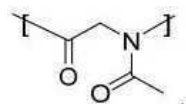
일부 실시양태에서, PEOX 그룹은 PEOX 그룹에 존재하는 질소 원자와 PEOX 연결 그룹에 존재하는 탄소 원자 사이에 형성된 연결을 통해 PEOX 연결 그룹(L1')에 공유적으로 부착되고, 각각의 PEOX 그룹은 빌딩 단위에 존재하는 질소 원자와 PEOX 연결 그룹에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 빌딩 단위



공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, L1'-PEOX 그룹은 각각  이다.

[0274]

일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 폴리스arco신 그룹, 즉 아래 화학식의 반복 단위를 포함하는 그룹을 포함한다:



[0275]

[0276]

일부 실시양태에서, 폴리스arco신 그룹은 빌딩 단위에 존재하는 질소 원자와 폴리스arco신 그룹에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 빌딩 단위에 부착된다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 그룹은 평균 분자량이 적어도 750달톤, 적어도 1000달톤, 또는 적어도 1500달톤인 폴리스arco신 그룹을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 말단 그룹은 평균 분자량이 750달톤 내지 2500달톤, 또는 1000달톤 내지 2000달톤 범위인 폴리스arco신 그룹을 포함한다.

[0277]

많은 경우에, 덴드리머 표면에서 작용화된 덴드리머 집단은 무작위 화학량론과 작용기 위상(topology)을 함유한다. 예를 들어, 하나 이상의 반응성 작용기를 가진 64개의 반응성 표면 그룹을 함유하는 덴드리머-표적화제 집

단은 다양한 작용화된 텐드리머 집단을 생성할 수 있으며, 일부 텐드리머는 다른 것보다 더 많은 수의 작용기를 함유한다. 반응성 작용기와 반응할 수 있는 상이한 표면 그룹이 여러 개 있는 경우 표면 위상이 다른 넓은 분포의 텐드리머도 수득할 수 있다.

[0278] 본 발명의 텐드리머-표적화제 접합체, 중간체 및 공정은 표면 빌딩 단위로의 공유 부착을 통해 치료제의 높은 로딩을 허용할 수 있다. 이러한 텐드리머-표적화제 접합체는 또한 투여 후 장기간에 걸쳐 방출되는 치료제의 치료적 유효 수준을 촉진하는 것으로 간주될 수 있고, 따라서 필요한 투여의 빈도 및/또는 횟수를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 텐드리머-표적화제 접합체는 또한 치료제의 작용 부위로의 표적화된 전달을 허용할 수 있다. 결과적으로, 이러한 텐드리머-표적화제 모이어티 작용제는 세포독성 활성화와 같은 표적외 활성을 감소시킬 수 있다.

[0279] *텐드리머-표적화제 접합체의 내재화*

[0280] 텐드리머-표적화제 접합체는 표적화된 항암 치료법을 제공한다. 상기 접합체의 유일한 특성은 적어도 부분적으로 MMAE 치료제를 함유하는 예시적인 접합체의 표적 세포 내로의 관찰된 신속한 내재화와 관련된 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 HER2 발현 세포 내에 내재화된다.

[0281] 본원에 사용된 용어 "내재화"는 텐드리머-표적화제 접합체의 세포 내로의 엔도시토시스(endocytosis)를 지칭한다. 텐드리머-표적화제 접합체가 표적 HER2 발현 암세포에서 HER2 수용체를 특이적으로 찾아 결합하고 빠르게 내재화되는 능력은 감소된 양의 접합체가 혈장에서 순환하고 있음을 의미한다. 따라서, MMAE와 같은 초세포독성 모이어티와 같은 치료제가 HER2가 과발현되는 부위(예를 들어, 종양 세포)가 아닌 다른 부위에서 텐드리머-표적화제 접합체로부터 원치 않게 절단될 기회가 줄고, 대상체에서 치료제의 비특이적 방출과 관련된 부작용 또는 독성의 가능성이 감소된다. 대조적으로, 초세포독성 모이어티와 같은 치료제의 등가 용량 투여는 상기 치료제 단독으로 안전하게 투여될 수 없는 지점까지 극도의 독성을 유발할 수 있다. 예를 들어, MMAE 및 MMAF는 대상체에게 단독으로 안전하게 투여하기에는 너무 독성이 있는 것으로 이해된다. 따라서, 텐드리머-표적화제 접합체는 MMAE 및 MMAF를 포함하는 초세포독성제와 같은 치료제를 전달하기 위한 더욱 안전한 수단을 제공하는 것으로 간주된다.

[0282] 일부 실시양태에서, 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 감소된 부작용을 제공한다. 일부 실시양태에서, 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제 투여와 비교하여 치료제의 혈장 농도(예를 들어, C_{max}, 또는 투여 후 특정 시점(예를 들어, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간)에서의 농도)에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 90% 감소를 제공한다.

[0283] 일부 실시양태에서, 치료제는 초세포독성(예를 들어, MMAE, MMAF)이고, 텐드리머-표적화제 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제 투여와 비교하여 치료제의 혈장 농도(예를 들어, C_{max}, 또는 투여 후 특정 시점(예를 들어, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간)에서의 농도)에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 감소를 제공한다.

[0284] 따라서, 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 HER2 발현 세포와 접촉시켜 상기 접합체가 세포 내에 내재화되도록 함으로써 치료제가 HER2 발현 세포를 사멸시키는 것을 포함하는, HER2 발현 세포를 사멸시키는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 초세포독성(예를 들어, MMAE, MMAF)이다. 일부 실시양태에서, 접합체(예를 들어, 초세포독성 함유 접합체)는 엔도시토시스를 통해 세포 내로 내재화된다.

[0285] 본 개시내용의 접합체는 생체 내 암 연구, 즉 이종이식 연구에서 효과적인 것으로 밝혀졌다. 비교적 작은 크기(예를 들어, 전체 접합체의 분자량이 낮음)는 종양 조직으로의 침투를 돕고 치료의 효과를 돕는 것으로 간주된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 접합체의 분자량은 약 120kDa 이하, 또는 약 100kDa 이하, 또는 약 80kDa 이하, 또는 약 60kDa 이하, 또는 약 50kDa 이하, 또는 약 45kDa 이하, 또는 약 40kDa 이하의 범위이다.

[0286] *조성물*

[0287] 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 조성물, 바람직하게는 약제학적 조성물로서 제공된다.

[0288] 텐드리머를 생산하기 위한 합성 공정의 특성의 결과로서 주어진 조성물에 존재하는 텐드리머-표적화제 접합체 사이의 분자 조성에 약간의 변동이 있을 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 상기 논의한 바와 같이 텐드리머-표적화제 접합체를 생성하는 데 사용되는 하나 이상의 합성 단계가 완전히 완료되지 않을 수 있으며, 이는 모두 동일한 수의 치료제 모이어티, 표적화제를 포함하지는 않거나 불완전한 세대의 빌딩 단위를 함유하는 텐드리머-표적화제 접합체의 존재를 초래할 수 있다.

- [0289] 한 예에서, 조성물은 모두 동일한 수의 치료제 모이어티를 포함하지는 않는 복수의 덴드리머를 포함한다. 한 예에서, 조성물은 모두 동일한 수의 표적화제를 포함하지는 않는 복수의 덴드리머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1.2이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1 내지 1.5이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1 내지 4이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1 내지 5이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 복수의 덴드리머-표적화제 접합체를 포함하며, 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 표적화제의 평균 수는 1 내지 1.5이다. 따라서, 복수의 덴드리머-표적화제 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물이 제공되며, 상기 덴드리머-표적화제 접합체는 본원에 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체 및 치료적으로 허용되는 부형제를 포함하는 치료 용도를 위한 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 비경구 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 정맥 내 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 피하 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 근육 내 주사용으로 제형화된다.
- [0290] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 및 선택적으로 임의의 다른 치료적 성분, 안정화제 등과 함께 포함하는, 수의학적 및 인간 의학적 용도 둘 다를 위한 약제학적 제형 또는 조성물을 제공한다.
- [0291] 따라서, i) 본원에 정의된 바와 같은 접합체; 및 ii) 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 약제학적 용도를 위한 조성물이 제공된다.
- [0292] 부형제(들)는 제형/조성물의 다른 성분과 상용성이고 그의 수용자에게 과도하게 해롭지 않다는 의미에서 약제학적으로 허용 가능해야 한다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 조성물은 주사용수 및/또는 약제학적으로 허용되는 유기 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 용매를 포함한다.
- [0294] 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어, 중합체성 부형제/첨가제 또는 담체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 유도체화된 셀룰로스, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 피콜(Ficoll)(중합체성 당), 하이드록시에틸전분(HES), 텍스트레이트(예를 들어, 사이클로텍스트린, 예컨대 2-하이드록시프로필- β -사이클로텍스트린 및 설포부틸에테르- β -사이클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜 및 펙틴을 포함할 수 있다.
- [0295] 조성물은 회석제, 완충제, 시트레이트, 트레할로스, 결합제, 붕해제, 증점제, 윤활제, 방부제(산화방지제 포함), 무기염(예를 들어, 염화나트륨), 항균제(예를 들어, 벤즈알코늄 클로라이드), 감미제, 대전방지제, 소르비탄 에스테르, 지질(예를 들어, 레시틴 및 기타 포스파티딜콜린과 같은 인지질, 포스파티딜에탄올아민, 지방산 및 지방 에스테르, 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤)), 및 킬레이트제(예를 들어, EDTA, 아연 및 기타 적절한 양이온)을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따른 조성물에 사용하기에 적합한 기타 약제학적 부형제 및/또는 첨가제는 "Remington: Science & Practice of Pharmacy", 19.sup.th ed., Williams & Williams, (1995), 및 "Physician's Desk Reference", 52.sup.nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998) 및 "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Third Ed., Ed. A. H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000에 열거되어 있다.
- [0296] 본 개시내용의 덴드리머-표적화제 접합체는, 예를 들어, 에어로졸, 또는 비경구(복막 내, 정맥 내, 피하 또는 근육 내 주사 포함) 투여에 의해 폐로의 흡입에 적합한 것을 포함하는 조성물로 제형화될 수 있다. 상기 조성물은 단위 투여형으로 편리하게 제공될 수 있고 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 모든 방법에는 덴드리머-표적화제 접합체를 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 회합시키는 단계가 포함된다. 일반적으로, 상기 조성물은 덴드리머-표적화제 접합체를 액체 담체와 회합시켜 용액 또는 현탁액을 형성하거나 대안적으로 덴드리머-표적화제 접합체를 고체, 선택적으로 미립자 제품을 형성하기에 적합한 제형 성분과 회합시키고, 이어서 정당한 경우 상기 제품을 원하는 전달 형태로 성형함으로써 제조된다. 본 개시내용의 고체 제형은 미립자인 경우, 전형적으로 크기가 약 1나노미터 내지 약 500마이크론 범위인 입자를 포함할 것이다. 일반적으로, 정맥 내 투여를 위한 고체 제형의 경우, 입자는 일반적으로 지름이 약 1nm 내지 약 10마이크론 범위

일 것이다. 상기 조성물은 입자 지름이 1000nm 미만, 예를 들어, 5 내지 1000nm, 특히 5 내지 500nm, 더욱 특히 5 내지 400nm, 예컨대 5 내지 50nm, 특히 5 내지 20nm인 나노입자인 본 개시내용의 텐드리머-표적화 모이어티 접합체를 함유할 수 있다. 한 예에서, 상기 조성물은 평균 크기가 5 내지 20nm인 텐드리머-표적화 모이어티 접합체를 함유한다. 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화 모이어티 접합체는 1.01 내지 1.8, 특히 1.01 내지 1.5, 더욱 특히 1.01 내지 1.2의 PDI로 상기 조성물에 다분산된다. 한 예에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 상기 조성물에 단분산된다.

- [0297] 일부 바람직한 실시양태에서, 상기 조성물은 비경구 전달을 위해 제형화된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제형은 주사 전에 수성 비히클로 재구성하기에 적합한 동결건조된 멸균 조성물일 수 있다.
- [0298] 일부 실시양태에서, 비경구 투여에 적합한 제형은 편리하게는, 예를 들어, 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 제형화될 수 있는 텐드리머-표적화제 접합체의 멸균 수성 제제를 포함한다.
- [0299] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 화학요법 요법(regimen)의 일부로서 비경구 주입을 위해 제형화된다.
- [0300] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 복막 내 전달을 위해 제형화된다. 임의의 적절한 전달 수단이 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 전달은 세척(lavage) 또는 에어로졸에 의한 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 조성물은 복막 내 전달을 위해 제형화되고, 악성 상피 종양(예를 들어, 난소암), 및 복막 암종증(peritoneal carcinomatosis)(예를 들어, 위장관암, 특히 결장직장암, 위암, 부인과암(gynecologic cancers) 및 원발성 복막 신생물)을 포함하는, 복막강의 암 치료를 위한 것이다.
- [0301] 흡입에 의한 에어로졸 투여에 적합한 약제학적 제형도 제공된다. 이들 제형은 원하는 텐드리머 또는 이의 염의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 원하는 제형을 작은 챔버에 넣고 분무할 수 있다. 분무는 압축 공기 또는 초음파 에너지에 의해 수행되어 텐드리머 또는 이의 염을 포함하는 복수의 액적 또는 고체 입자를 형성할 수 있다.
- [0302] 아래에 논의되는 바와 같이, 본 개시내용의 텐드리머-표적화제 접합체는, 예를 들어, 하나 이상의 추가의 약제학적 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 텐드리머-표적화제 접합체는 추가의 약제학적 활성제와 함께 조성물로 투여될 수 있다.
- [0303] 추가의 약제학적 활성제의 예는 화학요법제 및 세포독성제, 소분자 세포독성제, 티로신 키나제 억제제, 체크포인트 억제제, EGFR 억제제, 항체 요법, 타산 및 아로마타제 억제제를 포함한다.
- [0304] 본 개시내용의 텐드리머-표적화제 접합체는 다른 화학요법 약물과 함께 투여될 수 있을 뿐만 아니라 적절하게 다른 약물과 함께 조성물로 투여될 수도 있다.
- [0305] *사용 방법*
- [0306] 암의 치료가 필요한 대상체에게 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 또한 본원에 제공된다.
- [0307] 암 치료용 약제의 제조에 있어서 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 포함하는 조성물의 용도가 또한 본원에 제공된다.
- [0308] 치료(therapy)에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본원에 제공된다. 암 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 접합체 또는 본원에 정의된 바와 같은 접합체를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본원에 제공된다.
- [0309] 일부 실시양태에서, 텐드리머-표적화제 접합체는 암을 치료 또는 예방하는, 예를 들어, 종양의 성장을 억제하는 방법에 사용된다. 일부 실시양태에서 텐드리머-표적화제 접합체는 암 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 암은 원발성 또는 전이성 종양일 수 있다. 일부 실시양태에서 암은 원발성 종양이다. 일부 실시양태에서 암은 전이성 종양이다.
- [0311] 일부 실시양태에서, 암은 HER2(ERBB2로도 지칭됨)의 비정상 또는 과발현을 특징으로 한다. 이러한 HER2의 비정상 또는 과발현은, 예를 들어, 유방암, 고환암, 난소암, 위암(stomach cancer), 폐의 선암종(adenocarcinomas), 위암(gastric cancer), 췌장암, 타액관 암종(salivary duct carcinoma), 식도암 및 자궁암(예를 들어, 자궁 장액성 자궁내막암종(uterine serous endometrial carcinoma))에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 고환암, 난소암, 위암(stomach cancer), 폐의 선암종, 위암(gastric

cancer), 췌장암, 타액관 암종, 식도암 및 자궁암(예를 들어, 자궁 장액성 자궁내막암종)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 고환암이다. 일부 실시양태에서, 암은 난소암이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암(stomach cancer)이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐의 선암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암(gastric cancer)이다. 일부 실시양태에서, 암은 췌장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 타액관 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 식도암이다. 일부 실시양태에서, 암은 자궁암이다.

[0312] 따라서, 암이 난소암, 유방암, 위암(stomach cancer), 자궁암 또는 HER2(즉, ERBB2)의 비정상 또는 과발현을 특징으로 하는 다른 암으로 이루어진 군으로부터 선택된, 사용을 위한 방법, 용도, 덴드리머-표적화제 접합체 또는 조성물이 또한 제공된다.

[0313] 조합

[0314] 약물은 특히 화학요법 동안 다른 약물과 함께 투여되는 경우가 많다. 따라서, 일부 실시양태에서 덴드리머-표적화제 접합체는 하나 이상의 추가의 약제학적 활성제, 예를 들어, 하나 이상의 추가의 항암제/약물과 조합하여 투여된다. 덴드리머-표적화제 접합체 및 하나 이상의 추가의 약제학적 활성제는 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 이들은 동일한 조성물의 일부로서 또는 별도의 조성물의 투여에 의해 투여될 수 있다. 하나 이상의 추가의 약제학적 활성제는, 예를 들어, 결장직장암, 위암(stomach cancer), 췌장암, 전립선암 또는 유방암의 치료를 위한 항암제일 수 있다. 추가의 약제학적 활성제의 예는 화학요법제 및 세포독성제, 소분자 세포독성제, 티로신 키나제 억제제, 체크포인트 억제제, EGFR 억제제, 항체 요법, 타크산 및 아로마타제 억제제를 포함한다.

[0315] 용량

[0316] 용어 "치료적 유효량"은 치료되는 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화하거나 예방하기에 충분한 양으로 투여되는 덴드리머-표적화제 접합체를 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 덴드리머-표적화제 접합체의 치료적 유효량은, 예를 들어, 투여된 덴드리머-표적화제 접합체의 양을 기준으로 언급될 수 있다. 대안적으로, 덴드리머-표적화제 접합체가 이론적으로 전달할 수 있는 치료제의 양을 기반으로, 예를 들어, 덴드리머-표적화제 접합체에 대한 치료제의 로딩을 기반으로 결정될 수 있다.

[0317] 덴드리머-표적화제 접합체는, 예를 들어, 덴드리머-표적화제 접합체가 정맥 내 투여될 수 있는 것을 포함한 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 IV 볼루스로 전달된다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 0.5 내지 60분 범위, 또는 0.5 내지 15분 범위, 또는 0.5 내지 5분 범위의 기간에 걸쳐 IV 투여된다. 다른 예에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 복막 내 투여될 수 있다. 투여 경로는, 예를 들어, 대상체가 가지고 있는 질환 또는 장애를 표적으로 할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 상기 질환 또는 장애는 부인과암 또는 위장관암과 같은 복부 내 악성 종양일 수 있고, 덴드리머-표적화제 접합체가 복막 내 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서 덴드리머-표적화제 접합체는 복막강암, 예를 들어, 악성 상피 종양(예를 들어, 난소암) 또는 복막 암종증(예를 들어, 위장관암, 특히 결장직장암, 위암(gastric cancer), 부인과암 및 원발성 복막 신생물)의 치료를 위한 것일 수 있고 덴드리머-표적화 모이어티 접합체가 복막 내 투여된다.

[0318] 일부 실시양태에서, 투여되는 덴드리머-표적화제 접합체의 양은 2 내지 100mg의 활성제/m², 2 내지 50mg의 활성제/m², 2 내지 40mg의 활성제/m², 2 내지 30mg의 활성제/m², 2 내지 25mg의 활성제/m², 2 내지 20mg의 활성제/m², 5 내지 50mg의 활성제/m², 10 내지 40mg의 활성제/m², 15 내지 35mg의 활성제/m², 10 내지 20mg/m², 20 내지 30mg/m², 또는 25 내지 35mg의 활성제/m²를 전달하기에 충분하다. 마우스에서 10mg/kg의 활성제 용량은 인간의 30mg/m² 용량과 거의 동일하다(FDA 지침 2005). (인간 mg/kg 용량을 mg/m²로 변환하기 위해 수치에 37을 곱할 수 있음, FDA 지침 2005).

[0319] 일부 실시양태에서, 치료적 유효량의 덴드리머-표적화제 접합체는 이것이 필요한 대상체에게 미리 결정된 빈도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 덴드리머-표적화제 접합체가 1주 내지 4주에 1회 투여되는 투여 요법에 따라 이것이 필요한 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는 덴드리머-표적화제 접합체가 3 내지 4주에 1회 투여되는 투여 요법에 따라 이것이 필요한 대상체에게 투여된다.

[0320] 본 개시내용의 표적화된 접합체는 조절된 방식으로 치료제를 제공한다. 접합체로부터 치료제의 방출을 제어함으로써, 순환 치료제(예를 들어, 초세포독성)의 수준도 제어될 수 있다. 예를 들어, 치료제의 최대 혈장 농도는

등가량의 유리 치료제를 투여한 결과보다 상당히 낮을 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 방출된 치료제의 최대 혈장 농도에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 또는 적어도 80% 감소를 초래한다.

[0321] **접합체의 제조**

[0322] 덴드리머-표적화제는 실시예에 기재된 것과 같은 임의의 적합한 합성 경로를 사용하여 제조될 수 있다.

[0323] 일부 실시양태에서, 덴드리머-표적화제 접합체는:

[0324] 분자량이 약 80kDa 이하이고 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제를 포함하는 제1 중간체로서, 상기 표적화제는 스페이서 전구체 그룹에 공유적으로 부착되고, 상기 스페이서 전구체 그룹은 제1 반응성 그룹을 포함하는 제1 중간체를

[0325] i) 코어 단위(C); 및

[0326] ii) 빌딩 단위(BU)를 포함하는 덴드리머로서, 각각의 빌딩 단위는 라이신 잔기 또는 이의 유사체이고;

[0327] 상기 코어 단위는 아마이드 결합을 통해 적어도 2개의 빌딩 단위에 공유적으로 부착되고, 각각의 아마이드 결합은 상기 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성되는 덴드리머인 제2 중간체;

[0328] 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제; 및

[0329] 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 친수성 중합체성 그룹과 반응시키는 것을 포함하는 방법으로서,

[0330] 제2 중간체는 제2 반응성 그룹을 포함하며,

[0331] 상기 제1 및 제2 반응성 그룹은 HER2 표적화제를 덴드리머에 공유적으로 연결하도록 서로 반응에 적합하도록 상호보적인, 방법에 의해 생성된다.

[0332] 본 개시내용은 또한 덴드리머-표적화제 접합체의 합성에 유용한 중간체를 제공한다. 따라서, 분자량이 약 80kDa 이하이고 항원 결합 부위를 포함하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제를 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체의 제조를 위한 중간체도 제공되며, 상기 표적화제는 공유결합 스페이서 전구체 그룹에 부착되고, 상기 스페이서 전구체 그룹은 덴드리머 중간체에 존재하는 상보적 반응성 그룹과의 반응에 적합한 반응성 그룹을 포함한다.

[0333] 일부 실시양태에서, 표적화제는 비천연 아미노산 잔기를 통해 스페이서 전구체 그룹에 공유적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 트리아졸 모이어티(예를 들어, 아지도페닐알라닌과 같은 아지도 함유 비천연 아미노산과 DBCO[디벤질사이클로옥틴]와 같은 알킨 함유 그룹과의 반응에 의해 생성됨)를 통해 스페이서 전구체 그룹에 공유적으로 부착된다.

[0334] 일부 실시양태에서, 스페이서 전구체 그룹은 PEG, PEOX 또는 폴리아미노산(예를 들어, 폴리스arco신) 그룹과 같은 하나 이상의 올리고머 또는 중합체성 그룹을 포함한다. 예를 들어, 2개 내지 100개의 $-CH_2CH_2O-$ 단위로 된 PEG 그룹을 포함할 수 있다.

[0335] 일부 실시양태에서, 스페이서 전구체 그룹에 존재하는 반응성 그룹은 알켄 그룹, 예를 들어, 테트라진 함유 그룹과의 반응에 적합한 반응성 알켄이다. 일부 실시양태에서, 반응성 그룹은 트랜스-사이클로옥텐 그룹이다.

[0336] 본 개시내용은 또한 아래의 번호가 매겨진 항목에 관한 것이다:

[0337] 1. 다음을 포함하는 덴드리머-표적화제 접합체:

[0338] a) i) 코어 단위(C); 및

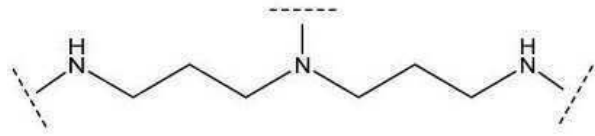
[0339] ii) 빌딩 단위(BU)로서, 각각의 빌딩 단위가 라이신 잔기 또는 이의 유사체인 빌딩 단위(BU)를 포함하는 덴드리머로서,

[0340] 상기 코어 단위는 아마이드 결합을 통해 적어도 2개의 빌딩 단위에 공유적으로 부착되고, 각각의 아마이드 결합은 상기 코어 단위에 존재하는 질소 원자와 빌딩 단위에 존재하는 아실 그룹의 탄소 원자 사이에 형성되는 덴드리머;

[0341] b) 분자량이 약 80kDa 이하이고 스페이서 그룹에 의해 상기 덴드리머에 공유적으로 연결된 항원 결합 부위를 포

합하는 펩타이드 모이어티인 HER2 표적화제;

- [0342] c) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 치료제; 및
- [0343] d) 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 PEG 또는 PEOX 그룹.
- [0344] 2. 항목 1에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 중쇄 항체, Fab, Fv, scFv 또는 단일 도메인 항체로부터 선택되는 집합체.
- [0345] 3. 항목 1 또는 항목 2에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 중쇄 가변(V_H) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진 집합체.
- [0346] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 펩타이드 모이어티는 경쇄 가변(V_L) 도메인을 포함하거나 이로 이루어진 집합체.
- [0347] 5. 항목 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 30kDa인 집합체.
- [0348] 6. 항목 5에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 5kDa 내지 약 15kDa인 집합체.
- [0349] 7. 항목 6에 있어서, 상기 표적화제는 분자량이 약 10kDa 내지 약 16kDa인 집합체.
- [0350] 8. 항목 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화제는 120개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 집합체.
- [0351] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화제는 본원에 정의된 바와 같은 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하거나 이로 이루어진 집합체.
- [0352] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화제와 상기 스페이서 그룹 사이의 공유적 연결은 표적화제 전구체에 존재하는 상보적 반응성 작용기와 스페이서 그룹 전구체 사이의 반응에 의해 형성된 것인 집합체.
- [0353] 11. 항목 10에 있어서, 상기 표적화제 전구체는 비천연 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 비천연 아미노산 잔기는 반응성 작용기를 포함하는 측쇄를 갖는 집합체.
- [0354] 12. 항목 11에 있어서, 상기 비천연 아미노산 잔기는 4-아지도페닐알라닌 잔기인 집합체.
- [0355] 13. 항목 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화제는 상기 표적화제의 C-말단을 통해 스페이서 그룹에 공유적으로 연결된 집합체.
- [0356] 14. 항목 10 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 스페이서 그룹 전구체는 알킨 그룹인 반응성 작용기를 포함하는 집합체.
- [0357] 15. 항목 14에 있어서, 상기 알킨 그룹은 디벤조사이클로옥틴 그룹인 집합체.
- [0358] 16. 항목 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제는 초세포독성제인 집합체.
- [0359] 17. 항목 16에 있어서, 상기 치료제는 아우리스타틴 또는 메이탄시노이드인 집합체.
- [0360] 18. 항목 17에 있어서, 상기 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 E인 집합체.
- [0361] 19. 항목 17에 있어서, 상기 치료제는 모노메틸 아우리스타틴 F인 집합체.
- [0362] 20. 항목 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제는 링커를 통해 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 집합체.
- [0363] 21. 항목 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료제는 절단 가능한 링커를 통해 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 집합체.
- [0364] 22. 항목 21에 있어서, 상기 절단 가능한 링커는 Val-Cit-PAB 그룹을 포함하는 집합체.
- [0365] 23. 항목 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 집합체는 상기 덴드리머의 표면 빌딩 단위에 공유적으로 연결된 PEG 그룹을 포함하는 집합체.
- [0366] 24. 항목 23에 있어서, 상기 PEG 그룹은 평균 분자량이 약 500 내지 약 2500g/mole 범위인 집합체.
- [0367] 25. 항목 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 스페이서 그룹은 PEG 그룹을 포함하는 집합체.
- [0368] 26. 항목 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 코어 단위는 아래 구조를 포함하는 집합체:



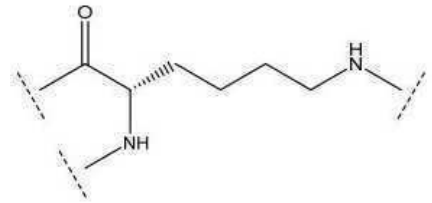
[0369]

[0370]

[0371]

27. 항목 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 덴드리머는 1세대 내지 5세대 빌딩 단위를 갖는 접합체.

28. 항목 27에 있어서, 상기 덴드리머는 3세대 빌딩 단위를 갖는 접합체.



[0372]

29. 항목 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 빌딩 단위는 각각
접합체.

인

[0373]

30. 항목 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 추가 활성제와 조합하여 투여하기 위한 접합체.

[0374]

31. 항목 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 접합체는 HER2 발현 세포 내에 내재화된 접합체.

[0375]

32. 항목 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 감소된 부작용을 초래하는 접합체.

[0376]

33. 항목 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 접합체의 투여는 등가 용량의 유리 치료제의 투여와 비교하여 방출된 치료제의 최대 혈장 농도에서 적어도 50% 감소를 초래하는 접합체.

[0377]

34. 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 복수의 접합체를 포함하는 조성물.

[0378]

35. i) 항목 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 접합체; 및

[0379]

ii) 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

[0380]

36. 항목 34 또는 35에 있어서, 비경구 전달용으로 제형화된 조성물.

[0381]

37. 암 치료에 사용하기 위한 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 따른 접합체 또는 항목 34 내지 36 중 어느 하나에 따른 조성물.

[0382]

38. 암의 치료가 필요한 대상체에게 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 따른 접합체 또는 항목 34 내지 37 중 어느 하나에 따른 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

[0383]

39. 암 치료용 약제의 제조에 있어서 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 따른 접합체 또는 항목 34 내지 38 중 어느 하나에 따른 조성물의 용도.

[0384]

40. 암이 난소암, 유방암, 위암(stomach cancer), 자궁암 또는 ERBB2 유전자의 비정상적 발현을 특징으로 하는 다른 암인, 항목 37 내지 39 중 어느 하나에 따른 사용을 위한 방법, 용도, 접합체 또는 조성물.

[0385]

41. 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 따른 접합체를 HER2 발현 세포와 접촉시켜 상기 접합체가 상기 세포 내에 내재화되도록 함으로써 치료제가 상기 HER2 발현 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, HER2 발현 세포를 사멸시키는 방법.

