(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월05일
(11) 등록번호 10-2540419
(24) 등록일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 31/4745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004110(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년10월10일
심사청구일자 2023년02월15일
(85) 번역문제출일자 2023년02월03일
(65) 공개번호 10-2023-0024433
(43) 공개일자 2023년02월20일
(62) 원출원 특허 10-2022-7035813
원출원일자(국제) 2013년10월10일
심사청구일자 2022년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2013/006069
(87) 국제공개번호 WO 2014/057687
국제공개일자 2014년04월17일
(30) 우선권주장
JP-P-2012-225887 2012년10월11일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2009538629 A
JP2008521828 A
JP2005511627 A

(73) 특허권자
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤
일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1
(72) 발명자
마스다 다케시
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
나이토 히로유키
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **글리신아미드 화합물의 제조 방법**

(57) 요 약

항종양 효과와 안전성면이 우수한 항종양약으로서, 다음 식으로 나타내는 항종양성 화합물과 항체를, 다음 식 : $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 로 나타내는 구조의 링커를 개재하여 결합시킨 것을 특징으로 하는 항체-약물 콘주게이트 (항체는 L^1 의 말단에 있어서 결합하고, 항종양성 화합물은 1 위치의 아미노기의 질소 원자를 결합 부위

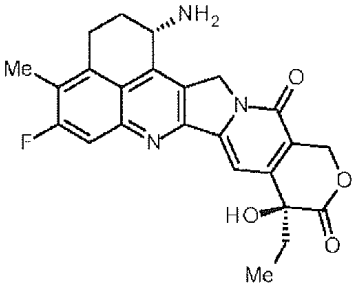
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

B7-H3베어리언트 1 의 아미노산 배열 (배열 번호 1)

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

로서, L^c 의 말단에 있어서 결합한다) 를 제공한다.



(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2827 (2013.01)

(72) 발명자
나카다 다카시
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
요시다 마사오
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
아시다 신지
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
미야자키 히데키
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
가스야 유지
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
모리타 고지
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
아베 유키
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이
오기타니 유스케
일본 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1쵸메 2방 58고 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

명 세 서

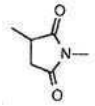
청구범위

청구항 1

다음 식으로 나타내는 링커와 항종양성 화합물을, 항체에 개재하여 결합시킨 항체-약물 콘주게이트로서,

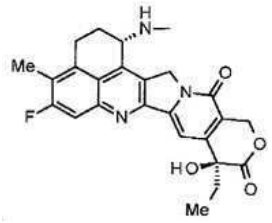
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

식 중, -(Succinimid-3-yl-N)- 는 다음 식:



으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

-(NH-DX) 는 다음 식:



으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기를 나타내는, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 2 내지 8 개의 범위인, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 3 내지 8 개의 범위인, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항체가 항 B7-H3 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 또는 항 CD70 항체인, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 항체가 항 B7-H3 항체인, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 항 B7-H3 항체가, 중사슬에 있어서의 상보성 결정 영역으로서 배열 번호 3 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRH1, 배열 번호 4 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRH2, 및 배열 번호 5 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRH3, 그리고 경사슬에 있어서의 상보성 결정 영역으로서 배열 번호 6 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRL1, 배열 번호 7 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRL2, 및 배열 번호 8 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 CDRL3 을 갖는, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 항 B7-H3 항체가,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역, 및

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬의 가변 영역

으로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬의 가변 영역 및 경사슬의 가변 영역을 갖는, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 항 B7-H3 항체가,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬,

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬, 및

배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열을 포함하는 경사슬

로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬 및 경사슬을 포함하는, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 항 B7-H3 항체가 중사슬의 배열 번호 9 또는 12 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 카르복실 말단의 아미노산이 결실되어 있는 것인, 항체-약물 콘주게이트.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 콘주게이트 또는 그 염을 함유하는 항종양 또는 항암용 의약.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 폐암, 신암, 요로 상피암, 대장암, 전립선암, 다형 신경 교아종, 난소암, 췌암, 유방암, 멜라노마, 간암, 방광암, 위암, 또는 식도암에 대해 사용되는, 항종양 또는 항암용 의약.

청구항 12

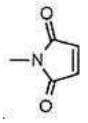
제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 콘주게이트 또는 그 염을 활성 성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 제제 성분을 함유하는, 항암용 의약 조성물.

청구항 13

다음 식으로 나타내는 화합물.

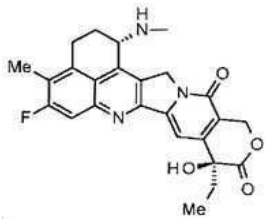
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

식 중, (maleimid-N-yl)- 는 다음 식:



으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

-(NH-DX) 는 다음 식:



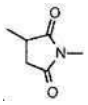
으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

청구항 14

링커를 개재하여 약물과 항체가 결합된 항체-약물 콘주게이트를 얻기 위한 다음 식으로 나타내는 링커.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

식 중, -(Succinimid-3-yl-N)- 는 하기 식:



으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합한다.

발명의 설명

기 술 분 야

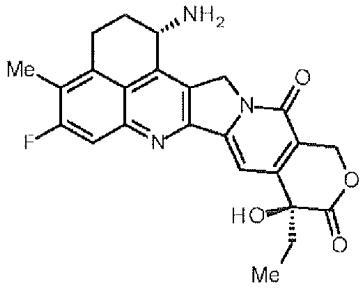
[0001] 본 발명은, 종양 세포를 표적으로 할 수 있는 항체와 항종양성 약물을 링커 구조 부분을 개재하여 결합시킨, 항종양약으로서 유용한 항체-약물 콘주게이트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암 세포 표면에 발현하고, 또한 세포에 내재화할 수 있는 항원에 결합하는 항체에, 세포 독성이 있는 약물을 결합시킨 항체-약물 콘주게이트 (Antibody-Drug Conjugate ; ADC) 는, 암 세포에 선택적으로 약물을 송달할 수 있는 것에 의해, 암 세포 내에 약물을 축적시켜, 암 세포를 사멸시키는 것을 기대할 수 있다 (비특허문헌 1 ~ 3 참조). ADC 로서 예를 들어, 항 CD33 항체에 칼리치아마이신을 결합시킨 Mylotarg (겜투주마브오조가마이신) 는 급성 골수성 백혈병의 치료약으로서 인가되어 있다. 또, 항 CD30 항체에 오리스타틴 E 를 결합시킨 Adcetris (브렌툭시마브베도틴) 는 호지킨 림프종과 미분화 대세포 림프종의 치료약으로서 최근 인가되었다 (비특허문헌 4 참조). 지금까지 인가된 ADC 에 함유되는 약물은 DNA, 또는 튜불린을 표적으로 하고 있다.

[0003] 항종양성의 저분자 화합물로서 토포이소머라아제 I 을 저해하여 항종양 작용을 발현하는 화합물인 캄프토테신 유도체가 알려져 있다. 그 중에서 하기 식

[0004] [화학식 1]



[0005]

[0006] 으로 나타내는 항종양성 화합물 (엑사테칸, 화학명 : (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4' : 6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온) 은 수용성의 캄프토테신 유도체이다 (특허문헌 1, 2). 현재 임상에서 사용되고 있는 이리노테칸과는 상이하고, 효소에 의한 활성화가 불필요하다. 또, 이리노테칸의 약효 본체인 SN-38 이나, 동 임상에서 사용되고 있는 토포테칸보다 토포이소머라아제 I 저해 활성이 강하고, in vitro 에서 여러 가지의 암 세포에 대해, 보다 강한 살세포 활성을 가지고 있다. 특히 P-glycoprotein 의 발현에 의해 SN-38 등에 내성을 나타내는 암 세포에 대해서도 효과를 나타냈다. 또, 마우스의 인간 종양 피하 이식 모델에서도 강한 항종양 효과를 나타내어, 임상 시험이 실시되었지만 출시에는 이르지 않았다 (비특허문헌 5 ~ 10 참조). 엑사테칸이 ADC 로서 유효하게 작용하는지에 대해서는 분명하지 않았다.

[0007] DE-310 은 생분해성의 카르복시메틸덱스트란폴리알코올폴리머에 엑사테칸을 GGFG 펩티드 스페이서를 개재하여

결합시킨 복합체이다 (특허문헌 3). 엑사테칸을 고분자 프로드러그화함으로써, 높은 혈중 체류성을 유지시키고, 또한 종양 신생 혈관의 투과성의 항진과 종양 조직 체류성을 이용하여, 수동적으로 종양 부위에 대한 지향성을 높인 것이다. DE-310 은, 효소에 의한 펩티드 스페이서의 절단에 의해, 활성 본체인 엑사테칸, 및 글리신이 아미노기에 결합하고 있는 엑사테칸이 지속적으로 유리된다. 그 결과, 약물 동태가 개선되어, 비임상 시험에 있어서의 여러 가지의 종양의 평가 모델에 있어서, DE-310 은 엑사테칸의 투여량이 엑사테칸 단제의 투여 시보다 감소하고 있는데도 불구하고, 엑사테칸 단제의 투여 시보다 더 높은 유효성을 나타냈다. DE-310 에 관해서는 임상 시험이 실시되어, 인간에게 있어서 유효예가 확인되고, 활성 본체가 정상 조직보다 종양에 집적하는 것이 확인되었다는 보고가 있는 한편, 인간에게 있어서의 종양에의 DE-310 및 활성 본체의 집적은 정상 조직에의 집적과 큰 차이 없고, 인간에서는 수동적인 타게팅은 보이지 않았다는 보고도 있다 (비특허문헌 11 ~ 14 참조). 결과적으로 DE-310 도 출시에는 이르지 않고, 엑사테칸이 이와 같은 타게팅을 지향한 약물로서 유효하게 기능하는지에 대해서는 분명하지 않았다.

[0008] DE-310 의 관련 화합물로서, $-NH(CH_2)_4C(=O)-$ 로 나타내는 구조 부분을 -GGFG- 스페이서와 엑사테칸의 사이에 삽입하고, $-GGFG-NH(CH_2)_4C(=O)-$ 를 스페이서 구조로 하는 복합체도 알려져 있지만 (특허문헌 4), 동 복합체의 항종양 효과에 대해서는 전혀 알려지지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 평5-59061호

(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 평8-337584호

(특허문헌 0003) 국제 공개 WO1997/46260 팜플렛

(특허문헌 0004) 국제 공개 WO2000/25825 팜플렛

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Ducry, L., et al. Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13. ; Antibody-Drug Conjugates : Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.

(비특허문헌 0002) Alley, S. C., et al. Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537. ; Antibody-drug conjugates : targeted drug delivery for cancer.

(비특허문헌 0003) Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452. ; Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.

(비특허문헌 0004) Senter P. D., et al. Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637. ; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma.

(비특허문헌 0005) Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7,625-632. ; Antitumour activity of DX-8951f : a new camptothecin derivative.

(비특허문헌 0006) Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., et al. Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786. ; A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors in vitro and in vivo.

(비특허문헌 0007) Takiguchi, S., Tohgo, A., et al. Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769. ; Antitumor effect of DX-8951, a novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11-resistant variants cultured in vitro and xenografted into nude mice.

(비특허문헌 0008) Joto, N. et al. Int J Cancer (1997) 72, 680-686. ; DX-8951f, a water-soluble camptothecin analog, exhibits potent antitumor activity against a human lung cancer cell line and its SN-38-resistant variant.

(비특허문헌 0009) Kumazawa, E. et al. Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220. ; Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice.

(비특허문헌 0010) De Jager, R.,et al. Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273. ; DX-8951f : summary of phase I clinical trials.

(비특허문헌 0011) Inoue, K. et al. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Edited by Maeda et al. (2003), 145-153. ; CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate, DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data.

(비특허문헌 0012) Kumazawa, E. et al. Cancer Sci (2004) 95, 168-175. ; DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f : Potent antitumor activities in various murine tumor models.

(비특허문헌 0013) Soepenberg, O. et al. Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711. ; Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors.

(비특허문헌 0014) Wente M. N. et al. Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347. ; DE-310, a macro molecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 항체에 의한 종양의 치료에 있어서는, 항체가 항원을 인식하여 종양 세포에 결합해도 항종양 효과가 충분하지 않은 경우가 관찰되는 경우도 있어, 보다 효과가 높은 항종양 항체가 필요하게 되는 경우가 있다. 또, 항종양성의 저분자 화합물에 있어서는, 항종양 효과가 우수해도 부작용이나 독성면 등, 안전성 상의 문제를 갖는 것이 많아, 저분자 항종양 화합물에 대해서는, 안전성을 보다 높여 보다 우수한 치료 효과를 획득하는 것도 과제이다. 즉, 본 발명은 항종양 효과와 안전성면이 우수하고, 우수한 치료 효과를 갖는 항종양약을 획득하여 제공하는 것이 과제이다.

과제의 해결 수단

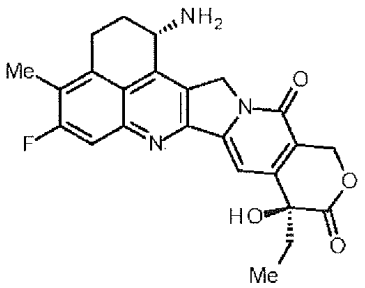
[0012] 본 발명자들은 항종양성 화합물인 엑사테칸을, 링커 구조 부분을 개재하여, 종양 세포를 표적으로 할 수 있는 항체, 즉, 종양 세포를 인식할 수 있는 특성, 종양 세포에 결합할 수 있는 특성, 종양 세포에 내재화할 수 있는 특성, 혹은 종양 세포에 세포 장해성을 갖는 특성 중 어느 하나 또는 그 이상의 특성을 구비한 항체에 결합시킨 화합물인 항체-약물 콘주게이트로 변환함으로써, 종양 세포에 세포 장해성을 갖는 항체이면 그 세포 장해성의 증강을 달성할 수 있는 것, 또한 항종양성 화합물을 종양 세포에 의해 확실하게 이동시켜 당해 화합물의 항종양 효과를 종양 세포에서 특이적으로 발휘시킬 수 있는 것, 따라서 항종양 효과의 확실한 발휘와 함께 항종양성 화합물의 투여량을 당해 화합물의 단체 투여 시보다 감소시킬 수 있으므로 보다 높은 안전성을 달성할 수 있는 것이 가능하다고 생각했다.

[0013] 이 때문에 본 발명자들은 특정 구조의 링커를 창출하고, 이 링커를 개재하여 항체와 엑사테칸을 결합시킨 항체-약물 콘주게이트를 획득하는 것에 성공하고, 그리고 이 화합물이 우수한 항종양 효과를 발휘하는 것을 알아내어 본 발명을 완성시킨 것이다.

[0014] 즉 본원 발명은,

[0015] [1] 다음 식

[0016] [화학식 2]



[0017]

[0018] 으로 나타내는 항종양성 화합물과 항체를 다음 식 :

[0019] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

[0020] 로 나타내는 구조의 링커를 개재하여 결합시킨 것을 특징으로 하는 항체-약물 콘주게이트에 관한 것이다.

[0021] 여기서, 항체는 L^1 의 말단에 있어서 결합하고, 항종양성 화합물은 1 위치의 아미노기의 질소 원자를 결합 부위로서, L^c 의 말단에 있어서 결합하고,

[0022] 식 중,

[0023] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0024] L^1 은 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-, $-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-, -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-, 또는 -C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 를 나타내고,

[0025] 여기서, n^2 는 2 내지 8 의 정수를 나타내고, n^3 은 1 내지 8 의 정수를 나타내고, n^4 는 1 내지 8 의 정수를 나타내고,

[0026] L^2 는 -NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2$-C(=O)-, -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-, 또는 단결합을 나타내고,

[0027] 여기서, n^5 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고, n^6 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0028] L^P 는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기를 나타내고,

[0029] L^a 는 -C(=O)-NH-, $-NR^1-(CH_2)n^7$-, -O-, 또는 단결합을 나타내고,

[0030] 여기서, n^7 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, R^1 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^8$-COOH, 또는 $-(CH_2)n^9$-OH 를 나타내지만, n^8 은 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^9 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

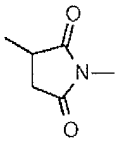
[0031] L^b 는 $-CR^2(-R^3)$-, -O-, $-NR^4$-, 또는 단결합을 나타내고,

[0032] 여기서, R^2 및 R^3 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b$-COOH, 또는 $-(CH_2)n^c$-OH 를 나타내고, R^4 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기를 나타내고, n^a 는 0 내지 6 의 정수를 나타내고, n^b 는 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^c 는 정수의 1 내지 4 를 나타내지만, n^a 가 0 일 때는, R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않고,

[0033] L^c 는 $-CH_2$- 또는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0034] -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

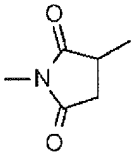
[0035] [화학식 3]

[0036] 

[0037] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0038] -(N-ly-3-diminiccuS)- 는 다음 식 :

[0039] [화학식 4]

[0040] 

[0041] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 L^2 와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이 구조를 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0042] cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0043] L^2 가 -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 일 때, L^1 은 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 가 된다.

[0044] 또한 본원 발명은 이하의 각각에 관한 것이기도 하다.

[0045] [2] L^c 가 -C(=O)- 인 [1] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0046] [3] 항체와 L^1 의 결합이

[0047] 항체의 힌지부에 존재하는 디술파이드 결합 부분에 있어서 형성시킨 티오에테르 결합,

[0048] 항체의 힌지부에 존재하는 디술파이드 결합 부분에 있어서 형성시킨 디술파이드 결합, 또는

[0049] 항체를 구성하는 아미노산의 측사슬 상에 존재하는 아미노기 또는 말단의 아미노기에 있어서 형성시킨 아미드 결합

[0050] 인 [1] 또는 [2] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

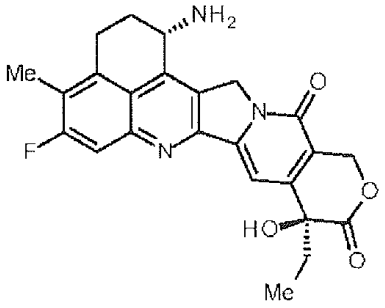
[0051] [4] L^P 의 펩티드 잔기가 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산에서 선택되는 아미노산으로 이루어지는 아미노산 잔기인 [1] 내지 [3] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0052] [5] L^P 가 4 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기인 [1] 내지 [3] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0053] [6] L^P 가 -GGFG- 인 [1] 내지 [3] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0054] [7] 다음 식

[0055] [화학식 5]



[0056]

[0057] 으로 나타내는 항종양성 화합물과 항체를 다음 식 :

[0058] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

[0059] 으로 나타내는 구조의 링커를 개재하여 결합시킨 것을 특징으로 하는 항체-약물 콘주게이트.

[0060] 여기서, 항체는 L^1 의 말단에 있어서 결합하고, 항종양성 화합물은 1 위치의 아미노기의 질소 원자를 결합 부위로서, L^c 의 말단에 있어서 결합하고,

[0061] 식 중,

[0062] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0063] L^1 은 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-, $-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-, -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-, 또는 -C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 를 나타내고,

[0064] 여기서, n^2 는 2 내지 8 의 정수를 나타내고, n^3 은 1 내지 8 의 정수를 나타내고, n^4 는 1 내지 8 의 정수를 나타내고,

[0065] L^2 는 -NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2$-C(=O)-, -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-, 또는 단결합을 나타내고,

[0066] 여기서, n^5 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고, n^6 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0067] L^P 는 GGFG 의 테트라펩티드 잔기를 나타내고,

[0068] L^a 는 -O- 또는 단결합을 나타내고,

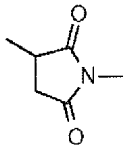
[0069] L^b 는 $-CR^2(-R^3)$- 또는 단결합을 나타내고,

[0070] 여기서, R^2 및 R^3 은 수소 원자를 나타내고,

[0071] L^c 는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0072] -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

[0073] [화학식 6]



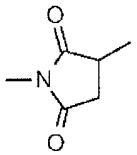
[0074]

[0075] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링

커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0076] -(N-ly-3-diminiccuS)- 는 다음 식 :

[0077] [화학식 7]

[0078] 

[0079] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 L^2 와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이 구조를 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0080] cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0081] L^2 가 -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 일 때, L^1 은 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 가 된다.

[0082] [8] L^1 이 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)- 또는 -CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)- 인 [1] 내지 [7] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0083] [9] L^1 이 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)- 인 [1] 내지 [7] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0084] [10] L^1 이 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 또는 -C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 인 [1] 내지 [7] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0085] [11] n^2 가 2 내지 5 의 정수로서, L^2 가 단결합인 [1] 내지 [9] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0086] [12] n^2 가 2 내지 5 의 정수로서, L^2 가 -NH-$(CH_2CH_2O)n^5$-CH_2-CH_2-C(=O)- 이며, n^5 가 2 또는 4 인 [1] 내지 [9] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0087] [13] -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c- 가 4 내지 7 원자의 사슬 길이를 갖는 부분 구조인 [1] 내지 [12] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0088] [14] -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c- 가 5 또는 6 원자의 사슬 길이를 갖는 부분 구조인 [1] 내지 [12] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0089] [15] -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-가

[0090] -NH-$(CH_2)_3$-C(=O)-,

[0091] -NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-, 또는

[0092] -NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(=O)-

[0093] 인 [1] 내지 [14] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0094] [16] 약물-링커 구조 부분이 다음의 약물-링커 구조의 군에서 선택되는 1 종의 약물-링커 구조인 [1] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트 :

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

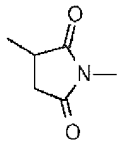
-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0095]

[0096] 여기서, -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

[0097] [화학식 8]

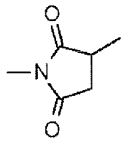


[0098]

[0099] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0100] -(N-ly-3-diminiccuS)- 는 다음 식 :

[0101] [화학식 9]



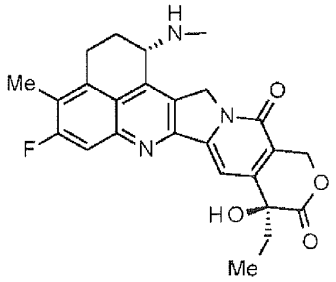
[0102]

[0103] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 L^2 와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이 구조를 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0104] cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0105] -(NH-DX) 는 다음 식 :

[0106] [화학식 10]

[0107] 

[0108] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기를 나타내고, -GGFG- 는 -Gly-Gly-Phe-Gly- 의 펩티드 잔기를 나타낸다.

[0109] [17] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 에 약물을 결합시킨 약물-링커 구조 부분이 다음의 군에서 선택되는 1 종의 약물-링커 구조인 [1] 내지 [9] 및 [11] 내지 [14] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트 :

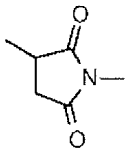
[0110] -(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0111] 여기서, -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

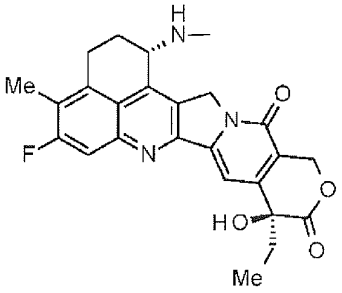
[0112] [화학식 11]

[0113] 

[0114] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0115] -(NH-DX) 는 다음 식 :

[0116] [화학식 12]

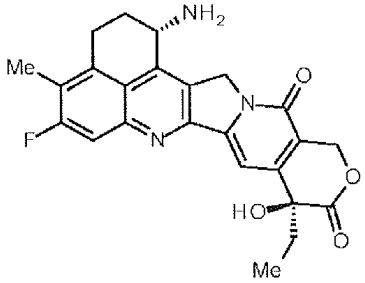


[0117]

[0118] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기를 나타낸다.

[0119] [18] 다음 식

[0120] [화학식 13]



[0121]

[0122] 으로 나타내는 항종양성 화합물과 항체를 다음 식 :

[0123] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

[0124] 으로 나타내는 구조의 링커를 개재하여 결합시킨 것을 특징으로 하는 항체-약물 콘주게이트.

[0125] 여기서, 항체는 L^1 의 말단에 있어서 결합하고, 항종양성 화합물은 L^c 의 말단에 있어서 결합하고,

[0126] 식 중,

[0127] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0128] L^1 은 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)- 를 나타내고, 항체의 힌지부에 존재하는 디술파이드 결합 부분에 있어서 형성시킨 티오에테르 결합을 개재하여 항체에 결합하지만,

[0129] 여기서, n^2 는 2 내지 8 의 정수를 나타내고,

[0130] L^2 는 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 또는 단결합을 나타내고,

[0131] 여기서, n^5 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0132] L^P 는 GGFG 의 테트라펩티드 잔기를 나타내고,

[0133] L^a 는 -O- 또는 단결합을 나타내고,

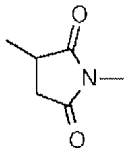
[0134] L^b 는 $-CR^2(-R^3)-$ 또는 단결합을 나타내고,

[0135] 여기서, R^2 및 R^3 은 수소 원자를 나타내고,

[0136] L^c 는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0137] -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

[0138] [화학식 14]

[0139] 

[0140] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합한다.

[0141] [19] n^2 가 2 이며, L^2 가 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 로서, n^5 가 2 이며, n^1 이 3 이며, L^a 및 L^b 가 모두 단결합이거나,

[0142] n^2 가 5 이며, L^2 가 단결합이며, n^1 이 1 이며, L^a 가 -O- 이고, L^b 가 $-CR^2(-R^3)-$ 이거나, 또는

[0143] n^2 가 5 이며, L^2 가 단결합이며, n^1 이 2 이며, L^a 가 -O- 이며, L^b 가 $-CR^2(-R^3)-$ 인 [18] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0144] [20] n^2 가 2 내지 5 의 정수로서, L^2 가 단결합인 [18] 또는 [19] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0145] [21] n^2 가 2 내지 5 의 정수로서, L^2 가 $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 이며, n^5 가 2 또는 4 인 [18] 또는 [19] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0146] [22] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 가

[0147] $-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$,

[0148] $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$, 또는

[0149] $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$

[0150] 인 [18] 내지 [21] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0151] [23] 약물-링커 구조 부분이 다음의 약물-링커 구조의 군에서 선택되는 1 종의 약물-링커 구조인 [18] 내지 [22] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트 :

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

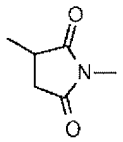
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0152]

[0153] 여기서, -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

[0154] [화학식 15]

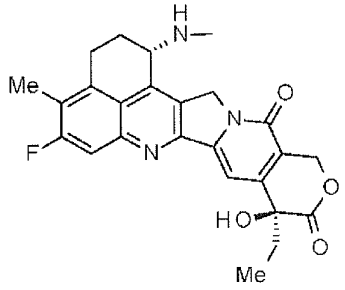


[0155]

[0156] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0157] -(NH-DX) 는 다음 식 :

[0158] [화학식 16]



[0159]

[0160] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기를 나타낸다.

[0161] [24] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 에 약물을 결합시킨 약물-링커 구조 부분이 다음의 군에서 선택되는 1 종의

약물-링커 구조인 [23] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트 :

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

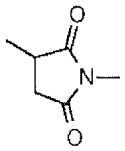
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0162]

[0163] 여기서, -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

[0164] [화학식 17]

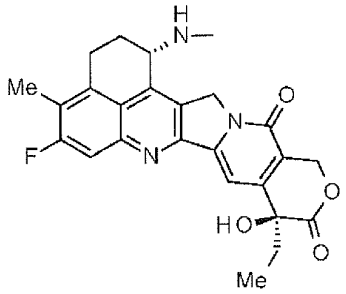


[0165]

[0166] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0167] -(NH-DX) 는 다음 식 :

[0168] [화학식 18]



[0169]

[0170] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기를 나타낸다.

[0171] [25] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 1 내지 10 개의 범위인 [1] 내지 [24] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0172] [26] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 2 내지 8 개의 범위인 [1] 내지 [24] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0173] [27] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 3 내지 8 개의 범위인 [1] 내지 [24] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0174] [28] 항체가 표적 세포를 인식할 수 있는 특성, 표적 세포에 결합할 수 있는 특성, 표적 세포에 내재화할 수 있는 특성, 표적 세포를 상해하는 특성 중 1 또는 그 이상의 특성을 구비한 항체인 [1] 내지 [27] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0175] [29] 항체-약물 콘주게이트가 표적으로 하는 세포가 종양 세포인 [1] 내지 [27] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0176] [30] 항체가 항 A33 항체, 항 B7-H3 항체, 항 CanAg 항체, 항 CD20 항체, 항 CD22 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD56 항체, 항 CD70 항체, 항 CEA 항체, 항 Cripto 항체, 항 EphA2 항체, 항 G250 항체, 항 MUC1 항체, 항 GPNMB 항체, 항 Integrin 항체, 항체 PSMA 항체, 항 Tenascin-C 항체, 항 SLC44A4 항체, 또는

항 Mesothelin 항체인 [1] 내지 [27] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0177] [31] 항체가 항 B7-H3 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 또는 항 CD70 항체인 [1] 내지 [27] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0178] [32] 항체가 항 B7-H3 항체인 [1] 내지 [27] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0179] [33] [1] 내지 [32] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트, 그 염, 또는 그들의 수화물을 함유하는 의약.

[0180] [34] [1] 내지 [32] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트, 그 염, 또는 그들의 수화물을 함유하는 항종양약 및/또는 항암약.

[0181] [35] 폐암, 신암, 요로 상피암, 대장암, 전립선암, 다형 신경 교아종, 난소암, 췌암, 유방암, 멜라노마, 간암, 방광암, 위암, 또는 식도암에 적용하기 위한 [34] 에 기재된 항종양약 및/또는 항암약.

[0182] [36] [1] 내지 [32] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트, 그 염, 또는 그들의 수화물을 활성 성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 제제 성분을 함유하는 의약 조성물.

[0183] [37] 폐암, 신암, 요로 상피암, 대장암, 전립선암, 다형 신경 교아종, 난소암, 췌암, 유방암, 멜라노마, 간암, 방광암, 위암, 또는 식도암에 적용하기 위한 [36] 에 기재된 의약 조성물.

[0184] [38] [1] 내지 [32] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트, 그 염, 또는 그들의 수화물을 투여하는 것을 특징으로 하는 종양 및/또는 암의 치료 방법.