[0386]

본 개시내용은 아래 실시예에 의해 추가로 설명된다. 아래 설명은 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며 상기 설명과 관련하여 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

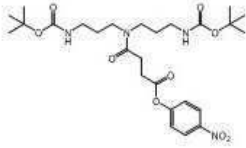
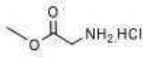
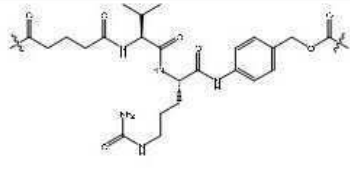
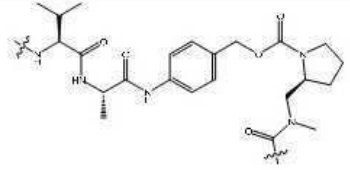
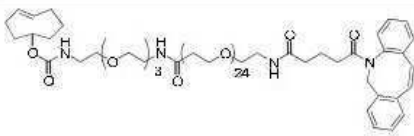
[0387]

실시예

[0388] 덴드리머 접합체 합성과 관련하여 아래 명명법이 본원에서 사용된다:

약어	명칭	구조 ¹
NEOEOEN	2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]- 에틸아민	
[Boc] NEOEOEN	t-부톡시카보닐아미노-3,6-옥사- -8-아미노옥탄	
Su(NPN) ₂		
Lys	라이신	
DBL-oPNP	디-Boc 라이신의 p-니트로페 닐 활성 에스테르	
NH ₂ .TFA	TFA 염으로서 탈보호된 분자의 표면 아민 그룹을 나타냄	
Boc	t-부톡시카보닐	
(NPN) ₂ [Boc] ₂		
HO-Su(NPN) ₂ [Boc] ₂		

[0389]

약어	명칭	구조 ¹
oPNPO-Su(NPN) ₂ [Boc] ₂		
MeOGly.HCl		
NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE 또는 NHGlu-vc-PAB-		
Val-Ala-PAB-P- 트리거- NMeCO		
DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ -TCO		

MeCN	아세토니트릴
LCMS	액체 크로마토그래피 질량 분석법
ESI MS	전자분무 질량 분석법
UPA	독특한 연결 지점
Lys	라이신

[0390]

Boc	벤질옥시카보닐
PBS	포스페이트 완충 식염수
DIPEA	디이소프로필에틸아민
PEG	폴리에틸렌 글리콜
NH-PEG NH-COPEG-OMe로도 알려짐	NH-CO폴리에틸렌 글리콜-OMe
PyBop	벤조트리아졸-1-일-옥시트리- 피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
SEC	크기 배제 크로마토그래피
TFA	트리플루오로아세트산
NMM	N-메틸모르폴린
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
DMF	디메틸포름아미드
DBL-oPNP	디-Boc-(L)-라이신 <i>para</i> -니트로페닐 에스테르
NHFmoc	NH-플루오레닐메틸옥시카보닐
NHBoc	NH-tert-부틸옥시카보닐
MMAE	모노-메틸 아우리스타틴 E
MMAF(OMe)	모노-메틸 아우리스타틴 F (메틸 에스테르)
N(PNBoc) ₂	디Boc 디프로필렌트리아민
TEA	트리에틸아민
NMR	핵자기공명
N ₂	질소

[0391]

D ₂ O	산화중수소
CD ₃ OD	중수소화 메탄올
Glu	글루탐산 유도체
Val	발린
Arg	아르기닌
Ala	알라닌
Cit	시트룰린
PAB	<i>p</i> -아미노벤질카바메이트
DGA	디글리콜산
R _t	머무름 시간
DMAP	4-(디메틸아미노)피리딘
NHS	N-하이드록시석신이미드
DCM	디클로로메탄
EtOAc	에틸 아세테이트
THF	테트라하이드로푸란
N ₃	아지드
MAL	말레이미드
BCN	바이사이클로노닌 함유 링커
MAL-EDA-BCN	말레이미도-에틸렌디아민-바이사이클로노닌
DBCO	디벤질사이클로옥틴 함유 링커
UPA	링커 또는 표적화제가 부착되거나 부착될 수 있는 선택된 연결 지점이 있는 덴드리머
BCN트리아졸로	바이사이클로[6,1,0]노닌-[1,2,3]트리아졸로

[0392]

DBCO트리아졸로	디벤조일사이클로옥틴-[1,2,3]트리아졸로
MPED	N-(3-말레이미도프로피온산)-에틸렌 디아민
DTX	도세탁셀
t-BuOH	3급 부탄올
TBTA	트리스[(1-벤질-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸]아민
DFO	데페록사민
CTX	카바지탁셀
SN-38	7-에틸-10-하이드록시캄포테킨

[0393]

[0394]

HPLC MS(질량 분석법) 및 NMR 장비 세부 정보:

[0395]

HPLC - 2996 다이오드 어레이 검출기(Diode Array Detector, DAD)가 있는 Waters 2795

[0396]

MS - ESI 프로브, MS에 약 50 μ L/분을 제공하는 입구 유동 스플리트(inlet flow split)가 있는 Waters ZQ4000.

[0397]

질량 스펙트럼 데이터는 표시된 대로 양성 또는 음성 전자분무 이온화 모드로 획득되었다. 원시 데이터(raw data)는 Waters Corporation에서 제공하는 MassLynx 소프트웨어 v4.0으로 구현된 최대 엔트로피 알고리즘(Maximum Entropy algorithm)(MaxEnt)을 사용하여 디콘볼루션(deconvolution)되었다. 실험 세부 사항에 보고된 데이터는 이론적인 제로 전하 상태로 디콘볼루션 후 관찰된 값에 해당한다

[0398]

NMR - 300MHz Bruker.

[0399]

카복시 반응성 텐드리머 스캐폴드의 제조는 이전에 특허 WO2007/082331, WO2008/017125, WO2012/167309 및 WO2015/184510에 기술되었다. 당해 분야의 숙련가는 이러한 방법을 사용하거나 조정하여 본원에 요약된 다양한 텐드리머를 제조할 수 있다.

[0400]

아래 실시예에서 공식의 [Lys]는 텐드리머의 표면층에 있는 라이신 빌딩 단위를 나타낸다.

[0401]

실시예 1

[0402]

일반 절차 A. Boc 탈보호

[0403]

물 중 Boc 화합물(1.0 당량)의 빙냉 교반 현탁액에 TFA(40-200 당량/Boc 그룹)를 첨가하였다. 5분 후, 빙욕(ice-bath)을 제거하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 남은 수용액을 물로 추가 희석하고 동결건조시켜 탈보호된 생성물을 정량적 수율로 얻었다.

[0404]

일반 절차 B. 텐드리머 표면에 라이신 층 첨가.

[0405]

질소 분위기 하에 DMF 중 TFA 텐드리머(1.0 당량)의 교반 용액에 TEA(6.0 당량/ NH_2), 이어서 DBL-oPNP(2.0 당량/ NH_2)를 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 표준 방법을 사용하여 정제하였다.

[0406]

일반 절차 C. HO-Lys-(α -NH₂Boc)(ϵ -NHPEG₁₀₀) 웨지를 사용한 텐드리머 표면의 폐길화.

[0407]

질소 분위기 하에 DMF 중 TFA 텐드리머(1.0 당량)의 교반 용액에 PyBOP(2.0 당량/ NH_2) 및 DIPEA(8.0 당량/ NH_2)를 첨가하였다. 10분 후, DMF 중 HO-Lys-(α -NH₂Boc)(ϵ -NHPEG₁₀₀)(1.35 당량/ NH_2)의 용액을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 표준 방법을 사용하여 정제하였다.

[0408]

일반 절차 D. HO-Lys-(α -NH₂Boc)(ϵ -NH₂Fmoc) 웨지로 텐드리머 표면의 캡핑 후 Fmoc 탈보호

- [0409] 단계 1: DMF 중 HO-Lys-(α -NH-Boc)(ϵ -NH-Fmoc)(1.5 당량/ NH_2) 및 NMM(2.5 당량/ NH_2)의 교반 용액에 PyBOP(1.4 당량/ NH_2)를 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반한 다음, DMF 중 TFA-테드리머(1.0 당량) 및 NMM(2.5 당량/ NH_2)의 용액을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반되도록 둔 다음, 빙냉 MeCN에 천천히 첨가하고 15분 동안 교반하였다. 생성된 고체를 여과로 수집하고 MeCN(3x)으로 세척한 다음 동결건조시켰다.
- [0410] 단계 2: DMF 중 Fmoc/Boc 테드리머(1.0 당량)의 용액에 피페리딘(21 당량/Fmoc)을 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 90분 동안 교반한 다음 빙냉 Et_2O 에 천천히 첨가하였다. 15분 후, 침전된 고체를 여과로 수집하고, Et_2O 로 세척하고, H_2O 에 용해시키고 동결건조시켰다.
- [0411] 일반 절차 E. DGA-독소루비신 또는 DGA-네모루비신으로 테드리머 표면 캡핑
- [0412] DGA-3'-NH-독소루비신
- [0413] 단계 1: DMF 중 DMAP(2.5 당량)의 용액을 실온에서 DMF 중 Dox.HCl(1.0 당량)의 교반 용액에 첨가하였다. 5분 후, DMF 중 DGA(0.9 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응은 3시간 만에 완료되었다.
- [0414] 단계 2: 상기 반응 혼합물에 PyBOP(2.0 당량/테드리머 NH_2)를 첨가한 다음, DMF 중 TFA-테드리머(아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₄ 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₈(1.0 당량) 및 DIPEA(6.0 당량/테드리머 NH_2)의 용액을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 SEC로 정제하였다.
- [0415] DGA-14-O-네모루비신
- [0416] 단계 1: DMF 중 DMAP(2.5 당량)의 용액을 실온에서 DMF 중 네모루비신(1.0 당량)의 교반 용액에 첨가하였다. 5분 후, DMF 중 DGA(0.9 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응은 3시간 만에 완료되었다.
- [0417] 단계 2: 상기 반응 혼합물에 PyBOP(2.0 당량/테드리머 NH_2)를 첨가한 다음, DMF 중 TFA-테드리머(아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₄ 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₈(1.0 당량) 및 DIPEA(6.0 당량/테드리머 NH_2)의 용액을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 SEC로 정제하였다.
- [0418] 일반 절차 F. Glu-vc-PAB-MMAE 또는 DGA-MMAF(OMe)로 테드리머 표면 캡핑
- [0419] 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG_{570/1100/2000})]₈(1.0 당량)을 실온에서 DMF와 NMM(5.0 당량/ NH_2)의 혼합물에 용해시켰다. 이 용액을 HO-Glu-vc-PAB-MMAE 또는 DGA-MMAF(OMe)(1.2 당량/ NH_2) 및 PyBOP(2.0 당량/ NH_2)에 첨가하고 실온에 두었다. 생성된 조 물질을 SEC로 정제하였다.
- [0420] 일반 절차 G. 애피바디의 Dox/Pt(IV)-아세테이트/MMAE/MMAF 테드리머로의 접합
- [0421] 단계 1: 애피바디 단백질 용액(1.0 mg/mL PBS)을 TCEP(50 mM, 39.0 당량)로 처리하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 650 rpm으로 진탕하였다. 생성된 용액을 SEC로 정제하였다.
- [0422] 단계 2: 수집된 투과물을 DMSO 중 말레이미드-바이사이클로[6.1.0]노닌(Mal-BCN)(20.0 당량)의 용액으로 처리하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 650 rpm으로 진탕하였다. 생성된 용액을 SEC로 정제하였다.
- [0423] 단계 3: 애피바디-BCN 용액을 PBS 중 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₄(858 μM) 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₈(PBS 중 580 μM) 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Pt(IV)-아세테이트)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₈(PBS 중 903 μM) 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Glu-vc-PAB-MMAE)(ϵ -NHPEG_{570/1100/2000})]₈(PBS 중 240 μM) 또는 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -DGA-MMAF(OMe))(ϵ -NHPEG_{570/1100/2000})]₈(PBS 중 365 μM)의 용액으로 처리하였다(1.3 당량 애피바디-BCN/테드리머). 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 650 rpm으로 진탕한 다음 DBCO 아가로스(5.0 당량/테드리머)의 9.38mM(30% EtOH/물) 용액으로 처리하였다. 후속 현탁액을 밤새 실온에서 1200 rpm으로 진탕하였다.

현탁액을 SEC를 사용하여 정제하였다.

[0424] 일반 절차 H. 나노바디의 MMAE 텐드리머로의 접합

[0425] 단계 1: 링커(1 mg)를 20:80(DMSO/10mM PBS, 1 mL)에 용해시켜 링커(BCN-PEG₂NH-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 또는 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO) 용액을 제조하였다.

[0426] 단계 2: TCO-링커 용액(1 당량)을 PBS(1) 중 테트라진 작용화된 텐드리머(예를 들어, Tz-MMAE-텐드리머 또는 BHA-Tz-MMAE-텐드리머)(1.0 당량, 8 mg/mL)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 방치하였다. 분홍색 테트라진 색상이 사라지면 반응이 완료되었음을 알 수 있다. 반응을 HPLC로 모니터링하였다.

[0427] 단계 3: 반응이 완료되면 내용물을 PBS와 함께 PBS(최종 부피 0.5 mL까지)로 희석하였다. BCN/DBCO-MMAE-텐드리머(1.0 당량)의 일부를 Tris 완충제(20mM, 1 mL) 중 나노바디-아지드(1.0 당량, 9.2 mg/mL)의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 7시간 동안 둔 다음, 4°C에서 밤새 두었다. 나노바디-텐드리머 작제물의 정제는 음이온 교환 크로마토그래피, 이어서 SEC로 수행하였다.

[0428] 실시예 1a 중간체의 합성

[0429] 1.1 아지도-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂] 화합물 1

[0430] N₂ 분위기 하에 DMF(20 mL) 중 아지도-PEG₂₄-산(2.00 g, 1.71 mmol) 및 PyBOP(1.33 g, 2.56 mmol)의 교반 용액에 NMM(563 μL, 5.12 mmol)을 첨가하였다. 10분 후, DMF(5 mL) 중 N(PNBoc)₂(622mg, 1.88 mmol)의 용액을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 오일을 MeCN에 용해시키고 분취용 HPLC(27-50-70% MeCN, R_t 47-50분)로 정제하여 담황색 유성 고체를 수득하였다(1.37 g, 54%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.44 (m, 18H); 1.65-1.84 (m, 4H); 2.63 (t, J 6.3 Hz, 2H); 3.05 (dt, J 6.9 및 14.7 Hz, 4H); 3.36-3.41 (m, 6H); 3.60-3.78 (m, 98H). LCMS (필릭 방법(philic method), 포름산 완충제) R_t = 9.32분. ESI MS (+ve) 1486.3 [M]⁺; C₆₇H₁₃₂N₆O₂₉ [M]⁺에 대한 m/z 계산치: 1486.8.

[0431] 1.2 아지도-PEG₂₄-CO[N(PNH₂.TFA)₂], 화합물 2

[0432] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂](1.37 g, 922 μmol)를 사용하여 제조하였다. 동결건조된 생성물을 담황색 오일로 수득하였다(1.67 g, 119%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.88-2.06 (m, 4H); 2.74 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.96 (t, J 7.2 Hz, 2H); 3.04 (피상(apparent) t, J 7.5 Hz, 2H); 3.42-3.52 (m, 6H); 3.67-3.95 (m, 93H). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 8.47분, ESI MS (+ve) 1286.0 [M]⁺; C₅₇H₁₁₆N₆O₂₅ [M]⁺에 대한 m/z 계산치 = 1286.6.

[0433] 1.3 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[Boc]₄, G1, 화합물 3

[0434] 일반 절차 B에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PNH₂.TFA)₂](186mg, 145 μmol)를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 MeCN에 용해시키고 분취용 HPLC(30-80% MeCN, R_t 33.5-36분)로 정제하여 담황색 오일을 얻었다(224mg, 80%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.22-1.87 (m, 56H); 2.64 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.03 (t, J 6.6 Hz, 4H); 3.13-3.23 (m, 4H); 3.36-3.45 (m, 6H); 3.60-3.69 (m, 100H); 3.77 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.85-3.88 (m, 1H); 3.92-4.02 (m, 2H). LCMS (포빅 방법(phobic method), 포름산 완충제) R_t = 6.74분; ESI MS (+ve) 1942.4, [M]⁺; C₈₉H₁₇₂N₁₀O₃₅ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 = 1942.4.

[0435] 1.4 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[NH₂·TFA]₄, G1, 화합물 4

[0436] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[Boc]₄(220 mg, 113 μmol)를 사용하여 제조하였다. 동결건조된 생성물을 담황색 오일로 수득하였다(251 mg, 111%). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 6.49분, ESI MS

(+ve) 1542.1 [M]⁺; C₆₉H₁₄₀N₁₀O₂₇ [M]⁺에 대한 m/z 계산치 = 1541.90.

[0437] 1.5 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(a-Boc)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 5

[0438] 일반 절차 C에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[NH₂.TFA]₄(120 mg, 60.1 μmol)를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 MeCN/H₂O(1:1)에 용해시키고 분취용 HPLC(20-70% MeCN, R_t 31-32.5분)로 정제하여 생성물을 담황색 오일로 얻었다(244 mg, 59%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.24-1.91 (m, 74H); 2.42-2.47 (m, 8H); 2.62-2.66 (m, 2H); 3.13-3.25 (m, 12H); 3.36 (s, 12H); 3.52-3.78 (m, 490H); 3.85-3.88 (m, 4H); 3.94-4.11 (m, 4H); 4.25-4.31 (m, 2H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 8.70분; ESI MS (+ve) 1714.0 [M+4H]⁴⁺/4, 1371.7 [M+5H]⁵⁺/5; 1143.0 [M+6H]⁶⁺/6, 980.0 [M+7H]⁷⁺/7. 6852로 변환.

[0439] 1.6 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(a-NH₂.TFA)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 6

[0440] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(a-Boc)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₄(244 mg, 35.6 μmol)를 사용하여 제조하였다. 동결건조된 조 물질을 물에 재용해시키고 분취용 HPLC(22-70% MeCN, 0.01% TFA, R_t 27분)로 정제하여 생성물을 담황색 점착성 고체로 얻었다(173mg, 67%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.31-1.98 (m, 40H); 2.51-2.56 (m, 8H); 2.72 (브로드 t, J 6.0 Hz, 2H); 3.16-3.30 (m, 16H); 3.40 (s, 12H); 3.46-3.53 (m, 4H); 3.62-3.97 (m, 490H); 4.03 (t, J 6.6 Hz, 2H); 4.24-4.29 (m, 2H). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 9.85분; ESI MS (+ve) 1614.1 [M+4H]⁴⁺/4, 1291.6 [M+5H]⁵⁺/5; 1076.5 [M+6H]⁶⁺/6. 6452로 변환.

[0441] 1.7 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[Boc]₈, G2, 화합물 7

[0442] 일반 절차 B에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[NH₂.TFA]₄(117 mg, 58.6 μmol)를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 담황색 오일로 수득하였다(167 mg, 100%). LCMS(포빅 방법 4.1a, 포름산 완충제) R_t = 8.35분; ESI MS (+ve) 1328.6 [M+2H]²⁺/2 -Boc; C₁₃₃H₂₅₂N₁₈O₄₇ [M]⁺에 대한 m/z 계산치 = 2855.6.

[0443] 1.8 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.TFA]₈, G2, 화합물 8

[0444] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[Boc]₄(167mg, 58.6 μmol)를 사용하여 제조하였다. 조 수용액을 분취용 HPLC(10-60% MeCN, 0.1% TFA 완충제; R_t 27-29분)로 정제하여 생성물을 매우 옅은 황색의 점착성 고체로 얻었다(124 mg, 2단계에 걸쳐 71%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.30-1.96 (m, 42H); 2.71 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.98-3.04 (m, 8H); 3.13-3.30 (m, 8H); 3.36-3.53 (m, 7H); 3.68-3.84 (m, 100H); 3.93 (t, J 6.6 Hz, 2H); 4.04 (t, J 6.6 Hz, 2H); 4.25 (t, J 7.2 Hz, 2H). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 7.76분, ESI MS (+ve) 1028.3 [M+2H]²⁺/2, 685.9 [M+3H]³⁺/3; C₉₃H₁₉₀N₁₈O₃₁ [M+2H]²⁺/2에 대한 m/z 계산치: 1028.3, C₉₃H₁₉₁N₁₈O₃₁ [M+3H]³⁺/3에 대한 m/z 계산치: 685.9.

[0445] 1.9 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(a-Boc)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 9

[0446] 일반 절차 C에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.TFA]₈(123 mg, 41.5 μmol)을 사용하여 조 물질을 갈색 오일로 얻었다. LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 11.52분, ESI MS (+ve) 2113 [M+6H]⁶⁺/6, 1812 [M+7H]⁷⁺/7, 1585 [M+8H]⁸⁺/8, 1409 [M+9H]⁹⁺/9, 1268 [M+10H]¹⁰⁺/10, 1153 [M+11H]¹¹⁺/11, 1057 [M+12H]¹²⁺/12. 12 673으로 변환.

[0447] 1.10 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(a-TFA)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 10

[0448] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(a-Boc)(ε-NHPEG₁₁₀₀)]₈(526 mg, 41.5 μmol)을 사용하여

제조하였다. 조 수용액을 분취용 HPLC(3-60% MeCN, 0.1% TFA 완충제; R_t 38-39분)로 정제하여 생성물을 담황색 점착성 고체로 얻었다(359 mg, 2단계에 걸쳐 68%). LCMS(필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 10.27분. 11 880으로 변환.

[0449] 1.11 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -Fmoc)]₈, G3, 화합물 11

[0450] 일반 절차 D에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.TFA]₈(105 mg, 35.4 μ mol)을 사용하여 제조하였다. 생성물을 백색 고체로 수득하였다(166 mg, 83%). ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm): 1.23-1.49 (m, 160H); 2.73-2.95 (m, 36H); 3.44-3.60 (m, 94H); 3.83 (m, 8H); 4.05-4.28 (m, 29H); 6.33-6.90 (m, 8H, NH); 7.24-7.87 (m, 84H).

[0451] 1.12 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NH₂)]₈, G3, 화합물 12

[0452] 일반 절차 D에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -Fmoc)]₈(169 mg, 29.9 μ mol)을 사용하여 솜털(fluffy) 고체를 얻었다(95 mg, 82%). ¹H-NMR (300 MHz, d₄-MeOH) δ (ppm): 1.46-1.49 (m, 160H); 2.69 (brs, 14H); 3.09-3.19 (m, 18H); 3.38-3.41 (m, 8H); 3.55-3.78 (m, 96H), 3.89-4.33 (m, 14H).

[0453] 1.13 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NHPEG₅₇₀)]₈, G3, 화합물 13 및 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₅₇₀)]₈, G3, 화합물 14

[0454] DMF(1.5 mL) 중 mPEG₅₇₀-CO₂H(205 mg, 348 μ mol), NMM(60 μ L, 546 μ mol) 및 PyBOP(171 mg, 329 μ mol)의 용액에 DMF(0.5 mL) 중 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NH₂)]₈을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 다음, 진공에서 농축시키고, 물에 용해시키고, TFA로 처리하고, 실온에서 밤새 교반하였다. 이 혼합물을 농축시키고 물에 녹인 다음 Millipore 원심분리 여과 장치(3K MWCO 재생 셀룰로스)를 사용하여 정제하고 회백색 솜털 물질로서의 생성물(2단계에 걸쳐 68%)을 동결 건조시켰다. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.33-1.90 (m, 88H); 2.51-2.55 (m, 16H); 2.67-2.75 (m, 4H), 3.16-3.23 (m, 32H); 3.40-3.53 (m, 32H), 3.62-4.03 (m, 470H); 4.21-4.39 (m, 7H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 7.50분.

[0455] 1.14 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈, G3, 화합물 15

[0456] DMF(4 mL) 중 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NH₂)]₈(95.0 mg, 24.5 μ mol)의 교반 용액에 DIPEA(85 μ L, 488 μ mol), 이어서 mPEG₂₀₀₀-NHS(720 mg, 313 μ mol)를 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 하였다. 조 잔사를 물에 용해시키고 한외여과(5K, Pall PES 막)로 정제하였다. 잔류물을 수집하고 동결 건조시켜 회백색 솜털 물질을 얻었다(76%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.33-1.63 (m, 160H); 3.05-3.15 (m, 35H); 3.29 (s, 24H); 3.35-3.96 (m, 1370H); 4.13-4.19 (m, 6H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 11.24분.

[0457] 1.15 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈, G3, 화합물 16

[0458] 일반 절차 A에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Boc)(ϵ -NHPEG₂₀₀₀)]₈(40.0 mg, 1.87 μ mol)을 사용하여 생성물을 회백색 솜털 물질로 얻었다(35mg, 88%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.28-1.79 (m, 88H); 2.51-2.58 (m, 4H); 3.04-3.18 (m, 35H); 3.28 (s, 24H); 3.35-3.97 (m, 1348H), 4.14-4.25 (m, 6H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) R_t = 9.12분.

[0459]

[0460] 1.16 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂] 화합물 46

[0461] DMF(3 mL) 중 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO₂H(0.402 g, 0.305 mmol), PyBOP(0.205 g, 0.394 mmol) 및 NMM(130 μ L, 1.18

mmol)의 교반 용액에 N_2 분위기하에 $NH(PNBoc)_2$ (0.147 g, 0.444 mmol)를 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 오일을 실리카 크로마토그래피(5% 내지 10% MeOH/DCM)에서 정제하여 원하는 생성물 화합물 106을 적색 잔사로 얻었다(0.474 g, 95%). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.43-1.44 (m, 18H); 1.64-1.80 (m, 4H); 2.63 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.00 (s, 3H); 3.02-3.09 (m, 4H); 3.34-3.40 (m, 4H), 3.58-3.77 (m, 99H); 3.88-3.91 (m, 2H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.15-7.20 (m, 2H); 8.46-8.51 (m, 2H). LCMS (포빅 방법, 포름산 완충제) RT = 6.20분. ESI MS (+ve) 1631.0 $[M+H]^+$; $C_{76}H_{140}N_7O_{30}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치: 1631.0.

[0462] 1.17 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNH₂.HCl)₂] 화합물 47

[0463] 빙/수욕(ice/water bath) 중 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂] 화합물 1(0.420 g, 0.258 mmol)에 1.25M HCl/MeOH 용액(8 mL, 10.0 mmol)을 천천히 첨가하였다. 5분 후, 빙욕을 제거하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하여 생성물 화합물 107을 적색 잔사로 얻었다(0.388 g, 100%). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.91-2.07 (m, 4H); 2.68 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.94-3.09 (m, 7H); 3.53-3.80 (m, 108H); 3.88-3.91 (m, 2H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.16-7.20 (m, 2H); 8.47-8.51 (m, 2H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) RT = 8.12분. ESI MS (+ve) 1430.9 $[M+H]^+$; $C_{66}H_{124}N_7O_{26}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치: 1430.8.

[0464] 1.18 (MeTzPh)-PEG₄CO-NH-PEG₂₄-CO[N(PNH₂.HCl)₂] 화합물 48

[0465] DMF(2.0 mL) 중 H_2N -PEG₂₄-CO[N(PNBoc)₂](0.418 g, 0.286 mmol)의 교반 용액에 (MeTzPh)-PEG₂₄-CO₂H(0.15 g, 0.344 mmol), PyBOP(0.178 g, 0.342 mmol) 및 NMM(80 μ L, 0.727 mmol)을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 오일을 빙/수욕에서 냉각시킨 다음 1.25M HCl/MeOH 용액(10.0 mL, 12.5 mmol)을 천천히 첨가하였다. 5분 후, 빙욕을 제거하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 오일을 MeCN/H₂O(8 mL, 1:1)에 용해시키고 분취용 HPLC(10-50% MeCN, 0.1% 포름산 완충제, RT 35분)로 정제하여 적색 고체 화합물 108을 얻었다(1.37 g, 54%). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.91-2.04 (m, 4H); 2.43 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.68 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.94-3.07 (m, 4H); 3.00 (s, 3H); 3.35 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.51-3.80 (m, 119H); 3.88-3.91 (m, 2H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.16-7.20 (m, 2H); 8.46-8.51 (m, 2H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) RT = 8.15분. ESI MS (+ve) 1677.9 $[M+H]^+$; $C_{77}H_{145}N_8O_{31}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치: 1678.0.

[0466] 1.19 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂[Lys]₂[NH₂Boc]₄] G1 화합물 49

[0467] DMF(3.0 mL) 중 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PNH₂.HCl)₂] 화합물 48(0.195 g, 0.111 mmol) 및 DBL-oPNP(0.146 g, 0.312 mmol)의 교반 용액에 N_2 분위기하에 NMM(125 μ L, 0.864 mmol)을 첨가하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 유성 잔사를 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피(5%-10%-15% MeOH/DCM)로 정제하여 원하는 생성물 화합물 109를 적색 오일(0.186 g, 72%)로 얻었다. 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 56H); 2.43 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.63 (t, J 6.0 Hz, 4H); 3.00 (s, 3H); 3.02-3.06 (m, 4H); 3.10-3.21 (m, 4H); 3.35-3.41 (m, 6H); 3.51-3.78 (m, 110H); 3.84-3.99 (m, 4H); 4.25-4.28 (m, 4H); 7.15-7.20 (m, 2H); 8.47-8.51 (m, 2H). LCMS (포빅 방법, 포름산 완충제) RT = 6.68분; ESI MS (+ve) 2335.3, $[M+H]^+$; $C_{109}H_{201}N_{12}O_{41}$ $[M+H]^+$ 에 대한 m/z 계산치 = 2335.4.

[0468] 1.20 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂[Lys]₂[NH₂.HCl]₄] G1 화합물 50

[0469] 빙냉된 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂[Lys]₂[NH₂Boc]₄] 화합물 49(0.215 g, 0.0921 mmol)에 1.25M HCl/MeOH(6.0 mL, 7.50 mmol)의 용액을 천천히 첨가하였다. 5분 후, 빙욕을 제거하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하여 생성물 화합물 110을 적색 오일로 얻었다(0.208 g, 108%). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.51-1.99 (m, 20H); 2.47 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.67 (t, J 6.0

Hz, 4H); 2.90-3.04 (m, 7H); 3.35-3.41 (m, 7H); 3.51-3.78 (m, 106H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.47-8.51 (m, 2H); LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) RT = 7.28분, ESI MS (+ve) 1934.9 [M+H]⁺; C₈₉H₁₆₉N₁₂O₃₃ [M]⁺에 대한 m/z 계산치 = 1935.2.

[0470] 1.21 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂Boc]₈ G2 화합물 51

[0471] DMF(3.0 mL) 중 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₂[NH₂.HCl]₄ 화합물 50(0.192 g, 0.0822 mmol) 및 DBL-oPNP(Ref.1)(0.215 g, 0.460 mmol)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 NMM(215 μL, 0.1.96 mmol)을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 유성 잔사를 실리카 크로마토그래피(5%-10%-15% MeOH/DCM)에서 정제하여 원하는 생성물 화합물 51을 적색 오일로 얻었다(0.231 g, 87%). ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 140H); 2.44 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.63 (t, J 6.0 Hz, 2H); 3.00 (s, 3H); 3.02-3.06 (m, 10H); 3.10-3.21 (m, 16kH);). 3.33-3.40 (m, 8kH); 3.51-3.77 (m, 120H); 3.84-3.99 (m, 14H); 3.94-4.10 (m, 4H); 4.25-4.28 (m, 4H); 7.15-7.20 (m, 2H); 8.47-8.52 (m, 2H). LCMS (포빅 방법, 포름산 완충제) RT = 8.15분; ESI MS (+ve) [M+2]⁺ = 1624.5; [(M-3Boc)+3] = 1016.6; C₁₅₃H₂₈₁N₂₀O₅₃ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 = 3247.99.

[0472] 1.22 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.HCl]₈ G2 화합물 52

[0473] 빙냉된 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂₄][Lys]₄[NH₂Boc]₈ 화합물 51(0.231 g, 0.0711 mmol)에 1.25M HCl/MeOH의 용액(9.0 mL, 11.3 mmol)을 천천히 첨가하였다. 5분 후, 빙욕을 제거하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하여 생성물 화합물 51을 적색 오일로 얻었다(0.226 g, 100%). ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.51-1.96 (m, 40H); 2.53 (t, J 6.0 Hz, 2H); 2.96-3.04 (m, 10H); 3.15-3.20 (m, 8H); 3.39-3.45 (m, 7H); 3.54-4.10 (m, 102H); 4.25-4.28 (m, 2H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.48-8.51 (m, 2H); LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) RT = 6.38분, ESI MS (+ve) 2447.6 [M+H]⁺; C₁₁₃H₂₁₇N₂₀O₃₇ [M+H]⁺에 대한 m/z 계산치 = 2447.6.

[0474] 1.23 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂·HCl)(ε-NH-COPEG₁₀₀)]₈ G3 화합물 53

[0475] DMF(2 mL) 중 HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG₁₀₀)(0.541 g, 0.402 mmol) 및 PyBOP(0.195 g, 0.375 mmol)의 교반된 용액에 N₂ 분위기에 NMM(225 μL, 2.96 mmol)을 첨가하였다. 10분 후, 그 용액을 DMF(1 mL) 중 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.HCl]₈ 화합물 52(0.109 g, 0.0398 mmol)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 빙/수욕에서 냉각시켰다. 냉각된 잔사에 1.25M(8.0 mL, 10 mmol)을 천천히 첨가하였다. 10분 후, 냉욕을 제거하고 반응물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거한 다음 H₂O(16 mL)에 용해시켰다. 용액은 Millipore Amicon Ultra-15 원심분리 필터 유닛(4유닛 × 10kDa MWCO 유닛)을 사용하여 원심분리*로 정제하였다. 잔류물을 밤새 동결 건조시켜 생성물 화합물 53을 적색 고체로 얻었다(0.327 g, 65%). ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.40-1.87 (m, 88H); 2.49-2.56 (m, 18H); 2.68-2.72 (m, 2H); 3.08 (s, 3H); 3.17-3.30 (m 30H); 3.37-3.51 (m, 10H); 3.41 (s, 24H); 3.59-4.01 (m, 816H); 4.25-4.40 (m, 8H); 7.29-7.33 (m, 2H); 8.44-8.49 (m, 2H); LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) RT = 10.28분.

[0476] * [유닛을 H₂O(5 mL)로 미리 행구고 4000 rpm으로 5분 동안 회전시켰다. 이 과정을 반복하였다. 조 용액을 0.45 μm 주사기 필터를 통해 여과한 다음 원심분리 장치에 넣었다. 그런 다음 유닛을 4000 rpm으로 15분 동안 회전시켰다. 그 다음, 보유물을 H₂O(4 mL)로 희석한 다음 4000 rpm으로 15분 동안 다시 회전시켰다. 이 과정을 8번 반복하였다.]