[0185] [39] 다음 식으로 나타내는 약물-링커 중간체 화합물 :

[0186] $Q-(CH_2)n^{Q}-C(=O)-L^{2a}-L^{P}-NH-(CH_2)n^{1}-L^{a}-L^{b}-L^{c}-(NH-DX)$

[0187] 식 중, Q 는 (maleimid-N-yl)-, HS-, $X-CH_2-C(=O)-NH-$, 또는 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 를 나타내고,

[0188] X 는 브롬 원자 또는 요오드 원자를 나타내고,

[0189] n^{Q} 는 정수의 2 내지 8 을 나타내고,

[0190] L^{2a} 는 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^{5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$, 또는 단결합을 나타내고,

[0191] 여기서, n^{5} 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0192] L^{P} 는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산에서 선택되는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기를 나타내고,

[0193] n^{1} 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0194] L^{a} 는 $-C(=O)-NH-$, $-NR^{1}-(CH_2)n^{7}-$, -O-, 또는 단결합을 나타내고,

[0195] 여기서, n^{7} 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, R^{1} 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^{8}-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^{9}-OH$ 를 나타내지만, n^{8} 은 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^{9} 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0196] L^{b} 는 $-CR^{2}(-R^{3})-$, -O-, $-NR^{4}-$, 또는 단결합을 나타내고,

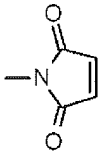
[0197] 여기서, R^{2} 및 R^{3} 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^{a}-NH_2$, $-(CH_2)n^{b}-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^{c}-OH$ 를 나타내고, R^{4} 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기를 나타내고, n^{a} 는 0 내지 6 의 정수를 나타내고, n^{b} 는 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^{c} 는 정수의 1 내지 4 를 나타내지만, n^{a} 가 0 일 때는,

R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않고,

[0198] L^c 는 $-CH_2-$ 또는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0199] (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

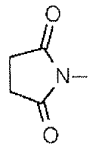
[0200] [화학식 19]

[0201] 

[0202] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0203] (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl) 은 다음 식

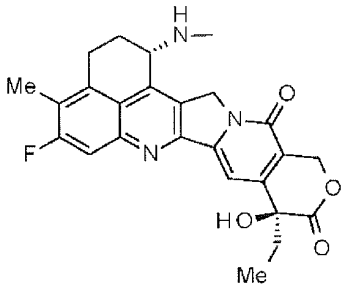
[0204] [화학식 20]

[0205] 

[0206] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0207] -(NH-DX) 는 다음 식

[0208] [화학식 21]

[0209] 

[0210] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0211] [40] L^c 가 -C(=O)-인 [39] 에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0212] [41] L^P 가 4 개의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기인 [39] 또는 [40] 에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0213] [42] L^P 가 -GGFG- 인 [39] 내지 [41] 중 어느 한 항에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0214] [43] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가

[0215] $-NH-CH_2CH_2-$,

[0216] $-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

[0217] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$,

[0218] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$,

[0219] $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는

[0220] $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 [39] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0221] [44] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가

[0222] $-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

[0223] $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는

[0224] $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-$ 인 [39] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0225] [45] n^Q 가 정수의 2 내지 6 인 [39] 내지 [44] 중 어느 한 항에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0226] [46] Q 가 (maleimid-N-yl)- 이며,

[0227] n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며,

[0228] L^{2a} 가 단결합인 [43] 에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0229] [47] Q 가 (maleimid-N-yl)- 이며,

[0230] n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며,

[0231] L^{2a} 가 단결합인 [44] 에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0232] [48] Q 가 (maleimid-N-yl)- 이며,

[0233] n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며,

[0234] L^{2a} 가 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 이며,

[0235] n^5 가 정수의 2 내지 4 이며,

[0236] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가

[0237] $-NH-CH_2CH_2-$,

[0238] $-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

[0239] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$,

[0240] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$,

[0241] $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는

[0242] $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 [39] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0243] [49] n^5 가 정수의 2 또는 4 이며,

[0244] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가

[0245] $-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

[0246] $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는

[0247] $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 [48] 에 기재된 약물-링커 중간체 화합물.

[0248] [50] 다음의 화합물 :

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0249] (maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=

O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0250] X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0251] HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0252] (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH

$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH$_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH$_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH$_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0253] (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O

-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

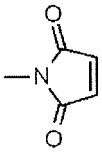
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、 또는

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0254]

[0255] 여기서, (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

[0256] [화학식 22]

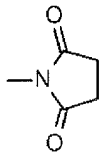
[0257] 

[0258] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0259] X 는 할로겐 원자를 나타내고,

[0260] (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)- 은 다음 식

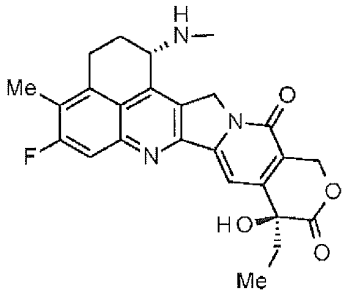
[0261] [화학식 23]

[0262] 

[0263] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0264] -(NH-DX) 는 다음 식

[0265] [화학식 24]

[0266] 

[0267] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0268] [51] 다음의 화합물 :

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0269]

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

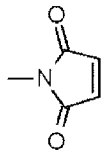
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、또는

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0270]

[0271] 여기서, (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

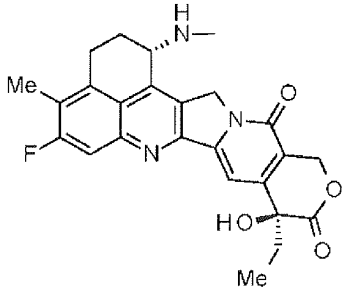
[0272] [화학식 25]

[0273] 

[0274] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0275] -(NH-DX) 는 다음 식

[0276] [화학식 26]

[0277] 

[0278] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

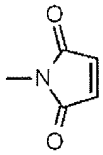
[0279] [52] 다음의 화합물 : (maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

[0280] (maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX) 또는

[0281] (maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

[0282] 여기서, (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

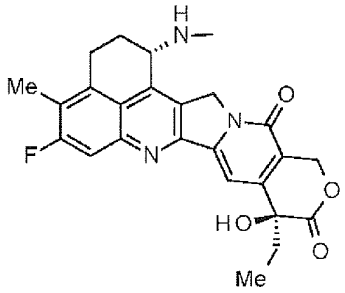
[0283] [화학식 27]

[0284] 

[0285] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0286] -(NH-DX) 는 다음 식

[0287] [화학식 28]

[0288] 

[0289] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0290] [53] 다음의 군에서 선택되는 화합물 :

[0291] NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

[0292] NH_2-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

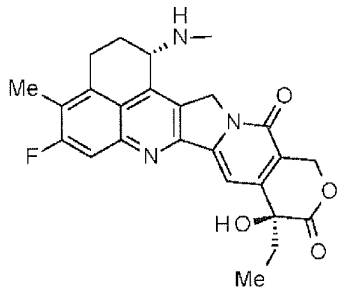
[0293] NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

[0294] NH_2-$CHCH_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX), 및

[0295] HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0296] 식 중, -(NH-DX) 는 다음 식

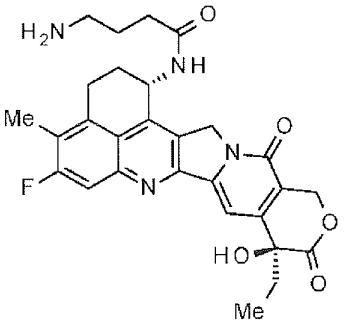
[0297] [화학식 29]

[0298] 

[0299] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0300] [54] 다음 식

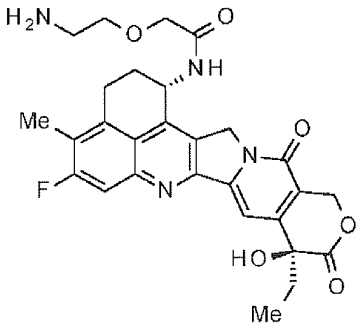
[0301] [화학식 30]

[0302] 

[0303] 으로 나타내는 화합물.

[0304] [55] 다음 식 :

[0305] [화학식 31]

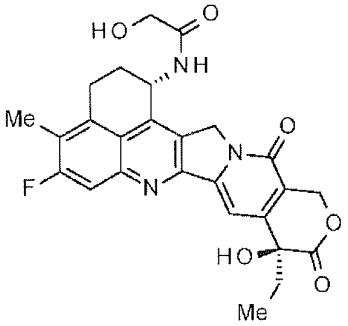


[0306]

[0307] 으로 나타내는 화합물.

[0308] [56] 다음 식

[0309] [화학식 32]



[0310]

[0311] 으로 나타내는 화합물.

[0312] [57] 다음 식으로 나타내는 화합물 :

[0313] $Q-(CH_2)n^Q-C(=O)-L^{2a}-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

[0314] 를 항체 또는 그 반응성 유도체와 반응시키고,

[0315] 항체의 힌지부에 존재하는 디술파이드 결합 부분에 있어서 티오에테르 결합을 형성시키는 방법, 또는

[0316] 항체를 구성하는 아미노산의 측사슬 상에 존재하는 아미노기 또는 말단의 아미노기에 있어서 아미드 결합을 형성시키는 방법

[0317] 에 의해 약물-링커 부분을 항체에 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체-약물 콘주게이트의 제조 방법.

[0318] 식 중, Q 는 (maleimid-N-yl)-, HS-, $X-CH_2-C(=O)-NH-$, 또는 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 를 나타내고,

[0319] X 는 브롬 원자 또는 요오드 원자를 나타내고,

[0320] n^Q 는 정수의 2 내지 8 을 나타내고,

[0321] L^{2a} 는 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$, 또는 단결합을 나타내고,

[0322] 여기서, n^5 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0323] L^P 는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산에서 선택되는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기를 나타내고,

[0324] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0325] L^a 는 -C(=O)-NH-, $-NR^1-(CH_2)n^7-$, -O-, 또는 단결합을 나타내고,

[0326] 여기서, n^7 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, R^1 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^8-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^9-OH$ 를 나타내지만, n^8 은 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^9 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

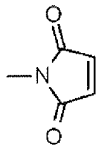
[0327] L^b 는 $-CR^2(-R^3)-$, -O-, $-NR^4-$, 또는 단결합을 나타내고,

[0328] 여기서, R^2 및 R^3 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^c-OH$ 를 나타내고, R^4 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기를 나타내고, n^a 는 0 내지 6 의 정수를 나타내고, n^b 는 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^c 는 정수의 1 내지 4 를 나타내지만, n^a 가 0 일 때는, R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않고,

[0329] L^c 는 $-CH_2-$ 또는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0330] (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

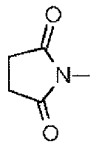
[0331] [화학식 33]

[0332] 

[0333] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0334] (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl) 은 다음 식

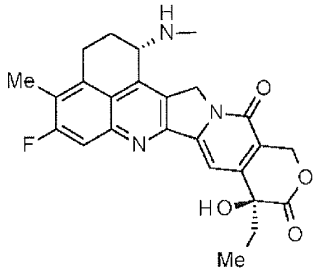
[0335] [화학식 34]

[0336] 

[0337] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0338] -(NH-DX) 는 다음 식

[0339] [화학식 35]

[0340] 

[0341] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0342] [58] 약물-링커 부분을 항체에 결합시키는 방법이,

[0343] 항체를 환원 처리한 후에, Q 가 말레이미딜기 또는 X-CH_2-C(=O)-NH- 인 화합물을 반응시켜 티오에테르 결합을 형성시키는 방법,

[0344] 항체에, Q 가 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 인 화합물을 반응시켜 아미드 결합을 형성시키는 방법, 또는

[0345] 항체에 식 Q^1-L^{1a}-Q^2

[0346] [식 중, Q^1 은 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-, (3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-, R^Q-O-C(=N)-, 또는 O=C=N- 을 나타내고, L^{1a}- 는 -cyc.Hex(1,4)-CH_2-, 탄소수 1 내지 10 의 알킬렌기, 페닐렌기, -(CH_2)n^4-C(=O)-, -(CH_2)n^{4a}-NH-C(=O)-(CH_2)n^{4b}-, 또는 -(CH_2)n^{4a}-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2- 를 나타내고,

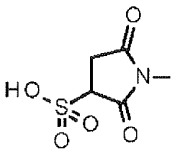
[0347] Q^2 는 (maleimid-N-yl), 할로겐 원자, 또는 -S-S-(2-Pyridyl) 을 나타내고,

[0348] R^Q 는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, n^4 는 1 내지 8 의 정수를 나타내고,

[0349] n^{4a} 는 0 내지 6 의 정수, n^{4b} 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0350] (3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)- 은 다음 식

[0351] [화학식 36]

[0352] 

[0353] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며, 이 술폰산은 리튬염, 나트륨염, 칼륨염을 형성할 수 있고,

[0354] cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0355] (2-Pyridyl) 은 2-피리딜기를 나타낸다.]

[0356] 으로 나타내는 화합물을 반응시킨 후에, Q 가 SH 인 화합물을 반응시켜 아미드 결합에 의해 약물-링커 구조를 형성시키는 방법 중 어느 것인 [57] 에 기재된 제조 방법.

[0357] [59] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 1 내지 10 개의 범위인 [57] 또는 [58] 에 기재된 제조 방법.

[0358] [60] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 2 내지 8 개의 범위인 [57] 또는 [58] 에 기재된 제조 방법.

[0359] [61] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 3 내지 8 개의 범위인 [57] 또는 [58] 에 기재된 제조 방법.

[0360] [62] 항체-약물 콘주게이트가 표적으로 하는 세포가 종양 세포인 [57] 내지 [61] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0361] [63] 항체가 항 A33 항체, 항 B7-H3 항체, 항 CanAg 항체, 항 CD20 항체, 항 CD22 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD56 항체, 항 CD70 항체, 항 CEA 항체, 항 Cripto 항체, 항 EphA2 항체, 항 G250 항체, 항 MUC1 항체, 항 GPNMB 항체, 항 Integrin 항체, 항체 PSMA 항체, 항 Tenascin-C 항체, 항 SLC44A4 항체, 또는 항 Mesothelin 항체인 [57] 내지 [61] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0362] [64] 항체가 항 B7-H3 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 또는 항 CD70 항체인 [57] 내지 [61] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0363] [65] 항체가 항 B7-H3 항체인 [57] 내지 [61] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0364] [66] [57] 내지 [65] 중 어느 것의 제조 방법에 의해 얻어지는 항체-약물 콘주게이트.

[0365] [67] 항체를 환원 조건에서 처리한 후에 이하의 화합물군에서 선택되는 화합물을 반응시키는 것을 특징으로 하는, 항체의 힌지부의 술파이드 결합 부분에 있어서 티오에테르 결합을 형성시켜 얻어지는 항체-약물 콘주게이트 :

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0366]

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

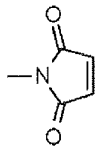
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、또는

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

[0367]

[0368] 여기서, (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

[0369] [화학식 37]

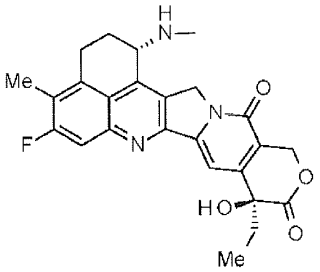


[0370]

[0371] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0372] -(NH-DX) 는 다음 식

[0373] [화학식 38]



[0374]

[0375] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0376] [68] 항체를 환원 조건에서 처리한 후에 이하의 화합물군에서 선택되는 화합물을 반응시키는 것을 특징으로 하

는, 항체의 힌지부의 술파이드 결합 부분에 있어서 티오에테르 결합을 형성시켜 얻어지는 항체-약물 콘주게이트 :

[0377] (maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

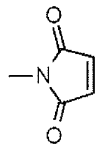
[0378] (maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

[0379] 또는

[0380] (maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

[0381] 여기서, (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

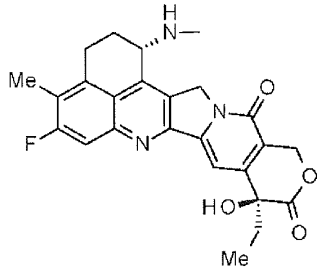
[0382] [화학식 39]

[0383] 

[0384] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0385] -(NH-DX) 는 다음 식

[0386] [화학식 40]

[0387] 

[0388] 으로 나타내는, 1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위로 되어 있는 기이다.