[0477] 1.24 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[NH₂.HCl]₁₆ G3 화합물 54

[0478] DMF(2.0 mL) 중 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[NH₂.HCl]₈ 화합물 52(0.098 g, 0.0358 mmol) 및 DBL-oPNP(0.207 g, 0.443 mmol)의 교반 용액에 N₂ 분위기하에 NMM(190 μL, 1.973 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 유성 잔사를 실리카 크로마토그래피(5%-10%-15% MeOH/DCM)에서 정제하여 Boc 보호된 생성물을 적색 오일로 얻었다(0.128 g, 70%). 정제된 물질을 빙/수욕에서 냉각시킨 다음, 1.25M HCl/MeOH(6.5 mL, 8.5 mmol)의 용액을 천천히 첨가하였다. 5분 후, 빙욕을 제거하고 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하여 생성물 화합물 54를 적색 오일로 얻었다(0.107 g, 100%). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) RT = 7.48분, ESI MS (+ve) 3471 [M+H]⁺; [M+H]⁺ m/z 계산치 = 3472.

[0479] 1.25 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α-NH₂.HCl)(ε-NH-CO PEG₁₀₀)]₁₆ G4 화합물 55

[0480] DMF(1.5 mL) 중 HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG₁₀₀)(0.107 g, 0.132 mmol) 및 PyBOP(0.065 g, 0.125 mmol)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 NMM(50 μL, 0.455 mmol)을 첨가하였다. 10분 후, 그 용액을 (MeTzPh)-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[NH₂.HCl]₁₆ 화합물 54(0.0221 g, 0.00545 mmol)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 빙/수욕에서 냉각시켰다. 냉각된 잔류물에 1.25M HCl/MeOH(1.5 mL, 1.88 mmol)를 천천히 첨가하였다. 10분 후, 냉욕을 제거하고 반응물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거한 다음 H₂O(5 mL)에 용해시켰다. 이 용액을 Millipore Amicon Ultra-15 원심분리 필터 유닛(10 kDa MWCO)을 사용하여 원심분리로 정제하였다. 잔류물을 밤새 동결 건조시키고 Gilson[단일 구매 60분, 10>60% ACN(0.1% TFA 완충제, RT 36분)]에서 추가로 정제하여 생성물 화합물 55를 적색 고체로 얻었다(0.021 g, 25%). ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.87 (m, 184H); 2.42-2.49 (m, 35H); 3.00 (s, 3H); 3.12-3.23 (m 60H); 3.34-3.40 (m, 63H); 3.52-4.01 (m, 826H); 4.25-4.39 (m, 16H); 7.17-7.20 (m, 2H); 8.48-8.51 (m, 2H); LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) RT = 8.96분. ESI MS (+ve) 2095 [M+7H]⁺; 1834 [M+8H]⁺; 1630 [M+9H]⁺.

[0481] 1.26 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[NH₂.TFA]₃₂ G4 화합물 56

[0482] 화합물 54에 따라 제조하고 TFA/AcOH를 사용하여 탈보호하여 화합물 56을 적색 고체로 얻었다(0.078 g, 78%). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) RT = 7.74분. ESI MS (+ve) 2095 [M+7H]⁺; 1834 [M+8H]⁺; 1630 [M+9H]⁺.

[0483] 1.27 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α-NH₂.TFA)(ε-NH-COPEG₁₀₀)]₃₂ G5 화합물 57

[0484] DMF(3.0 mL) 중 HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG₁₀₀)(0.476 g, 0.354 mmol) 및 PyBOP(0.170 g, 0.327 mmol)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 NMM(180 μL, 0.500 mmol)을 첨가하였다. 10분 후, 그 용액을 (MeTzPh)-PEG₄CO-NHPEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[NH₂.TFA]₃₂ 화합물 56(0.078 g, 0.00850 mmol)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 휘발물을 진공에서 제거하고 생성된 조 물질을 H₂O(1.0 mL)에 용해시키고 TFA(1.0 mL)를 천천히 첨가하였다. 반응물을 실온에서 밤새 교반되도록 두었다. 반응물을 H₂O(12 mL)로 희석하고 Millipore Amicon Ultra-15 원심분리 필터 유닛(10kDa MWCO)을 사용하여 원심분리로 정제하였다. 잔류물을 밤새 동결 건조시켜 생성물 화합물 57(0.374 g, 91%)을 분홍색 고체로 얻었다(0.374 g, 91%). ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.41-1.87 (m, 376H); 2.52-2.56 (m, 64H); 3.09 (s, 3H); 3.17-3.24 (m, 126H); 3.41 (s, 93H) 3.48-3.98 (m, 2960H); 4.27-4.39 (m, 32H); 7.30-7.33 (m, 2H); 8.46-8.49 (m, 2H); HPLC 분석 (필릭 방법, 완충제로서 암모늄 포르메이트) RT = 8.60분.

[0485] 1.28 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NHCy5)₁(α-NHAc)₇](ε-NH-COPEG₁₀₀)₈], G3, 화합물 37

[0486] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 1.0 mL; 1.0 mg, 1.59 μmol)을, DMF(0.5 mL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH₂.HCl)₈](ε-NH-COPEG₁₀₀)₈], 화합물 53(20 mg, 1.59 μmol)을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(10 μL, 91.0 μmol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(20 μL, 212 μmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정

제를 위해 2개로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 밝은 청색 분말 19.3 mg(93%)으로 얻었다. HPLC(C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O(0-1분), 5-80% ACN(1-7분), 80% ACN(7-12분), 80-5% ACN(12-13분), 5% ACN(13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.30.

[0487] 1.29 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₁₆[((α-NHCy5)₁(α-NHAc)₁₅)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆], G4, 화합물 38

[0488] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 520 μL; 0.52 mg, 844 nmol)을, DMF(1.0 mL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₁₆[((α-NH₂.HCl)₁₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆], 화합물 55(20 mg, 844nmol)를 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(10 μL, 94.5 μmol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(20 μL, 230 μmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정제를 위해 2개로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 밝은 청색 분말 19.9 mg(98%)으로 얻었다. HPLC(C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O(0-1분), 5-80% ACN(1-7분), 80% ACN(7-12분), 80-5% ACN(12-13분), 5% ACN(13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.40

[0489] 1.30 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₃₂[((α-NHCy5)₁(α-NHAc)₃₁)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂], G5, 화합물 39

[0490] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 300 μL, 0.30 mg, 487 nmol)을, DMF(1.2 mL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₃₂[((α-NH₂.HCl)₃₂)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂], 화합물 57(20 mg, 435 nmol)을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(11 μL, 97.5 μmol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(22 μL, 237 μmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정제를 위해 2개로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 밝은 청색 분말 18.7mg(91%)으로 얻었다. HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.50.

[0491] 1.31 카바지탁셀 (CTX)-2'-OCO-oPNP 에스테르, 화합물 58

[0492] DMF(3 mL) 중 카바지탁셀(CTX, 111.0 mg, 0.132 mmol)의 용액에 트리에틸아민(37.0 μL, 0.264 mmol), DMAP(1.64 mg, 0.013 mmol) 및 *p*-니트로페닐 클로로포르메이트(24.0 mg, 0.12 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 수득된 잔류물을 0:100 내지 50:50(에틸 아세테이트:헥산)의 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 표제 생성물을 백색 고체로 얻었다(28mg, 21%). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) Rt = 6.55분. ESI MS (+ve) 1001 [M]⁺; C₅₂H₆₀N₂O₁₈ [M]⁺에 대한 m/z 계산치: 1001

[0493] 1.32 Fmoc-Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc), 화합물 59

[0494] 화합물은 Dal Corso 등 Angew. Chem Int. Ed. 2020, 59, 4176-4181에 기술된 바와 같이 수득할 수 있다. 이것은 다음과 같이 제조할 수도 있다. Fmoc-Val-Ala-PAB-O-oPNP 에스테르(Iris Biotech, 127.0 mg, 0.186 mmol) 및 (S)-tert-부틸 메틸(피롤리딘-2-일메틸)카바메이트(Ascension Chemical, 42.0 mg, 0.195 mmol)를 둥근 바닥 플라스크에 넣은 다음 THF(5 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 불활성 분위기하에 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 표제 화합물의 형성을 나타내었다. 감압하에 용매를 제거하고 수득한 생성물을 정제 없이 다음 반응에 사용하였다. LCMS(필릭 방법, TFA 완충제), Rt = 6.60분. ESI MS (+ve) 756 [M]⁺+1; C₄₂H₅₃N₅O₈ [M]⁺+1에 대한 m/z 계산치: 756]

[0495] 1.33 TFA.NH₂-Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc), 화합물 60

[0496] DMF(3 mL) 중 화합물 59(141.0 mg, 0.186 mmol)의 교반 용액에 0°C에서 피페리딘(0.6 mL, 6.07 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 수득된 잔사를 아세토니트릴에 용해시키고 분취용 HPLC(40-90% MeCN, 0.05% TFA 완충제, RT ~45분)를 사용하여 정제하여 동결건조 후 표제 화합물을 무색

액체로 얻었다(63.0 mg, 52%). LCMS(필릭 방법, TFA 완충제) ESI MS (+ve) 556 [M]+Na; C₂₇H₄₃N₅O₆ [M]+Na에 대한 m/z 계산치: 556; ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.62 - 7.51 (m, 2H), 7.44 - 7.25 (m, 2H), 5.18 - 4.98 (bs, 2H), 4.56 (q, J = 9.0 Hz, 1H), 4.13 (bs, 1H), 3.72 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.51 - 3.36 (m, 2H), 2.89 (s, 1H), 2.73 (bs, 1H), 2.35 - 2.13 (m, 1H), 2.05 - 1.70 (m, 4H), 1.59 - 1.36 (m, 11H), 1.18 - 1.00 (m, 6H).

[0497] 1.34 COOH-PEG₉-Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc), 화합물 61

[0498] 아세트니트릴(2 mL) 중 화합물 60(52.0 mg, 0.081 mmol)의 교반 용액에 DIPEA(87.2 μL, 0.50 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 0℃로 냉각시켰다. COOH-PEG₉-NHS 에스테르(Iris Biotech; 86.0 mg, 0.139 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 생성물의 형성을 보여주었다. LCMS(필릭 방법, TFA 완충제; 15분에 걸쳐 5-60% 아세트니트릴), Rt = 11.32분. ESI MS (+ve) 1048 [M]+H₂O; C₄₉H₈₃N₅O₁₈ [M]+H₂O에 대한 m/z 계산치: 1048]. 감압하에 용매를 제거하고 수득한 생성물을 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0499] 1.35 COOH-PEG₉-Val-Ala--PAB-P-트리거-(NMe.TFA), 화합물 62

[0500] 디클로로메탄(2 mL) 중 화합물 61(84.0 mg, 0.081 mmol)의 교반 용액에 TFA(0.5 mL, 6. mmol)를 0℃에서 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 수득된 잔사를 아세트니트릴에 용해시키고 분취용 HPLC(5-70% 아세트니트릴, 0.05% TFA 완충제, RT 32-33분)를 사용하여 정제하여 동결건조 후 표제 화합물을 걸쭉한 무색 액체로 얻었다(87.0 mg, 100%). LCMS(필릭 방법, FA 완충제) ESI MS (+ve) 930 [M]+1; C₄₅H₇₇N₅O₁₅ [M]+1에 대한 m/z 계산치: 930; ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.64 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 5.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.61 - 4.40 (m, 2H), 4.19 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.85 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.79 - 3.69 (m, 4H), 3.69 - 3.51 (m, 35H), 3.17 - 3.05 (m, 2H), 2.85 (s, 1H), 2.76 - 2.68 (m, 3H), 2.92 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 2.62 - 2.45 (m, 4H), 2.27 -1.84 (m, 4H), 1.46 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 1.08 - 0.92 (m, 6H).

[0501] 1.36 COOH-PEG₉-Val-Ala-PAB-P-트리거-NMeCO-CTX, 화합물 63

[0502] DMF(3 mL) 중 화합물 46(28.0 mg, 0.027 mmol)의 용액에 DIPEA(9.40 μL, 0.54 mmol) 및 화합물 51(27.3 mg, 0.027 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 수득된 잔사를 아세트니트릴(2 mL)에 용해시켰다. 이 용액을 분취용 HPLC(5-60% ACN, Rt 32.2-34.3분)로 정제하여 동결건조 후 표제 생성물을 백색 고체로 얻었다(26mg, 56%). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) Rt = 5.57분. ESI MS (+ve) 1792 [M]+; C₉₀H₁₃₀N₆O₃₁ [M]+에 대한 m/z 계산치: 1792

[0503] 실시예 1b BCN 및 DBCO 링커의 합성

[0504] 1.37 BCN-PEG₂-Glu-CO-NHPEG₂₄CO₂H, 화합물 31

[0505] 물/THF(1:1, 4 mL)의 혼합물 중 NH₂-PEG₂₄-COOH(93.7 mg, 0.082 mmol)의 용액에 중탄산나트륨(15.2 mg, 0.181 mmol)을 첨가하였다. THF(2 mL) 중 BCN-PEG₂-NHS 에스테르(50 mg, 0.093 mmol)의 용액을 첨가하기 전에 혼합물을 5분 동안 실온에서 교반하였다. 생성된 반응 혼합물을 실온에서 15시간 동안 교반하였다. 이어서 휘발물을 감압하에 제거하고 ACN(2.5 mL)을 생성된 수성 현탁액에 첨가하였다. 이 용액을 정제용 HPLC(5-60% ACN, Rt 32.2-34.3분)로 정제하여 동결건조 후 표제 생성물을 백색 고체로 얻었다(42mg, 33%). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.85-0.92 (m, 2H); 1.25-1.35 (m, 1H); 1.43-1.57 (m, 2H); 1.73-1.83 (m, 2H); 2.09-2.25 (m, 9H); 2.39 (t, J = 9.0 Hz, 2H); 3.21-3.31 (m, 6H); 3.35-3.85 (m, 106H); 4.10 (d, J= 9.0 Hz, 2H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) Rt = 10.28분.; ESI MS (+ve) m/z 1566.7 [M]+.

[0506] 1.38 BCN-PEG₂-Glu-CO-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO, 화합물 32

[0507] DMF(3.0 mL) 중 BCN-PEG₂-Glu-CO-NHPEG₂₄-COOH 화합물 31(10.0 mg, 0.006 mmol)의 교반 용액에 PyBOP(3.64 mg, 0.007 mmol), NMM(1.31 μL, 0.012 mmol), 이어서 TCO-PEG₃-NH₂(2.41 mg, 0.007 mmol)를 첨가하였다. 후속 반응

혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 이어서 용매를 감압하에 제거하고 생성된 잔류물을 ACN(2 mL)에 용해시킨 다음 0.45 μ m 필터를 통해 여과하였다. 수집된 여액을 분취용 HPLC(30-50% ACN Rt 40-42분)로 정제하고 생성물 함유 분획을 감압하에 농축시켜 ACN을 제거하였다. 남은 수용액을 밤새 동결건조시켜 표제 생성물을 백색 고체로 얻었다(4.7mg, 39%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 0.89-1.05 (m, 2H), 1.26-1.48 (m, 2H), 1.52-1.79 (m, 5H), 1.83-2.06 (m, 6H), 2.11-2.39 (m, 12H), 2.48 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.35-3.44 (m, 6H), 3.47-3.79 (m, 102H), 3.83-3.92 (m, 1H), 4.16 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 4.26-4.41 (m, 1H), 4.58 (bs, 10 H), 5.39-5.74 (m, 3H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 11.0$ 분. ESI MS (+ve) 1894.0 [M]⁺; C₉₀H₁₆₅N₅O₃₆ [M]⁺에 대한 m/z 계산치: 1894.2

[0508] 1.39 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO, 화합물 33

[0509] DMF(3 mL) 중 DBCO-Glu-NHPEG₂₄COOPFP(50.0 mg, 0.031 mmol)의 교반 용액에 TCO-PEG₃-NH₂(10.7 mg, 0.031 mmol), 이어서 NMM(4.08 μ L, 0.037 mmol)을 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음, 감압하에 농축시켰다. 생성된 잔류물을 ACN(2 mL)에 용해시키고, 0.45 μ m 필터를 통해 여과하고, 여액을 분취용 HPLC(40-70% ACN Rt 27-29분)로 정제하였다. 생성물 함유 분획을 감압하에 농축시켜 ACN을 제거하고 남은 수용액을 밤새 동결건조시켜 표제 생성물을 점성 무색 액체로 얻었다(25.0 mg, 42%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.31-1.62 (m, 4H), 1.60-1.83 (m, 6H), 1.92-2.16 (m, 4H), 2.25 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.91-3.03 (m, 4H), 3.12-3.58 (m, 78H), 3.59-3.69 (m, 1H), 4.01-4.18 (m, 1H), 4.92 (d, 2H, $J = 15$ H), 5.15-5.49 (m, 3H), 6.95-7.59 (m, 8H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 7.0$ 분. ESI MS (+ve) 1775.0.0 [M]⁺; C₈₈H₁₄₈N₄O₃₂ [M]⁺에 대한 m/z 계산치: 1775.12

[0510] 1.40 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -Cy5)₁(α -NHAc)₇(ϵ -NHPEG₁₀₀)₈], G3, 화합물 37

[0511] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 1.0 mL; 1.0 mg, 1.59 μ mol)을, DMF(0.5 mL) 중 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈(α -NH₂)₈(ϵ -NHPEG₁₀₀)₈, (20 mg, 1.59 μ mol)을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(10 μ L, 91.0 μ mol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(20 μ L, 212 μ mol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정제를 위해 2개로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 밝은 청색 분말 19.3mg(93%)으로 얻었다. HPLC (C8 XBridge, 3 $\times$ 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t (분) = 8.30.

[0512] 1.41 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α -Cy5)₁(α -NHAc)₁₅(ϵ -NHPEG₁₀₀)₁₆], G4, 화합물 38

[0513] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 520 μ L; 0.52 mg, 844 nmol)을, DMF(1.0 mL) 중 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α -NH₂)₁₆(ϵ -NHPEG₁₀₀)₁₆], (20 mg, 844 nmol)을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(10 μ L, 94.5 μ mol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(20 μ L, 230 μ mol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정제를 위해 2개로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 밝은 청색 분말 19.9mg(98%)으로 얻었다. HPLC (C8 XBridge, 3 $\times$ 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t (분) = 8.40.

[0514] 1.42 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α -Cy5)₁(α -NHAc)₃₁(ϵ -NHPEG₁₀₀)₃₂], G5, 화합물 39

[0515] Cy5-NHS 에스테르 용액(DMF 중 1 mg/mL 용액 300 μ L; 0.30 mg, 487 nmol)을, DMF(1.2 mL) 중 MeTzPh-PEG₄PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α -NH₂)₃₂(ϵ -NHPEG₁₀₀)₃₂], (20 mg, 435 nmol)을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 이 용액에 NMM(11 μ L, 97.5 μ mol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 교반하였다. 3.5시간 후 아세트산 무수물(22 μ L, 237 μ mol)을 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반되도록 두었다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시킨 다음 MQ 물(5 mL)에 녹이고 2개의 (사전 평형화된) PD10 컬럼을 통한 정제를 위해 2개

로 나누었다. 샘플이 컬럼 베드에 들어가면 3.5 mL MQ 물로 샘플을 용리하고 여액을 수집하였다. 여액을 합하고 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조로 표제 생성물을 맑은 청색 분말 18.7mg(91%)으로 얻었다. HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.50.

[0516] 1.43 $BHA[Lys]_4[((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-3}(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\epsilon-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_{0-2})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_4]$, G2, 화합물 99

[0517] 일반 절차 C에 따라 $BHA[Lys]_4[(\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-3}(\alpha-NH_2)_{1-3})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_4]$, G2, 화합물 107(3.0 mg, 0.414 μ mol) 및 HO-Lys[(α -Cy5)(ϵ -DFO)] 화합물 108(0.56 mg, 0.414 μ mol)을 사용하여 제조하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10 kDa MW 컷오프)으로 정제하여 원하는 생성물 화합물 99를 얻었다(300 μ L MQ 물 중 3.56 mg의 최종 농도).

[0518] 1.44 $BHA[Lys]_8[((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-4}(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\epsilon-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_{3-6})(\epsilon-NH-COPEG_{412})_8]$, G3, 화합물 100

[0519] 일반 절차 C에 따라 $BBHA[Lys]_8[((\alpha-NHCOPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-4}(\alpha-NH_2)_{4-7})(\epsilon-NH-COPEG_{412})_8]$, G3, 화합물 109(2.97 mg, 0.452 μ mol) 및 HO-Lys[(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO)] 화합물 40(0.61 mg, 0.452 μ mol)을 사용하여 제조하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10kDa MW 컷오프)으로 정제하여 생성물 화합물 100을 얻었다(300 μ L MQ 물 중 3.60 mg의 최종 농도).

[0520] 1.45 $BHA[Lys]_8[((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\epsilon-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_6)(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_8]$, G3, 화합물 101

[0521] 일반 절차 C에 따라 $BHA[Lys]_8[((\alpha-NHCOPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha-NH_2)_7)(\epsilon-NHCOPEG_{1000})_8]$, G3, 화합물 110(3.14 mg, 0.234 μ mol) 및 HO-Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO) 화합물 108(0.32 mg, 0.234 μ mol)을 사용하여 제조하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10 kDa MW 컷오프)으로 정제하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10 kDa MW 컷오프)으로 정제하여 생성물 화합물 27을 얻었다(300 μ L MQ 물 중 3.45 mg의 최종 농도).

[0522] 1.46 $BHA[Lys]_{16}(((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\epsilon-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_{14})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_{16})]$, G4, 화합물 102

[0523] 일반 절차 C에 따라 $BHA[Lys]_{16}(((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha-NH_2)_{15})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_{16})]$, G4, 화합물 111(11.8 mg, 0.454 μ mol) 및 HO-Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO) 화합물 108(0.62 mg, 0.454 μ mol)을 사용하여 제조하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10 kDa MW 컷오프)으로 정제하여 화합물 289.3 mg을 청색 고체로 얻었다(동결건조 후).

[0524] 1.47 $BHA[Lys]_{32}(((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-4}(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\epsilon-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_{27-30})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_{32})]$, G5, 화합물 103

[0525] 일반 절차 C에 따라 $BHA[Lys]_{16}(((\alpha-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_{1-4}(\alpha-NH_2)_{27-30})(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_{32})]$, G4, 화합물 112(12.9 mg, 0.271 μ mol) 및 HO-Lys(α -Cy5)(ϵ -DFO) 화합물 108(0.37 mg, 0.271 μ mol)을 사용하여 제조하고 스핀 컬럼(10 × 450 μ L MQ 물로 세척하는 10 kDa MW 컷오프 세척)으로 정제하여 동결건조 후 생성물 화합물 103 8.4 mg을 청색 고체로 얻었다.

[0526] 1.48 $BHA[Lys]_4[(\alpha-Lys(\alpha-NHCy5)(\alpha-NHDFO))_1(\alpha-NH_2)_3)(\epsilon-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_4]$, G2, 화합물 105

[0527] DMF(3 mL) 중 실온에서 $BHA[Lys]_4[(\alpha-NH_2.HCl)_4(\epsilon-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))_4]$, G2, 화합물 113 (11.0 mg, 0.0015 mmol)의 교반 용액에 NMM(3.32 μ L, 0.039 mmol), HO-Lys[(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO)] 화합물 108(2.06mg, 0.0015 mmol) 및 PyBOP(1.18mg, 0.0022 mmol)를 첨가하였다. 18시간 후, 휘발물을 감압하에 제거하고 청색 고체 잔류물을 MQ 물에 용해시키고 용액을 여과하였다(0.45 μ m 아크로디스크 주사기 필터). 여액을 스핀 컬럼(Amicon Ultra, 0.5 mL, 3kDa MW 컷오프)으로 농축시키고 보유물을 MQ 물(10 × 450 μ L)로 반복적으로 세척하

여 화합물 24를 얻었다(MQ 물 중 농도 10 mg/mL; 1.3 mL. LCMS(필릭 방법, TFA 완충제), 구배: 8분에 걸쳐 20에서 90% 아세토니트릴, Rt = 5.64분; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.52 (d, 8H, J = 9.0 Hz), 8.32 (s, 1H), 8.29-8.17 (m, 2H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.69-7.62 (m, 2H), 7.57-7.47 (m, 2H), 7.48-7.25 (m, 16H), 7.21 (d, 8H, J = 9.9 Hz), 7.15-7.08 (m, 1H), 7.06-7.00 (m, 1H), 6.70-6.60 (m, 2H), 6.21-6.12 (m, 2H), 4.37-4.20 (m, 14H), 4.18-4.06 (m, 8H), 3.98-3.50 (m, 480H), 3.48-3.34 (m, 15H), 3.27-3.06 (m, 18H), 3.06-2.97 (m, 19H), 2.88 (s, 8H), 2.54-2.40(m, 19H), 2.08-1.98 (m, 28H), 1.93-1.12 (m, 99H), 1.00-0.82 (m, 8H).

[0528] 1.49 BHA[Lys]₄[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₃)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 화합물 107

[0529] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₄[(α-NH₂.TFA)₄(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄](50.0 mg, 0.007 mmol) 및 HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools, 13.39 mg, 0.010 mmol)를 사용하여 제조하여 생성물 화합물 107을 얻었다(44.00 mg, 77%); ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.42-8.26 (m, 2H), 7.44-7.11 (m, 12H), 6.04 (bs, 1H), 4.44-4.07 (m, 8H), 4.07-3.37 (m, 556H), 3.33 (s, 12H), 3.25-2.90 (m, 17H), 2.62-2.43 (m, 2H), 1.96-0.97 (m, 48H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배 (포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt (분) = 8.08-9.01.

[0530] 1.50 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₇)(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 화합물 109

[0531] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈](50.0 mg, 0.008 mmol) 및 HOOC-PEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 11.2 mg, 0.008 mmol)를 사용하여 제조하여 생성물 화합물 109를 얻었다(29 mg, 55%); ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.43-8.20 (m, 2H), 7.50-7.09 (m, 10H), 6.03 (bs, 1H), 4.41-4.05 (m, 10H), 4.01-3.41 (m, 258H), 3.31 (s, 16H), 3.24-2.83 (m, 28H), 2.41 (bs, 13H), 2.00-0.98 (m, 75H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배 (포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t= 8.16-8.93분.

[0532] 1.51 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₇)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 110

[0533] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₈[(α-NH₂.TFA)₈(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈](100.0 mg, 0.007 mmol) 및 HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 15.97 mg, 0.010 mmol)를 사용하여 제조하여 생성물 화합물 19(SPL-9248)를 얻었다(69 mg, 66%); ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.45-8.25 (m, 2H), 7.47-7.07 (m, 12H), 6.07 (bs, 1H), 4.45-4.05 (m, 12H), 4.04-3.37 (m, 936H), 3.32 (s, 25H), 3.23-2.88 (m, 32H), 2.59-2.32 (m, 6H), 1.90-0.98 (m, 90H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배 (포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t= 8.21-9.15분.

[0534] 1.52 BBHA[Lys]₁₆[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁(α-NH₂)₁₅)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 화합물 111

[0535] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[Lys]₁₆[(α-NH₂.TFA)₁₆(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆](Ref. 1)(100.0 mg, 0.004 mmol) 및 HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 6.74 mg, 0.005 mmol)를 사용하여 제조하여 화합물 111을 얻었다(63 mg, 65%); ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.45-8.28 (m, 2H), 7.47-7.07 (m, 12H), 6.03 (bs, 1H), 4.40-4.08 (m, 23H), 4.06-3.38 (m, 1906H), 3.33 (s, 56H), 3.29-2.91 (m, 78H), 2.63-2.45 (m, 3H), 1.98-0.98 (m, 200H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배

(포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 243nm, 0.4 mL/분, R_t = 8.51-9.02분.

[0536] 1.53 BHA[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₁₋₄(α-NH₂)₂₈₋₃₁)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂], G5, 화합물 112

[0537] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₃₂[(α-NH₂.TFA)₃₂(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂](100.0 mg, 0.002 mmol) 및 HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 3.38 mg, 0.005 mmol)를 사용하여 제조하여 생성물 화합물 21을 얻었다(68 mg, 72%); ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.44-8.29 (m, 2H), 7.44-7.09 (m, 12H), 6.02 (bs, 1H), 4.37-4.11 (m, 31H), 4.08-3.37 (m, 2937H), 3.32 (s, 83H), 3.27-2.88 (m, 116H), 2.59-2.42 (m, 3H), 2.18-0.92 (m, 313H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배 (포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t = 8.77분.

[0538] 1.54 BHA[Lys]₄[(α-NHBoc)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2, 화합물 113

[0539] 실온에서 DMF 중 BHA[Lys]₄[(α-NHBoc)₄(ε-NH₂)₄](46.0 mg, 0.031 mmol)의 교반 용액에 NMM(68.0 μL, 0.620 mmol), HOOCPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 43.0 mg, 0.155 mmol) 및 PyBOP(81.0 mg, 0.155 mmol)를 첨가하였다. 16시간 후, 반응 혼합물을 ACN:MQ 물(3 mL, 1:1 v/v)에 용해시키고 용액을 여과하였다(0.45 μm 아크로디스크 주사기 필터). 여액을 분취용 HPLC; 60분에 걸쳐 30-80% ACN, 이동상: MQ 물 및 아세트 니트릴, R_t 33.0-36.0분으로 정제하여 화합물 22를 분홍색 고체 52mg(22%)으로 얻었다. LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 5.66분; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.52 (d, 8H, J = 9.0 Hz), 7.40-7.26 (m, 10H), 7.20 (d, 8H, J = 9.0 Hz), 6.23-6.17 (m, 1H), 4.36-4.21 (m, 10H), 3.99-3.83 (m, 13H), 3.82-3.46 (m, 487H), 3.46-3.32 (m, 22H), 3.27-3.02 (m, 15H), 3.02 (s, 12H), 2.54-2.38 (m, 17H), 1.92-1.14 (m, 89H).

[0540] 1.55 BHA[Lys]₄[(α-NH₂.HCl)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2, 화합물 114

[0541] 메탄올(2 mL) 중 BHA[Lys]₄[(α-NHBoc)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2, 화합물 113(48.0 mg)의 교반 용액에 메탄올(2 mL) 중 3M HCl 용액을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하여 BHA[Lys]₂[Lys]₂[(α-NH₂.HCl)₄(ε-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))₄], G2, 화합물 23을 분홍색 고체 41.0 mg(91%)으로 얻었다. LCMS (필릭 방법, TFA 완충제), 구배: 8분에 걸쳐 20 내지 90% 아세트니트릴; R_t = 5.27분.

[0542] 1.56 HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)], 화합물 108

[0543] DMSO(5 mL) 중 화합물 115(20.0 mg, 0.032 mmol)의 교반 용액에 DIPEA(32 μL, 0.224 mmol), 이어서 p-SCN-테페 룩사민(Deferoxamine)(Macrocylics, 24.0 mg, 0.032 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반한 다음, 질소 기체 스트림을 용액에 몇 시간 동안 불어 넣어 농축시켰다. 이어서 수득된 잔사를 분취용 HPLC: MQ 물 중 30-60% ACN + 0.1% TFA(60분, R_t 39-42분)로 정제하여 생성물 화합물 108을 청색 고체 15mg(34%)으로 얻었다. LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 5.93분; ESI MS (+ve) 1364 [M]⁺; C₇₁H₁₀₃N₁₂O₁₁S₂ [M]⁺에 대한 m/z 계산치 = 1364 ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.25 (t, 2H, J = 12.0 Hz), 7.56-7.18 (m, 9H), 6.65 (t, 1H, J = 12.0 Hz), 6.37-6.15 (m, 2H), 4.43-4.32 (m, 1H), 4.11 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.70-3.46 (m, 8H), 3.22-3.10 (m, 3H), 2.86-2.69 (m, 3H), 2.56-2.38 (m, 3H), 2.31 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.11 (s, 2H), 1.96-1.18 (m, 32H).

[0544] 1.57 HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH₂)], 화합물 115

[0545] DMF(4 mL) 중 화합물 116(36 mg; 0.043 mmol)의 교반 용액에 피페리딘(1.5 mL)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 잔사를 분취용 HPLC; MQ 물 중 20-90% ACN + 0.1% 포름 산(60분, R_t 32.0-33.0분)으로 정제하여 생성물 화합물 59를 청색 고체 12mg(44%)으로 얻었다. LCMS (필릭

방법, TFA 완충제) $R_t = 7.65$ 분; ESI MS (+ve) 611 $[M]^+$; $C_{38}H_{51}N_4O_3$ $[M]^+$ 에 대한 m/z 계산치 = 611.

[0546] 1.58 HO-Lys[(α -NH₂Cy5)(ϵ -NHDFO)] 웨지, 화합물 116의 합성

[0547] DMF(5 mL) 중 HO-Lys[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHFMoc)](57.0 mg, 0.118 mmol)의 교반 용액에 NMM(52 μ L, 0.472 mmol) 및 Cyanine5 NHS 에스테르(Lumiprobos, 40.0 mg, 0.059 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후 휘발물을 진공에서 제거하였다. 잔류물을 ACN:MQ 물(3 mL 1:1 v/v)에 용해시키고 용액을 여과하였다(0.45 μ m 아크로디스크 주사기 필터). 여액을 분취용 HPLC; MQ 물 중 20-90% ACN + 0.1% 포름산(60분, R_t 39.0-42.0분)으로 정제하여 화합물 58을 청색 고체 33mg(67%)으로 얻었다. LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) $R_t = 10.54$ 분; ESI MS (+ve) 833 $[M]^+$; $C_{53}H_{61}N_4O_5$ $[M]^+$ 에 대한 m/z 계산치 = 833.46 1 H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.21 (t, 2H, $J = 15.0$ Hz), 7.79 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 7.63 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 7.49-7.24 (m, 10H), 6.61 (t, 1H, $J = 12.0$ Hz), 6.29-6.22 (m, 2H), 4.49-4.26 (m, 2H), .18 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.07 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.68-3.60 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.12 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.28 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 1.94-1.61 (m, 6H), 1.71 (s, 12H), 1.62-1.19 (m, 6H).