[0389] [69] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 1 내지 10 개의 범위인 [67] 또는 [68] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0390] [70] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 2 내지 8 개의 범위인 [67] 또는 [68] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0391] [71] 선택된 1 종의 약물-링커 구조의 1 항체당 평균 결합수가 3 내지 8 개의 범위인 [67] 또는 [68] 에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0392] [72] 항체-약물 콘주게이트가 표적으로 하는 세포가 종양 세포인 [67] 내지 [71] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0393] [73] 항체가 항 A33 항체, 항 B7-H3 항체, 항 CanAg 항체, 항 CD20 항체, 항 CD22 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD56 항체, 항 CD70 항체, 항 CEA 항체, 항 Cripto 항체, 항 EphA2 항체, 항 G250 항체, 항 MUC1 항체, 항 GPNMB 항체, 항 Integrin 항체, 항체 PSMA 항체, 항 Tenascin-C 항체, 항 SLC44A4 항체, 또는 항 Mesothelin 항체인 [67] 내지 [71] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0394] [74] 항체가 항 B7-H3 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 또는 항 CD70 항체인 [67] 내지 [71] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0395] [75] 항체가 항 B7-H3 항체인 [67] 내지 [71] 중 어느 한 항에 기재된 항체-약물 콘주게이트.

[0396] [76] 링커를 개재하여 약물과 항체가 결합된 항체-약물 콘주게이트를 얻기 위한 다음 식으로 나타내는 링커.

[0397] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

[0398] 여기서, L^1 은 항체에 대한 결합 부위이며, L^c 는 항종양성 화합물에 대한 결합 부위이며,

[0399] 식 중,

[0400] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0401] L^1 은 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-, $-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-, -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-, 또는 -C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 를 나타내고,

[0402] 여기서, n^2 는 2 내지 8 의 정수를 나타내고, n^3 은 1 내지 8 의 정수를 나타내고, n^4 는 1 내지 8 의 정수를 나타내고,

[0403] L^2 는 -NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2$-C(=O)-, -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-, 또는 단결합을 나타내고,

[0404] 여기서, n^5 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고, n^6 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, L^P 는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기를 나타내고,

[0405] L^a 는 -C(=O)-NH-, $-NR^1-(CH_2)n^7$-, -O-, 또는 단결합을 나타내고,

[0406] 여기서, n^7 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, R^1 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^8$-COOH, 또는 $-(CH_2)n^9$-OH 를 나타내지만, n^8 은 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^9 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

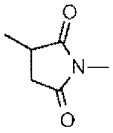
[0407] L^b 는 $-CR^2(-R^3)$-, -O-, $-NR^4$-, 또는 단결합을 나타내고,

[0408] 여기서, R^2 및 R^3 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b$-COOH, 또는 $-(CH_2)n^c$-OH 를 나타내고, R^4 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기를 나타내고, n^a 는 0 내지 6 의 정수를 나타내고, n^b 는 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^c 는 정수의 1 내지 4 를 나타내지만, n^a 가 0 일 때는, R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않고,

[0409] L^c 는 $-CH_2$- 또는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0410] -(Succinimid-3-yl-N)- 은 다음 식 :

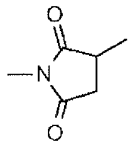
[0411] [화학식 41]

[0412] 

[0413] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 항체와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이것을 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0414] -(N-ly-3-diminiccuS)- 는 다음 식 :

[0415] [화학식 42]

[0416] 

[0417] 으로 나타내는 구조이며, 이것의 3 위치에서 L^2 와 결합하고, 1 위치의 질소 원자 상에서 이 구조를 포함하는 링커 구조 내의 메틸렌기와 결합하고,

[0418] cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0419] L^2 가 -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 일 때, L^1 은 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 가 된다.

[0420] [77] 다음의 군에서 선택되는 [76] 에 기재된 링커, 단 좌단이 항체와의 결합 부위이며, 우단이 항종양성 화합물과의 결합 부위이다.

[0421]
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

[0422] -(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-

GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

[0423] -CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH

$_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0424]

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG

[0425]

-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0426]

[0427] [78] 다음의 군에서 선택되는 [76] 에 기재된 링커, 단 좌단이 항체와의 결합 부위이며, 우단이 항종양성 화합물과의 결합 부위이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0428]

[0429] [79] 다음의 군에서 선택되는 [76] 에 기재된 링커, 단 좌단이 항체와의 결합 부위이며, 우단이 항종양성 화합물과의 결합 부위이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0430]

[0431] [80] 다음의 군에서 선택되는 [76] 에 기재된 링커 링커, 단 좌단이 항체와의 결합 부위이며, 우단이 항종양성 화합물과의 결합 부위이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

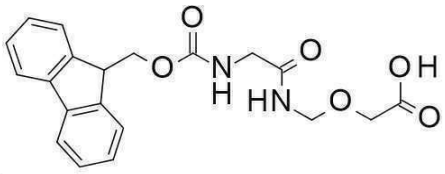
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0432]

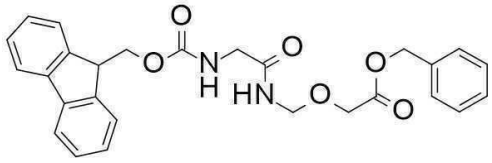
[0433] 또한, 본원 발명은 하기에 관한 것이다.

[0434] [1] 다음 화학식으로 나타내는 [({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실}아미노)메톡시]아세트산의 제조 방법으로서:



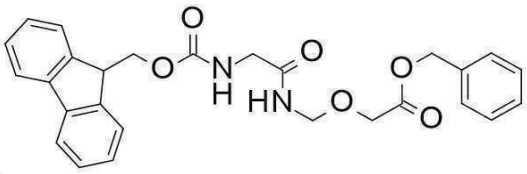
[0435]

[0436] 다음 화학식으로 나타내는 벤질 [({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실}아미노)메톡시]아세테이트:

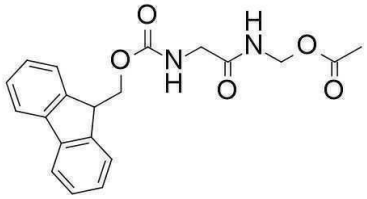


[0437] 의 카르복시기의 보호기를 제거하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

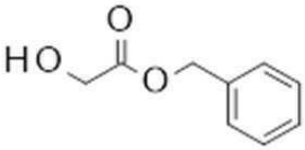
[0438] [2] 다음 화학식으로 나타내는 벤질 [({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실}아미노)메톡시]아세테이트의 제조 방법으로서:

[0439] 

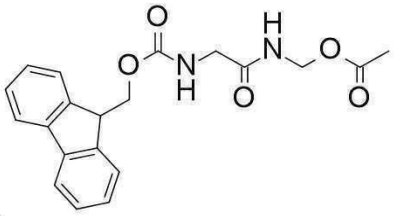
[0440] 다음 화학식으로 나타내는 ({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실}아미노)메틸 아세테이트:

[0441]  를

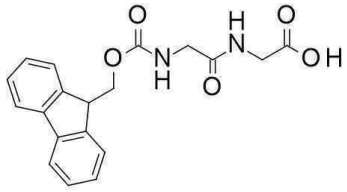
[0442] 다음 화학식으로 나타내는 벤질 글리콜레이트:

[0443]  와 반응시키는 단계를 포함하는, 제조 방법.

[0444] [3] 다음 화학식으로 나타내는 ({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실}아미노)메틸 아세테이트의 제조 방법으로서:

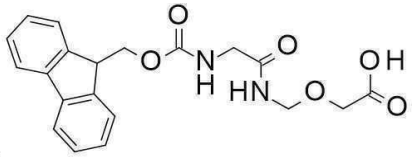
[0445] 

[0446] 다음 화학식으로 나타내는 N-9-플루오레닐메톡시카르보닐글리실글리신:

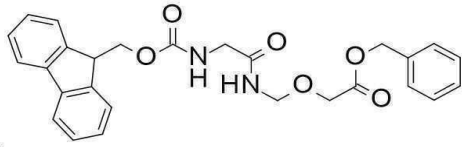
[0447]  을

[0448] 4 아세트산납과 반응시키는 단계를 포함하는, 제조 방법.

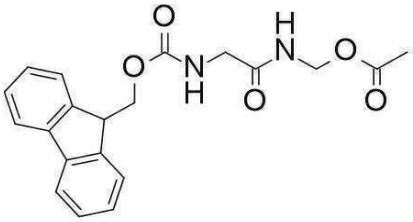
[0449] [4] 다음 화학식으로 나타내는 화합물:

[0450]  .

[0451] [5] 다음 화학식으로 나타내는 화합물:

[0452]  .

[0453] [6] 다음 화학식으로 나타내는 화합물:

[0454] 

.

발명의 효과

[0455] 특정 구조의 링커를 개재하여 항종양성 화합물 엑사테칸을 결합시킨 항체-약물 콘주게이트에 의해 우수한 항종양 효과 및 안전성을 달성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0456] 도 1 은 B7-H3 베어리언트 1 의 아미노산 배열 (배열 번호 1) 을 나타낸다.

도 2 는 B7-H3 베어리언트 2 의 아미노산 배열 (배열 번호 2) 을 나타낸다.

도 3 은 M30-H1 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 9) 을 나타낸다.

도 4 는 M30-H2 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 10) 을 나타낸다.

도 5 는 M30-H3 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 11) 을 나타낸다.

도 6 은 M30-H4 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 12) 을 나타낸다.

도 7 은 M30-L1 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 13) 을 나타낸다.

도 8 은 M30-L2 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 14) 을 나타낸다.

도 9 는 M30-L3 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 15) 을 나타낸다.

도 10 은 M30-L4 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 16) 을 나타낸다.

도 11 은 M30-L5 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 17) 을 나타낸다.

도 12 는 M30-L6 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 18) 을 나타낸다.

도 13 은 M30-L7 타입 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 19) 을 나타낸다.

도 14 는 M30 항체 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 20) 을 나타낸다.

도 15 는 M30 항체 경사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 21) 을 나타낸다.

도 16 은 B7-H3 베어리언트 1 의 뉴클레오티드 배열 (배열 번호 26) 을 나타낸다.

도 17 은 피하 이식한 인간 멜라노마주 A375 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 삼각선은 M30-H1-L4P 항체, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다.

도 18 은 피하 이식한 인간 멜라노마주 A375 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다. 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흑색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 0.1 mg/kg 투여 시, 선 -X- 는 0.3 mg/kg 투여 시, 흑색 삼각선은 1 mg/kg 투여 시, 흰색 둥근선은 3 mg/kg 투여 시의 효과를 나타낸다.

도 19 는 피하 이식한 인간 비소세포 폐암주 Calu-6 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다. 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 삼각선은 M30-H1-L4P 항체, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다.

도 20 은 피하 이식한 인간 멜라노마주 A375 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (1), (13), (41), (55) 의 효과를 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (1), 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (13), 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (41), 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게

이트 (55) 의 효과를 나타낸다.

도 21 은 피하 이식한 인간 비소세포 폐암주 Calu-6 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (13), (41), (55) 의 효과를 나타낸다. 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 둥근선은 DE-310, 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (13), 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (41), 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (55) 의 효과를 나타낸다.

도 22 는 피하 이식한 인간 멜라노마주 A375 세포에 대한 항체-약물 콘주게이트 (17), (18), (19), (59), (60), (61) 의 효과를 나타낸다. 도면 흑색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흑색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (17), 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (18), 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (19), 흑색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (59), 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (60), 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (61) 의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0457] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는, 항종양성 항체에, 링커 구조 부분을 개재하여 항종양성 화합물을 결합시킨 항종양성 약물이며, 이하에 상세하게 설명한다.

[0458] [항체]

[0459] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트에 사용되는 항체는 면역 글로불린을 의미하고, 항원과 면역 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자이다. 본 발명의 항체로서 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY 중 어느 클래스여도 되지만, IgG 가 바람직하다. 또, 서브 클래스로서 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2 중 어느 것이어도 되지만 IgG1 및 IgG2 가 바람직하다. 항체는 어느 종에서 유래해도 되지만, 바람직하게는, 인간, 래트, 마우스 및 토끼를 예시할 수 있다. 인간 이외의 종에서 유래하는 경우에는, 주지의 기술을 이용하여, 키메라화 또는 인간화하는 것이 바람직하다. 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체이거나, 모노클로날 항체여도 되지만, 모노클로날 항체가 바람직하다.

[0460] 본 발명의 항체는 종양 세포를 표적으로 할 수 있는 항체이면 된다. 즉 항종양 활성을 갖는 약물을 링커를 개재하여 결합시키는 점에서, 항체로서는, 종양 세포를 인식할 수 있는 특성, 종양 세포에 결합할 수 있는 특성, 종양 세포 내에 수용되어 내재화하는 특성, 나아가서는 종양 세포를 장해하는 특성 중 1 또는 그 이상의 특성을 구비하고 있는 것이 바람직하다.

[0461] 항체의 종양 세포에 대한 결합성은 플로사이트메트리를 사용하여 확인할 수 있다. 종양 세포 내에 대한 항체의 수용은, (1) 치료 항체에 결합하는 2 차 항체 (형광 표식) 를 사용하여 세포 내에 받아들여진 항체를 형광 현미경으로 가시화하는 어세이 (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) 치료 항체에 결합하는 2 차 항체 (형광 표식) 를 사용하여 세포 내에 받아들여진 형광량을 측정하는 어세이 (molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004) 또는 (3) 치료 항체에 결합하는 이뮤노톡신을 사용하여, 세포 내에 받아들여지면 독소가 방출되어 세포 증식이 억제된다는 Mab-ZAP 어세이 (BioTechniques 28 : 162-165, January 2000) 를 사용하여 확인할 수 있다.

[0462] 항체의 항종양 활성은 종양 세포에 대한 세포 장해 활성, 살세포 효과를 말하지만, in vitro 에서는, 세포의 증식의 억제 활성으로 측정함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어, 항체의 표적 단백질을 과잉 발현하고 있는 암 세포주를 배양하고, 배양계에 여러 가지의 농도로 항체를 첨가하여, 포커스 형성, 콜로니 형성 및 스페로이드 증식에 대한 억제 활성을 측정할 수 있다. In vivo 에서는, 예를 들어, 표적 단백질을 고발현하고 있는 종양 세포주를 이식한 누드 마우스에 항체를 투여하고, 암 세포의 변화를 측정함으로써, 항종양 활성을 확인할 수 있다. 또한, 항체-약물 콘주게이트는 항종양 효과를 발휘하는 약물을 결합시키고 있으므로, 항체 자체에 항종양 효과가 있는 것은 필수는 아니지만 항종양 효과를 갖는 것이 보다 바람직하다. 항종양 효과의 발휘의 점에서는 항체가 내재화되어 종양 세포 내로 이행하는 성질이 있는 것이 약물에 의해 종양 세포를 특이적·선택적으로 장해를 주는 점에서 중요하고, 바람직하다.

[0463] 이와 같은 항체로서 항 A33 항체, 항 B7-H3 항체, 항 CanAg 항체, 항 CD20 항체, 항 CD22 항체, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD56 항체, 항 CD70 항체, 항 CEA 항체, 항 Cripto 항체, 항 EphA2 항체, 항 G250 항체, 항 MUC1 항체, 항 GPNMB 항체, 항 Integrin 항체, 항체 PSMA 항체, 항 Tenascin-C 항체, 항 SLC44A4 항체, 항 Mesothelin 항체를 예시할 수 있지만 이것에 한정되지 않는다.

[0464] 본 발명의 항체로서 바람직하게는, 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD70 항체 및 항 B7-H3 항체이며, 더욱 바

람직하게는 항 B7-H3 항체이다.

[0465] 본 발명의 항체는, 이 분야에서 통상적으로 실시되는 방법을 이용하여, 항원이 되는 폴리펩티드를 동물에 면역하고, 생체 내에 산생되는 항체를 채취, 정제함으로써 얻을 수 있다. 항원의 유래는 인간으로 한정되지 않고, 마우스, 래트 등의 인간 이외의 동물에서 유래하는 항원을 동물에게 면역할 수도 있다. 이 경우에는, 취득된 이종 항원에 결합하는 항체와 인간 항원의 교차성을 시험함으로써, 인간의 질환에 적용 가능한 항체를 선별할 수 있다.

[0466] 또, 공지된 방법 (예를 들어, Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) 에 따라, 항원에 대한 항체를 산생하는 항체 산생 세포와 미엘로마 세포를 융합시킴으로써 하이브리도마를 수립하여, 모노클로날 항체를 얻을 수도 있다.

[0467] 또한, 항원은 항원 단백질을 코드하는 유전자를 유전자 조작에 의해 숙주 세포에 산생시킴으로써 얻을 수 있다. 구체적으로는, 항원 유전자를 발현 가능한 벡터를 제작하고, 이것을 숙주 세포에 도입하여 그 유전자를 발현시키고, 발현한 항원을 정제하면 된다.

[0468] 항 CD30 항체, 항 CD33 항체, 항 CD70 항체는, 각각, WO2002/043661, 미국 특허 제5,773,001호, WO2006/113909 에 기초하여, 공지된 수단에 의해 취득할 수 있다.

[0469] 본 발명에 있어서 사용되는 B7-H3 항체로서는, 이하의 특성을 갖는 항체가 바람직하다.

[0470] (1) 이하의 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 항체 ;

[0471] (a) B7-H3 에 특이적으로 결합한다

[0472] (b) 항체 의존성 세포 매개식 작용 (ADCP) 활성을 갖는다

[0473] (c) in vivo 에서 항종양 활성을 갖는다

[0474] (2) B7-H3 이 배열 번호 1 또는 2 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 분자인 상기 (1) 에 기재된 항체 또는 당해 항체.

[0475] (3) 중사슬에 있어서의 상보성 결정 영역으로서 배열 번호 3 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH1, 배열 번호 4 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH2 및 배열 번호 5 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH3, 그리고 경사슬에 있어서의 상보성 결정 영역으로서 배열 번호 6 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL1, 배열 번호 7 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL2 및 배열 번호 8 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL3 을 갖는 상기 (1) 또는 (2) 에 기재된 항체.

[0476] (4) 정상 영역이 인간 유래 정상 영역인 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 한 항에 기재된 항체.

[0477] (5) 인간화되어 있는 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 한 항에 기재된 항체.

[0478] (6) (a) 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열, (b) 배열 번호 10 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열, (c) 배열 번호 11 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열, (d) 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열, (e) (a) 내지 (d) 의 배열에 대해 적어도 95 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 배열, 및 (f) (a) 내지 (d) 의 배열에 있어서 1 또는 수 개의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 배열로 이루어지는 군에서 선택된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역, 그리고 (g) 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (h) 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (i) 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (j) 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (k) 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (l) 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (m) 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열, (n) (g) 내지 (m) 의 배열에 대해 적어도 95 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 배열, 및 (o) (g) 내지 (m) 의 배열에 있어서 1 또는 수 개의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 배열로 이루어지는 군에서 선택된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역을 갖는 상기 (5) 에 기재된 항체.

[0479] (7) 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의

가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역, 그리고 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬의 가변 영역 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬의 가변 영역으로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬의 가변 영역 및 경사슬의 가변 영역을 갖는 상기 (6) 에 기재된 항체.

[0480] (8) 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 그리고 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬 및 경사슬로 이루어지는 상기 (6) 또는 (7) 에 기재된 항체.

[0481] (9) 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 17 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배

열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 18 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 19 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬, 그리고 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬 및 경사슬로 이루어지는 상기 (14) 내지 (16) 중 어느 한 항에 기재된 항체.

[0482] (10) 중사슬이 배열 번호 9 또는 12 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 카르복실 말단의 아미노산이 결실되어 있는 중사슬인 상기 (8) 또는 (9) 에 기재된 항체.

[0483] (11) 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항에 기재된 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 배양하는 공정 및 당해 공정에서 얻어진 배양물로부터 목적으로 하는 항체를 채취하는 공정을 포함하는 당해 항체의 제조 방법에 의해 얻어지는 항체.

[0484] (12) 항체 의존성 세포 상해 활성을 증강시키기 위해서 당사슬 수식이 조절되어 있는 상기 (1) 내지 (11) 중 어느 한 항에 기재된 항체.

[0485] 이하에, 본 발명에 있어서 사용되는 B7-H3 항체에 대해 설명한다.

[0486] 본 명세서 중에 있어서, 「암」 과 「종양」 은 동일한 의미로 사용하고 있다.

[0487] 본 명세서 중에 있어서, 「유전자」 라는 말에는, DNA 뿐만 아니라 그 mRNA, cDNA 및 그 cRNA 도 포함된다.

[0488] 본 명세서 중에 있어서, 「폴리뉴클레오티드」 라는 말은 핵산과 동일한 의미로 사용하고 있고, DNA, RNA, 프로브, 올리고뉴클레오티드, 및 프라이머도 포함된다.

[0489] 본 명세서 중에 있어서는, 「폴리펩티드」 와 「단백질」 은 구별하지 않고 사용하고 있다.

[0490] 본 명세서 중에 있어서, 「세포」 에는, 동물 개체 내의 세포, 배양 세포도 포함하고 있다.

[0491] 본 명세서 중에 있어서, 「B7-H3」 은 B7-H3 단백질과 동일한 의미로 사용하고 있고, 또, B7-H3 베어리언트 1 및/또는 B7-H3 베어리언트 2 를 의미한다.

[0492] 본 명세서에 있어서의 「CDR」 이란, 상보성 결정 영역 (CDR : Complemetarity deterring region) 을 의미한다. 항체 분자의 중사슬 및 경사슬에는 각각 3 지점의 CDR 이 있는 것이 알려져 있다. CDR 은 초가변 영역 (hypervariable domain) 이라고도 불리고, 항체의 중사슬 및 경사슬의 가변 영역 내에 있고, 1 차 구조의 변이성이 특히 높은 부위이며, 중사슬 및 경사슬의 폴리펩티드 사슬의 1 차 구조 상에 있어서, 각각 3 지점으로 분리되어 있다. 본 명세서 중에 있어서는, 항체의 CDR 에 대해, 중사슬의 CDR 을 중사슬 아미노산 배열의 아미노 말단측으로부터 CDRH1, CDRH2, CDRH3 으로 표기하고, 경사슬의 CDR 을 경사슬 아미노산 배열의 아미노 말단측으로부터 CDRL1, CDRL2, CDRL3 으로 표기한다. 이들의 부위는 입체 구조 상에서 서로 근접하여, 결합하는 항원에 대한 특이성을 결정하고 있다.

[0493] 본 발명에 있어서, 「스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이즈한다」 란, 시판되는 하이브리다이제이션 용액 ExpressHyb Hybridization Solution (클론텍크사 제조) 중, 68 ℃ 에서 하이브리다이즈하는 것, 또는, DNA 를 고정한 필터를 사용하여 0.7-1.0 M 의 NaCl 존재하 68 ℃ 에서 하이브리다이제이션을 실시한 후, 0.1-2 배 농도의 SSC 용액 (1 배 농도 SSC 란 150 mM NaCl, 15 mM 시트르산나트륨으로 이루어진다) 을 사용하고, 68 ℃ 에서 세정함으로써 동정할 수 있는 조건 또는 그것과 동등한 조건으로 하이브리다이즈하는 것을 말한다.

[0494] 1. B7-H3

[0495] B7-H3 은 항원 제시 세포에 보조 자극 분자로서 발현하는 B7 패밀리의 하나이며, T 세포 상의 리셉터에 작용하여 면역 작용을 촉진 또는 억제한다고 생각되고 있다.

[0496] B7-H3 은 1 회 막 관통 구조를 갖는 단백질이지만, B7-H3 의 N 말단측의 세포 외 영역에는 2 개의 베어리언트가 존재한다. B7-H3 베어리언트 1 (4Ig-B7-H3) 에는 각 2 지점의 V 또는 C 형 Ig 도메인이 존재하고, B7-H3 베어리언트 2 (2Ig-B7-H3) 에는 각 1 지점의 V 또는 C 형 Ig 도메인이 존재한다.

[0497] 본 발명에서 사용하는 B7-H3 은 인간, 비인간 포유 동물 (래트, 마우스 등) 의 B7-H3 발현 세포로부터 직접 정

제하여 사용하거나, 혹은 당해 세포의 세포막 획분을 조제하여 사용할 수 있고, 또, B7-H3 을 in vitro 에서 합성하거나, 혹은 유전자 조작에 의해 숙주 세포에 산생시킴으로써 얻을 수 있다. 유전자 조작에서는, 구체적으로는, B7-H3 cDNA 를 발현 가능한 벡터에 삽입한 후, 전사와 번역에 필요한 효소, 기질 및 에너지 물질을 포함하는 용액 중에서 합성하거나, 혹은 다른 원핵 생물, 또는 진핵 생물의 숙주 세포를 형질 전환시킴으로써 B7-H3 을 발현시키는 것에 의해, 그 단백질을 얻을 수 있다.

[0498] 인간 B7-H3 베어리언트 1 유전자의 오픈 리딩 프레임 (ORF) 의 아미노산 배열은 배열표의 배열 번호 1 에 기재되어 있다. 또, 배열 번호 1 의 배열은 도 1 에 기재되어 있다.

[0499] 인간 B7-H3 베어리언트 2 유전자의 ORF 의 아미노산 배열은 배열표의 배열 번호 2 에 기재되어 있다. 또, 배열 번호 2 의 배열은 도 2 에 기재되어 있다.

[0500] 또, 상기 각 B7-H3 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 수 개의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 부가된 아미노산 배열로 이루어지고, 당해 단백질과 동등한 생물 활성을 갖는 단백질도 B7-H3 에 포함된다.

[0501] 시그널 배열이 제거된 성숙 인간 B7-H3 베어리언트 1 은 배열 번호 1 에 나타내는 아미노산 배열의 27 번째 내지 534 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열에 상당한다. 또, 시그널 배열이 제거된 성숙 인간 B7-H3 베어리언트 2 는 배열 번호 2 에 나타내는 아미노산 배열의 27 번째 내지 316 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열에 상당한다.

[0502] 2. 항 B7-H3 항체의 제조

[0503] 본 발명의 B7-H3 에 대한 항체는, 통상적인 방법을 이용하여, B7-H3 또는 B7-H3 의 아미노산 배열에서 선택되는 임의의 폴리펩티드를 동물에 면역하고, 생체 내에 산생되는 항체를 채취, 정제함으로써 얻을 수 있다. 항원이 되는 B7-H3 의 생물종은 인간으로 한정되지 않고, 마우스, 래트 등의 인간 이외의 동물에서 유래하는 B7-H3 을 동물에게 면역할 수도 있다. 이 경우에는, 취득된 이종 B7-H3 에 결합하는 항체와 인간 B7-H3 의 교차성을 시험함으로써, 인간의 질환에 적용 가능한 항체를 선별할 수 있다.

[0504] 또, 공지된 방법 (예를 들어, Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) 에 따라, B7-H3 에 대한 항체를 산생하는 항체 산생 세포와 미엘로마 세포를 융합시킴으로써 하이브리도마를 수립하여, 모노클로날 항체를 얻을 수도 있다.

[0505] 또한, 항원이 되는 B7-H3 은 B7-H3 유전자를 유전자 조작에 의해 숙주 세포에 발현시킴으로써 얻을 수 있다.

[0506] 구체적으로는, B7-H3 유전자를 발현 가능한 벡터를 제작하고, 이것을 숙주 세포에 도입하여 그 유전자를 발현시키고, 발현한 B7-H3 을 정제하면 된다. 이하, 구체적으로 B7-H3 에 대한 항체의 취득 방법을 설명한다.

[0507] (1) 항원의 조제

[0508] 항 B7-H3 항체를 제작하기 위한 항원으로서는, B7-H3 또는 그 적어도 6 개가 연속된 부분 아미노산 배열로 이루어지는 폴리펩티드, 혹은 이들에 임의의 아미노산 배열이나 담체가 부가된 유도체를 들 수 있다.

[0509] B7-H3 은 인간의 종양 조직 혹은 종양 세포로부터 직접 정제하여 사용할 수 있고, 또, B7-H3 을 in vitro 에서 합성하거나, 혹은 유전자 조작에 의해 숙주 세포에 산생시킴으로써 얻을 수 있다.

[0510] 유전자 조작에서는, 구체적으로는, B7-H3 의 cDNA 를 발현 가능한 벡터에 삽입한 후, 전사와 번역에 필요한 효소, 기질 및 에너지 물질을 포함하는 용액 중에서 합성하거나, 혹은 다른 원핵 생물, 또는 진핵 생물의 숙주 세포를 형질 전환시킴으로써 B7-H3 을 발현시키는 것에 의해, 항원을 얻을 수 있다.

[0511] 또, 막 단백질인 B7-H3 의 세포 외 영역과 항체의 정상 영역을 연결한 융합 단백질을 적절한 숙주·벡터계에 있어서 발현시킴으로써, 분비 단백질로서 항원을 얻는 것도 가능하다.

[0512] B7-H3 의 cDNA 는, 예를 들어, B7-H3 의 cDNA 를 발현하고 있는 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여, B7-H3 cDNA 를 특이적으로 증폭하는 프라이머를 사용하여 폴리머라아제 연쇄 반응 (이하 「PCR」 이라고 한다) (Saiki, R. K., et al. Science (1988) 239, p. 487-489 참조) 을 실시하는, 이른바 PCR 법에 의해 취득할 수 있다.

[0513] 폴리펩티드의 인·비트로 (in vitro) 합성으로서는, 예를 들어 로슈·다이아그노스틱스사 제조의 래피드 트랜스레이션 시스템 (RTS) 을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지 않는다.

[0514] 원핵 세포의 숙주로서는, 예를 들어, 대장균 (Escherichia coli) 이나 고초균 (Bacillus subtilis) 등을 들 수

있다. 목적으로 하는 유전자를 이들의 숙주 세포 내에서 형질 전환시키려면, 숙주와 적합할 수 있는 종 유래의 레프리콘 즉 복제 기점과, 조절 배열을 포함하고 있는 플라스미드 벡터로 숙주 세포를 형질 전환시킨다. 또, 벡터로서는, 형질 전환 세포에 표현 형질 (표현형) 의 선택성을 부여할 수 있는 배열을 갖는 것이 바람직하다.

[0515] 진핵 세포의 숙주 세포에는, 척추 동물, 곤충, 효모 등의 세포가 포함되고, 척추 동물 세포로서는, 예를 들어, 원숭이의 세포인 COS 세포 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), 마우스 선유아 세포 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) 이나 차이니즈·햄스터 난소 세포 (CHO 세포, ATCC CCL-61) 의 디하이드로 엽산 환원 효소 결손주 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, p. 4126-4220) 등이 흔히 사용되고 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0516] 상기와 같이 하여 얻어지는 형질 전환체는 통상적인 방법에 따라 배양할 수 있고, 그 배양에 의해 세포 내, 또는 세포 외에 목적으로 하는 폴리펩티드가 산생 된다.