[0548] 실시예 2 덴드리머 약물 접합체의 합성

[0549] 2.1 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-3'-NH-DoX)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 17

[0550] 일반 절차 E에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₄(50.0 mg, 7.24 μ mol)를 사용하여 제조하여 암적색 유성 고체를 얻었다(58 mg, 89%). 1 H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.69-2.17 (m, 68H); 2.30-2.50 (m, 8H); 2.56-2.68 (m, 2H); 3.02-3.24 (m, 8H); 3.38-3.41 (m, 24H); 3.52-4.56 (m, 520H); 4.69-4.77 (m, 12H); 5.19-5.57 (m, 4H); 7.15-8.14 (m, 12H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 11.23$ 분. ESI MS (+ve) 9016으로 변환.

[0551] 2.2 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 64

[0552] 일반 절차 E에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄(50.0 mg, 7.24 μ mol)를 사용하여 제조하여 암적색 유성 고체를 얻었다(58 mg, 89%). 1 H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.69-2.17 (m, 68H); 2.30-2.50 (m, 8H); 2.56-2.68 (m, 2H); 3.02-3.24 (m, 8H); 3.38-3.41 (m, 24H); 3.52-4.56 (m, 520H); 4.69-4.77 (m, 12H); 5.19-5.57 (m, 4H); 7.15-8.14 (m, 12H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 11.23$ 분. ESI MS (+ve) 9016으로 변환.

[0553] 2.3 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-DGA-3'-NH-DoX)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 18

[0554] 일반 절차 E에 따라 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₈(50.0 mg, 3.91 μ mol)을 사용하여 제조하여 암적색 유성 고체를 얻었다(50 mg, 75%). 1 H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.88-1.93 (m, 120H); 2.33-2.51 (m, 16H); 2.58-2.72 (m, 2H); 3.04-3.24 (m, 8H); 3.35-3.41 (m, 76H); 3.52-4.61 (m, 964H); 5.27-5.45 (m, 8H); 7.13-8.13 (m, 24H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 11.30$ 분

[0555] 2.4 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 65

[0556] 일반 절차 E에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈](50.0 mg, 3.91 μ mol)을 사용하여 제조하여 암적색 유성 고체를 얻었다(50 mg, 75%). 1 H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.88-1.93 (m, 120H); 2.33-2.51 (m, 16H); 2.58-2.72 (m, 2H); 3.04-3.24 (m, 8H); 3.35-3.41 (m, 76H); 3.52-4.61 (m, 964H); 5.27-5.45 (m, 8H); 7.13-8.13 (m, 24H). LCMS (필릭 방법, 포름산 완충제) $R_t = 11.30$ 분

[0557] 2.5 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ϵ -NH-COPEG₅₇₀)₈], G3, 화합물 19

[0558] 일반 절차 F에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₅₇₀)₈](7.2 mg, 842 nmol) 및 HO-

Glu-vc-PAB-MMAE(10.0 mg, 8.08 μ mol)를 사용하여 제조하여 14.6 mg/3.5 mL(240 μ M)의 생성물 농도를 얻었다.

[0559] 2.6 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 20

[0560] 일반 절차 F에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈](10.8 mg, 842 nmol) 및 HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0 mg, 8.08 μ mol)를 사용하여 제조하여 18 mg/3.5 mL(240 μ M)의 생성물 농도를 얻었다.

[0561] 2.7 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ϵ -NH-COPEG₂₀₀₀)₈], G3, 화합물 21

[0562] 일반 절차 F에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₂₀₀₀)₈](18.1 mg, 842 nmol) 및 HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0 mg, 8.08 μ mol)를 사용하여 제조하여 25.5 mg/3.5 mL(240 μ M)의 생성물 농도를 얻었다.

[0563] 2.8 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α -NH-DGA-MMAF(OMe))₈(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 22

[0564] 일반 절차 F에 따라 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(16.3 mg, 1.28 μ mol) 및 DGA-MMAF(OMe)(10.6 mg, 12.3 μ mol)를 사용하여 제조하여 23.8 mg/3.5 mL(365 μ M)의 생성물 농도를 얻었다.

[0565] 2.9 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-DGA-Pt(IV) 아세테이트)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 23

[0566] DMF(0.5 mL) 중 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH₂.TFA)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(SPL 19 및 SPL 32)(22.4 mg, 1.75 μ mol)의 교반 용액에 NMM(7.4 μ L, 67.3 μ mol)을 첨가하였다. 이어서 생성된 용액을 DMF(0.5 mL) 중 아세테이트-디글리콜산-1R,2R-사이클로헥산-1,2-디아민-옥살라토 백금(IV)(10.4 mg, 17.7 μ mol) 및 PyBOP(8.74 mg, 16.8 μ mol)의 교반 용액에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반한 다음 SEC로 정제하여 생성물을 회백색 고체로 수득하였다(24 mg, 86%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.28-1.89 (m, 128H), 2.07 (s, 23H), 2.24-3.01 (m, 57H), 3.12-3.26 (m, 22H), 3.37 (s, 25H), 3.39-3.90 (m, 768H), 4.04-4.69 (m, 80H). LCMS (필릭 방법, TFA 완충제) R_t = 10.63분. ICP-OES: 측정된 Pt% 9.0%는 거대분자에 7개의 Pt 함유 부분이 있음을 나타낸다. 접합체의 실제 분자량은 16.1kDa로 측정되었다.

[0567] 2.10 BHA[Lys]₈[(α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α -NH₂)₄₋₇)(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 34

[0568] DMF(300 μ L) 중 BHA[Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈](100 mg, 0.00786 mmol, 1.0 당량)의 교반 용액을 실온에서 제조하였다. 여기에 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO₂H(Click Chemistry Tools; 16mg, 0.01 mmol, 1.3 당량), PyBOP(8 mg, 0.013 mmol, 1.6 당량) 및 DMF(200 μ L)를 첨가하였다. NMM(40 mg, 50 μ L, 0.38 mmol, 48 당량)을 첨가하기 전에 반응 혼합물을 3분 동안 교반하였다. 내용물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 MQ 물로 희석하고 밤새 동결건조시켰다. 동결건조된 물질을 MeOH(1 mL)에 녹이고 SEC(400방울/튜브, MeOH 세파텍스 LH20, 35방울/분)로 정제하였다. 생성물 함유 분획을 HPLC로 확인하고 2개의 상이한 분획으로 수집하였다. 각 분획을 감압하에 농축시킨 다음, 생성된 잔류물을 MQ 물에 녹이고, 여과하고(0.45 μ m 아크로디스크 필터) 동결 건조시켜 표제 생성물을 분홍색 고체로 수득하였다(69 mg, 66%). HPLC (C8 Xbridge, 3 $\times$ 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_f(분) = 8.4 (넓은 피크). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 1.00-2.00 (m, 90H), 2.51 (t, 3H), 2.60 (br s, 3H), 3.00-3.12 (m, 6H), 3.12-3.35 (br s, 27H), 3.35-3.45 (m, 26H), 3.45-4.15 (m, 937H), 4.15-4.45 (m, 12H), 6.12 (s, 1H), 7.15-7.50 (m, 12H), 8.40-8.50 (m, 2H).

[0569] 2.11 BHA[Lys]₈[(α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₂-BCN)₁₋₄(α -NH₂)₄₋₇)(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 35

[0570] DMF(200 μ L) 중 BCN-PEG₂CO-NHPEG₂₄-CO₂H 화합물 31(9.6 mg, 0.006 mmol, 1.3 당량)의 교반 용액을 실온에서 제조하였다. 여기에 PyBOP(4 mg, 0.008 mmol, 1.6 당량) 및 NMM(23 mg, 25 μ L, 0.226 mmol, 48 당량)을 첨가하고 5분 후에 BHA[Lys]₈[(α -NH₂.TFA)₈(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₈](60 mg, 0.006 mmol, 1.0 당량), 이어서 DMF(200 μ L)를 첨가하였다. 내용물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 ACN(10 mL)으로 희석한 다음 SEC(400방울/튜브, ACN 세파텍스 LH20, 35방울/분)로 정제하였다. 생성물 함유 분획을 HPLC로 확인하고, 수집하고, 여과하고(0.45 μ m 아크로디스크 필터), 감압하에 농축시키고 밤새 동결 건조시켜 표제 화합물을 담황색

고체로 얻었다(58 mg, 수율 92%). HPLC (C8 Xbridge, 3 × 100 mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7 분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_f(분) = 8.43 (넓은 피크). ¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.75-1.12 (m, 15H), 1.12-2.15 (m, 95H), 2.15-2.35 (m, 7H), 2.55 (br s, 3H), 3.00-3.35 (m, 90H), 3.35-3.38 (s, 17H), 3.38-4.09 (m, 592H), 4.13 (d, 2H), 4.18-4.63 (br s, 7H), 6.18 (s, 0.9H), 7.12-7.48 (m, 7H).

[0571] 2.12 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-Cy5)₁₋₄(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₄₋₇)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 36

[0572] Cy5-NHS 용액(DMF 중 4.2 mg/mL 용액 214 μL, 1.43 μmol, 1.0 당량)을 순수한 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈((α-NH₂.HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈) 화합물 8(18 mg, 1.43 μmol)에 첨가하였다. 완전히 용해되면 NMM(10 μL, 91.0 μmol)을 첨가하고 후속 반응 혼합물을 교반하고 빛으로부터 보호하였다. 2시간 후, NMM(10 μL, 91.0 μmol) 및 PyBOP(7.3 mg, 14.0 μmol), 이어서 DMF 중 Glu-VC-PAB-MMAE 용액(60 mg/mL 용액 290 μL, 14.0 μmol, 9.8 당량)을 텐드리머 용액에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반하였다.

[0573] 반응 혼합물을 PBS(2.0 mL)로 희석하여 최종 부피가 2.5 mL가 되도록 하였다. 이어서 전체 용액이 컬럼 베드에 들어가면 PBS(3.5 mL)를 첨가하여 생성물(파란색 밴드로 나타남)을 용리하였다. 작제물의 최종 이론 농도 = PBS 중 8.7 mg/mL. 물질을 -80°C에서 냉동 보관하였다. HPLC (C8 Xbridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t(분) = 95-10분 (넓은 피크); 17% MMAE/MMAE-링커가 있는 83% 접합체 관련 피크.

[0574] 2.13 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[³H-Lys]₄[Lys]₈[((α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 40

[0575] NMM/DMF(7.8 μL/0.5mL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₂[³H-Lys]₄[Lys]₈((α-NH₂.HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈)(화합물 53의 합성에 사용된 방법을 사용하여 제조됨)(6.8 mg, 2.93 mol)의 용액에 고체 PyBOP(24.7 mg, 47.5 mol)를 첨가하였다. 완전히 용해되면 텐드리머 용액을 NMM/DMF(7.8 μL/0.5 mL) 중 HO-Glu-VC-PAB-MMAE(40 mg, 32.3 mol)의 용액에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반하였다.

[0576] 반응 혼합물을 PBS(4.0 mL)로 희석하여 최종 부피가 5 mL가 되도록 하였다. 이어서 희석된 용액을 2개의 PD10 탈염 컬럼을 통과시켰다(PBS로 사전 평형화됨, 각 컬럼을 통해 2.5 mL). 모든 용액이 컬럼 베드에 들어가면 PBS(3.5 mL)를 각 컬럼에 첨가하여 생성물을 용리하였다. 생성된 조 혼합물을 재생 셀룰로스 Amicon Ultra-0.5 mL 원심분리 장치(10K MWCO)를 사용하여 추가로 정제하였다. 작제물의 최종 이론 농도 = PBS 중 29-30 mg/mL. 물질을 -20°C에서 냉동 보관하였다. HPLC(C8 Xbridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O(0-1분), 5-80% ACN(1-7분), 80% ACN(7-12분), 80-5% ACN(12-13분), 5% ACN(13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t(분) = 9.5-12분 (넓은 피크); 8.6% MMAE/MMAE-링커 관련 피크가 있는 91.4% 접합체 관련 피크.

[0577] 2.14 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3 화합물 66

[0578] DMSO(100 μL) 중 p-SCN-테페록사민(2.1 mg, 2.79 μmol)의 교반 용액을 실온에서 제조하였다. 여기에 DMF(200 μL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO[N(PN)₂][Lys]₈((α-NH₂.HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈) 화합물 53(17.0 mg, 1.35 μmol)을 첨가하였다. NMM(10 μL, 91.0 μmol)을 첨가하기 전에 후속 반응 혼합물을 3분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 빛으로부터 보호하고 실온에서 4시간 동안 교반하였다. PyBOP(7.0 mg, 13.5 μmol)를 첨가하고 5분 후 반응 혼합물을 순수한 HO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.76 mg, 7.89 μmol)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 밤새 두었다. 반응 혼합물을 PBS 완충제(4.5 mL)로 희석하고 4개의 Amicon Ultra 원심분리 필터(10K MWCO)로 나누고 필터를 원심분리하였다(14K rcf, 15분). 잔류물을 PBS(400 μL, 14K rcf, 15분 × 10회)에 대해 정용여과하였다. 잔류물을 합하여 2 mL 중 화합물 67.16mg의 대략 농도로 분홍색 용액을 얻었다. HPLC(C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O(0-1분), 5-80% ACN(1-7분), 80% ACN(7-12분), 80-5% ACN(12-13분), 5% ACN(13-15

분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.7-9.8분(넓은 피크).

[0579] 2.15 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅)(ε-NH-COPEG₁₀₀)₈], G3, 화합물 67

[0580] DMSO(100 μL) 중 p-SCN-테페록사민(2.0 mg, 2.66 μmol)의 교반 용액을 실온에서 제조하였다. 여기에 DMF(200 μL) 중 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-NH₂)₇)(ε-NHPEG₁₀₀)₈] 화합물 34(17.0 mg, 1.27 μmol)를 첨가하였다. NMM(10 μL, 91.0 μmol)을 첨가하기 전에 후속 반응 혼합물을 3분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 빗으로부터 보호하고 실온에서 4시간 동안 교반하였다. PyBOP(7.0 mg, 13.5 μmol)를 첨가하고 5분 후 반응 혼합물을 순수한 HO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.17 mg, 7.41 μmol)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 밤새 두었다. 반응 혼합물을 PBS 완충제(4.5 mL)로 희석하고 4개의 Amicon Ultra 원심분리 필터(10K MWCO)로 나누고 여액을 원심분리하였다(14K rcf, 15분). 잔류물을 PBS(400 μL, 14K rcf, 15분 × 10회)에 대해 정용여과하였다. 잔류물을 합하여 2 mL 중 화합물 68 16mg의 대략적인 농도로 분홍색 용액을 얻었다. HPLC(C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배: 5% ACN/H₂O(0-1분), 5-80% ACN(1-7분), 80% ACN(7-12분), 80-5% ACN(12-13분), 5% ACN(13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 9.3-9.7분(넓은 피크).

[0581] 2.16 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-SN38)₇)(ε-NH-COPEG₁₀₀)₈], G3 화합물 68

[0582] DMF(2 mL) 중 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH₂.HCl)₈(ε-NH-COPEG₁₀₀)₈] 화합물 53(10 mg, 0.75 μmol)의 교반 용액에 NMM(4.0 μL, 36.0 μmol) 및 설포 Cy5 NHS 에스테르(0.58mg, 0.75 μmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. SN38-Glu-COOH(W02020/102852)(3.94mg, 7.8 μmol) 및 PyBOP(4.05mg, 7.8 μmol)를 반응 혼합물에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 추가로 20시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 수득된 잔류물을 이동상으로 아세토니트릴을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피(Sephadex LH 20)를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 청색 고체로 수득하였다(6.0mg). 반응 혼합물의 UPLC-TOF 분석으로 텐드리머에 설포 Cy5 NHS 에스테르 및 SN-38-Glu-COOH의 무작위 첨가를 확인한다. UPLC-TOF(필릭 방법, TFA 완충제) Rt = 84.80-5.80분.

[0583] 2.17 BHA[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-NH₂)₂₈₋₃₁(ε-NH-COPEG₁₀₀)₃₂], G5, 화합물 69

[0584] 반응 용기를 호일로 싸서 빛을 차단하고 잔사를 용리액으로 메탄올을 사용하여 SEC(Sephadex™ LH-20)로 정제하는 것을 제외하고는 일반 절차 C에 따라 BHA[Lys]₃₂[((α-NH₂.TFA)₃₂(ε-NH-COPEG₁₀₀)₃₂](100.0 mg, 0.002 mmol) 및 HOOCEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe)(Click Chemistry Tools; 3.38mg, 0.005 mmol)를 사용하여 제조하여 화합물 69(68mg, 72%)를 얻었다. ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.44-8.29 (m, 2H), 7.44-7.09 (m, 12H), 6.02 (bs, 1H), 4.37-4.11 (m, 31H), 4.08-3.37 (m, 2937H), 3.32 (s, 83H), 3.27-2.88 (m, 116H), 2.59-2.42 (m, 3H), 2.18-0.92 (m, 313H); HPLC (C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배 (포르메이트 완충제): 5% ACN/H₂O (0-1분), 5-80% ACN (1-7분), 80% ACN (7-12분), 80-5% ACN (12-13분), 5% ACN (13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, R_t = 8.77 분.

[0585] 2.18 BHA[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-NHCy5)₁(α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-P-트리카-NMeCOCTX)₂₂)(α-NH₂)₅₋₈(ε-NH-COPEG₁₀₀)₃₂], G5, 화합물 70

[0586] DMF 중 BHA[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-NH₂)₂₈₋₃₁(ε-NH-COPEG₁₀₀)₃₂] 화합물 69(20.0 mg, 0.4 μmol)의 교반 용액에 NMM(8.0 μL, 72 μmol), 이어서 Cy5-NHS 에스테르(0.26 mg, 0.4 μmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 화합물 63(25.7 mg, 14.4 μmol) 및 PyBOP를 반응 혼합물에 첨가하고 혼합물을 실온에서 추가로 20시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 조 잔사를 아세토니트릴(2 mL)에 용해시키고 수득된 용액을 0.45 μM 필터를 통해 여과하였다. 여액을 수집하고 용매로서 아세토니트릴을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피(Sephadex LH20)를 사용하여 정제하여 표제 화합물을 청색 고체로 얻었다(27mg; 75%). ¹HNMR(300 MHz, MeOD) δ (ppm): 8.52 (d, 2H, J = 9.0Hz), 8.25-7.05(m, 329H), 6.39-5.89(m, 23H), 5.73-4.94(m, 141H), 4.64-4.05 (m, 161H), 4.05-3.36(m, 4026H), 3.18-2.22(m, 323H), 2.18-0.56(m, 1362H); HPLC(C8 XBridge, 3 × 100mm) 구배(포르메이트 완충제): 75% ACN/H₂O(0-1분), 75-90% ACN(1-7분), 90% ACN(7-

12분), 90-75% ACN(12-13분), 75% ACN(13-15분), 214nm, 0.4 mL/분, Rt(분) = 8.90-9.10.

[0587] **실시예 3 표적화된 덴드리머 접합체의 합성**

[0588] 3.1 *에피바디-MPED-BCN-트리아졸로-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)₁₋₄(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 24*

[0589] 일반 절차 G에 따라 에피바디-BCN(900 μL) 및 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)₁₋₄(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄(858 μM 용액 300 μL)를 사용하여 제조하였다(물 비 에피바디-BCN:DGA-Dox 덴드리머, 1:3). SDS-PAGE 분석은 약 19kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다.

[0590] 3.2 *에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, G2, 화합물 71*

[0591] 일반 절차 G에 따라 에피바디-BCN(900 μL) 및 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α-NH-14-O-DGA-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₄(858 μM 용액 300 μL)를 사용하여 제조하였다(물 비 에피바디-BCN:DGA-Nemo 덴드리머, 1:3). SDS-PAGE 분석은 약 19kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다.

[0592] 3.3 *에피바디-MPED-BCN-트리아졸로-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 25*

[0593] 일반 절차 G에 따라 에피바디-BCN(105 μL) 및 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(580 μM 용액 35 μL)을 사용하여 제조하였다(물 비 에피바디-BCN:DGA-Dox 덴드리머; 1:1). SDS-PAGE 분석은 약 27kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다. 접합체 수율은 80%로 추정되었는데, 이는 아지드 IR Dye 800CW의 첨가와 800nm에서의 형광 측정으로 계산되었다.

[0594] 3.4 *에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 72*

[0595] 일반 절차 G에 따라 에피바디-BCN(105 μL) 및 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(580 μM 용액 35 μL)을 사용하여 제조하였다(물 비 에피바디-BCN:DGA-Nemo 덴드리머, 1:1). SDS-PAGE 분석은 약 27kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다. 접합체 수율은 80%로 추정되었는데, 이는 아지드 IR Dye 800CW의 첨가와 800nm에서의 형광 측정으로 계산되었다.

[0596] 3.5 *에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 26*

[0597] 일반 절차 G에 따라 에피바디 BCN(2.0 mg, 1.0 mg/mL PBS에서 286nmol) 및 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(240 μM 용액 1.0 mL)을 사용하여 제조하였다. 정제된 물질을 동결건조시켜 백색의 솜털 분말을 얻었다(2.19mg, 31%). SDS-PAGE 분석은 약 30kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다.

[0598] 3.6 *에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₈(ε-NH-COPEG₂₀₀₀)]₈, G3, 화합물 27(SPL 40 중 화합물 78)*

[0599] 일반 절차 G에 따라 에피바디 BCN(1.0 mg, 1.0 mg/mL PBS에서 143nmol) 및 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NH-COPEG₂₀₀₀)]₈(233 μM 용액 250 μL)을 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 약 40kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다.

[0600] 3.7 *에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-Pt(IV)-아세테이트)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈, G3, 화합물 28*

[0601] 일반 절차 G에 따라 에피바디 BCN(5.0 mg, 1.0 mg/mL PBS에서 715nmol) 및 아지도-PEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α-NH-DGA-Pt(IV)-아세테이트)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(903 μM 용액 600 μL)를 사용하여 제조하였다. 정제된 물질을 동결건조시켜 백색의 솜털 분말을 얻었다(5.90 mg, 47%). SDS-PAGE 분석은 약 30kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 대응하는 밴드(700nm)를 보여주었다.

- [0602] 3.8 Fab-트리아줄로DBCO-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NHPEG₁₁₀₀)]₄ G2-Dox/PEG1100 덴드리머, 화합물 29
- [0603] 아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄ 용액(PBS 중 500 μ M 용액 10 μ L)을 Fab-DBCO* 용액(HEPES 완충제 중 13.4 μ M 용액 40 μ L)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 밤새 실온에서 진탕(650 rpm)하여 Fab-아지도-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-3'-NH-Dox)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄를 생성하였다. SDS-PAGE 분석을 수행하고 Odyssey 스캐너를 사용하여 700nm 및 800nm에서 스캔하였다. 700nm에서 스캔했을 때 SDS-PAGE는 50kDa에 해당하는 DBCO-Fab 밴드와 약 65kDa의 예상된 Fab-[덴드리머-Dox/PEG₁₁₀₀]₂, 화합물 30을 보여주었다.
- [0604] 3.9 Fab-DBCO/N₃-PEG₂₄-CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄, 화합물 73
- [0605] 아지도-PEG₂₄-CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄ 용액(PBS 중 500 μ M 용액 10 μ L)을 Fab-DBCO* 용액(HEPES 완충제 중 13.4 μ M 용액 40 μ L)에 첨가하였다. 후속 반응 혼합물을 밤새 실온에서 진탕(650 rpm)하여 Fab-DBCO/N₃-PEG₂₄-CO-[N(PN)₂][Lys]₄[(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₄를 생성하였다. SDS-PAGE 분석을 수행하고 Odyssey 스캐너를 사용하여 700nm 및 800nm에서 스캔하였다. 700nm에서 스캔할 때 SDS-PAGE는 50kDa에 해당하는 DBCO-Fab 밴드와 약 65kDa의 예상된 Fab-[덴드리머-Nemo/PEG₁₁₀₀]₂, 화합물 30을 보여주었다.
- [0606] 3.10 에피바디-BCN/N₃-PEG₂₄-CO-[N(PN)₂][Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[(α -NH-DGA-MMAF(OMe)₈(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 30
- [0607] 일반 절차 G에 따라 에피바디 BCN(2.0 mg, 1.0 mg/mL PBS에서 286nmol) 및 아지도-PEG₂₄-CO-[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-DGA-MMAF(OMe))(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)]₈(365 μ M 용액 600 μ L)을 사용하여 제조하였다. 정제된 물질을 동결건조시켜 백색의 솜털 분말을 얻었다(2.06mg, 33%). SDS-PAGE 분석은 약 30kDa의 에피바디-덴드리머 접합체에 해당하는 밴드(700nm)를 보여주었다.
- [0608] 3.11 나노바디-PEG₁₂-TCO-MePhTz-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-Cy5)₁(α -NH-Glu-VC-PAB-MMAE)₇(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 41
- [0609] 아래 실시예 4에 따라 DBCO-PEG₁₂-TCO 및 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드를 사용하여 나노바디 작제물을 제조하였다.
- [0610] 3.12 나노바디-PEG₁₂-TCO-MePhTz-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₈[(α -NH-Cy5)₁(α -NH-Glu-VC-PAB-MMAE)₇(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 42
- [0611] 아래 실시예 4에 따라 DBCO-PEG₁₂-TCO 및 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드를 사용하여 나노바디 작제물을 제조하였다.
- [0612] 3.13 나노바디-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₁₆[(α -NH-Cy5)₁(α -NHAc)₁₅(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₁₆], 화합물 43
- [0613] 아래 실시예 4에 따라 DBCO-PEG₁₂-TCO 및 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드를 사용하여 나노바디 작제물을 제조하였다.
- [0614] 3.14 나노바디-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][Lys]₃₂[(α -NH-Cy5)₁(α -NHAc)₃₁(ϵ -NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂], 화합물 44
- [0615] 아래 실시예 4에 따라 DBCO-PEG₁₂-TCO 및 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드를 사용하여 나노바디 작제물을 제조하였다.
- [0616] 3.15 나노바디-PEG₁₂-TCO-MeTzPh-PEG₄-PEG₂₄-CO[N(PN)₂][3H-Lys]₄[Lys(α -NH-Glu-VC-PAB-MMAE)₈(ϵ -NH-

COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 45

- [0617] 아래 실시예 4에 따라 DBCO-PEG₁₂-TCO 및 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드를 사용하여 나노바디 작제물을 제조하였다.
- [0618] 3.16 나노바디-N₃/DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO/(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 74
- [0619] 일반 절차 H에 따라 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 링커 화합물 33(1 당량), 테트라진 텐드리머 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[Lys]₈[((α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 66(1 당량) 및 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(1 당량)를 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 나노바디-텐드리머 접합체 ~37kDa에 해당하는 밴드를 보여주었다(도 1).
- [0620] 3.17 나노바디-N₃/BCN-NHPEG₂-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO/(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 75
- [0621] 일반 절차 H에 따라 BCN-NHPEG₂-Glu-NHPEG₂₄CONHPEG₃-TCO 링커 화합물 32(1 당량), 테트라진 텐드리머 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₄[Lys]₈[((α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₆)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 66(1 당량) 및 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(1 당량)를 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 나노바디-텐드리머 접합체 ~37kDa에 해당하는 밴드를 보여주었다(도 1).
- [0622] 3.18 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], G3, 화합물 76
- [0623] 일반 절차 H에 따라 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 링커 화합물 33(1 당량), 테트라진 텐드리머 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-NH-DFO)₂(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)₅)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 67(1 당량) 및 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(1 당량)를 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 나노바디-텐드리머 접합체 ~37kDa에 해당하는 밴드를 보여주었다(도 1).
- [0624] 3.19 나노바디-N₃/DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO/(MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-10-O-SN38)₇)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 77
- [0625] 일반 절차 H에 따라 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 링커 화합물 33(1 당량), 테트라진 텐드리머 (MeTzPh)PEG₄CO-NHPEG₂₄CO-[N(PN)₂][Lys]₈[((α-NH-Cy5)₁(α-NH-Glu-10-O-SN38)₇)(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₈], 화합물 68(1 당량) 및 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(1 당량)를 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 나노바디-텐드리머 접합체 ~37kDa에 해당하는 밴드를 보여주었다(도 2).
- [0626] 3.20 BHA[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁₋₄(α-NHCy5)₁(α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-P-트리거-NMeCO-CTX)₂₂(α-NH₂)₅₋₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂], G5, 화합물 78
- [0627] 일반 절차 H에 따라 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 링커 화합물 33(1 당량), 테트라진 텐드리머 BHA[Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[Lys]₁₆[Lys]₃₂[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-NHCy5)₁(α-NH-COPEG₉-Val-Ala-PAB-P-트리거-NMeCO-CTX)₂₂(NH₂)₅₋₈(ε-NH-COPEG₁₁₀₀)₃₂], 화합물 70(1 당량) 및 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(1 당량)를 사용하여 제조하였다. SDS-PAGE 분석은 나노바디-텐드리머 접합체 ~95kDa에 해당하는 밴드를 보여주었다(도 2).
- [0628] 3.21 BHA[Lys]₄[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₂)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 화합물 86 및 BHA[Lys]₄[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz)/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂₋₃(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₀₋₁(ε-

NHCOPEG₁₀₀₀)₄], G2, 화합물 87

- [0629] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BHA[Lys]₄[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₁)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 화합물 99를 사용하여 제조하였다:
- [0630] 단계 1: TCO 링커 용액 80을 순수 DMSO에서 제조하였다.
- [0631] 단계 2: 덴드리머는 pH 8의 Tris 완충제에 용해시켰고, TCO 링커와 덴드리머의 완전한 반응(UPLC 또는 LCMS) 시, 반응 혼합물은 DMSO의 최종 농도가 ≤ 5%(v/v)가 되도록 Tris 완충제로 희석하였고 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO)로 정제하였다.
- [0632] 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 86(232 μg; pH 8의 HEPES 완충제 중 0.45 μg/μL) 및 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 87(60 μg; pH 8의 HEPES 완충제 중 0.30 μg/μL)을 얻었다.
- [0633] 3.22 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₆)(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 화합물 88 및 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃₋₅)(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3 화합물 88a
- [0634] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃₋₆)(ε-NH-COPEG₄₁₂)₈], G3, 화합물 100을 사용하여 제조하였다:
- [0635] 단계 1: 순수한 DMSO에서 TCO 링커 화합물 80 용액을 제조하였다.
- [0636] 단계 2: 덴드리머는 pH 8의 Tris 완충제에 용해시켰고, TCO 링커와 덴드리머의 완전한 반응(UPLC 또는 LCMS) 시, 반응 혼합물은 DMSO의 최종 농도가 ≤ 5%(v/v)가 되도록 Tris 완충제로 희석하였고 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO)로 정제하였다.
- [0637] 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 88(140 μg; pH 8의 HEPES 완충제 중 1.48 μg/μL) 및 화합물 88a(순수하지 않음)를 얻었다.
- [0638] 3.23 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₆)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 89 및 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃₋₅)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 89a
- [0639] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BHA[Lys]₈[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₃₋₆)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₈], G3, 화합물 101을 사용하여 제조하였다:
- [0640] 단계 1: 순수한 DMSO에서 TCO 링커(화합물 80) 용액을 제조하였다.
- [0641] 단계 2: 덴드리머는 pH 8의 Tris 완충제에 용해시켰고, TCO 링커와 덴드리머의 완전한 반응(UPLC 또는 LCMS) 시, 반응 혼합물은 DMSO의 최종 농도가 ≤ 5%(v/v)가 되도록 Tris 완충제로 희석하였고 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO)로 정제하였다.
- [0642] 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 89(249 μg; pH 8의 HEPES 완충제 중 2.68 μg/μL) 및 화합물 89a(순수하지 않음)를 얻었다.
- [0643] 3.24 BHA[Lys]₁₆[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₁₄)(ε-NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 화합물 90 및 BHA[Lys]₁₆[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂₋₄(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))₁(α-NH₂)₁₁₋₁₃)(ε-NHCOPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 화합물 91
- [0644] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BHA[Lys]₁₆[((α-NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(α-Lys(α-NHCy5)(ε-

NHDFO))₁(α -NH₂)₁₄(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₁₆], G4, 화합물 102를 사용하여 제조하였다:

- [0645] 단계 1: 순수한 DMSO에서 TCO 링커(화합물 80) 용액을 제조하였다.
- [0646] 단계 2: 덴드리머는 pH 8의 Tris 완충제에 용해시켰고, TCO 링커와 덴드리머의 완전한 반응(UPLC 또는 LCMS) 시, 반응 혼합물은 DMSO의 최종 농도가 $\leq 5\%$ (v/v)가 되도록 Tris 완충제로 희석하였고 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO)로 정제하였다.
- [0647] 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 90(203 μ g; pH 8의 HEPES 완충제 중 0.975 μ g/ μ L 및 0.556 μ g/ μ L) 및 화합물 91(101 μ g; pH 8의 HEPES 완충제 중 0.34 μ g/ μ L)을 얻었다.
- [0648] 3.25BHA[Lys]₃₂[((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₁(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₃₀(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂], G5, 화합물 92 및 BHA[Lys]₃₂[((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂₋₄(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₂₇₋₂₉(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂], G5, 화합물 93
- [0649] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BBHA[Lys]₃₂[((α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁₋₄(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₂₇₋₃₀(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₃₂], G5, 화합물 103을 사용하여 제조하였다:
- [0650] 단계 1: 순수한 DMSO에서 TCO 링커 화합물 80 용액을 제조하였다.
- [0651] 단계 2: 덴드리머는 pH 8의 Tris 완충제에 용해시켰고, TCO 링커와 덴드리머의 완전한 반응(UPLC 또는 LCMS) 시, 반응 혼합물은 DMSO의 최종 농도가 $\leq 5\%$ (v/v)가 되도록 Tris 완충제로 희석하였고 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO)로 정제하였다.
- [0652] 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 92(370 μ g; pH 8의 HEPES 완충제 중 3.66 μ g/ μ L) 및 생성물 화합물 93(177 μ g; pH 8의 HEPES 완충제 중 1.72 μ g/ μ L)을 얻었다.
- [0653] 3.26BHA[Lys]₄[(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₃(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₂(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₂], G2, 화합물 94a, BHA[Lys]₄[(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₃(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₁(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₃], G2, 화합물 94, 및 BHA[Lys]₄[(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₃(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))/TCO-PEG₃NH-COPEG₂₄NH-Glu-DBCO/N₃-나노바디)₄], G2, 화합물 95
- [0654] 다음을 제외하고 일반 절차 H에 따라 BHA[Lys]₄[(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -NH₂)₃(ϵ -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhMeTz))₄], G2 덴드리머, 화합물 24를 사용하여 제조하였다:
- [0655] 단계 1: TCO 링커 화합물 51 용액을 물에서 제조하였다.
- [0656] 단계 2: 덴드리머를 MQ 물에 용해시켰다.
- [0657] 정제 방법은 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 것과 동일하여 나노바디-덴드리머 접합체 화합물 95 및 화합물 94를 분리할 수 없는 혼합물(pH 8의 HEPES 완충제 중 294 μ g의 최종 농도)로 얻었다.
- [0658] 또한 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO 화합물 80 용액(MQ 물 중 10 mg/mL 용액 57 μ L, 0.322 μ mol)을 나노바디-N₃("나노바디-N3-C-말단 태그")(2.5mg, pH 8의 Tris 완충제 900 μ L 중 0.161 μ mol) 용액에 첨가하여 제조하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2일 동안 둔 후 반응 혼합물을 Tris 완충제 pH 8(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO; 10 $\times$ 450 μ L)을 사용하는 원심 한외여과로 정제하였다. 이 용액에 화합물 105의 용액(500 μ L MQ 물 중 230.0 μ g; 0.026 μ mol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 두었다. 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 나노바디-덴드리머 화합물 95, 화합물 94a 및 화합물 94를 분리할 수 없는 혼합물(pH 8의 HEPES 완충제 중 124 μ g의 최종 농도)로 얻었다.
- [0659] 3.27 BHA[Lys]₄[(α -NH-COPEG₂₄NH-COPEG₄(PhTzMe))/TCO-PEG₈-나노바디)₁(α -Lys(α -NHCy5)(ϵ -NHDFO))₁(α -

$NH_2)_2)(\epsilon-NH-COPEG_{1000})_4]$, G2, 화합물 97

[0660] 디-브로모 말레이미드 링커 화합물 106의 용액은 2.0mg을 1 mL DMSO(1.0 mL)에 용해시켜 제조하였다. TCEP(pH 7 PBS 중 0.5M) 용액(2.3 μ L, 1.174 μ mmol)을 나노바디("나노바디-N3-C-말단 태그")(화합물 79)(1.0 mg, pH 8 Tris 완충제 715 μ L 중 0.058 μ mmol) 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 가열한 후 DMSO(673 μ L), 이어서 DMSO(47.0 μ L) 중 링커 화합물 57(93.0 μ g, 0.117 μ mmol)의 용액을 첨가하였다. 1.5시간 후, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 원심분리한 후 화합물 99(100 μ g, 17 μ L, 300 μ L MQ 물 중 1.78mg)의 용액을 침전물에 첨가하고 용액을 4°C에서 밤새 방치하였다. 화합물 74 및 76의 정제에 사용된 방법과 동일한 정제 방법으로 화합물 97(29 μ g)을 pH 8 Tris 완충제 중 용액으로 얻었다(최종 농도 = 1.78 mg/mL).

[0661] 3.28 BHA[Lys]₄[((α -NH-COPEG₂₄-NH-COPEG₄(PhTzMe)/TCO-PEG₃-나노바디)₁₋₃(α -Lys(α -NHCy5)₁(ϵ -NHDFO)₁)(α -NH₂)₀₋₂)(ϵ -NH-COPEG₁₀₀₀)₄], G2, 화합물 98

[0662] DMSO(50 μ L) 중 TCO-PEG₃-알테히드(Conju-Probe) 링커 용액(0.7mg, 1.46 μ mol)을 나노바디 용액("나노바디-N3-C-말단 태그")(화합물 79)(pH 6.5 PBS 완충제 중 1.07 mg/mL 스톡 용액 931 μ L)에 첨가하고, 이어서 물(19 μ L) 중 NaBH₃CN(0.09mg, 1.5 μ mol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 4°C로 냉각시키고 반응을 UPLC 분석으로 모니터링하였다. 16시간 후, 반응 혼합물을 PBS 완충제(pH 6.5)로 총 부피 2.0 mL로 희석한 다음 pH 6.5 PBS 완충제를 사용하여 원심 한외여과(Amicon, 0.5 mL 재생 셀룰로스 막, 10kDa MWCO; 14 $\times$ 450 μ L)로 정제하였다; UPLC: 0.01% TFA 완충제를 사용하여 15분에 걸쳐 5-20-30 ACN%; 나노바디(화합물 79) Rt = m/z 13802에서 8.46 분; 생성물: m/z 14263에서 9.99분. 나노바디-PEG₃-TCO 용액(500 μ L pH 6.5 PBS)에 MQ 물(15 μ L) 중 G2 덴드리머 화합물 107(179 μ g, 0.020 μ mol) 용액을 첨가하였다. 4°C에서 밤새 방치한 후, 반응 혼합물을 화합물 74 및 764의 정제에 사용된 것과 동일한 방법을 사용하여 정제하여 화합물 99(12 μ g; 도 1i, 레인 1에 도시된 바와 같음)를 pH 8 Tris 완충제 중 용액으로 얻었다(최종 농도 = 575 μ g/mL).

표 1. 제조된 화합물의 표

순서	화합물 설명
1	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PNBoc) ₂]
2	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PNH ₂ .TFA) ₂]
3	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Boc] ₄
4	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NH ₂ .TFA] ₄
5	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄
6	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH ₂ .TFA)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄
7	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Boc] ₈
8	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NH ₂ .TFA] ₈
9	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈
10	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ .TFA)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈
11	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-Fmoc)] ₈
12	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NH ₂)] ₈
13	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈
14	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ .TFA)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈
15	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Boc)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈
16	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ .TFA)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈
17	아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄ / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-DGA-Dox)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄ G2
18	아지도-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₄ / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-DGA-Nemo)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3
19	아지도-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₅₇₀) ₈], G3 / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₅₇₀)] ₈ G3
20	아지도-PEG ₂₄ -CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]

[0663]

	/ 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G 3
21	아지도-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-CO PEG ₂₀₀₀) ₈] / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG ₂₀₀₀)] ₈ G 3
22	아지도-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NHDGA-MMAF(OMe)) ₈ (ε- NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-DGA-MMAF(OMe))(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3
23	아지도-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NHDGA-Pt(IV) 아세테이트)] ₈ (ε-NH-COP EG ₁₁₀₀)] ₈ , G3, / 아지도-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Pt(IV)-아세테이트)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ G3
24	애피바디-MPED-BCN-트리아졸로-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-DGA-3'-NH- Dox) ₁₋₄ (ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₄ / 애피바디-G2-DGA-Dox/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체
25	애피바디-MPED-BCN-트리아졸로-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-DGA-3'-NH- Dox)(ε-NHPEG ₁₁₀₀)] ₈ , G3 / 애피바디-G3-DGA-Dox/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체
26	애피바디-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMA E) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / 애피바디-G3-MMAE/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체
27	애피바디-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMA E) ₈ (ε-NH-COPEG ₂₀₀₀) ₈] / 애피바디-G3-MMAE/PEG ₂₀₀₀ 덴드리머 접합체
28	애피바디-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH-DGA-Pt(IV)-아세테이 트)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀)] ₈ , G3 / 애피바디-G3-Pt(IV)-아세테이트 /PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체

[0664]

29	Fab-트리아졸로DBCO-PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NHP EG ₁₁₀₀) ₄ G2-Dox/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 / Fab-G2-독소루비신/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체
30	애피바디-BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NHDGA-MMAF (OMe) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / 애피바디-G3-MMAF/PEG ₁₁₀₀ 덴드리머 접합체
31	BCN-PEG ₂ -Glu-CO-NHPEG ₂₄ CO ₂ H / BCN-PEG ₂ -Glu-PEG ₂₄ -CO ₂ H
32	BCN-PEG ₂ -Glu-CO-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / BCN-PEG ₂ -Glu-PEG ₂₄ -PEG ₃ -TCO
33	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-Glu-PEG ₂₄ -PEG ₃ -TCO
34	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α-NH ₂) ₄₋₇](ε-NH-CO PEG ₁₀₀₀) ₈ , G3 / BHA-[Lys] ₈ [(α-(MeTzPh-PEG ₄ -PEG ₂₄)) ₁ (α-NH ₂) ₇ (ε-NHPEG ₁₀₀₀) ₈]
35	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₂ -BCN)) ₁₋₄ (α-NH ₂) ₄₋₇](ε-NH-COPE G ₁₀₀₀) ₈ , G3 / BHA-[Lys] ₈ [(α-(BCN-PEG ₃ -Glu-PEG ₂₄)) ₁ (α-NH ₂) ₇ (ε-NHPEG ₁₀₀₀) ₈]
36	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH-Cy5)) ₁₋₄ (α-NH-Glu-V al-Cit-PAB-MMAE) ₄₋₇](ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈ / MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5)) ₁ (α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
37	MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Cy5)) ₁ (α-NHAc) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈ / MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-Cy5)) ₁ (α-NHAc) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
38	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-NHCy5)) ₁ (α-NHAc) ₁₅ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₁₆ / MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-Cy5)) ₁ (α-NHAc) ₁₅ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₁₆]
39	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-NHCy5)) ₁ (α-NHAc) ₃₁ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₃₂ / MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-Cy5)) ₁ (α-NHAc) ₃₁ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₃₂]

[0665]

40	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₂ [³ H-Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE) ₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈] / MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ CO[N(PN) ₂][3H-Lys] ₄ [Lys(α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₈ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
41	나노바디-PEG ₁₂ -TCO-MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5) ₁ (α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
42	나노바디-PEG ₁₂ -TCO-MePhTz-PEG ₄ -PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-(Cy5) ₁ (α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₇ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
43	나노바디-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₁₅ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₁₆]
44	나노바디-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-Cy5) ₁ (α-NHAc) ₃₁ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₃₂]
45	나노바디-PEG ₁₂ -TCO-MeTzPh-PEG ₄ PEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][3H-Lys] ₄ [Lys(α-Glu-VC-PAB-MMAE) ₈ (ε-NHPEG ₁₁₀₀) ₈]
46	(MeTzPh)-PEG ₂₄ -CO[N(PNBoc) ₂]
47	(MeTzPh)-PEG ₂₄ -CO[N(PNH ₂ .HCl) ₂]
48	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PNH ₂ .HCl) ₂]
49	((MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NHBoc] ₄
50	((MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₂ [NH ₂ .HCl] ₄
51	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NHBoc] ₈
52	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₄ [NH ₂ .HCl] ₈
53	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH ₂ .HCl)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
54	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₈ [NH ₂ .HCl] ₁₆
55	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [(α-NH ₂ .HCl)(ε-NH-CO-PEG ₁₁₀₀) ₁₆]
56	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₁₆ [NH ₂ .TFA] ₃₂
57	(MeTzPh)-PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ -CO[N(PN) ₂][Lys] ₃₂ [(α-NH ₂ .TFA)(ε-NH-CO-PEG ₁₁₀₀) ₃₂]
58	카바지탁셀 (CTX)-2'-OCOO-oPNP 에스테르
59	Fmoc-Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc)
60	TFA.NH ₂ -Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc)
61	COOH-PEG ₉ -Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMeBoc)
62	COOH-PEG ₉ -Val-Ala-PAB-P-트리거-(NMe.TFA)
63	COOH-PEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-트리거-NMeCO-CTX
46	아지도-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α-NHDGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₄]
65	아지도-PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
66	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Lys] ₈ [(α-NHDFO) ₂ (α-NHGI

[0666]

	u-Val-Cit-PAB-MMAE) ₆)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
67	BHA[Lys] ₈ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁ (α-NHDFO) ₂ (α-NHGl u-Val-Cit-PAB-MMAE) ₅)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
68	(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [Lys] ₈ (((α-NHCy5) ₁ (α-NHGl u-SN38) ₇)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
69	BHA[Lys] ₃₂ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α-NH ₂) ₂₈₋₃₁ (ε-NH-C OPEG ₁₁₀₀) ₃₂]
70	BHA[Lys] ₃₂ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁₋₄ (α-NHCy5) ₁ (α-NH-C OPEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-트리거-NHCO-CTX) ₂₂)(α-NH ₂) ₅₋₈ (ε-NH-COPEG _{110 0}) ₃₂]
71	0 피바 BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -NHDGA-14-O-Nemo)(ε-N H-COPEG ₁₁₀₀)] ₄
72	0 피바 BCN/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ [(α -NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COP EG ₁₁₀₀)] ₈
73	Fab-DBCO/N ₃ -PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₄ [(α -NHDGA-14-O-Nemo)(ε-NH-CO PEG ₁₁₀₀)] / G2-Nemo/PEG1100 덴드리머
74	나노바 N ₃ /DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NH PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ (((α-NHDFO) ₂ (α-NHGl u-Val-Cit-PAB-MMAE) ₆)(ε- NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
75	나노바 N ₃ /BCN-NHPEG ₂ -Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NHPEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ (((α-NHDFO) ₂ (α-NHGl u-Val-Cit-PAB-MM AE) ₆)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
76	BHA[Lys] ₈ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG _{2 4} NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바) ₁ (α-NHDFO) ₂ (α-NHGl u-Val-Cit-PAB-MMAE) ₅)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
77	나노바 N ₃ /DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO/(MeTzPh)PEG ₄ CO-NH PEG ₂₄ CO-[N(PN) ₂][Lys] ₈ (((α-NHCy5) ₁ (α-NHGl u-SN38) ₇)(ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₈]
78	BHA[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [Lys] ₃₂ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeT z)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바) ₁₋₄ (α-NHCy5) ₁ (α-NH -COPEG ₉ -Val-Arg-PAB-P-트리거-NHCO-CTX) ₂₂)(α-NH ₂) ₅₋₈ (ε-NH-COPEG ₁₁₀₀) ₃₂]
79	나노바 (플레인) GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQG EVQL VESGGSLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGT HTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTW FEKSGSAGQGTQVTYSS
80	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ -TCO
81	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PE G ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆)(ε- NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3
82	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ (((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe/TCO-PEG ₃ NH-

[0667]

	COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
83	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
84	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
85	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [Lys] ₁₆ [Lys] ₃₂ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₀ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
86	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2 (“나노바디-N3-C-말단 태그” 사용)
87	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₂₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₀₋₁ (ε-NHCOPEG ₁₀₀₀) ₄], G2 (“나노바디-N3-C-말단 태그” 사용)
88	BHALys[Lys] ₂ [Lys] ₄ [Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3 (“나노바디-N3-C-말단 태그” 사용)
88a	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₅ (ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3
89	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
89a	BHA[Lys] ₈ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₅ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3, 화합물 89a
90	BHA[Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
91	BHA[Lys] ₁₆ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₁₋₁₃ (ε-NHCOPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
92	BHA[Lys] ₃₂ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₀ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
93	BHA[Lys] ₃₂ [((α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디)) ₂₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂₇₋₂₉ (ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5

[0668]

	-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
94	BHA[Lys] ₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₁ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디) ₃], G2
94a	BHA[Lys] ₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)) ₂ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디) ₂], G2,
95	BHA[Lys] ₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhMeTz)/TCO-PEG ₃ NH-COPEG ₂₄ NH-Glu-DBCO/N ₃ -나노바디) ₄], G2
96	DBCO-Glu-NHPEG ₂₄ CO-NHPEG ₃ -TCO / DBCO-PEG ₁₂ -TCO
97	BHA[Lys] ₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₈ -나노바디) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)) ₁ (ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
98	BHA[Lys] ₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)/TCO-PEG ₃ -나노바디) ₁₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)) ₁ (ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₀₋₂](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
99	BHA[Lys] ₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₃ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₀₋₂](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
100	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃₋₆](ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3
101	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₆](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
102	BHA[Lys] ₁₆ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₁₄](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
103	BHA[Lys] ₃₂ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₂₇₋₃₀](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
104	나노바디-N3-C-말단 태그/DBCO-DFO
105	BHA[Lys] ₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
106	BHA[Lys] ₄ [(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
107	BHA[Lys] ₄ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₃](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₄], G2
108	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]
109	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₇](ε-NH-COPEG ₄₁₂) ₈], G3
110	BHA[Lys] ₈ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₇](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₈], G3
111	BHA[Lys] ₁₆ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁ (α-NH ₂) ₁₅](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₁₆], G4
112	BHA[Lys] ₃₂ [(α-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₁₋₄ (α-NH ₂) ₂₈₋₃₁](ε-NH-COPEG ₁₀₀₀) ₃₂], G5
113	BHA[Lys] ₄ [(α-NHBoc) ₄ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
114	BHA[Lys] ₄ [(α-NH ₂ .HCl) ₄ (ε-NH-COPEG ₂₄ NH-COPEG ₄ (PhTzMe)) ₄], G2
115	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH ₂)]
116	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] 웨지

[0669]

[0670] 실시예 4: HER2-표적화된 덴드리머 접합체의 합성

[0671] a) 나노바디 서열 정보

[0672] 나노바디 2D3 서열 화합물 79

[0673] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGHTTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQTVSS

[0674] 나노바디 2D3 N-말단 태그, TEV, C-말단 아지드 ("N-말단 태그-나노바디-N3")

[0675] GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGHTTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQTVSS#

[0676] 나노바디 2D3, C-말단 태그 있음, TEV, 아지드 ("나노바디-N3-C-말단 태그")

[0677] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGHTTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRD

AGTTWFEKSGSAGQGTQVTSS#ENLYFQGHHHHHH

[0678] # = 비천연 아미노산.

[0679] b) 나노바디-N3 발현 플라스미드

[0680] 항-HER2 나노바디 클론 2D3의 코딩 서열(US20110028695A1 서열번호: 1986)을 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 발현 플라스미드 pET-His6-TEV-1B(애드진 플라스미드(Addgene plasmid) 29653)에 삽입하였다. 대장균 K12 코돈 최적화된 DNA 서열을 합성한 다음 플라스미드 pET-His6-TEV-1B에 클로닝하였다.

[0681] 재조합 단백질에 비천연 아미노산을 통합하기 위해 앰버 종결 코돈(amber stop codon)(TAG)이 나노바디 코딩 서열의 마지막 위치에 프레임 내 삽입된 다음 번역 종료를 위한 오키(ochre)(TAA) 또는 오팔(opal)(TGA) 종결 코돈이 삽입되었다. C-말단 his6 태그가 사용된 경우, 앰버 종결 코돈(TAG)은 나노바디 코딩 서열의 마지막 위치에 프레임 내 삽입되었고, TEV 프로테아제 절단 부위 및 6his 태그를 코딩하는 서열에 이어 번역 종료를 위한 오키(TAA) 또는 오팔(TGA) 종결 코돈이 이 서열에 추가되었다.

[0682] c) 나노바디-N3의 발현 및 정제

[0683] 항-HER2 나노바디 2D3 발현은 나노바디 발현 플라스미드 및 직교 쌍 발현 플라스미드 pEVOL-pAcFRS.2.t1로 형질 전환된 대장균 균주 B95(DE3)(Mukai 등, *Scientific Reports* (2015), 5, 9699)에서 수행되었다(Amiram 등, *Nat. Biotechnol* (2015), 33(12). 세포를 OD₆₀₀ 0.7-1.0의 세포 밀도에 도달할 때까지 37°C에서 배플된 진탕 플라스크에 함유된 Terrific 배지(25g/L 트립톤, 30g/L 효모 및 5g/L 글리세롤, 0.017M KH₂PO₄, 0.072M K₂HPO₄)에서 배양하였다. 재조합 단백질 발현은 1.5mM p-아지도-페닐알라닌의 첨가와 함께 1.5mM IPTG 및 0.05%w/v L-(+)-아라비노스의 첨가에 의해 유도되었고, 25°C에서 20시간 동안 진행되도록 하였다. 원심분리에 의해 박테리아를 수확하고 고압 균질화, 이어서 프로테아제 억제제 칵테일, 리소자임의 처리 및 DNase 처리로 세포 용해물을 생성하였다. 불용성 물질은 리폴딩(refolding) 완충제(6M 구아니딘 HCl, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 8)에 용해될 수 있다. 고속 원심분리 및 0.45 μm 막 필터를 통한 여과로 정화한 후, his6 태그된 나노바디를 니켈 충전된 니트릴로트리아세트산-아가로스를 사용하는 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 정제하였다. 컬럼 부피의 3M 구아니딘 HCl, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 8로 결합된 단백질을 먼저 세척한 다음 2 컬럼 부피의 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 8로 결합된 단백질을 세척함으로써 컬럼의 리폴딩이 달성되었다. 결합된 단백질을 2 컬럼 부피의 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM 이미다졸, pH 8로 용리하였다. IMAC 후, -나노바디-N3를 HiTrap Q HP 컬럼(GE Healthcare, 카탈로그 17115301)을 사용하여 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제하였다. 결합 및 세척 단계는 Tris 완충제(20mM, pH 8)를 사용하여 수행하고 용리는 0%에서 50%의 1M NaCl 완충제(1M NaCl, 20mM Tris, pH 8)의 구배를 사용하여 수행하였다. 수득한 관련 나노바디 분획을 Amicon 10k MWCO 필터 유닛(Merck, 카탈로그 UFC901008)을 사용하여 20mM Tris, pH 8로 완충제 교환하였다.

[0684] d) 텐드리머에 대한 나노바디-N3-C-말단 태그의 접합

[0685] 나노바디-N3-C-말단 태그는 링커 DBCO-Glu-NHPEG₂₄CO-NHPEG₃-TCO(화합물 51, Click Chemistry Tools)를 사용하는 것을 제외하고 화합물 74 및 76에 대해 기술된 절차에 따라 화합물 86-95를 생성하기 위해 생체-직교 클릭 화학을 사용하여 텐드리머 화합물 81-85에 접합되었다.

[0686] 겔은 화합물 41 내지 45에 대해 실행되었으며, 이는 나노바디-텐드리머 접합체의 적절한 MW에서 밴드를 나타냈다. 각각의 나노바디-텐드리머 접합체의 순도는 비환원성 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 사용하여 확인하였다(도 3). 4-15% 폴리아크릴아미드 겔(Bio-rad, 카탈로그 4561086)에서 전기영동 분리 후 나노바디-텐드리머 접합체는 Typhoon Biomolecular Imager(GE Healthcare)를 사용하여 영상화하는 경우 대략 텐드리머의 크기에 나노바디의 추가 질량을 더한 크기에 해당하는 형광 밴드로 나타난다. 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue, CBB)를 사용한 후속 염색으로 동일한 위치에서 나노바디의 존재가 드러났다. 미반응 나노바디의 부재 및 제제의 순도를 나타내는 다른 밴드는 CBB에 의해 드러나지 않았다.

[0687] 실시예 5 에피바디-MMAE 텐드리머의 Erb2 ECD와의 SPR 결합 연구

[0688] ErbB2-ECD의 직접 고정화

[0689] ProteOn XPR36 기기를 사용하여 ErbB2-ECD를 HBS-P+ 실행 완충제(running buffer)(10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)와 함께 GLC 센서 칩 표면(Bio-Rad)에 25℃에서 고정화하였다. 이 고정에는 Bio-Rad의 아민 커플링 키트에 설명된 표준 아민 커플링 방법을 사용하였다. 레인 1은 EDC(0.5mM)와 설포-NHS(0.125mM)의 50:50 혼합물로 활성화하였다. ErbB2 단백질을 10mM 아세트산나트륨, pH 5.0에서 2 mg/mL로 희석하고 활성화된 표면 채널에 주입하였다. 임의의 남은 활성화된 부위는 1M 에탄올아민-HCl, pH 8.5로 차단되었다. 약 590RU(1RU = 단백질 1pg/mm²)의 평균 반응 수준에서 단백질 커플링이 관찰되었다.

[0690] SPR 실험 분석

[0691] 모든 SPR 결합 실험은 HBS-EP+/BSA(10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20, 0.1 mg/mL BSA)를 기기 실행 완충제(RB)로 사용하여 25℃에서 수행하였다. 고정화 절차에 따라 다양한 농도의 항-ErbB2 애포바디 및 이들의 MMAE-덴드리머 접합체를 고정화된 ErbB2 단백질에 60 μl/분으로 주입하고 이들의 회합을 90초 동안 모니터링하였다. 후속적으로 실행 완충제를 결합된 Ab-ErbB2 복합체에 주입하고 최대 60분 동안 해리를 모니터링하였다. Herceptin 및 애포바디 대조군은 합리적인 시간 프레임(≤60분)에서 실행 완충제의 칩 표면에서 분리되지 않았다. 모든 결합 측정은 삼중으로 수행하였다.

[0692] SPR 데이터 처리 및 분석

[0693] 수집된 실험 데이터는 Scrubber-Pro 소프트웨어(www.biologic.com.au)를 사용하여 처리하였다. 운동 매개변수 (k_a = 회합 및 k_d = 해리 속도 상수) 및 평형 해리 상수($K_D = k_d/k_a$)는 각 실험 데이터 세트를 랭뮤어(Langmuir) 1:1 결합 모델에 피팅하여 유도하였다. 모든 결합 매개변수는 평균값 +/- 표준 편차로 보고되었다.

[0694] SPR 결과

[0695] 애포바디-MMAE-덴드리머 접합체는 고전적인 운동 결합 프로필을 생성하는 과정에서 ErbB2 단백질에 특이적으로 결합한다. 애포바디-MMAE-덴드리머 접합체의 운동 결합 분석은 용량 반응 방법론을 사용하여 후속적으로 수행하였다. SPR 센서그램(sensorgram)에서 파생된 운동 속도 및 친화도 매개변수는 아래에 요약되어 있다. 애포바디는 이량체이므로 덴드리머 접합체에 사용되는 단량체 애포바디에 대해 관찰되는 것보다 결합 상수가 낮다. 화합물 20 및 21에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다. 결과는 천연 애포바디와 비교하여 감소된 양이지만 애포바디-덴드리머 표적의 나노물 특이적 결합을 분명히 나타낸다.

[0696] 표 2 SPR 결합 연구

	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)x10 ⁴	k_d (s ⁻¹)x10 ⁻⁴	K_D
Herceptin	230 ± 10	0.1 ± 0.0	4.3 ± 0.1 (pM)
애포바디	190 ± 30	5.1 ± 0.2	266 ± 46(pM)
화합물 26 (애포바디-MMAE-PEG 1100)	2.5 ± 0.2	13.0 ± 00.1	50 ± 5(nM)
화합물 27 (애포바디-MMAE-PEG 2000)	3.2 ± 0.2	11.4 ± 00.3	36 ± 3(nM)
화합물 20 (G3-MMAE-PEG 1100)	-	-	-
화합물 21 (G3-MMAE-PEG 2000)	-	-	-

[0697]

[0698] 실시예 6. 애포바디-MMAE 덴드리머에 의한 세포 성장 억제(SRB 검정)

[0699] HER2-(ES2) 및 HER2+(SKOV3) 세포주에서의 세포 성장 억제는 각 실험을 이중으로 실행하면서 72시간 후 다양한 암세포주에 대해 설포로다민(Sulforhodamine) B(SRB) 분석[Voigt W. "Sulforhodamine B assay and

chemosensitivity" Methods Mol. Med. 2005, 110, 39-48.]을 사용하여 결정하였다. GI50은 NCI 표준 프로토콜에 따라 전체 세포 성장을 50% 억제하는 데 필요한 농도이다.

모든 화합물은 동등한 약물 로딩을 기반으로 테스트하였다. 결과는 PEG 1100 표적화된 덴드리머 접합체가 PEG 2000 표면이 있는 덴드리머보다 세포 성장을 억제하는 데 더 효과적임을 보여준다. 에피바디 단독은 HER2+ 또는 HER2- 세포주에서 이 검정에서 효과가 없었다.

표 3 HER2⁻ (ES2) 및 HER2⁺ (SKOV3) 세포에서의 세포 성장 억제

시험된 화합물	사용된 용매	ES2 세포주	SKOV3 세포주
		GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)
MMAE	DMSO	<5, 2	<5, 0.6
MMAE-Cit-Val-PAB	DMSO	320, >500	201, 330
에피바디	PBS	>500, >500	>500, >500
화합물 26	PBS	248, 250	4, 5
화합물 27	PBS	>100	>500

실시예 7 생체 내 에피바디-MMAE 덴드리머의 내약성

마우스 그룹에 3주 동안 매주 1회(1일, 8일 및 15일) 덴드리머(PBS 중 0.1 - 0.3 mL 용액)를 정맥 주사하였다. 마우스의 체중을 매일 측정하고 독성 징후를 관찰하였다. 동물은 최종 약물 투여 후 최대 10일 동안 모니터링하였다. 윤리적 엔드포인트(ethical endpoint)를 초과하는 모든 마우스(체중 감소 ≥20%, 전반적인 건강 상태 불량)는 즉시 희생시키고 관찰을 기록하였다.

1 mg/kg의 화합물 26은 nude SCID 및 balb/c 마우스 모두에서 내약성이 우수했으며 건강이 좋지 않아 희생이 필요한 동물이 없었다.

실시예 8: 접합체의 시험관 내 효능

사용된 세포주에 대한 설명:

세포주	암 유형	Her2 상태	세포당 보고된 Her2 수용체 밀도	EGFR (Her1) 밀도	Her 3 상태
MDA-MB-231	유방암	1+		200,000	낮음/중간
SKOV-3	난소암	2+/3+	3-700,000	50,000	낮음
SK-BR-3	유방암	3+	~1,500,000		중간
NCI-N87	위암	3+	~1,300,000		낮음
OE19	식도암	3+	>1,000,000		

GI₅₀ 결과:

MDA-MB-231, SKOV-3, SK-Br-3, NCI-N87 및 OE-19 세포에 대한 Herceptin®, Kadcyla®, 라파티닙(Lapatinib), 화합물 36(대조군) 및 2D3 나노바디 표적화된 덴드리머(화합물 41)의 세포독성을 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. 세포를 96웰 플레이트에 5 × 103의 밀도로 시딩하고 밤새 배양하였다. 이어서 세포를 72시간(또는 Herceptin의 경우 6일) 동안 테스트 조성물의 1 로그 단위 연속 희석액으로 처리하였다. 10% 배지 부피의 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(Merck, Cat# M5655, 5 mg/mL 멸균 용액)는 배양의 마지막 2시간 동안

첨가하였다. 살아있는 세포에서 MTT를 감소시키면 불용성 보라색 포마잔(formazan) 대사산물이 생성된다. 2시간 동안 배양한 후 모든 배지를 분석 플레이트에서 제거하고 100 μ l의 DMSO를 첨가하고 플레이트를 570nm에서 흡광도를 즉시 판독하였다. GI₅₀은 세포의 성장/증식을 50% 억제하는 농도로 정의된다. 세포 생존율 및 후속 GI₅₀ 값은 GraphPad Prism 7.02에서 4-매개변수 비선형 곡선 피트로 블랭크 보정된 용량-반응 곡선으로부터 결정되었다. 결과는 본 개시내용의 예시적인 접합체가 SK-BR-3, NCI-N87 및 OE19와 같은 HER2를 과발현하는 세포주에 대해 강력한 세포독성 효과가 있다는 것을 입증한다.