[0517] 그 배양에 사용되는 배지로서는, 채용한 숙주 세포에 따라 관용되는 각종의 것을 적절히 선택할 수 있고, 대장균이면, 예를 들어, LB 배지에 필요에 따라, 암피실린 등의 항생 물질이나 IPMG 를 첨가하여 사용할 수 있다.

[0518] 상기 배양에 의해, 형질 전환체의 세포 내 또는 세포 외에 산생되는 재조합 단백질은 그 단백질의 물리적 성질이나 화학적 성질 등을 이용한 각종 공지된 분리 조작법에 의해 분리·정제할 수 있다.

[0519] 그 방법으로서는, 구체적으로는 예를 들어, 통상적인 단백질 침전제에 의한 처리, 한외 여과, 분자체 크로마토그래피 (겔 여과), 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피 등의 각종 액체 크로마토그래피, 투석법, 이들의 조합 등을 예시할 수 있다.

[0520] 또, 발현시키는 재조합 단백질에 6 잔기로 이루어지는 히스티딘 태그를 연결함으로써, 니켈 어피니티 칼럼으로 효율적으로 정제할 수 있다. 혹은, 발현시키는 재조합 단백질에 IgG 의 Fc 영역을 연결함으로써, 프로테인 A 칼럼으로 효율적으로 정제할 수 있다.

[0521] 상기 방법을 조합함으로써 용이하게 고수율, 고순도로 목적으로 하는 폴리펩티드를 대량으로 제조할 수 있다.

[0522] (2) 항 B7-H3 모노클로날 항체의 제조

[0523] B7-H3 과 특이적으로 결합하는 항체의 예로서, B7-H3 과 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 들 수 있지만, 그 취득 방법은 이하에 기재하는 바와 같다.

[0524] 모노클로날 항체의 제조에 있어서는, 일반적으로 하기와 같은 작업 공정이 필요하다.

[0525] 즉,

[0526] (a) 항원으로서 사용하는 생체 고분자의 정제,

[0527] (b) 항원을 동물에 주사함으로써 면역한 후, 혈액을 채취하여 그 항체가를 검정하여 비장 적출의 시기를 결정하고 나서, 항체 산생 세포를 조제하는 공정,

[0528] (c) 골수종 세포 (이하 「미엘로마」 라고 한다) 의 조제,

[0529] (d) 항체 산생 세포와 미엘로마의 세포 융합,

[0530] (e) 목적으로 하는 항체를 산생하는 하이브리도마군의 선별,

[0531] (f) 단일 세포 클론으로의 분할 (클로닝),

[0532] (g) 경우에 따라서는, 모노클로날 항체를 대량으로 제조하기 위한 하이브리도마의 배양, 또는 하이브리도마를 이식한 동물의 사육,

[0533] (h) 이와 같이 하여 제조된 모노클로날 항체의 생리 활성, 및 그 결합 특이성의 검토, 혹은 표식 시약으로서의 특성의 검정

[0534] 등이다.

[0535] 이하, 모노클로날 항체의 제작법을 상기 공정을 따라 상세히 서술하지만, 그 항체의 제작법은 이것에 제한되지 않고, 예를 들어 비세포 이외의 항체 산생 세포 및 미엘로마를 사용할 수도 있다.

[0536] (a) 항원의 정제

[0537] 항원으로서는, 상기한 바와 같은 방법으로 조제한 B7-H3 또는 그 일부를 사용할 수 있다.

[0538] 또, B7-H3 발현 재조합 체세포에 의해 조제한 막 획분, 또는 B7-H3 발현 재조합 체세포 자체, 또한, 당업자에게 주지의 방법을 이용하여, 화학 합성한 본 발명의 단백질의 부분 펩티드를 항원으로서 사용할 수도 있다.

[0539] (b) 항체 산생 세포의 조제

[0540] 공정 (a) 에서 얻어진 항원과, 프로인드의 완전 또는 불완전 애주번트, 또는 칼리명반과 같은 보조제를 혼합하여, 면역원으로서 실험 동물에게 면역한다. 실험 동물은 공지된 하이브리도마 제작법에 사용되는 동물을 지장없이 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 마우스, 래트, 염소, 양, 소, 말 등을 사용할 수 있다. 단, 적출한 항체 산생 세포와 융합시키는 미엘로마 세포의 입수 용이성 등의 관점에서, 마우스 또는 래트를 피면역 동물로 하는 것이 바람직하다.

[0541] 또, 실제로 사용하는 마우스 및 래트의 계통에는 특별히 제한은 없고, 마우스의 경우에는, 예를 들어 각 계통 A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, 129 등이, 또 래트의 경우에는, 예를 들어, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer 등을 사용할 수 있다.

[0542] 이들의 마우스 및 래트는 예를 들어 닛폰 쿠레아, 닛폰 찰스 리버, 등 실험 동물 사육 판매업자로부터 입수할 수 있다.

[0543] 이 중, 후술하는 미엘로마 세포와의 융합 적합성을 감안하면, 마우스에서는 BALB/c 계통이, 래트에서는 Wistar 및 Low 계통이 피면역 동물로서 특히 바람직하다.

[0544] 또, 항원의 인간과 마우스에서의 상동성을 고려하여, 자기 항체를 제거하는 생체 기구를 저하시킨 마우스, 즉 자기 면역 질환 마우스를 사용하는 것도 바람직하다.

[0545] 또한, 이들 마우스 또는 래트의 면역 시의 주령은 바람직하게는 5 ~ 12 주령, 더욱 바람직하게는 6 ~ 8 주령이다.

[0546] B7-H3 또는 이 재조합체에 의해 동물을 면역하려면, 예를 들어, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 등에 상세하게 기재되어 있는 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[0547] 이들의 면역법 중, 본 발명에 있어서 바람직한 방법을 구체적으로 나타내면, 예를 들어 이하와 같다.

[0548] 즉, 먼저, 항원인 막 단백질 획분, 혹은 항원을 발현시킨 세포를 동물의 피내 또는 복강 내에 투여한다.

[0549] 단, 면역 효율을 높이기 위해서는 양자의 병용이 바람직하고, 전반은 피내 투여를 실시하고, 후반 또는 최종회만 복강내 투여를 실시하면, 특히 면역 효율을 높일 수 있다.

[0550] 항원의 투여 스케줄은 피면역 동물의 종류, 개체차 등에 따라 상이하지만, 일반적으로는, 항원 투여 횟수 3 ~ 6 회, 투여 간격 2 ~ 6 주간이 바람직하고, 투여 횟수 3 ~ 4 회, 투여 간격 2 ~ 4 주간이 더욱 바람직하다.

[0551] 또, 항원의 투여량은 동물의 종류, 개체차 등에 따라 상이하지만, 일반적으로는 0.05 ~ 5 mg, 바람직하게는 0.1 ~ 0.5 mg 정도로 한다.

[0552] 추가 면역은 이상과 같은 항원 투여의 1 ~ 6 주일 후, 바람직하게는 2 ~ 4 주일 후, 더욱 바람직하게는 2 ~ 3 주일 후에 실시한다.

[0553] 또한, 추가 면역을 실시할 때의 항원 투여량은 동물의 종류, 크기 등에 따라 상이하지만, 일반적으로, 예를 들어 마우스의 경우에는 0.05 ~ 5 mg, 바람직하게는 0.1 ~ 0.5 mg, 더욱 바람직하게는 0.1 ~ 0.2 mg 정도로 한다.

[0554] 상기 추가 면역으로부터 1 ~ 10 일 후, 바람직하게는 2 ~ 5 일 후, 더욱 바람직하게는 2 ~ 3 일 후에 피면역 동물로부터 항체 산생 세포를 포함하는 비장 세포 또는 림프구를 무균적으로 꺼낸다. 그 때에 항체가를 측정하고, 항체가가 충분히 높아진 동물을 항체 산생 세포의 공급원으로서 사용하면, 이후의 조작의 효율을 높일 수 있다.

[0555] 여기서 사용되는 항체가의 측정법으로서는, 예를 들어, RIA 법 또는 ELISA 법을 들 수 있지만 이들의 방법으로 제한되지 않는다.

[0556] 본 발명에 있어서의 항체가의 측정은, 예를 들어 ELISA 법에 의하면, 이하에 기재하는 바와 같은 순서에 의해 실시할 수 있다.

[0557] 먼저, 정제 또는 부분 정제한 항원을 ELISA 용 96 구멍 플레이트 등의 고상 표면에 흡착시키고, 또한 항원이 흡착되어 있지 않은 고상 표면을 항원과 무관계한 단백질, 예를 들어 소 혈청 알부민 (이하 「BSA」 라고 한다) 에 의해 덮고, 그 표면을 세정 후, 제 1 항체로서 단계 희석한 시료 (예를 들어 마우스 혈청) 에 접촉시켜, 상기 항원에 시료 중의 항체를 결합시킨다.

[0558] 또한 제 2 항체로서 효소 표식된 마우스 항체에 대한 항체를 추가하여 마우스 항체에 결합시키고, 세정 후 그 효소의 기질을 추가하고, 기질 분해에 기초하는 발색에 의한 흡광도의 변화 등을 측정함으로써, 항체가를 산출한다.

[0559] 피면역 동물의 비장 세포 또는 림프구로부터의 항체 산생 세포의 분리는 공지된 방법 (예를 들어, Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495, ; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p. 511, ; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550, ; Walsh, Nature, (1977) 266, p. 495) 에 따라 실시할 수 있다. 예를 들어, 비장 세포의 경우에는, 비장을 세절하여 세포를 스테인리스 메시로 여과한 후, 이글 최소 필수 배지 (MEM) 에 부유시켜 항체 산생 세포를 분리하는 일반적 방법을 채용할 수 있다.

[0560] (c) 골수종 세포 (이하, 「미엘로마」 라고 한다) 의 조제

[0561] 세포 융합에 사용하는 미엘로마 세포에는 특별한 제한은 없고, 공지된 세포주로부터 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 단, 융합 세포로부터 하이브리도마를 선택할 때의 편리성을 고려하여, 그 선택 수속이 확립되어 있는 HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 결손주를 사용하는 것이 바람직하다.

[0562] 즉, 마우스 유래의 X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8. U1 (P3U1), X63-Ag8. 653 (X63. 653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45. 6TG1. 7 (45. 6 TG), FO, S149/5XXO, BU. 1 등, 래트 유래의 210. RSY3. Ag. 1. 2. 3 (Y3) 등, 인간 유래의 U266AR (SKO-007), GM1500·GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2), 8226AR/NIP4-1 (NP41) 등이다. 이들의 HGPRT 결손주는 예를 들어, American Type Culture Collection (ATCC) 등으로부터 입수할 수 있다.

[0563] 이들의 세포주는 적당한 배지, 예를 들어 8-아자구아닌 배지 [RPMI-1640 배지에 글루타민, 2-메르캅토에탄올, 겐타마이신, 및 소 태아 혈청 (이하 「FBS」 라고 한다) 을 추가한 배지에 8-아자구아닌을 추가한 배지], 이스코브 개변 덜벡코 배지 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; 이하 「IMDM」 이라고 한다), 또는 덜벡코 개변 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; 이하 「DMEM」 이라고 한다) 에서 계대 배양하지만, 세포 융합의 3 내지 4 일 전에 정상 배지 [예를 들어, 10 % FCS 를 포함하는 ASF104 배지 (아지노모토 (주) 사 제조)] 에서 계대 배양하고, 융합 당일에 2×10^7 이상의 세포수를 확보해 둔다.

[0564] (d) 세포 융합

[0565] 항체 산생 세포와 미엘로마 세포의 융합은, 공지된 방법 (Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 등) 에 따라, 세포의 생존률을 극도로 저하시키지 않을 정도의 조건하에서 적절히 실시할 수 있다.

[0566] 그러한 방법은, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 등의 고농도 폴리머 용액 중에서 항체 산생 세포와 미엘로마 세포를 혼합하는 화학적 방법, 전기적 자극을 이용하는 물리적 방법 등을 이용할 수 있다. 이 중, 상기 화학적 방법의 구체예를 나타내면 이하와 같다.

[0567] 즉, 고농도 폴리머 용액으로서 폴리에틸렌글리콜을 사용하는 경우에는, 분자량 1500 ~ 6000, 바람직하게는 2000 ~ 4000 의 폴리에틸렌글리콜 용액 중에서, 30 ~ 40 ℃, 바람직하게는 35 ~ 38 ℃ 의 온도에서 항체 산생 세포와 미엘로마 세포를 1 ~ 10 분간, 바람직하게는 5 ~ 8 분간 혼합한다.

[0568] (e) 하이브리도마군의 선택

[0569] 상기 세포 융합에 의해 얻어지는 하이브리도마의 선택 방법은 특별히 제한은 없지만, 통상적으로 HAT (히포크산

틴·아미노프테린·티미딘) 선택법 (Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495 ; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550) 이 사용된다.

[0570] 이 방법은 아미노프테린으로 생존할 수 없는 HGPRT 결손주의 미엘로마 세포를 사용하여 하이브리도마를 얻는 경우에 유효하다.

[0571] 즉, 미융합 세포 및 하이브리도마를 HAT 배지에서 배양함으로써, 아미노프테린에 대한 내성을 가진 하이브리도마만을 선택적으로 잔존시키고, 또한 증식시킬 수 있다.

[0572] (f) 단일 세포 클론으로의 분할 (클로닝)

[0573] 하이브리도마의 클로닝법으로서는, 예를 들어 메틸셀룰로오스법, 연아가로오스법, 한계 희석법 등의 공지된 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어 Barbara, B. M. and Stanley, M. S. : Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 참조). 이들의 방법 중, 특히 메틸셀룰로오스법 등의 삼차원 배양법이 바람직하다. 예를 들어, 세포 융합에 의해 형성된 하이브리도마군을 ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies 사 제조 #03804) 등의 메틸셀룰로오스 배지에 현탁하여 배양하고, 형성된 하이브리도마 콜로니를 회수함으로써 모노 클론 하이브리도마의 취득이 가능하다. 회수된 각 하이브리도마 콜로니를 배양하고, 얻어진 하이브리도마 배양 상청 중에 안정적으로 항체가가 확인된 것을 B7-H3 모노클로날 항체 산생 하이브리도마주로서 선택한다.

[0574] 이와 같이 하여 수립된 하이브리도마주의 예로서는, B7-H3 하이브리도마 M30 을 들 수 있다. 또한, 본 명세서 중에 있어서는, B7-H3 하이브리도마 M30 이 산생하는 항체를 「M30 항체」 또는 간단히 「M30」 으로 기재한다.

[0575] M30 항체의 중사슬은 배열표의 배열 번호 20 에 나타내는 아미노산 배열을 갖는다. 또, M30 항체의 경사슬은 배열표의 배열 번호 21 에 나타내는 아미노산 배열을 갖는다. 또한, 배열표의 배열 번호 20 에 나타내는 중사슬 아미노산 배열 중에서, 1 내지 19 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 시그널 배열이며, 20 내지 141 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 가변 영역이며, 142 내지 471 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 정상 영역이다. 또, 배열표의 배열 번호 21 에 나타내는 경사슬 아미노산 배열 중에서, 1 내지 22 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 시그널 배열이며, 23 내지 130 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 가변 영역이며, 131 내지 235 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 정상 영역이다.

[0576] (g) 하이브리도마의 배양에 의한 모노클로날 항체의 조제

[0577] 이와 같이 하여 선택된 하이브리도마는, 이것을 배양함으로써, 모노클로날 항체를 효율적으로 얻을 수 있지만, 배양에 앞서, 목적으로 하는 모노클로날 항체를 산생하는 하이브리도마를 스크리닝하는 것이 바람직하다.

[0578] 이 스크리닝에는 그 자체 이미 알려진 방법을 채용할 수 있다.

[0579] 본 발명에 있어서의 항체가의 측정은 예를 들어 상기 (b) 의 항목에서 설명한 ELISA 법에 의해 실시할 수 있다.

[0580] 이상의 방법에 의해 얻은 하이브리도마는 액체 질소 중 또는 -80 ℃ 이하의 냉동고 중에 동결 상태로 보존할 수 있다.

[0581] 클로닝을 완료한 하이브리도마는 배지를 HT 배지로부터 정상 배지로 변경하여 배양된다.

[0582] 대량 배양은 대형 배양병을 사용한 회전 배양, 혹은 스피너 배양으로 실시된다. 이 대량 배양에 있어서의 상청으로부터, 겔 여과 등, 당업자에게 주지의 방법을 이용하여 정제함으로써, 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 얻을 수 있다.

[0583] 또, 동 계통의 마우스 (예를 들어, 상기의 BALB/c), 혹은 Nu/Nu 마우스의 복강 내에 하이브리도마를 주사하고, 그 하이브리도마를 증식시킴으로써, 본 발명의 모노클로날 항체를 대량으로 포함하는 복수를 얻을 수 있다.

[0584] 복강 내에 투여하는 경우에는, 사전 (3 ~ 7 일 전) 에 2,6,10,14-테트라메틸펜타데칸 (2,6,10,14-tetramethyl pentadecane) (프리스탄) 등의 광물유를 투여하면, 보다 다량의 복수가 얻어진다.

[0585] 예를 들어, 하이브리도마와 동 계통의 마우스의 복강 내에 미리 면역 억제제를 주사하고, T 세포를 불활성화한 후, 20 일 후에 10^6 ~ 10^7 개의 하이브리도마·클론 세포를, 혈청을 포함하지 않는 배지 중에 부유 (0.5 ㎖) 시켜 복강 내에 투여하고, 통상적으로 복부가 팽만하고, 복수가 고인 시점에서 마우스로부터 복수를 채취한다.

이 방법에 의해, 배양액 중에 비해 약 100 배 이상의 농도의 모노클로날 항체가 얻어진다.

[0586] 상기 방법에 의해 얻은 모노클로날 항체는 예를 들어 Weir, D.M. : Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978) 에 기재되어 있는 방법으로 정제할 수 있다.

[0587] 이렇게 하여 얻어지는 모노클로날 항체는 B7-H3 에 대해 높은 항원 특이성을 갖는다.

[0588] (h) 모노클로날 항체의 검정

[0589] 이렇게 하여 얻어진 모노클로날 항체의 아이소타입 및 서브 클래스의 결정은 이하와 같이 실시할 수 있다.

[0590] 먼저, 동정법으로서는 오크테르로니 (Ouchterlony) 법, ELISA 법, 또는 RIA 법을 들 수 있다.

[0591] 오크테르로니법은 간편하기는 하지만, 모노클로날 항체의 농도가 낮은 경우에는 농축 조작이 필요하다.

[0592] 한편, ELISA 법 또는 RIA 법을 이용한 경우에는, 배양 상청을 그대로 항원 흡착 고상과 반응시키고, 또한 제 2 차 항체로서 각종 이뮤노글로불린 아이소타입, 서브 클래스에 대응하는 항체를 사용함으로써, 모노클로날 항체의 아이소타입, 서브 클래스를 동정하는 것이 가능하다.

[0593] 또, 더욱 간편한 방법으로서, 시판되는 동정용의 키트 (예를 들어, 마우스 타이퍼키트 ; 바이오래드사 제조) 등을 이용할 수도 있다.

[0594] 또한, 단백질의 정량은 포린로우리법, 및 280 nm 에 있어서의 흡광도 [1.4 (OD280) = 이뮤노글로불린 1 mg/mℓ] 로부터 산출하는 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0595] 또한, (2) 의 (a) 내지 (h) 의 공정을 재차 실시하여 별도로 독립적으로 모노클로날 항체를 취득한 경우에 있어서도, M30 항체와 동등한 세포 상해 활성을 갖는 항체를 취득하는 것이 가능하다. 이와 같은 항체의 일례로서, M30 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 들 수 있다. M30 은 B7-H3 의 세포 외 영역 중의 도메인인 IgC1 도메인 또는 IgC2 도메인에 있어서의 에피토프를 인식하고, IgC1 도메인 혹은 IgC2 도메인 또는 양자에 결합하므로, 특히 당해 에피토프로서는 B7-H3 의 IgC1 도메인 또는 IgC2 도메인에 존재하는 에피토프를 들 수 있다. 새롭게 제작된 모노클로날 항체가 M30 항체의 결합하는 부분 펩티드 또는 부분 입체 구조에 결합하면, 그 모노클로날 항체가 M30 항체와 동일한 에피토프에 결합한다고 판정할 수 있다. 또, M30 항체의 B7-H3 에 대한 결합에 대해 그 모노클로날 항체가 경합하는 (즉, 그 모노클로날 항체가 M30 항체와 B7-H3 의 결합을 방해한다) 것을 확인함으로써, 구체적인 에피토프의 배열 또는 구조가 결정되어 있지 않아도, 그 모노클로날 항체가 M30 항체와 동일한 에피토프에 결합한다고 판정할 수 있다. 에피토프가 동일한 것이 확인된 경우, 그 모노클로날 항체가 M30 항체와 동등한 세포 상해 활성을 가지고 있는 것이 강하게 기대된다.

[0596] (3) 그 밖의 항체

[0597] 본 발명의 항체에는, 상기 B7-H3 에 대한 모노클로날 항체에 추가하여, 인간에 대한 이종 항원성을 저하시키는 것 등을 목적으로 하여 인위적으로 개변한 유전자 재조합형 항체, 예를 들어, 키메라 (Chimeric) 항체, 인간화 (Humanized) 항체, 인간 항체 등도 포함된다. 이들의 항체는 이미 알려진 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0598] 키메라 항체로서는, 항체의 가변 영역과 정상 영역이 서로 이종인 항체, 예를 들어 마우스 또는 래트 유래 항체의 가변 영역을 인간 유래의 정상 영역에 접합한 키메라 항체를 들 수 있다 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 참조).

[0599] 인간화 항체로서는, 상보성 결정 영역 (CDR ; complementarity determining region) 만을 인간 유래의 항체에 삽입한 항체 (Nature (1986) 321, p. 522-525 참조), CDR 이식법에 의해, CDR 의 배열에 추가하여 일부의 프레임 워크의 아미노산 잔기도 인간 항체에 이식한 항체 (국제 공개 팜플렛 WO90/07861) 를 들 수 있다.

[0600] 단, M30 항체 유래의 인간화 항체로서는, M30 항체의 6 종 모든 CDR 배열을 유지하고, 항종양 활성을 갖는 한, 특정의 인간화 항체로 한정되지 않는다. 또한, M30 항체의 중사슬 가변 영역은 배열표의 배열 번호 3 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH1 (NYVMH), 배열 번호 4 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG), 및 배열 번호 5 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRH3 (WGYYGSPLYYFDY) 을 보유하고 있다. 또, M30 항체의 경사슬 가변 영역은 배열표의 배열 번호 6 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL1 (RASSRLIYMH), 배열 번호 7 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL2 (ATSNLAS), 및 배열 번호 8 에 나타내는 아미노산 배열로 이루어지는 CDRL3 (QQWNSNPPT) 을 보유하고 있다.

[0601] 마우스 항체 M30 의 인간화 항체의 실예로서는, (1) 배열표의 배열 번호 9, 10, 11 또는 12 의 20 내지 141 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열, (2) 상기 (1) 의 아미노산 배열에 대해 적어도 95 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 배열, 및 (3) 상기 (1) 의 아미노산 배열에 있어서 1 또는 수 개의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 배열 중 어느 하나로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 포함하는 중사슬, 그리고 (4) 배열 번호 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19 의 21 내지 128 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열, (5) 상기 (4) 의 아미노산 배열에 대해 적어도 95 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 배열, 및 (6) 상기 (4) 의 아미노산 배열에 있어서 1 또는 수 개의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 배열 중 어느 하나로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 경사슬의 임의의 조합을 들 수 있다.

[0602] 또한, 본 명세서 중에 있어서의 「수 개」란, 1 내지 10 개, 1 내지 9 개, 1 내지 8 개, 1 내지 7 개, 1 내지 6 개, 1 내지 5 개, 1 내지 4 개, 1 내지 3 개, 또는 1 혹은 2 개를 의미한다.

[0603] 또, 본 명세서 중에 있어서의 아미노산의 치환으로서는 보존적 아미노산 치환이 바람직하다. 보존적 아미노산 치환이란, 아미노산 측사슬에 관련이 있는 아미노산 그룹 내에서 생기는 치환이다. 바람직한 아미노산 그룹은 이하와 같다 : 산성 그룹 = 아스파긴산, 글루탐산 ; 염기성 그룹 = 리신, 아르기닌, 히스티딘 ; 비극성 그룹 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판 ; 및 비대전 극성 패밀리 = 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 다른 바람직한 아미노산 그룹은 다음과 같다 : 지방족 하이드록시 그룹 = 세린 및 트레오닌 ; 아미드 함유 그룹 = 아스파라긴 및 글루타민 ; 지방족 그룹 = 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신 ; 그리고 방향족 그룹 = 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신. 이러한 아미노산 치환은 원래의 아미노산 배열을 갖는 물질의 특성을 저하시키지 않는 범위에서 실시하는 것이 바람직하다.

[0604] 상기 중사슬 및 경사슬의 바람직한 조합의 항체로서는, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체, 그리고 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 141 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 갖는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 128 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 갖는 경사슬로 이루어지는 항체를 들 수 있다.

[0605] 더욱 바람직한 조합의 항체로서는, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루

어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 17 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 18 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 19 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 번째의 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 번째의 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 그리고 배열 번호 12 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체.

[0606] 또, 다른 바람직한 조합으로서는, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 17 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 18 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 9 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 19 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 13 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 14 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 15 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체, 그리고 배열 번호 12 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체를 들 수 있다.

[0607] 상기의 중사슬 아미노산 배열 및 경사슬 아미노산 배열과 높은 상동성을 나타내는 배열을 조합함으로써, 상기의 각 항체와 동등한 세포 상해성 활성을 갖는 항체를 선택하는 것이 가능하다. 이와 같은 상동성은 일반적으로는 80 % 이상의 상동성이며, 바람직하게는 90 % 이상의 상동성이며, 보다 바람직하게는 95 % 이상의 상동성이며, 가장 바람직하게는 99 % 이상의 상동성이다. 또, 중사슬 또는 경사슬의 아미노산 배열에 1 내지 수 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 배열을 조합하는 것에 의해서도, 상기의 각 항체와 동등한 세포 상해성 활성을 갖는 항체를 선택하는 것이 가능하다.

[0608] 2 종류의 아미노산 배열간의 상동성은 Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., ThomasL. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs」, Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402) 의 디폴트 파라미터를 사용함으로써 결정할 수 있다. Blast algorithm 은 인터넷으로 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 에 액세스하는 것에 의해서도 사용할 수 있다.

[0609] 또한, 배열표의 배열 번호 9, 10, 11 또는 12 에 나타내는 중사슬 아미노산 배열 중에서, 1 내지 19 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 시그널 배열이며, 20 내지 141 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는

아미노산 배열은 가변 영역이며, 142 내지 471 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 정상 영역이다. 배열 번호 9 의 배열은 도 3 에, 배열 번호 10 의 배열은 도 4 에, 배열 번호 11 의 배열은 도 5 에, 배열 번호 12 의 배열은 도 6 에 각각 기재되어 있다.

[0610] 또, 배열표의 배열 번호 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19 에 나타내는 경사슬 아미노산 배열 중에서, 1 내지 20 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 시그널 배열이며, 21 내지 128 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 가변 영역이며, 129 내지 233 번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 배열은 정상 영역이다. 배열 번호 13 의 배열은 도 7 에, 배열 번호 14 의 배열은 도 8 에, 배열 번호 15 의 배열은 도 9 에, 배열 번호 16 의 배열은 도 10 에, 배열 번호 17 의 배열은 도 11 에, 배열 번호 18 의 배열은 도 12 에, 배열 번호 19 의 배열은 도 13 에 각각 기재되어 있다.

[0611] 본 발명의 항체로서는, 또한, M30 항체와 동일한 에피토프에 결합하는, 인간 항체를 들 수 있다. 항 B7-H3 인간 항체란, 인간 염색체 유래의 항체의 유전자 배열만을 갖는 인간 항체를 의미한다. 항 B7-H3 인간 항체는 인간 항체의 중사슬과 경사슬의 유전자를 포함하는 인간 염색체 단편을 갖는 인간 항체 산생 마우스를 사용한 방법 (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143, ; Kuroiwa, Y. et. al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448 ; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology : Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999. ; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727 등을 참조.) 에 의해 취득할 수 있다.

[0612] 이와 같은 인간 항체 산생 마우스는, 구체적으로는, 내재성 면역 글로불린 중사슬 및 경사슬의 유전자 자리가 파괴되고, 대신에 효모 인공 염색체 (Yeast artificial chromosome, YAC) 벡터 등을 개재하여 인간 면역 글로불린 중사슬 및 경사슬의 유전자 자리가 도입된 유전자 재조합 동물을, 녹아웃 동물 및 트랜스제닉 동물의 제작, 및 이들의 동물끼리를 교배시킴으로써 만들어 낼 수 있다.

[0613] 또, 유전자 재조합 기술에 의해, 그러한 인간 항체의 중사슬 및 경사슬의 각각을 코드하는 cDNA, 바람직하게는 그 cDNA 를 포함하는 벡터에 의해 진핵 세포를 형질 전환하고, 유전자 재조합 인간 모노클로날 항체를 산생하는 형질 전환 세포를 배양함으로써, 이 항체를 배양 상청 중에서 얻을 수도 있다.

[0614] 여기서, 숙주로서는 예를 들어 진핵 세포, 바람직하게는 CHO 세포, 림프구나 미엘로마 등의 포유 동물 세포를 사용할 수 있다.

[0615] 또, 인간 항체 라이브러리에서 선별한 파지 디스플레이 유래의 인간 항체를 취득하는 방법 (Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308 ; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203 ; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431 등 참조.) 도 알려져 있다.

[0616] 예를 들어, 인간 항체의 가변 영역을 한 개 사슬 항체 (scFv) 로서 파지 표면에 발현시켜, 항원에 결합하는 파지를 선택하는 파지 디스플레이법 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116) 을 이용할 수 있다.

[0617] 항원에 결합함으로써 선택된 파지의 유전자를 해석함으로써, 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 코드하는 DNA 배열을 결정할 수 있다.

[0618] 항원에 결합하는 scFv 의 DNA 배열이 밝혀지면, 당해 배열을 갖는 발현 벡터를 제작하고, 적당한 숙주에 도입하여 발현시킴으로써 인간 항체를 취득할 수 있다 (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p.1105-1116).