[0711] IC 50 결과

	Herceptin (n=3)	Kadcyla* (n=3)	라파티닙 (n=2)	화합물 41 (n=2)	화합물 36 (n=2)
성장 억제 %	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM	GI ₅₀ nM
MDA-MB-231	1.7	22.9	112,000	172	12,470
SKOV-3	10	50.7	7,200	13.1	1600
SK-BR-3	51	0.04	138	0.83	948
NCI-N87	52	0.10	8.1	0.61	2040
OE19	62	0.06	200	1.67	6120

* 예상 중량 ADC 기준; # MMAE 약물 등가 기준

[0712] 한 쌍의 hi/lo HER2 세포주에 대한 HER2+ MDA-MB-231 유방암 세포주의 생성

MDA-MB-231 유방암 세포는 제조업체의 지침에 따라 Lipofectamine 3000을 사용하여 플라스미드 HER2 WT Addgene, 16257)로 형질감염시켰다. 500ug/mL Geneticin(Thermo Fisher, 카탈로그 10131035)의 존재하에 계대한 후, HER2 WT의 안정적인 과발현이 있는 세포를 MoFlo Astrios(Beckman Coulter)를 사용하여 형광 활성화된 단일 세포 분류에 의해 분리하였다. 이 과정에서 분리된 클론 세포 집단은 두 번째 라운드의 세포 분류 및 전이 유전자(transgene) 발현 스크리닝 전에 Geneticin에서 추가로 계대하였다. 이어서 선택된 클론을 추가로 확장하고 MDA-MB-231/HER2로 지칭되는 이 세포주의 스톡을 동결보존하여 안정적으로 형질도입된 세포의 마스터 스톡을 생성하였다.

[0715] lo/hi 발현 MDA-MB-231 모델에서의 IC50 결과:

MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 형질감염된 세포에 대한 화합물 36(대조군) 및 화합물 41(표적화됨)의 세포독성을 alamarBlue 검정을 통해 평가하였다. 세포를 96웰 플레이트에 5×10^3 의 밀도로 시딩하고 밤새 배양하였다. 이어서 세포를 48시간 동안 표시된 농도의 시험 조성물로 처리하였다. alamarBlue(Thermo Fisher, DAL1025)는 배양의 마지막 4시간 동안 첨가하였다. 살아있는 세포에서 alamarBlue의 감소는 플레이트 판독기에서 판독할 수 있는 적색 형광 대사산물을 생성한다(560nm 여기/610nm 방출). 세포 생존율 및 후속 IC₅₀은 GraphPad Prism 7.02에서 4-매개변수 비선형 곡선 피트, 가변 기울기(4개 매개변수)를 사용하여 블랭크 보정된 용량-반응 곡선으로부터 결정되었다. 아래 표는 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 세포가 있는 화합물 36(대조군) 및 화합물 41(표적화됨)의 IC₅₀ 값을 보여준다. 화합물 36(대조군) 및 화합물 41(표적화됨)을 포함하는 MDA-MB-231/HER2의 IC₅₀ 값은 각각 2.842 μ M 및 13.55nM이었다. 화합물 41(표적화됨)은 화합물 36(대조군)과 비교하여 MDA-MB-231/HER2 세포 성장 억제가 대략 140배 증가한다.

상이한 MMAE 농도에서 화합물 36(대조군)의 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2에 대한 용량 반응 곡선 및 IC₅₀ 값이 아래에 제공된다. 값은 평균±표준 편차(sd, n = 4)이다:

	화합물 36 (세포 생존력 %)	
MMAE 농도 (M)	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
5×10^{-5}	81.1 ± 5.4	49.9 ± 15.0
1×10^{-5}	94.2 ± 12.1	61.6 ± 3.1
1×10^{-6}	94.4 ± 8.2	78.2 ± 9.1
1×10^{-7}	94.2 ± 12.5	96.1 ± 3.6
1×10^{-8}	96.6 ± 11.7	95.4 ± 7.6
IC ₅₀	불분명	2.842 μ M

[0718]

[0719]

상이한 MMAE 농도에서 화합물 41(표적화됨)의 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2에 대한 용량 반응 곡선 및 IC₅₀ 값. 값은 평균±표준 편차(sd, n = 4)이다:

	화합물 41 (세포 생존력 %)	
MMAE 농도 (M)	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
1×10^{-6}	-	5.25 ± 1.24
1×10^{-7}	-	10.9 ± 2.4
2.5×10^{-8}	49.7 ± 2.7	27.4 ± 1.3
1×10^{-8}	67.2 ± 3.0	57.8 ± 2.3
1×10^{-9}	81.0 ± 1.8	80.0 ± 3.3
1×10^{-10}	87.6 ± 4.2	91.1 ± 2.5
1×10^{-11}	96.1 ± 5.6	90.0 ± 3.0
IC ₅₀	불분명	13.55 nM

[0720]

[0721]

실시예 9: HER2+ 세포에 대한 2D3-덴드리머 접합체의 결합

[0722]

시아닌 5(Cy5), 화합물 42, 43 및 44로 표지된 다양한 크기의 나노바디-덴드리머 접합체를 사용하여 비표적화 화합물 37, 38 및 39(G3, G4 및 G5)에 대한 HER2+ 인간 세포주로의 결합을 입증하였다. HER2 발현 인간 전이성 암종 세포주 MDA-MB-453(ATCC HTB-131) 및 HER2 음성 상피 선암종 세포주 MDA-MB-231(ATCC HTB-26)을 37°C에서 5% CO₂ 가습 대기하에 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신(100U/mL)을 함유한 둘베코 수정 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)에 유지하고 트립신을 사용하여 합류 전에 계대배양하였다. 인간 선암종 난소 세포주 SKOV-3(ATCC® HTB-77) 세포를 37°C, 5% CO₂ 가습 대기에서 10%(v/v) FBS 및 페니실린-스트렙토마이신(100U/mL)을 첨가한 rpmI 배지에 유지하고 합류 전 계대배양하였다.

[0723]

형광 현미경에 의한 세포 회합의 측정을 위해, 세포를 8웰 챔버 슬라이드에서 웰당 1×10^5 개 세포로 시딩하고 밤새 부착되도록 하였다. 다음 날, 비접합된 덴드리머 화합물 37, 38 및 39(대조군) 또는 나노바디 덴드리머 화합물 42, 43 및 44를 배지에 최종 농도 0.5ug/mL로 첨가하고 얼음 위에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 염색하여 원형질막(밀배아 응집소-alexa fluor 488)과 핵(Hoechst 33342)을 시각화하였다. 세포를 10% FBS가 보충된 냉각된 Fluorobrite 배지 400ul로 3회 세척하였다. 표준 "Pinkel" DAPI/FITC/CY5 필터 세트와 함께 40 ×

0.9 NA 대물렌즈가 있는 Olympus IX83 현미경을 사용하여 세포를 영상화하였다.

[0724] 유세포 분석에 의한 세포 회합의 측정을 위해, 현탁액 중의 세포를 96웰 검정 플레이트에 웰당 1×10^5 개 세포로 첨가하였다. 얼음 위에서 1시간 동안 나노바디-덴드리머 또는 비접합된 덴드리머와 함께 배양한 후, 세포를 10% FBS를 함유하는 DMEM 200 μ L로 3회 세척하여 결합되지 않은 덴드리머를 제거하였다. 이어서 세포를 0% FBS가 보충된 냉각된 Fluorobrite 배지에 재현탁하고 642nm 여기 및 661-691nm 사이에서 수집된 발광을 사용하여 Cy5 형광을 측정하였다. 내재화 역학을 측정하기 위해, 결합되지 않은 나노바디-덴드리머를 세척으로 제거하고 유세포 분석으로 분석하기 전에 나노바디-덴드리머를 37℃에서 24, 4, 1, 0.5 및 0.1시간 동안 세포와 함께 배양하였다.

[0725] 시험관 내 회합 연구

[0726] MDA-MB-231, MDA-MB-231/HER2(HER2 녹인(knock-in))(상술한 바와 같음) 또는 SKOV-3 세포를 10%(v/v) 태아 소혈청(FBS)이 첨가된 적절한 성장 배지 500 μ L 중 24웰 플레이트(웰당 1×10^5 개 세포)에 시딩하고 37℃, 5% CO₂ 가습 대기에서 1~24시간으로 다양한 배양 시간으로 3.33nM의 화합물 36 또는 41과 함께 배양하였다. 배양 후, DPBS로 3회(300 μ L/웰) 부드럽게 세척하여 비결합/비회합 입자를 부착 세포에서 제거하였다. TrypLE™ Express Enzyme(1X), 페놀 레드 없음(150 μ L/웰)으로 실온에서 5-10분 동안 처리하여 플레이트에서 세포를 제거하였다. 이어서 플레이트를 얼음 위에 놓았다. 그런 다음 Cy5에서 신호를 수집하여 유세포 분석을 통해 샘플의 세포 결합 및 회합을 결정하였다.

[0727] 유세포 분석:

[0728] 결과는 나노바디-덴드리머 화합물 42, 43 및 44가 HER2-양성 MDA-MB-453 세포에 결합함을 보여준다. 비접합된 덴드리머 화합물 37, 38 및 39는 MDA-MB-453 세포에 결합하지 않았다. 표시된 데이터는 표준 편차가 있는, 3중 웰에서 처리된 세포의 평균 MFI이다. Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용한 ANOVA가 통계 분석에 사용되었다.

[0729] 덴드리머와 함께 배양된 세포의 평균 형광 강도(Cy5):

시험된 화합물	MFI	분산 분석
세포만	3.047 $\pm$ 0.02	-
37	3.097 $\pm$ 0.01	NS
38	6.827 $\pm$ 0.07	NS
39	4.349 $\pm$ 0.08	NS
42	50.83 $\pm$ 14.98	<0.0001
43	158.4 $\pm$ 6.611	<0.0001
44	176.9 $\pm$ 4.041	<0.0001

[0730]

[0731] 유세포 분석 결과

[0732] 결과는 24시간에 걸쳐 모든 3개의 세포주에 대한 화합물 36(대조군)의 최소 결합을 분명히 나타낸다. 화합물 41(표적화됨)은 세포주의 HER2 수용체 발현 수준과 관련하여 증가하는 결합을 나타냈다. 24시간까지, 유세포 분석으로 화합물 41(146.1 $\pm$ 9.6)로 처리된 MDA-MB-231/HER2 세포가 화합물 36(16.05 $\pm$ 1.89)으로 처리된 세포와 비교하여 약 9배 더 강한 형광을 나타내는 것으로 드러났다. 또한, 화합물 41(277.5 $\pm$ 5.9)로 처리된 SKOV-3 세포는 화합물 36(16.4 $\pm$ 6.86)으로 처리된 세포에 비해 약 16배 더 강한 형광을 나타냈다. 결과는 도 4에 나와 있다.

[0733] 덴드리머 크기 G3 내지 G5:

[0734] 추가 덴드리머 세대를 테스트하였다: 화합물 37 및 42(G3), 화합물 38 및 43(G4) 및 화합물 39 및 44(G5), 각각 비접합 및 2D3에 접합. 비접합된 대조군 덴드리머 화합물 37, 38 및 39는 MDA-MB-231(HER2 음성) 및 MDA-MB-231/HER2(HER2 양성)와의 회합이 유의하게 더 낮았다. 2D3 접합된 덴드리머 42, 43 및 44는 24시간에 걸쳐 MDA-MB-231/HER2와의 회합이 유의했으며, 화합물 44(G5)는 가장 높은 퍼센트(73.47% $\pm$ 0.92)의 세포 회합을 나타내고, 두 번째는 화합물 42(G3, 60.73 $\pm$ 0.21) 및 화합물 43(G4, 56.27 $\pm$ 1.02)이다. 덴드리머 생성에 관계없이

덴드리머와 접합된 2D3 HER2-나노바디는 HER2 수용체를 과발현하는 세포에 대한 결합을 실질적으로 개선한다.

[0735]

24시간 동안 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 세포와 화합물 42(G3), 화합물 43(G4) 및 화합물 44(G5)의 세포 회합 값의 백분율 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다(SD, n = 3):

MDA-MB-231/HER2							
시간(h)	화합물 42	화합물 43	화합물 44	화합물 86	화합물 89	화합물 90	화합물 92
0.25	0.67 $\pm$ 0.12	0.57 $\pm$ 0.12	0.43 $\pm$ 0.40	-	-	-	-
0.5	0.60 $\pm$ 0.0	0.67 $\pm$ 0.15	0.70 $\pm$ 0.10	189.7 $\pm$ 9.074	218.3 $\pm$ 16.5	157.3 $\pm$ 7.02	165.3 $\pm$ 31.5
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	2.57 $\pm$ 0.64	0.77 $\pm$ 0.15	2.80 $\pm$ 0.61	-	-	-	-
2	17.43 $\pm$ 4.15	6.13 $\pm$ 2.60	17.97 $\pm$ 2.20	-	-	-	-
4	50.63 $\pm$ 0.15	36.03 $\pm$ 2.36	59.77 $\pm$ 4.13	-	-	-	-
24	60.73 $\pm$ 0.21	56.27 $\pm$ 1.02	73.47 $\pm$ 0.92	-	-	-	-

[0736]

MDA-MB-231/HER2						
시간(h)	화합물 97	화합물 98	화합물 82	화합물 83	화합물 84	화합물 185
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	14.83 $\pm$ 1.60	43.23 $\pm$ 3.48	16.7 $\pm$ 2.48	25.6 $\pm$ 0.43
0.75	14.97 $\pm$ 0.7	82.5	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[0737]

MDA-MB-231							
시간(h)	화합물 42	화합물 43	화합물 44	화합물 86	화합물 89	화합물 90	화합물 92
0.25	1.07 $\pm$ 0.38	0.87 $\pm$ 0.25	0.53 $\pm$ 0.50	-	-	-	-
0.5	0.87 $\pm$ 0.12	0.53 $\pm$ 0.15	1.03 $\pm$ 0.32	30.77 $\pm$ 0.50	25.07 $\pm$ 3.91	20.03 $\pm$ 2.73	17.47 $\pm$ 1.62
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	0.80 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.44	1.37 $\pm$ 0.59	-	-	-	-
2	1.13 $\pm$ 0.21	0.77 $\pm$ 0.31	0.73 $\pm$ 0.49	-	-	-	-
4	0.93 $\pm$ 0.45	0.83 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.25	-	-	-	-
24	0.83 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.10	-	-	-	-

[0738]

MDA-MB-231						
시간 (h)	화합물 97	화합물 98	화합물 82	화합물 83	화합물 84	화합물 85
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	23.3±3.98	42.8±2.78	20.23±0.63	33.23±2.2
0.75	13.36 ± 2.82	0.15 ± 0.07				
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[0739]

[0740] 24시간 동안 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 세포와 화합물 37(G3), 화합물 38(G4) 및 화합물 39(G5)의 세포 회합 값의 백분율. 값은 평균±표준 편차이다(SD, n = 3):

MDA-MB-231/HER2			
시간 (h)	화합물 37	화합물 38	화합물 39
1	2.47 ± 0.81	0.90 ± 0.35	1.07 ± 0.35
2	1.00 ± 0.26	0.50 ± 0.10	0.83 ± 0.31
4	1.07 ± 0.64	0.50 ± 0.35	0.47 ± 0.21
24	0.60 ± 0.17	0.37 ± 0.15	0.53 ± 0.49

[0741]

MDA-MB-231			
시간 (h)	화합물 37	화합물 38	화합물 39
1	1.10 ± 0.35	0.80 ± 0.10	0.97 ± 0.12
2	1.23 ± 0.47	0.77 ± 0.06	1.07 ± 0.21
4	0.83 ± 0.15	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.15
24	0.73 ± 0.06	0.60 ± 0.17	0.57 ± 0.06

[0742]

[0743] 24시간 동안 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 세포를 사용한 화합물 42(G3), 화합물 43(G4) 및 화합물 44(G5)의 평균 형광 강도 값. 값은 평균±표준 편차이다(SD, n = 3):

MDA-MB-231			
시간 (h)	2D3-화합물 42	2D3-화합물 43	2D3-화합물 44
0.25	245.7 ± 17.5	227.3 ± 14.0	194.7 ± 95.8
0.5	228.0 ± 4.6	222.7 ± 2.1	245.0 ± 4.0
1	237.0 ± 9.2	229.7 ± 6.4	253.7 ± 12.9
2	241.0 ± 18.2	235.7 ± 4.0	233.3 ± 9.7
4	250.0 ± 5.8	246.3 ± 5.5	247.0 ± 10.6
24	224.3 ± 5.1	219.0 ± 4.6	223.0 ± 4.4

MDA-MB-231/HER2			
시간 (h)	2D3-화합물 42	2D3-화합물 43	2D3-화합물 44
0.25	235.0 ± 7.0	215.3 ± 14.0	207.0 ± 51.6
0.5	226.3 ± 8.7	224.3 ± 2.9	237.0 ± 9.5
1	294.3 ± 15.6	241.0 ± 11.5	295.0 ± 4.0
2	445.0 ± 33.2	342.3 ± 22.2	435.7 ± 16.3
4	799.7 ± 18.0	611.3 ± 35.2	1,038 ± 127.6
24	1,110 ± 27.8	1,012 ± 45.6	2,749 ± 88.1

[0744]

[0745]

24시간 동안 MDA-MB-231 및 MDA-MB-231/HER2 세포를 사용한 화합물 37(G3), 화합물 38(G4) 및 화합물 39(G5)의 평균 형광 강도 값. 값은 평균 ± 표준 편차이다(SD, n = 3):

MDA-MB-231/HER2			
시간 (h)	화합물 37	화합물 38	화합물 39
1	293.0 ± 8.5	269.0 ± 19.8	257.5 ± 12.0
2	268.0 ± 11.3	225.0 ± 5.7	249.0 ± 15.6
4	241.5 ± 17.7	198.0 ± 2.8	207.0 ± 2.8
24	206.0 ± 2.8	175.5 ± 0.7	207.5 ± 40.3

MDA-MB-231			
시간 (h)	화합물 37	화합물 38	화합물 39
1	258.3 ± 19.6	239.3 ± 1.2	252.0 ± 6.0
2	256.7 ± 24.8	230.7 ± 2.3	249.0 ± 8.7
4	221.3 ± 3.5	217.3 ± 3.2	247.3 ± 7.2
24	215.3 ± 4.9	195.7 ± 0.6	196.3 ± 3.1

[0746]

[0747]

접합체에 대한 유세포 분석 결과는 도 5에 나와 있다.

[0748]

실시예 10: HER2 과발현 세포로의 접합체의 내재화를 입증하는 연구

[0749]

공초점 세포 흡수

[0750]

MDA-MB-231, MDA-MB-231/HER2 및 SKOV-3 세포를 μ -슬라이드 8웰 챔버 커버슬립(ibidi)에 웰당 1.0×10^4 개 세포로 플레이팅하고 37°C, 5% CO₂에서 밤새 부착되도록 두었다. 이어서 화합물 36 및 41(3.33nm)을 첨가하고 1, 3, 6 및 24시간 동안 배양하였다. 세포를 세척한 후 실온에서 20분 동안 1% 파라포름알데히드로 고정하였다. 세포막을 실온에서 10분 동안 DPBS에서 Alexa Fluor 488-밀 배아 응집소(agglutinin)(AF488-WGA, 5 μ g mL⁻¹)로 염색하였다. 세포핵을 실온에서 10분 동안 DPBS에서 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, 2 μ g mL⁻¹)로 대조염색 하였다. 공초점 현미경(Leica SP8)을 사용하여 형광 이미지와 광학 섹션을 수집하였다. 이미지는 Fiji(이미지 J 1.52n)로 처리하였다.

- [0751] 공초점 현미경 이미지는 도 6-8에 나와 있다. 공초점 이미지는 24시간 배양 후 MDA-MB-231과 회합된 도 6a의 화합물 36 및 도 6b의 화합물 41 모두에서 거의 나타나지 않는다. 반면, 표적화된 화합물 41은 24시간 배양 후 MDA-MB-231/HER2 및 SKOV-3 세포에 의해 내재화되었지만(도 7a 및 8a), 화합물 36은 그렇지 않았다(도 7b 및 8b).
- [0752] **실시예 11 삼중수소 표지된 MMAE 접합된 덴드리머(화합물 40 및 45)의 종양 분포**
- [0753] MDA-MB-231/HER2 세포(50 μ L의 PBS:Matrigel에서 5×10^6 개 세포)를 암컷 NOD/SCID 마우스(5~7주령)의 4번째 유방 지방층(mammary fat pad)에 피하 이식하였다. 고형 종양은 100mm³(약 3-4주)까지 자라도록 하였다. 마우스는 각 그룹에 6마리의 마우스로 이루어진 두 개의 다른 그룹으로 나뉘었다. 이어서 화합물 40(대조군) 또는 화합물 45(표적화 군)(100 μ L 중 0.5 μ Ci, PBS pH 7)를 이소플루란(isoflurane) 진정 하에 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 마우스를 48시간 후 이소플루란으로 마취하고, 경추 탈구(cervical dislocation) 직전에 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다. 선택된 장기(종양, 간, 비장, 신장, 췌장, 폐, 심장 및 뇌 포함)를 후속적으로 제거하고, 중량을 측정하고, 삼중수소(³H) 생체분포(biodistribution)를 위해 처리하였다.
- [0754] 결과는 도 9에 나타나 있다. 표적화된 덴드리머 화합물 45는 비접합된 대조군 화합물 40(1.88% 용량/g $\pm$ 0.28)보다 HER2 양성 종양(3.53% 용량/g $\pm$ 0.43)에 더 많이 축적되었는데, 이는 종양 흡수가 약 80%(p < 0.05) 증가한 것에 해당한다. 혈중 농도의 차이는 각각 4.52% 용량/g $\pm$ 0.24 및 3.69% 용량/g $\pm$ 0.31로 표적화된 덴드리머와 대조군 덴드리머 사이에 유의하지 않았다. 약동학에서의 차이가 종양 보유에 영향을 미칠 가능성이 낮기 때문에 2D3 HER2-나노바디 표적화는 덴드리머 보유를 개선하였다.
- [0755] **실시예 12 SKOV3 종양 모델에서 Cy5 표지된 MMAE 접합된 덴드리머(화합물 36 및 41)의 종양 흡수의 효능 및 공초점 영상화**
- [0756] 암컷 NOD SCID 마우스(8주령)의 옆구리에 PBS:Matrigel(1:1) 중 3×10^6 개 OV3 세포를 피하 접종하였다. 고형 종양을 200mm³(약 3주)까지 자라도록 하였다. 마우스를 5개의 다른 그룹으로 나눈 다음, 화합물 36(대조군) 또는 화합물 41(표적화 그룹)(250 μ L, PBS pH 7 중 0.5mg/kg MMAE 등가물), Kadcyla® 40mg/kg 및 Herceptin® (40mg/kg)을 이소플루란 진정 하에 꼬리 정맥을 통해 주입하였다.
- [0757] (a) 공초점 영상화
- [0758] 마우스를 48시간 후 이소플루란으로 마취하고, 경추 탈구 직전에 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다(n=2/그룹). 후속적으로 종양을 제거하고, 4% 파라포름알데히드에서 밤새 고정하고, PBS로 세척하고, 아가로스에 봉입하였다. 이어서 종양을 핵(DAPI, 농도, 시간, 공급업체) 및 혈관(CD31, 농도, 시간, 공급업체)에 대해 염색된 섹션으로 100 μ m로 절단하였다. 공초점 현미경(Leica SP8)을 사용하여 형광 이미지와 광학 섹션을 수집하였다. 결과를 도 10 및 11에 나타냈다. 표적화된 덴드리머(화합물 41)는 종양의 코어 및 말초 영역에서 흡수를 나타냈지만 화합물 36은 그렇지 않았다.
- [0759] (b) 접합체의 효능
- [0760] 윤리적 엔드포인트가 충족될 때까지 종양 측정을 규칙적인 간격으로 수행하였다(n=6/그룹). 결과는 도 12(시간 경과에 따른 평균 종양 부피 플롯), 도 13(시간 경과에 따른 생존율 플롯) 및 도 14(시간 경과에 따른 평균 체중 변화 플롯)에 나타나 있다. 표적화된 덴드리머 화합물 41은 화합물 36, Herceptin® 및 Kadcyla®와 비교하여 전체 종양 퇴행을 나타냈다.
- [0761] **실시예 13. MDA-MB-231/HER2+ 세포주에서 4세대 다중 나노바디 덴드리머 내재화의 동역학**
- [0762] 상술한 바와 같이 분리된 1개(단일 나노바디) 또는 2개 내지 4개(다중 나노바디)의 항-HER2 2D3 나노바디, 화합물 90 및 91에 접합된, 사이드로포어(siderophore) 유래 킬레이터 데스페리옥사민(desferrioxamine, DFO)과의 4세대 Cy5 표지된 나노바디-덴드리머 접합체를 덴드리머당 서로 다른 수의 나노바디가 부착된 HER2+ 인간 세포주에 대한 결합을 비교하는 데 사용하였다.
- [0763] HER2 녹인(knock-in)이 있는 상피 선암종 세포주, MDA-MB-231/HER2(상술한 바와 같음)를 37°C에서 5% CO₂ 가습 대기하에 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신(100U mL⁻¹)을 함유하는 둘베코 수정 이슬 배지(DMEM)에 유지하였다.

- [0764] 유세포 분석에 의한 세포 결합의 측정을 위해, 웰당 20,000개의 세포를 10% FBS가 보충된 DMEM 배지에서 96웰 배양 플레이트에 밤새 플레이팅하였다. 단일 또는 다중 나노바디 덴드리머를 3, 6, 12 및 30nM에서 세포에 첨가하고 37℃에서 0.5, 1, 2, 4 및 6시간 동안 배양하였다. 동일한 방식으로 제조된 대조군 세포를 미리 냉각시키고 얼음 위에서 6시간 동안 30nM 단일 및 다중 나노바디 덴드리머와 함께 배양하였다.
- [0765] 나노바디 접합된 덴드리머로 배양한 후 세포를 1% 소 혈청 알부민이 보충된 빙냉 PBS로 3회 세척하여 결합되지 않은 덴드리머를 제거하고 TrypLE™ Express Enzyme(1X), 페놀 레드 없음(Gibco, 12604013)으로 플레이트에서 유리시켰다. Cy5로부터의 신호 획득에 의해 측정된 덴드리머의 존재하에 유세포 분석법(Stratedigm S1000EON, California)에 의한 분석을 위해 냉각된 DPBS에 세포를 재현탁시켰다. 각 농도 및 시점에서 내재화된 덴드리머의 양을 추정하기 위해 얼음 위에서 덴드리머와 함께 배양된 세포의 Cy5 신호를 내재화가 가정되지 않는 최대 표면 결합된 덴드리머로서 취했다. 이 신호는 표면 결합 및 내재화된 덴드리머를 나타내는, 37℃에서 배양된 세포에서 측정된 신호에서 차감되어 내재화된 덴드리머에서만 신호를 분리한다(도 15 참조).
- [0766] 다중(화합물 91) 접합된 항-HER2 나노바디 덴드리머는 단일(화합물 90)보다 낮은 농도에서 더 빨리 내재화된다. 더 높은 농도에서 화합물 90은 약 2시간 후에 화합물 91보다 더 큰 수준의 내재화를 나타낸다.
- [0767] **실시예 14. HER2 Hi 세포주에서 단일 및 다중 나노바디가 있는 접합체의 공초점 영상화**
- [0768] HER2 hi, SKOV-3 세포를 웰당 1.0×10^4 개 세포로 μ -슬라이드 8 웰 챔버 커버슬립(ibidi)에 플레이팅하고 37℃, 5% CO₂에서 밤새 부착되도록 하였다. 이어서 화합물 91(다중 2D3-덴드리머 접합체) 및 화합물 90(단일 2D3-덴드리머 접합체)(3.33nM)을 첨가하고 1, 3, 6 및 24시간 동안 배양하였다. 세포를 DPBS로 세척한 후 실온에서 20분 동안 1% 파라포름알데히드로 고정하였다. 세포막을 실온에서 10분 동안 DPBS에서 밀 배아 응집소의 Alexa Fluor 488® 접합체(AF488-WGA, 5 μ g mL⁻¹)로 염색하였다. 세포핵을 실온에서 10분 동안 PBS에서 Hoechst 33342(2 μ g mL⁻¹)로 대조염색하였다. 공초점 현미경(Leica SP8)을 사용하여 형광 이미지와 광학 섹션을 수집하였다. 이미지는 Fiji(ImageJ 1.52p)로 처리하였다.
- [0769] 공초점 현미경 이미지는 도 16 및 17에 나타나 있다. 화합물 90 및 91 둘 모두는 24시간의 배양 후에 SKOV-3 세포에 결합하고 내재화한다. 주목할 만하게, 화합물 91은 화합물 90과 비교하여 3 및 6시간 시점에서 더 큰 결합 및 내재화 정도를 나타낸다.
- [0770] 다중(화합물 91) 접합된 항-HER2 나노바디 G4 덴드리머는 이 농도에서 단일 나노바디 G4 덴드리머(화합물 90)보다 더 빨리 내재화되며 차이는 최대 6시간까지 볼 수 있지만 24시간까지는 다르게 나타나지 않는다.
- [0771] **실시예 15. 표적화된 Zr 방사성핵종 함유 덴드리머-SKOV3 유방암 이중이식편을 사용한 영상화 연구**
- [0772] 난소암의 SKOV3 무린(murine) 이중이식 모델에서 89Zr 표지된 HER2 표적화 및 비표적화 덴드리머 작제물의 축적을 조사하였다. 생체분포는 주입 후 9일까지 PET-CT로 측정하였고 2일 및 9일(가능한 경우)에 절제된 기관의 생체 외 감마 섬광 영상으로 검증하였다. 연구는 3가지 부분으로 수행하였다.
- [0773] **종양 개시 및 성장**
- [0774] 5×10^6 개 SKOV3 세포(50:50 matrigel:PBS 50 μ L)를 건강한 암컷 NOD-SCID(~20g) 8주령 마우스의 오른쪽 옆구리에 SC 주사하였다. 영상화 화합물을 주사하기 전에 종양을 4주 동안 자라게 하였다.
- [0775] 모든 종양은 영상화 당시 측정되었으며 영상화 실험 당시 크기는 ~3-5mm였다.
- [0776] **연구 화합물**
- [0777] 하기 표의 화합물은 아래 기술된 바와 같이 표지화되었다.

[0778] 표. 연구 화합물

화합물 번호	비표적화	화합물 번호	표적화
		104	DFO-NB
99	BHA-G2-PEG ₁₀₀₀	86	BHA-G2-PEG ₁₀₀₀ +NB
		86	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀ +NB + 라이신 선행 로드 대조군
100	BHA-G3-PEG ₄₁₂	88	BHA-G3-PEG ₄₁₂ +NB
101	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀	89	BHA-G3-PEG ₁₀₀₀ +NB
102	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀	90	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀ +NB
102	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀	90	BHA-G4-PEG ₁₀₀₀ +NB
103	BHA-G5-PEG ₁₀₀₀	92	BHA-G5-PEG ₁₀₀₀ +NB

#= 반복

[0779]

[0780] Zr-89 및 RadioTLC 분석을 사용한 연구 화합물의 방사성 표지화

[0781] 모든 작제물(필요에 따라 철 제거를 위해 사전 처리됨: <http://jnm.snmjournals.org/content/44/8/1271.long>)을 37℃에서 45분 동안 0.1M pH 7.4 HEPES 완충제 중 과량의 텐드리머(과량에 대해서는 표 1 참조)에서 ⁸⁹Zr과 함께 배양하였다. 각 용액의 샘플을 채취하여 50mM DTPA와 1:1로 혼합하였다. 각각의 용액 5μL를 TLC 종이(실리카겔이 함침된 Agilent iTLC-SG Glass 극세사 크로마토그래피 종이)에 스팟팅하고 50:50 H₂O:에탄올로 실행하였다. 이어서 플레이트를 Eckert & Ziegler Mini-Scan 및 Flow-Count iTLC 판독기에서 영상화하였다. 필요한 경우 제조업체 프로토콜에 따라 7K MWCO Zeba 스핀 컬럼(Thermo Scientific)을 사용하여 결합되지 않은 지르코늄을 정제로 제거하였다. 모든 샘플은 >95% 표지화를 보여주었다. 대조군 실험은 품질 관리를 위해 유리 ⁸⁹Zr 및 DTPA에 결합된 ⁸⁹Zr의 용출 거동을 모니터링하기 위해 수행하였으며, 각 샘플은 ⁸⁹Zr로 표지된 임의의 결합되지 않은 킬레이터를 확인하기 위해 DTPA가 있거나 없는 상태로 실행하였다. 모든 ⁸⁹Zr이 텐드리머에 결합되었고 유리 ⁸⁹Zr이 없었음을 보여주는 대표적인 RadioTLC 이미지가 도 18에 나타나 있다. RadioTLC는 다음과 같다.

식별자	면적	피크%	최대 mm	출발 mm	최종 mm	최대	전체%	Rf	도심 mm
화합물	55460	97.76	120	96	140	5815	33.5	0.61	118.44
Zr89	1272	2.24	156	148	168	318	77	0.81	156.1

[0782]

[0783] 연구 주입 세부 사항

[0784] 생체 내 영상화 실험을 위해 연구 화합물을 2마리의 마우스에 꼬리 정맥(29G 바늘, 약 1.5 내지 3.5MBq)을 통해 100μL 주사하여 다양한 시점에서 종양 축적 및 생체분포를 모니터링하였다. 정량은 주입 후 9일에 기관 분포를 결정하기 위해 감마 계수로 생체 외에서 수행하였다. 생체분포 실험을 위해, 감마 계수로 주입 후 48시간에 종양 축적 및 생체 외 생체분포를 모니터링하기 위해 작제물을 2마리의 마우스에 주입하였다

[0785] 결과

[0786] PET-CT 영상화

[0787] 30 - 90분 정적 획득(static acquisition)을 사용하여 주사 후 4시간, 24시간, 48시간, 5일, 7일 및 9일에 이미지를 촬영하였다. PET 이미지는 OSEM2D(ordered-subset expectation maximization) 알고리즘을 사용하여 재구성하였으며 CT 및 PET 이미지의 융합 및 관심 영역(regions of interest, ROI)의 해상도가 허용되는 Inveon Research Workplace 소프트웨어(IRW 4.1)(Siemens)를 사용하여 분석하였다. IRW 소프트웨어(Siemens)를 사용하

여 각 개별 동물의 CT 및 PET 데이터 세트를 정렬하여 관심 기관이 잘 겹칠 수 있도록 하였다. 복셀당 활성은 PET 스캐너 효율성을 설명하기 위해 알려진 활성 89Zr로 채워진 원통형 팬텀을 스캔하여 수득한 변환 계수를 사용하여 nci/cc로 변환하였다. 이어서 활성 농도를 주입된 용량/g 백분율(%ID/g)로 근사할 수 있는 조직 cm³당 부패 보정된 주입된 활성(decay-corrected injected activity)의 백분율로 표현하였다. 결과는 도 19에 화합물 89, 90 및 92에 대해 9일 동안 (a) 신장, (b) 간 및 (c) 종양에서 그램당 주입된 지르코늄 용량의 백분율 그래프로 표시된다. 대표적인 PET 이미지가 도 20 방사성 표지된 접합체의 대표적인 최대 강도 투영에 나타나 있다. 모든 PET 데이터는 복셀당 베크렐(cm³)로 표시되며 종양 흡수를 강조하기 위해 임계값을 지정하였다.

[0788] 주사 후 2일 및 9일에 장기를 제거하고 생체 외 감마 분석으로 신호 강도를 정량화하고 영상화하였다. 또한, 코호트당 n=2를 48시간에 선별하고 감마 분석으로 생체분포에 대해 평가하였다. 생체 외 생체분포 결과는 2일 및 9일에 주입된 용량/g의 생체 외 신호의 종양:장기 비율을 제공하는 도 21의 표에 나타나 있다.

[0789] 결과는 특히 2일차에 화합물 88(작은 G3 덴드리머)에서 비표적화에 비해 표적화에 대한 더 높은 종양:혈액 비율을 보여준다. 9일까지, 비표적화에 비해 표적화에 대한 종양:혈액 비율이 더 좋으며, 특히 화합물 90 및 92(더 큰 G4 및 G5 덴드리머)에 대해 더 우수하다.

[0790] 생체 외 종양 및 기관에서 주입된 Zr 용량/그램의 백분율도 도 22의 표에 나타나 있다.

[0791] 결과는 특히 화합물 90 및 92(더 큰 G4 및 G5 덴드리머)에서 비표적화에 비해 표적화에 대해 종양에서 더 높은 신호를 나타내고, 또한 화합물 89(G3 덴드리머)에 대해 9일차에 더 높은 신호를 나타냄을 보여준다.

[0792] 결론

[0793] 1. 덴드리머가 클수록 종양 축적이 더 잘된다. 2D3은 빠른 제거와 낮은 축적을 보였다.

[0794] 2. 표적화 요법은 표적화 되지 않은 덴드리머보다 더 높은 종양 축적을 유도한다.

[0795] 3. 화합물 88(G3 1K-나노바디)은 다른 작은 덴드리머와 비교하여 종양에서 유의하게 향상된 신호를 나타낸다.

[0796] 4. 화합물 90 및 92(G4 및 G5 나노바디)는 48시간에 종양에서 >12% ID/g, 9일에 각각 >4% 및 >8%를 나타냈다.

[0797] 5. 덴드리머를 포함하는 작은 나노바디와 나노바디 단독은 신장 유지력이 더 높다. 클리어런스 기관에서 비정상적인 축적이 관찰되지 않았고, 간 및 비장 신호는 유사한 시스템에서 전형적으로 관찰되는 예상 농도 범위를 나타낸다.

[0798] 실시예 16: 카바지탁셀을 포함하거나 포함하지 않는 G5, PEG₁₀₀₀ 덴드리머의 시험관 내 회합 연구

[0799] MDA-MB-231, MDA-MB-231/HER2(HER2 녹인(knock-in)) 또는 SKOV-3 세포를 10%(v/v) 소 태아 혈청(FBS) 및 1%(v/v) 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 500 µL의 적절한 성장 배지에서 24웰 플레이트(웰당 1 × 10⁵ 개 세포)에 시딩하고 37°C, 5% CO₂ 가습 대기에서 1 내지 24시간의 다양한 배양 시간으로 3.33nM의 화합물 70(G5, PEG1000, CTX) 또는 78(2D3, G5, PEG1000, CTX)과 배양하였다. 배양 후, DPBS로 3회(300 µL/웰) 부드럽게 세척하여 비결합/비회합 입자를 부착된 세포에서 제거하였다. TrypLETM Express Enzyme(1X), 페놀 레드 없음(150 µL/well)으로 실온에서 5-10분 동안 처리하여 플레이트에서 세포를 제거하였다. 이어서 플레이트를 얼음 위에 놓았다. 그런 다음 Cy5에서 신호를 수집하여 유세포 분석을 통해 샘플의 세포 결함 및 회합을 결정하였다.

[0800] 유세포 분석 결과

[0801] 결과는 24시간에 걸쳐 3개의 모든 세포주에 대한 화합물 70(대조군)의 최소 결함을 분명히 나타낸다. 화합물 78(표적화됨)은 세포주의 HER2 수용체 발현 수준과 관련하여 결함 증가를 나타냈다. 24시간까지, 유세포 분석으로 화합물 78(표적화됨)(4,269±322)로 처리된 MDA-MB-231/HER2 세포가 화합물 70(대조군)으로 처리된 세포(12.4±0.64)와 비교하여 약 340배 더 강한 형광을 나타낸 것으로 드러났다. 또한, 화합물 78(표적화됨)(1,817±60.8)로 처리된 SKOV-3 세포는 화합물 70(대조군)(11.4±0.42)으로 처리된 세포와 비교하여 약 160배 더 강한 형광을 나타냈다. 결과는 도 23-25에 나와 있다.

[0802] 24시간 동안 MDA-MB-231, MDA-MB-231/HER2 및 SKOV-3 세포를 사용한 화합물 70(대조군) 및 화합물 78(표적화됨)의 평균 형광 강도(MFI) 값. 값은 평균±표준 편차(SD, n = 2)이다:

MDA-MB-231		
시간 (h)	화합물 70 (대조군)	화합물 78 (표적화됨)
1	1.00 ± 0.14	36.7 ± 0.85
3	4.10 ± 0.71	64.8 ± 31.5
6	5.65 ± 0.64	125 ± 2.12
24	13.4 ± 0.07	197 ± 0.71

MDA-MB-231/HER2 (HER2 녹인)		
시간 (h)	화합물 70 (대조군)	화합물 78 (표적화됨)
1	0.77 ± 0.06	755.7 ± 3.54
3	7.72 ± 4.17	$2,460 \pm 17.7$
6	5.82 ± 0.07	$3,567 \pm 33.2$
24	12.4 ± 0.64	$4,269 \pm 322$

SKOV-3		
시간 (h)	화합물 70 (대조군)	화합물 78 (표적화됨)
1	1.00 ± 0.29	625.8 ± 0.71
3	3.46 ± 0.69	$1,422 \pm 0.71$
6	3.90 ± 0.10	$1,621 \pm 1.41$
24	11.4 ± 0.42	$1,817 \pm 60.8$

[0803]

[0804]

당업자는 본 개시내용의 광범위하고 일반적인 범위를 벗어나지 않고 전술한 실시양태에 대해 다양한 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 실시양태는 모든 면에서 예시적인 것으로 간주해야 하며 제한적인 것은 아니다.

[0805]

참고문헌

[0806]

Abdollahpour-Alitappeh 등 (2017) Novelty in Biomedicine 4: 145-151.

[0807]

Al-Lazikani 등 (1997) J Mol Biol 273: 927-948.

[0808]

Arezumand 등 (2017) Front Immunol 8:1746.

[0809]

Bethesda, Md., 1987 및 1991.

[0810]

Chetterjee 등 (2013) Biochemistry 52(10).

[0811]

Chothia 및 Lesk (1987) J Mol Biol 196: 901 -917.

[0812]

Chothia 등 (1989) Nature 342: 877-883.

[0813]

Giudicelli 등 (1997) Nucleic Acids Res 25: 206-211.

[0814]

Honnegher 및 Plukthun (2001) J Mol Biol 309: 657-670.

[0815]

Hussack 등 (2018) BMC Res notes 11(1):866.

[0816]

Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health,

[0817]

Messerer 등 (2004) Clin. Cancer Res 10(19): 6638-6649.

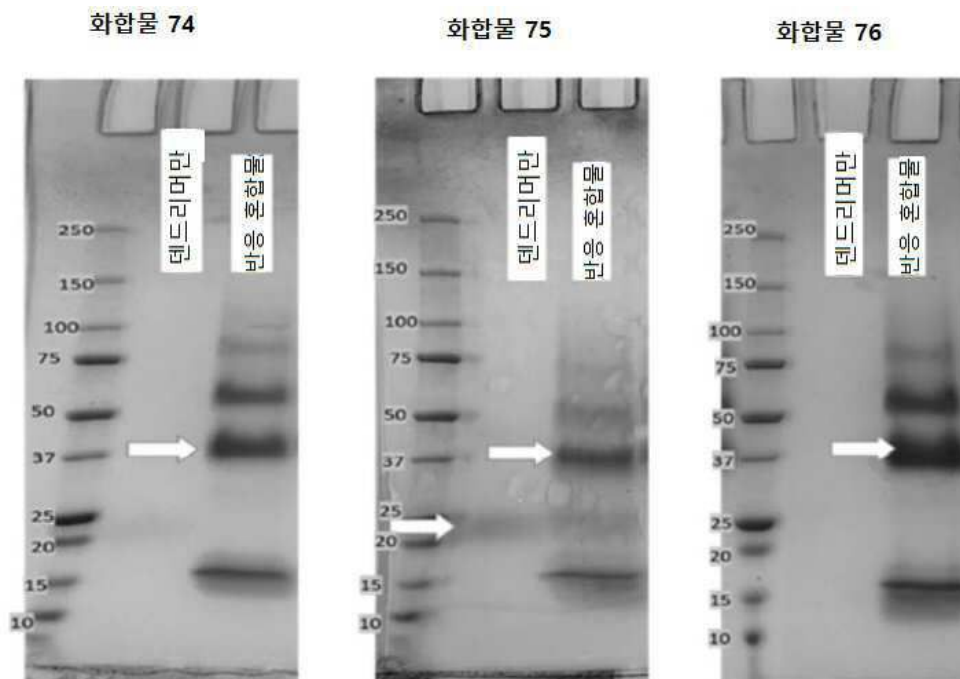
[0818]

Milla 등 (2012) Current Drug Metabolism 13(1): 105-119.

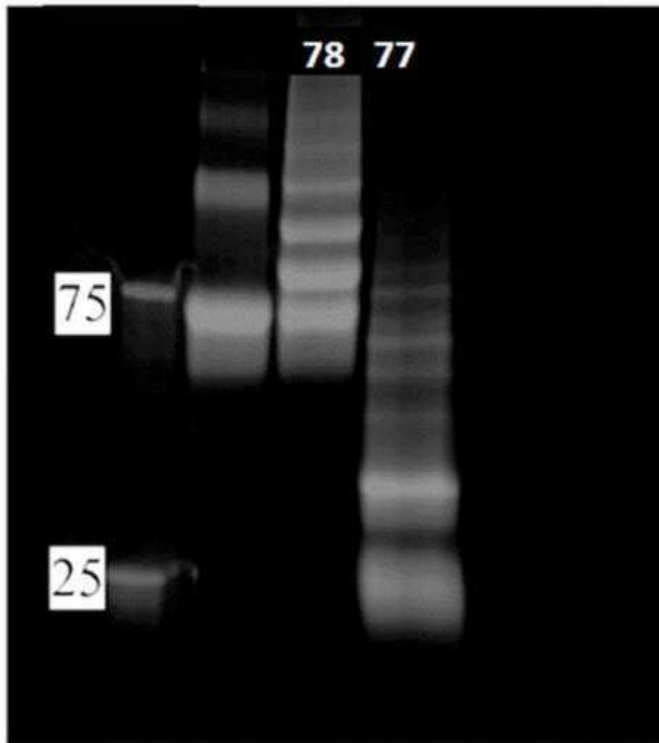
- [0819] Mukai 등 (2015) Scientific Reports 5: 9699.
- [0820] Nord 등 (1995) Protein Eng 8:601-608.
- [0821] Oroudjev 등 (2010) Mol Can Thera 9:2700-2713.
- [0822] Owen 등 (2011) WO2012167309.
- [0823] Padlan 등 (1995) FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 9: 133-9.
- [0824] Pohlmann 등 (2009) Clin Cancer Research 15(24): 7479-7491.
- [0825] Pruszyński 등 (2013) Nucl Med Biol 40(1): 52-59.
- [0826] Revets 등 (2011) US Application No. 20110028695
- [0827] Vaneycken 등 (2011) FASEB J 25(7): 2433-2446.
- [0828] Verel 등 (2003) J Nucl Med 44(8): 1271-1281.
- [0829] Voigt (2015) Methods Mol Med 110: 39-48.
- [0830] Wu 등 (2018) Translational Oncology 11(2): 366-373.

도면

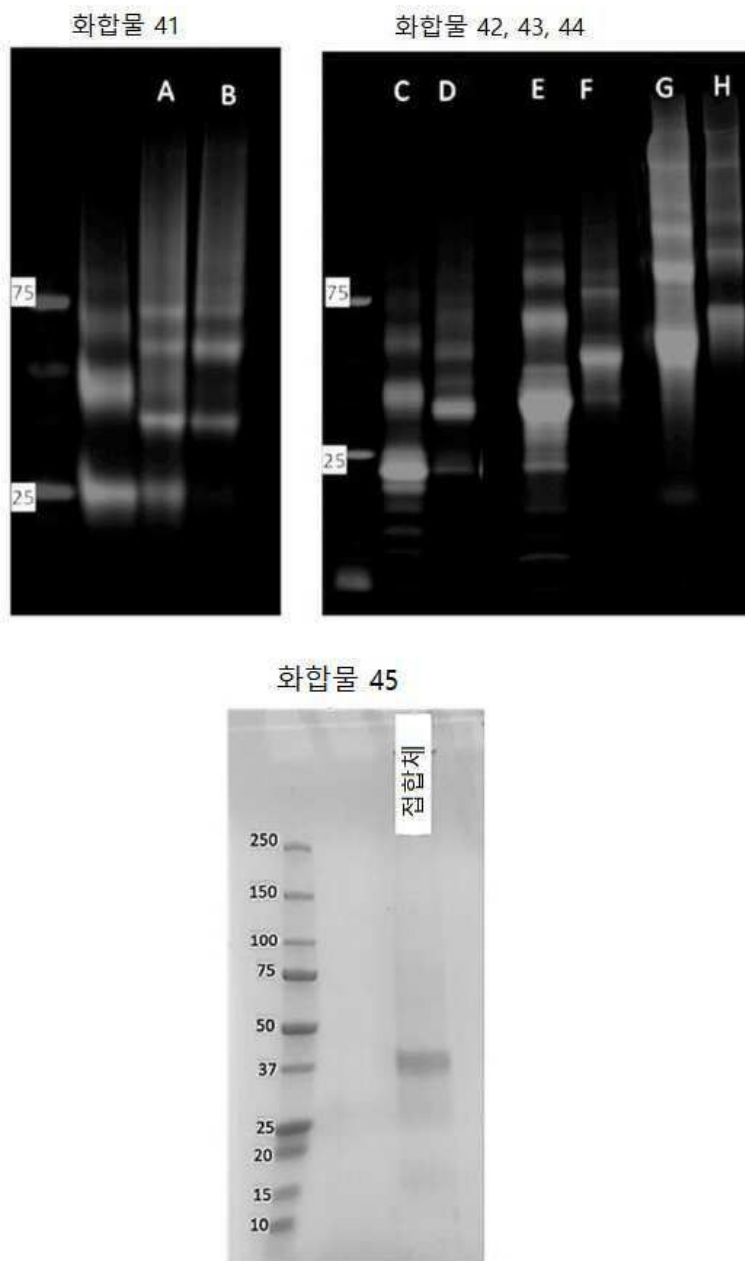
도면1



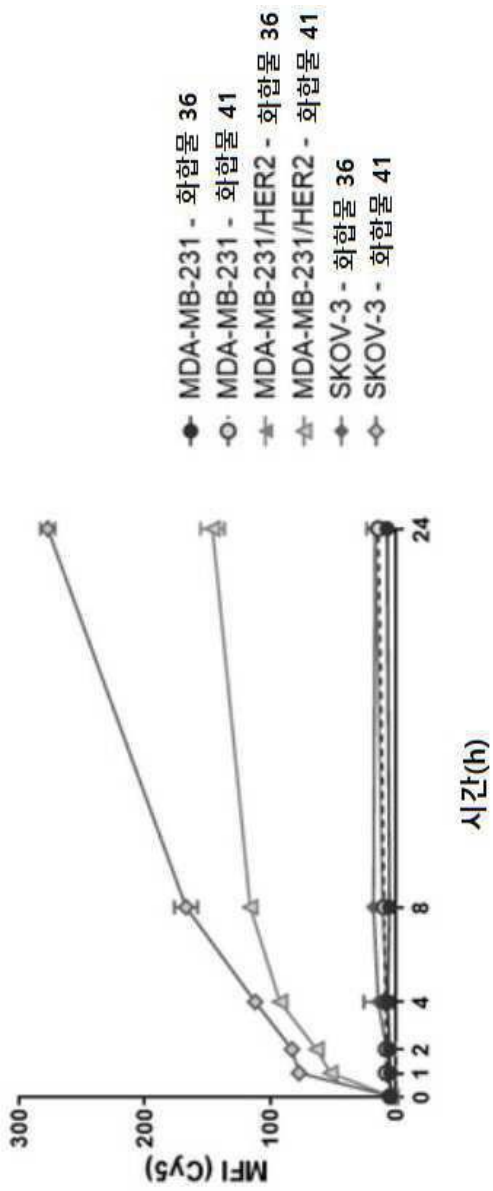
도면2



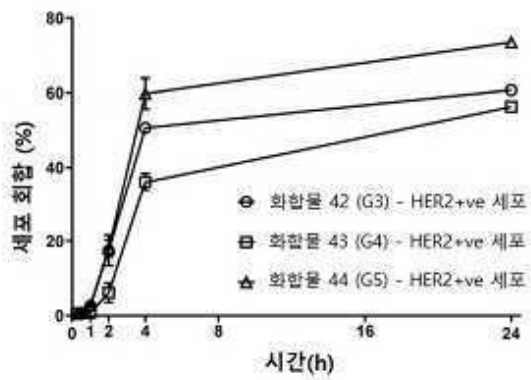
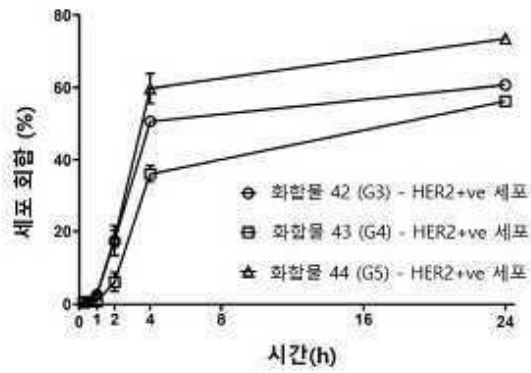
도면3



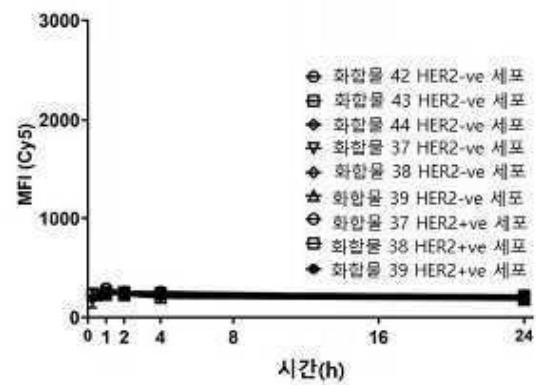
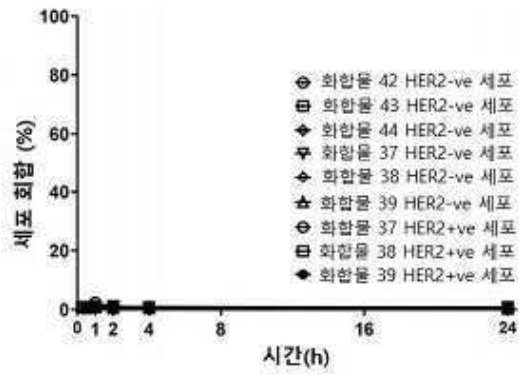
도면4



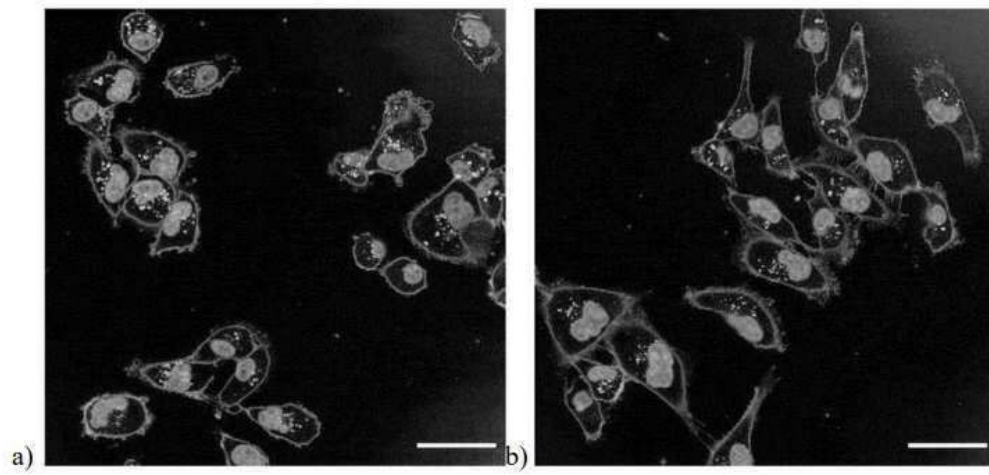
도면5a



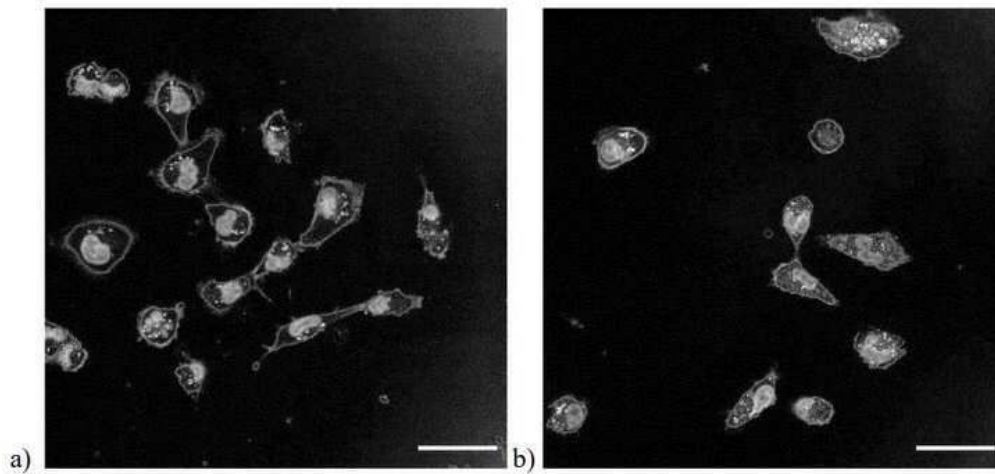
도면5b



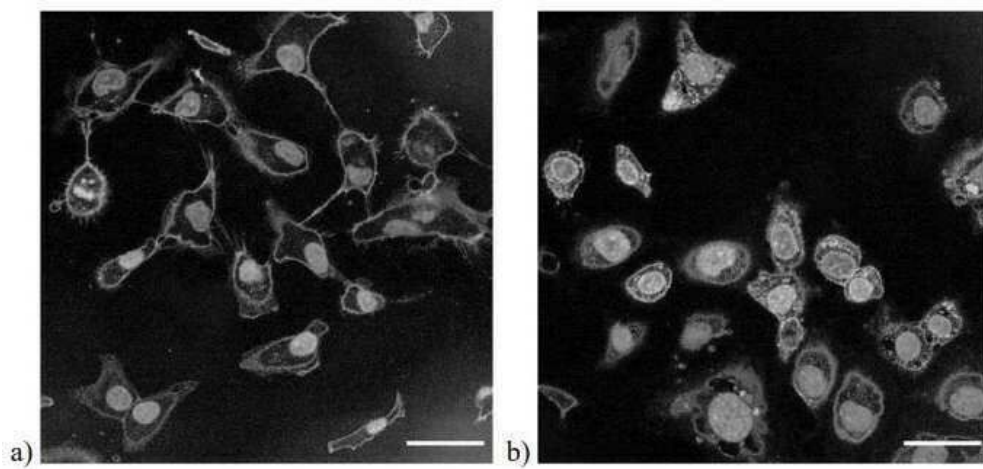
도면6



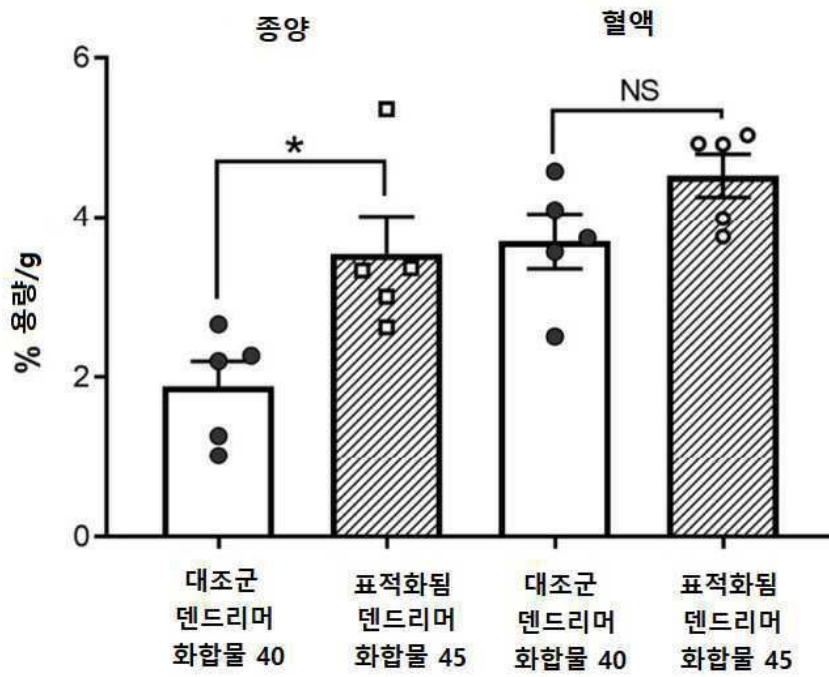
도면7



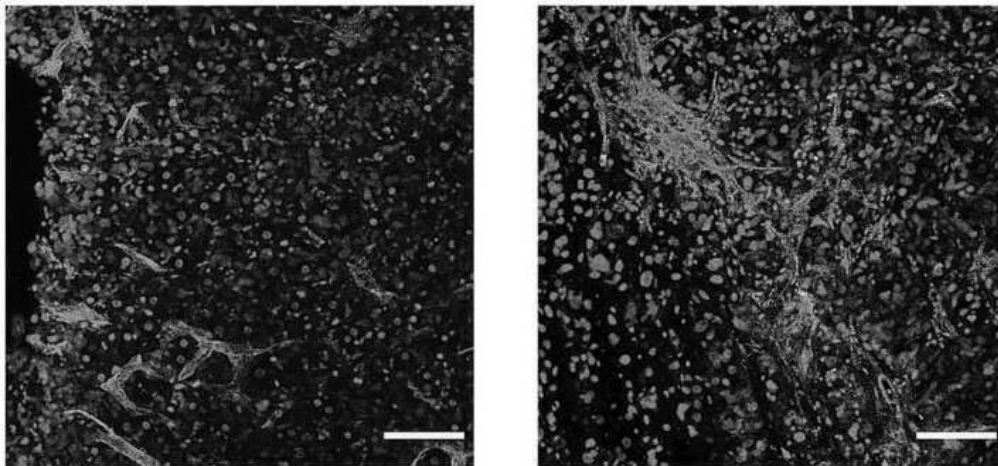
도면8



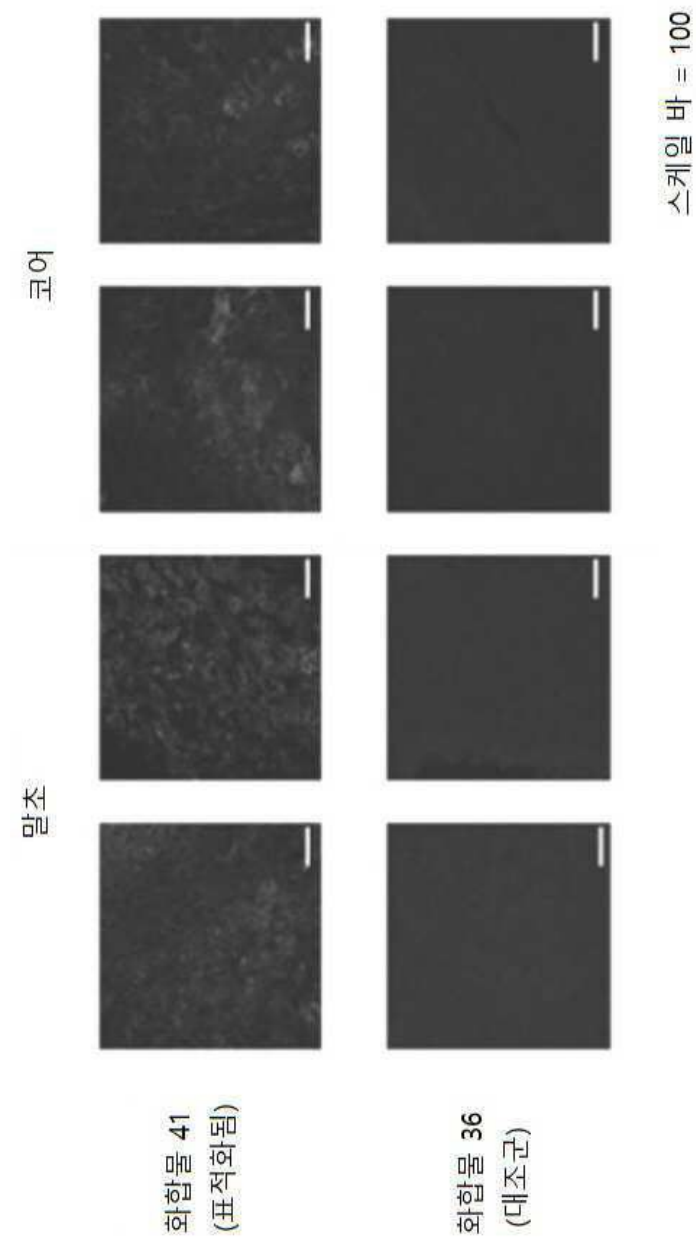
도면9



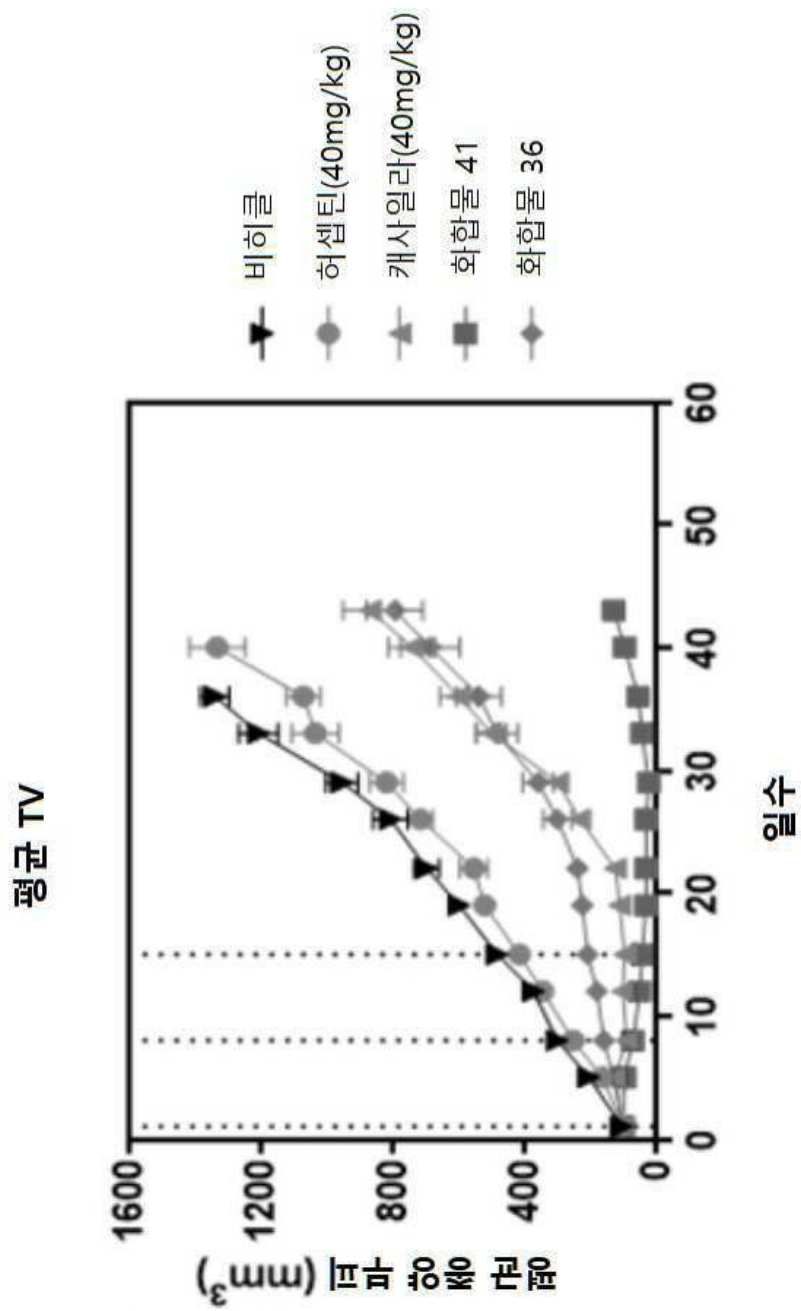
도면10



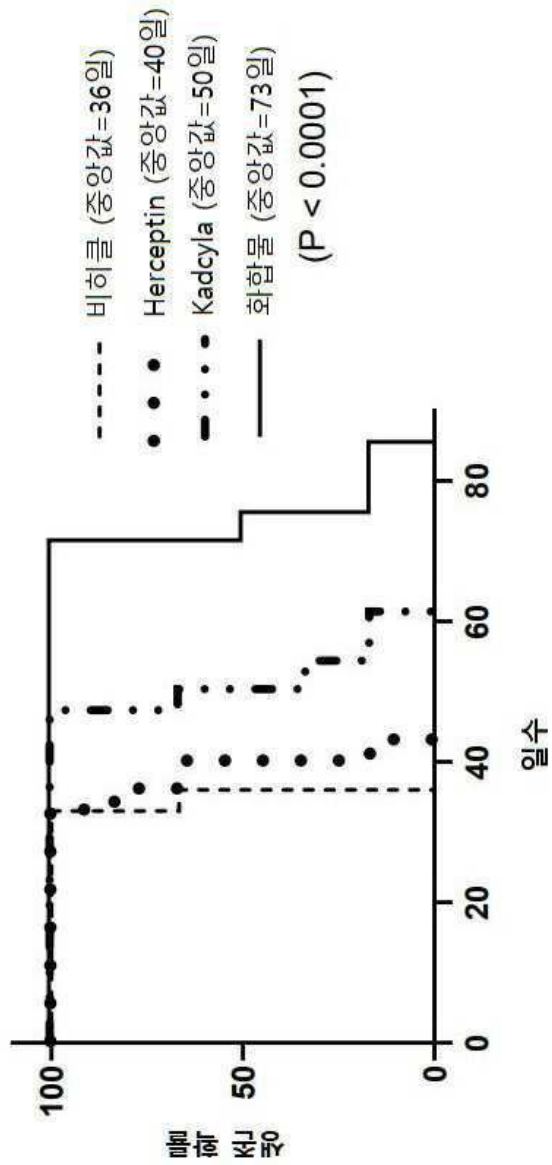
도면11



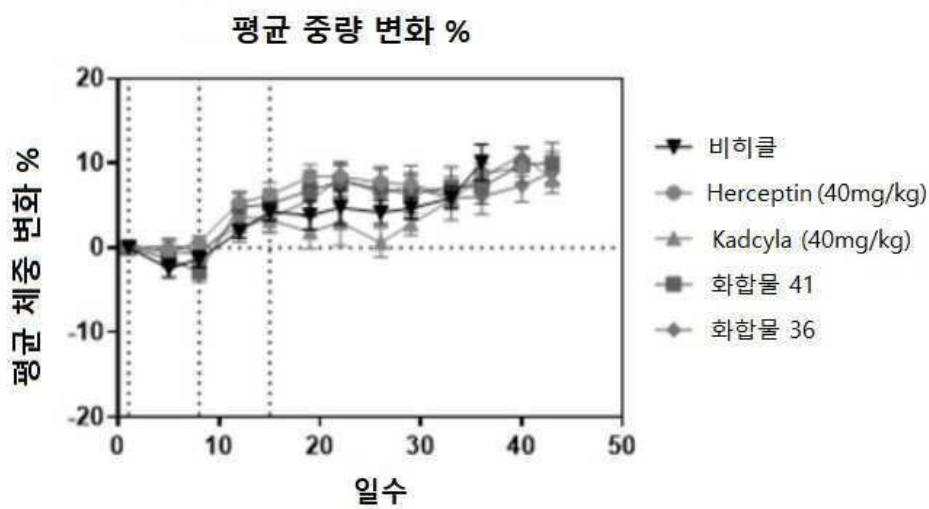
도면12



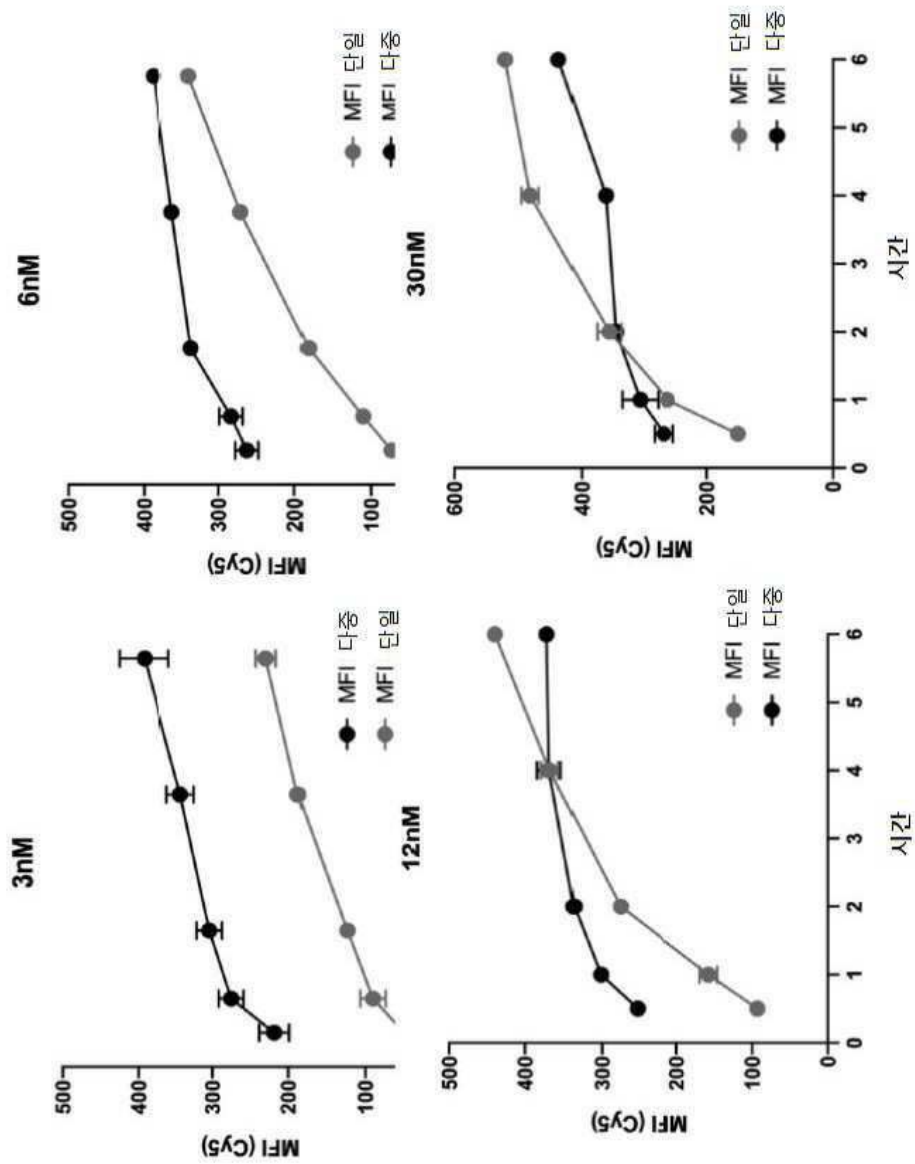
도면13



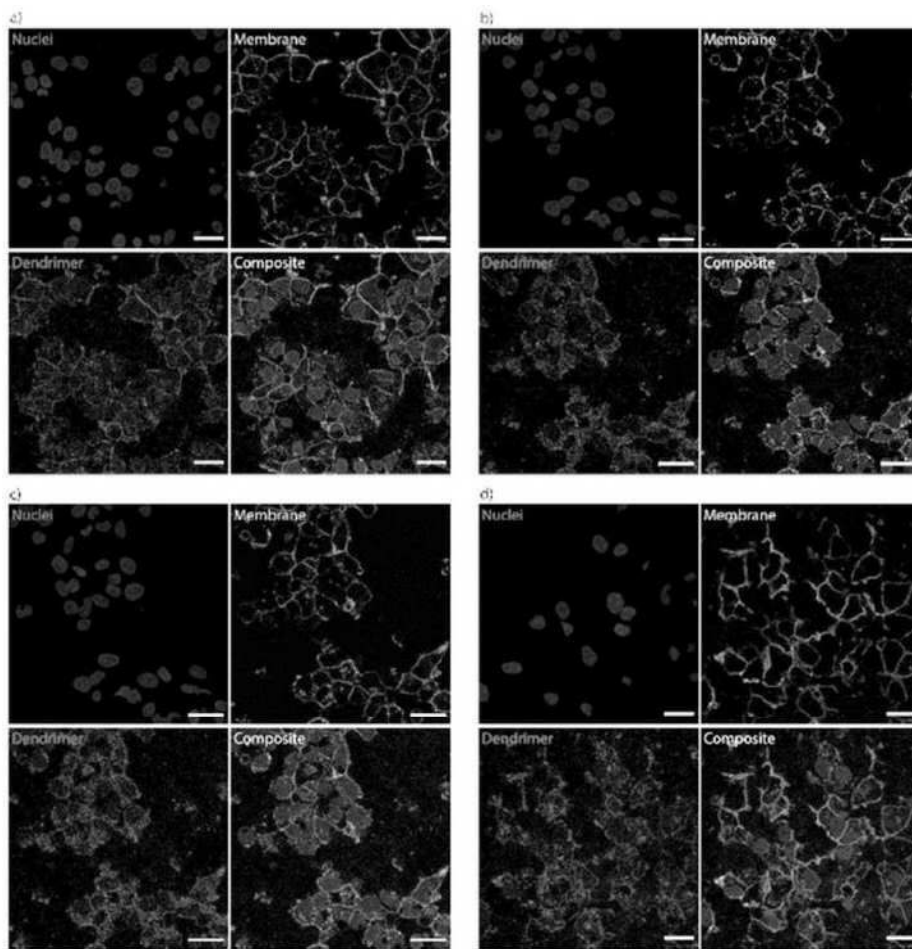
도면14



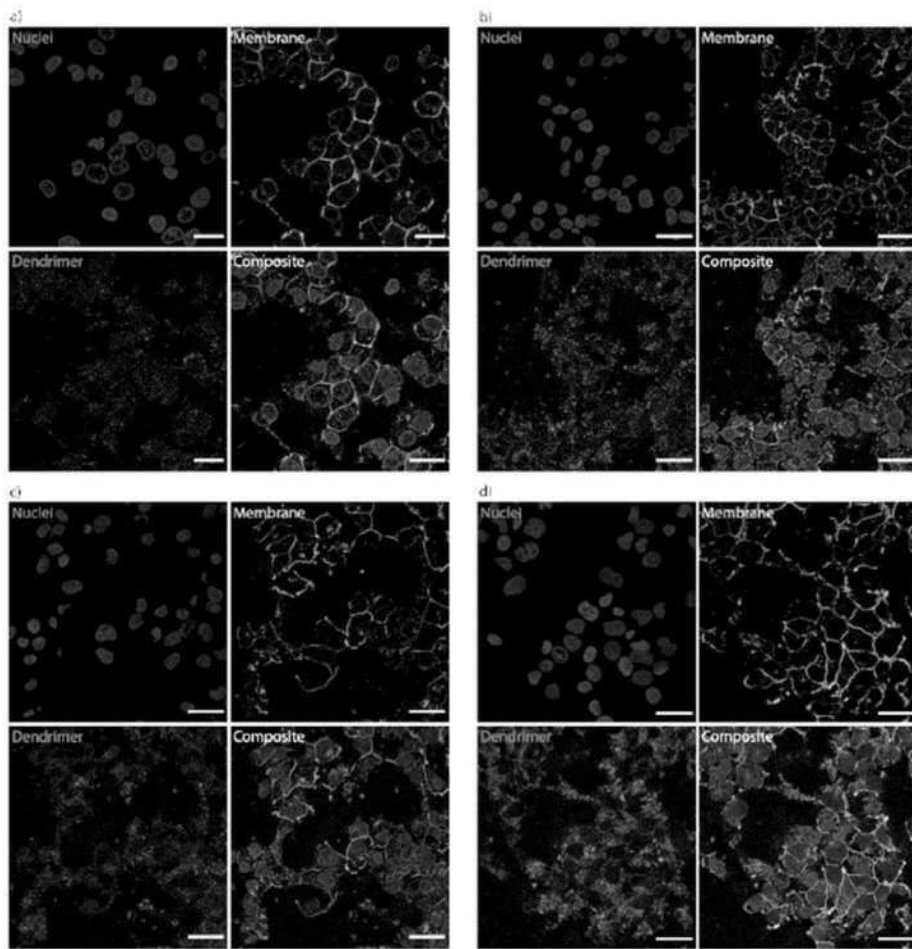
도면15



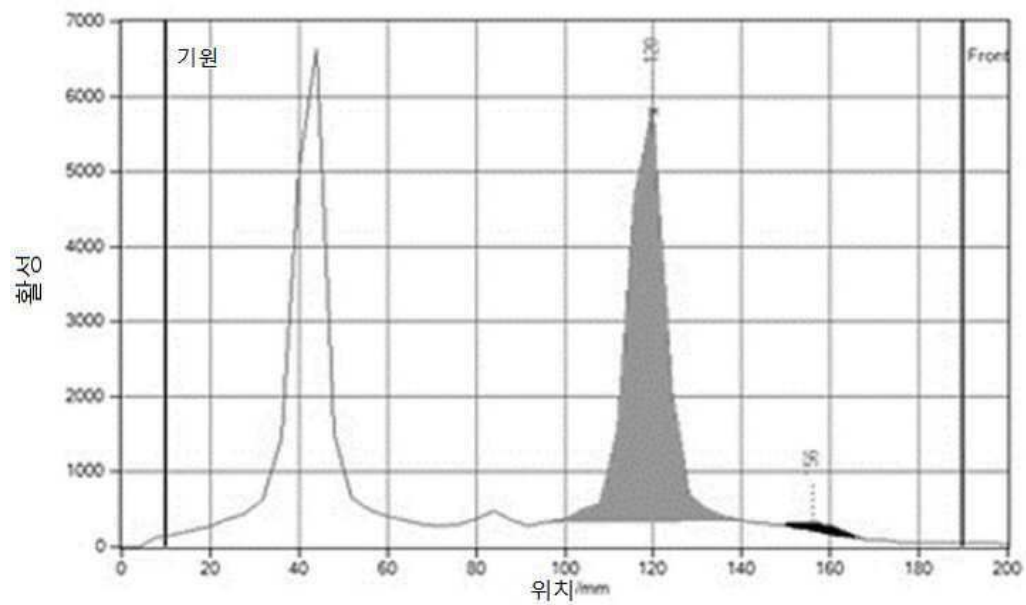
도면16



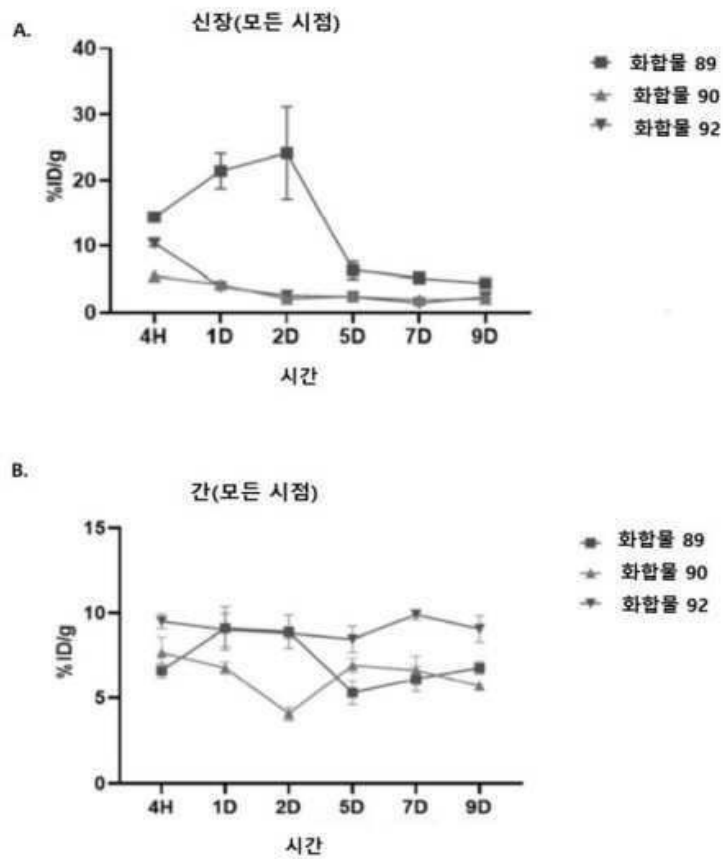
도면17



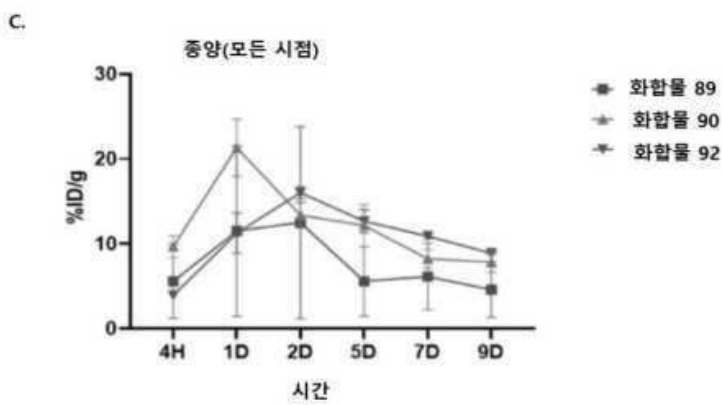
도면18



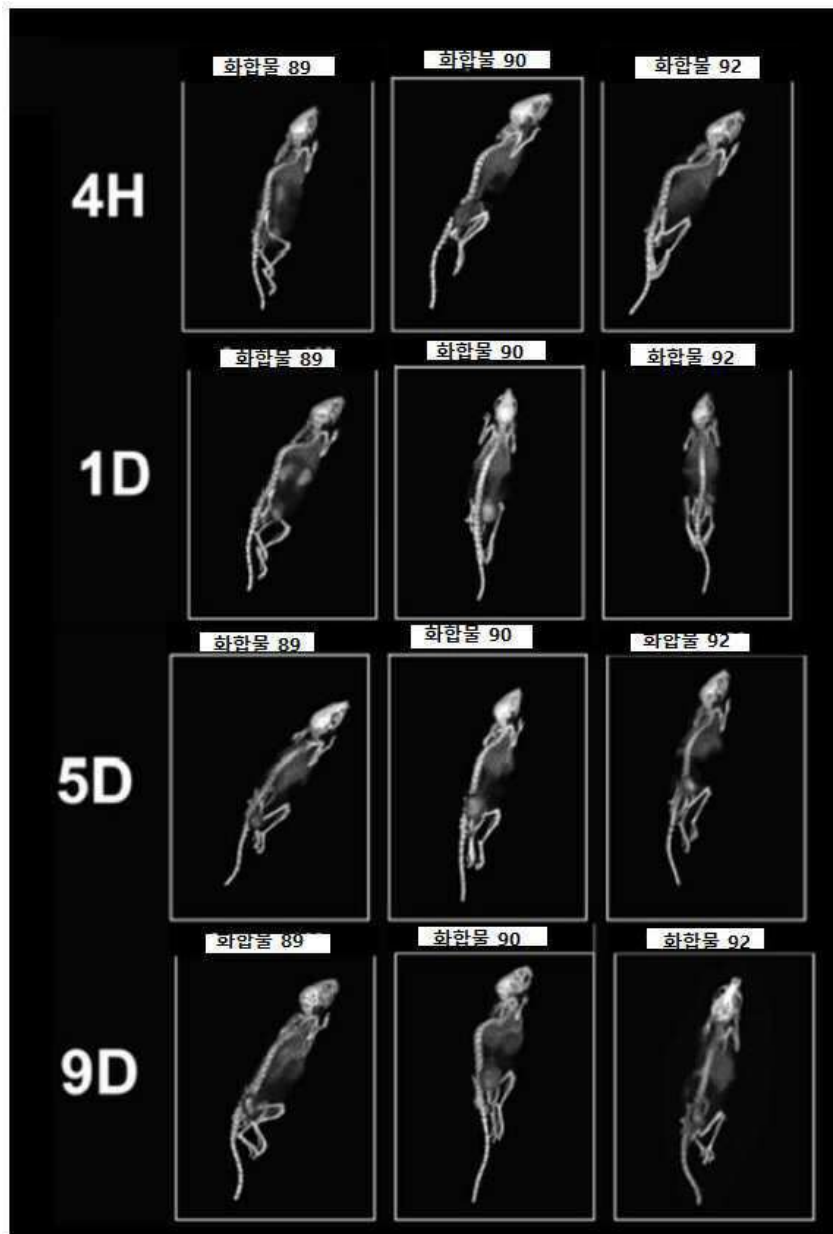
도면19a



도면19b



도면20



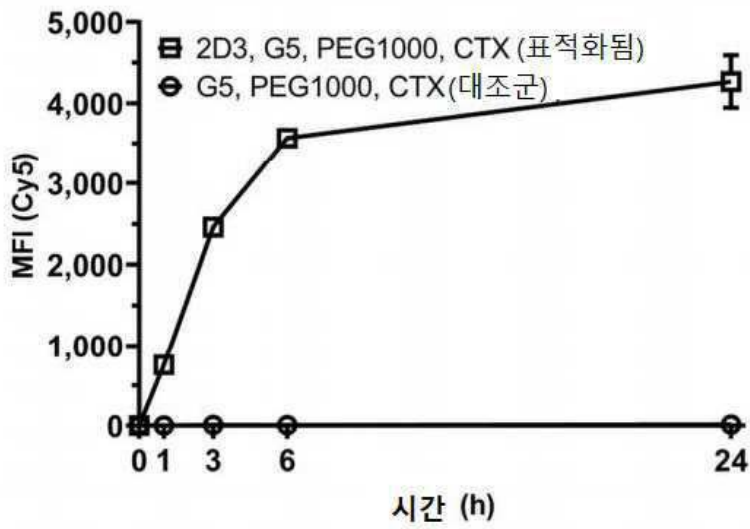
도면21

기관	시간 / 일	멘드리머 / 기관 비율 값												
		NB (16 kDa)	G2 (10.2 kDa)	G2 + NB (25.7 kDa)	G3-P412 (9.6 kDa)	G3-P412 + NB (25.1 kDa)	G3-PIK (16.4 kDa)	G3-PIK + NB (31.9 kDa)	G4 (27.9 kDa)	G4 + NB (43.4 kDa)	(G4 + NB) + 10 x NB (43.4 kDa)	G4 + 2-4 NB (multi NB) (60.3 kDa)	G5 (51.4kDa)	G5 + NB (66.8 kDa)
중앙:혈액		104	99	86	100	88	101	87	102	90	90	91	103	92
	2	17.17	1.02	13.04	1.70	24.30	0.91	4.87	1.66	3.87	3.58	4.43	0.69	7.14
중앙:간	9	1.24	6.57	10.58	0.74	1.67	7.76	25.86	21.92	56.95	32.30	12.62	13.68	325.01
	2	4.51	0.20	0.94	0.04	0.31	0.28	0.96	0.67	2.09	1.78	1.19	0.75	1.63
중앙:비장	9	1.36	0.11	0.28	0.01	0.05	0.15	0.71	0.29	0.66	0.52	0.27	0.37	1.09
	2	2.56	0.29	1.09	0.13	1.16	0.33	1.12	0.35	1.41	0.95	0.83	0.29	1.12
중앙:신장	9	0.10	0.11	0.23	0.01	0.05	0.04	0.25	0.05	0.21	0.16	0.07	0.07	0.09
	2	0.01	0.73	0.10	0.06	0.03	0.69	0.24	2.05	5.21	3.87	3.40	2.22	7.15
	9	0.00	0.82	0.06	0.05	0.01	0.51	1.15	2.03	2.99	3.07	1.43	2.29	6.36

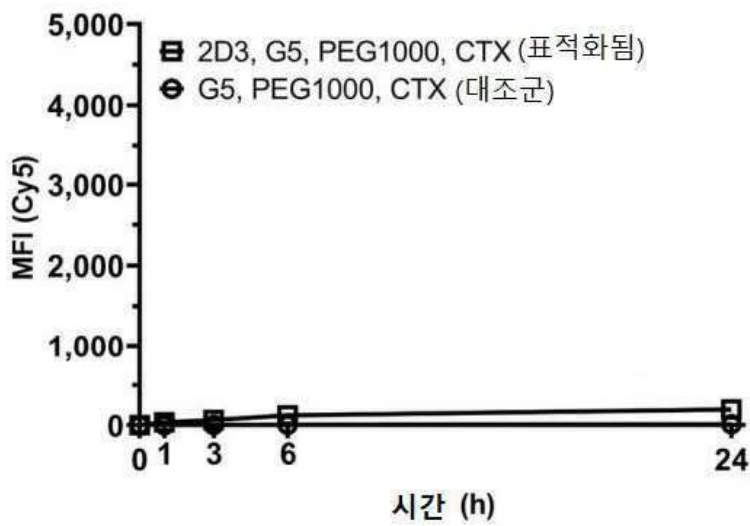
도면22

테드리머 / % 주입된 용량: 그램 ¹														
기관	시간 / 일	NB (16 kDa)	G2 (10.2 kDa)	G2 + NB (25.7 kDa)	G3-P412 (9.6 kDa)	G3-P412 + NB (25.1 kDa)	G3-P1K (16.4 kDa)	G3-P1K + NB (31.9 kDa)	G4 (27.9 kDa)	G4 + NB (43.4 kDa)	(G4 + NB) + 10 x NB (43.4 kDa)	G4 + 2-4 NB (multi NB) (60.3 kDa)	G5 (51.4kDa)	G5 + NB (66.8 kDa)
화합물		104	99	86	100	88	101	87	102	90	90	91	103	92
중양	2	1.05	1.74	2.70	0.71	2.28	2.67	4.78	3.96	12.53	12.64	7.85	4.04	11.96
	9	0.31	0.78	1.06	0.25	0.31	1.53	4.56	1.72	4.15	4.55	2.70	3.31	8.18
간	2	0.23	8.70	3.06	18.25	7.82	9.62	5.22	5.85	6.05	7.34	6.73	5.48	7.29
	9	0.23	7.18	3.71	20.85	6.02	10.10	6.44	5.85	7.34	8.72	10.23	9.59	7.56
비장	2	0.53	5.83	2.96	5.51	2.14	8.12	4.27	11.13	8.98	13.06	9.46	16.45	10.65
	9	0.00	7.38	4.47	35.24	6.88	47.73	18.02	34.23	21.52	30.23	37.09	45.59	87.39
신장	2	109.01	2.36	28.56	11.23	79.08	4.05	20.07	1.93	2.47	3.29	2.33	1.87	1.66
	9	62.22	0.93	17.03	5.36	55.61	3.11	4.06	0.85	1.44	1.57	1.91	1.43	1.29
심장	2	0.10	1.42	0.61	1.39	0.49	1.91	1.29	1.53	2.62	3.18	1.98	3.08	3.33
	9	0.00	0.64	0.52	0.92	0.28	1.23	0.81	1.11	1.36	1.35	1.72	1.83	1.99
폐	2	0.11	1.25	0.54	4.95	0.58	4.36	2.31	1.39	2.82	2.80	1.72	2.71	2.86
	9	0.00	0.44	0.38	2.78	0.55	3.55	1.33	1.06	1.32	1.24	1.38	1.12	1.43
뼈	2	0.26	1.04	0.63	0.98	0.63	0.93	1.75	1.31	2.17	3.03	2.27	1.70	8.07
	9	0.00	0.28	0.34	0.58	-0.53	0.79	0.54	1.54	1.78	1.78	3.77	1.30	2.72
혈액	2	0.08	1.67	0.22	0.42	0.09	3.05	1.03	2.37	3.40	3.51	1.81	5.97	2.75
	9	0.00	0.00	-0.26	-0.45	-0.29	-0.20	-0.18	0.08	-0.19	-0.21	-0.22	0.04	0.00
GI 관	2	0.04	0.87	0.37	1.17	0.34	1.01	0.67	0.68	1.04	1.35	0.96	0.85	0.89
	9	0.11	0.31	0.32	0.80	0.29	0.77	0.52	0.37	0.46	0.57	0.64	0.63	0.62
표리	2	0.07	1.78	0.71	2.36	0.69	1.14	0.71	0.93	2.26	2.14	0.90	1.47	1.47
	9	0.03	2.56	1.76	0.58	1.50	0.99	1.32	2.53	1.12	1.29	1.03	1.03	1.14

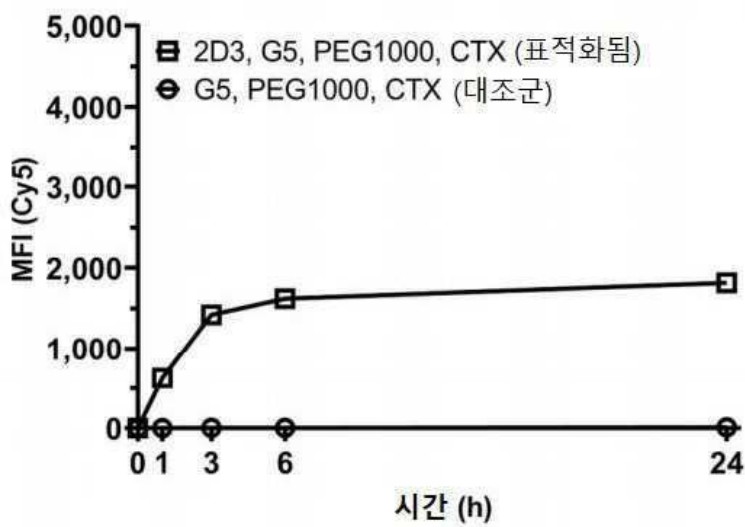
도면23



도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Starpharma Pty Ltd

<120> Targeted Dendrimer Conjugates

<130> 530387PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody 2D3 sequence

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly

100 105 110

Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody 2D3 N-terminal tag, TEV, C-terminal azide

<220><221> X

<222> (157)..(157)

<223> is unnatural amino acid

<400> 2

Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly

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

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

130 135 140
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa
145 150 155

<210> 3

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody 2D3, with C-terminal tag, TEV, azide

<220><221> X

<222> (125)..(125)

<223> is unnatural amino acid

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly

100 105 110

Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa Glu Asn Leu

115 120 125

Tyr Phe Gln Gly His His His His His His

130 135