[0619] 새롭게 제작된 인간 항체가 M30 항체의 결합하는 부분 펩티드 또는 부분 입체 구조에 결합하면, 그 인간 항체가 M30 항체와 동일한 에피토프에 결합한다고 판정할 수 있다. 또, M30 항체의 B7-H3 에 대한 결합에 대해 그 인간 항체가 경합하는 (즉, 그 인간 항체가 M30 항체와 B7-H3 의 결합을 방해한다) 것을 확인함으로써, 구체적인 에피토프의 배열 또는 구조가 결정되어 있지 않아도, 그 인간 항체가 M30 항체와 동일한 에피토프에 결합한다고 판정할 수 있다. 에피토프가 동일한 것이 확인된 경우, 그 인간 항체가 M30 항체와 동등한 세포 상해 활성을 가지고 있는 것이 강하게 기대된다.

[0620] 이상의 방법에 의해 얻어진 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체는, 공지된 방법 등에 의해 항원에 대한 결합성을 평가하여, 바람직한 항체를 선발할 수 있다.

[0621] 항체의 성질을 비교할 때의 다른 지표의 일례로서는, 항체의 안정성을 들 수 있다. 시차주사 칼로리메트리 (DSC) 는 단백의 상대적 구조 안정성이 좋은 지표가 되는 열변성 중점 (Tm) 을 재빠르게, 또 정확하게 측정할 수 있는 장치이다. DSC 를 사용하여 Tm 값을 측정하고, 그 값을 비교함으로써, 열안정성의 차이를 비교할 수 있다. 항체의 보존 안정성은 항체의 열안정성과 어느 정도의 상관을 나타내는 것이 알려져 있고 (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p. 265-273), 열안정성을 지표로, 바람직한 항체를 선발할 수 있다. 항체를 선발하기 위한 다른 지표로서는, 적절한 숙주 세포에 있어서의 수량이 높은 것, 및 수용액 중에서의 응집성이 낮은 것을 들 수 있다. 예를 들어 수량이 가장 높은 항체가 가장 높은 열안정성을 나타낸다고는 할 수 없기 때문에, 이상에 기술한 지표에 기초하여 종합적으로 판단하여, 인간에의 투여에 가장 적합한 항체를 선발할 필요가 있다.

[0622] 본 발명의 항체에는 항체의 수식체도 포함된다. 당해 수식체란, 본 발명의 항체에 화학적 또는 생물학적인 수식이 실시되어 이루어지는 것을 의미한다. 화학적인 수식체에는, 아미노산 골격에의 화학 부분의 결합, N-결합 또는 O-결합 탄수화물 사슬의 화학 수식체 등이 포함된다. 생물학적인 수식체에는, 번역 후 수식 (예를 들어, N-결합 또는 O-결합에의 당사슬 부가, N 말 또는 C 말의 프로세싱, 탈아미드화, 아스파르트산의 이성화, 메티오닌의 산화) 된 것, 원핵 생물 숙주 세포를 사용하여 발현시킴으로써 N 말에 메티오닌 잔기가 부가된 것 등이 포함된다. 또, 본 발명의 항체 또는 항원의 검출 또는 단리를 가능하게 하기 위해서 표식된 것, 예를 들어, 효소 표식체, 형광 표식체, 어피니티 표식체도 이러한 수식물의 의미에 포함된다. 이와 같은 본 발명의 항체의 수식물은 원래의 본 발명의 항체의 안정성 및 혈중 체류성의 개선, 항원성의 저감, 이러한 항체 또는 항원의 검출 또는 단리 등에 유용하다.

[0623] 또, 본 발명의 항체에 결합하고 있는 당사슬 수식을 조절하는 것 (글리코실화, 탈푸코오스화 등) 에 의해, 항체 의존성 세포 상해 활성을 증강하는 것이 가능하다. 항체의 당사슬 수식의 조절 기술로서는, WO99/54342, WO00/61739, WO02/31140 등이 알려져 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 항체에는 당해 당사슬 수식이 조절된 항체도 포함된다.

[0624] 항체 유전자를 일단 단리한 후, 적당한 숙주에 도입하여 항체를 제작하는 경우에는, 적당한 숙주와 발현 벡터의 조합을 사용할 수 있다. 항체 유전자의 구체예로서는, 본 명세서에 기재된 항체의 중사슬 배열을 코드하는 유전자, 및 경사슬 배열을 코드하는 유전자를 조합한 것을 들 수 있다. 숙주 세포를 형질 전환할 때에는, 중사슬 배열 유전자와 경사슬 배열 유전자는, 동일한 발현 벡터에 삽입되어 있는 것이 가능하고, 또 각각의 발현 벡터에 삽입되어 있는 것도 가능하다.

[0625] 진핵 세포를 숙주로서 사용하는 경우, 동물 세포, 식물 세포, 진핵 미생물을 사용할 수 있다. 특히 동물 세포로서는, 포유류 세포, 예를 들어, 원숭이의 세포인 COS 세포 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), 마우스 선유아 세포 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) 이나 차이니즈·햄스터 난소 세포 (CHO 세포, ATCC CCL-61) 의 디하이드로 엽산 환원 효소 결손주 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126-4220) 를 들 수 있다.

[0626] 원핵 세포를 사용하는 경우에는, 예를 들어, 대장균, 고초균을 들 수 있다.

[0627] 이들의 세포에 목적으로 하는 항체 유전자를 형질 전환에 의해 도입하고, 형질 전환된 세포를 in vitro 에서 배양함으로써 항체가 얻어진다. 당해 배양에 있어서는 항체의 배열에 의해 수량이 상이한 경우가 있고, 동등한 결합 활성을 가지는 항체 중에서 수량을 지표로 의약으로서의 생산이 용이한 것을 선별하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명의 항체에는, 상기 형질 전환된 숙주 세포를 배양하는 공정, 및 당해 공정에서 얻어진 배양물로부터 목적으로 하는 항체 또는 당해 항체의 기능성 단편을 채취하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 당해 항체의 제조 방법에 의해 얻어지는 항체도 포함된다.

[0628] 또한, 포유류 배양 세포에서 생산되는 항체의 중사슬의 카르복실 말단의 리신 잔기가 결실되는 것이 알려져 있고 (Journal of Chromatography A, 705 : 129-134 (1995)), 또, 동 중사슬 카르복실 말단의 글리신, 리신의 2 아미노산 잔기가 결실되고, 새롭게 카르복실 말단에 위치하는 프롤린 잔기가 아미드화되는 것이 알려져 있다 (Analytical Biochemistry, 360 : 75-83 (2007)). 그러나, 이들의 중사슬 배열의 결실 및 수식은 항체의 항원 결합능 및 이펙터 기능 (보체의 활성화나 항체 의존성 세포 장해 작용 등) 에는 영향을 미치지 않는다. 따라서, 본 발명에는 당해 수식을 받은 항체 및 당해 항체의 기능성 단편도 포함되고, 중사슬 카르복실 말단에 있어서 1 또는 2 개의 아미노산이 결실된 결실체, 및 아미드화된 당해 결실체 (예를 들어, 카르복실 말단 부위의 프롤린 잔기가 아미드화된 중사슬) 등을 들 수 있다. 단, 항원 결합능 및 이펙터 기능이 유지되어 있는 한, 본 발명에 관련된 항체의 중사슬의 카르복실 말단의 결실체는 상기의 종류로 한정되지 않는다. 본

발명에 관련된 항체를 구성하는 2 개의 중사슬은 완전 길이 및 상기의 결실체로 이루어지는 군에서 선택되는 중사슬 중 어느 1 종이어도 되고, 어느 2 종을 조합한 것이어도 된다. 각 결실체의 양비는 본 발명에 관련된 항체를 산생하는 포유류 배양 세포의 종류 및 배양 조건에 영향을 받을 수 있지만, 본 발명에 관련된 항체의 주성분으로서는 2 개의 중사슬의 쌍방에서 카르복실 말단의 하나의 아미노산 잔기가 결실되어 있는 경우를 들 수 있다.

[0629] 본 발명의 항체의 아이소타입으로서는, 예를 들어 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 등을 들 수 있지만, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2 를 들 수 있다.

[0630] 항체의 기능으로서는, 일반적으로는 항원 결합 활성, 항원의 활성을 중화하는 활성, 항원의 활성을 증강하는 활성, 항체 의존성 세포 상해 (ADCC) 활성 및 보체 의존성 세포 상해 (CDC) 활성을 들 수 있지만, 본 발명에 관련된 항체가 갖는 기능은 B7-H3 에 대한 결합 활성이며, 바람직하게는 항체 의존성 세포 매개식 작용 (ADCP) 활성이며, 보다 바람직하게는 종양 세포에 대한 ADCP 활성을 개재한 세포 상해 활성 (항종양 활성) 이다. 또한, 본 발명의 항체는, ADCP 활성에 더하여, ADCC 활성 및/또는 CDC 활성을 겸비하고 있어도 된다.

[0631] 얻어진 항체는 균일하게까지 정제할 수 있다. 항체의 분리, 정제는 통상적인 단백질로 사용되고 있는 분리, 정제 방법을 사용하면 된다. 예를 들어 칼럼 크로마토그래피, 필터 여과, 한외 여과, 염석, 투석, 조제용 폴리아크릴아미드겔 전기 영동, 등전점 전기 영동 등을 적절히 선택, 조합하면, 항체를 분리, 정제할 수 있지만 (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996) ; Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0632] 크로마토그래피로서는, 어피니티 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 등을 들 수 있다.

[0633] 이들의 크로마토그래피는 HPLC 나 FPLC 등의 액체 크로마토그래피를 사용하여 실시할 수 있다.

[0634] 어피니티 크로마토그래피에 사용하는 칼럼으로서는, 프로테인 A 칼럼, 프로테인 G 칼럼을 들 수 있다. 예를 들어 프로테인 A 칼럼을 사용한 칼럼으로서, Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (파르마시아) 등을 들 수 있다.

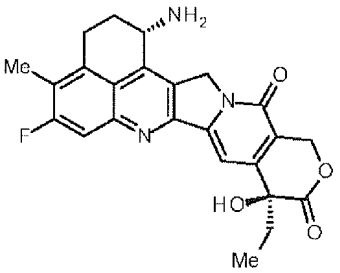
[0635] 또 항원을 고정화한 담체를 사용하여, 항원에의 결합성을 이용하여 항체를 정제하는 것도 가능하다.

[0636] [항종양성 화합물]

[0637] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트에 결합되는 항종양성 화합물에 대해 기술한다. 항종양성 화합물로서는, 항종양 효과를 갖는 화합물로서, 링커 구조에 결합할 수 있는 치환기, 부분 구조를 갖는 것이면 특별히 제한은 없다. 항종양성 화합물은 링커의 일부 또는 전부가 종양 세포 내에서 절단되어 항종양성 화합물 부분이 유리되어 항종양 효과가 발현된다. 링커가 약물과의 결합 부분에서 절단되면 항종양성 화합물이 본래의 구조에서 유리되고, 그 본래의 항종양 효과가 발휘된다.

[0638] 항종양성 화합물로서는, 예를 들어, 독소르비신, 다우노르비신, 마이토마이신 C, 블레오마이신, 시클로시티딘, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 백금계 항종양제 (시스플라틴 혹은 그 유도체), 택솔 혹은 그 유도체, 캄프토테신 혹은 그 유도체 (일본 공개특허공보 평6-87746호에 기재된 항종양제) 등을 들 수 있다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트에 있어서는, 캄프토테신 유도체인 엑사테칸 ((1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온 ; 다음 식 :)

[0639] [화학식 43]



[0640]

[0641] 을 바람직하게 사용할 수 있다. 이 엑사테칸은 우수한 항종양 활성을 가지고 있지만, 항종양약으로서 시판되기에는 이르지 않았다. 동 화합물은 공지된 방법으로 용이하게 취득할 수 있고, 1 위치의 아미노기를 링커 구조에의 결합 부위로서 바람직하게 사용할 수 있다. 또, 엑사테칸은 링커의 일부가 결합한 상태로 종양 세포 내에서 유리되는 경우도 있지만, 이와 같은 상태에서도 우수한 항종양 효과가 발휘되는 우수한 화합물이다.

[0642] 항체-약물 콘주게이트에 있어서, 항체 1 분자에 대한 약물의 결합수는 그 유효성, 안전성에 영향을 미치는 중요 인자이다. 항체-약물 콘주게이트의 제조는, 약물의 결합수가 일정한 수가 되도록, 반응시키는 원료·시약의 사용량 등의 반응 조건을 규정하여 실시되지만, 저분자 화합물의 화학 반응과는 상이하고, 상이한 수의 약물이 결합한 혼합물로서 얻어지는 것이 통상적이다. 항체 1 분자에 대한 약물의 결합수는 평균치, 즉, 평균 약물 결합수로서 특정되어 표기된다. 본 발명에서도 원칙으로서 언급이 없는 한, 즉, 상이한 약물 결합수를 가지는 항체-약물 콘주게이트 혼합물에 포함되는 특정의 약물 결합수를 가지는 항체-약물 콘주게이트를 나타내는 경우를 제외하고, 약물의 결합수는 평균치를 의미한다. 항체 분자에 대한 엑사테칸의 결합수는 컨트롤 가능하고, 1 항체당 약물 평균 결합수로서, 1 내지 10 개 정도의 엑사테칸을 결합시킬 수 있지만, 바람직하게는 2 내지 8 개이며, 보다 바람직하게는 3 내지 8 개이다. 또한, 당업자이면 본원의 실시예의 기재로부터 항체에 필요한 수의 약물을 결합시키는 반응을 설계할 수 있고, 엑사테칸의 결합수를 컨트롤한 항체를 취득할 수 있다.

[0643] 엑사테칸은 캄프토테신 구조를 가지므로, 산성 수성 매체 중 (예를 들어 pH 3 정도) 에서는 락톤 고리가 형성된 구조 (폐환체) 에 평형이 치우치고, 한편, 염기성 수성 매체 중 (예를 들어 pH 10 정도) 에서는 락톤 고리가 개환된 구조 (개환체) 에 평형이 치우치는 것이 알려져 있다. 이와 같은 폐환 구조 및 개환 구조에 대응하는 엑사테칸 잔기를 도입한 약물 콘주게이트여도 동등한 항종양 효과가 기대되고, 어느 것이나 본 발명의 범위에 포함되는 것은 말할 필요도 없다.

[0644] [링커 구조]

[0645] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트에 있어서 항종양성 약물을 항체에 결합하는 링커 구조에 대해 기술한다. 당해 링커는 다음 식 :

[0646] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

[0647] 의 구조를 가지고 있고, 항체는 L^1 의 말단, L^2 가 결합하는 것과는 반대측의 말단에서 결합하고, 항종양성 약물은 L^c 의 말단, L^b 가 결합하는 것과는 반대측의 말단에서 결합한다.

[0648] n^1 은 0 내지 6 의 정수를 나타내지만, 바람직하게는 1 내지 5 의 정수이며, 보다 바람직하게는 1 내지 3 이다.

[0649] 1. L^1

[0650] L^1 은

[0651] $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$,

[0652] $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^3-C(=O)-$,

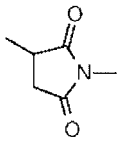
[0653] $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$, 또는

[0654] $-C(=O)-(CH_2)n^4-C(=O)-$

[0655] 의 각 구조로 나타내는 구조의 링커이다. 여기서, n^2 는 2 내지 8 의 정수이며, n^3 은 1 내지 8 의 정수이며, n^4 는 1 내지 8 의 정수이다.

[0656] 링커 L^1 중의 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 로 나타내는 구조의 링커에 있어서, 「$-(Succinimid-3-yl-N)-$」 은 다음 식

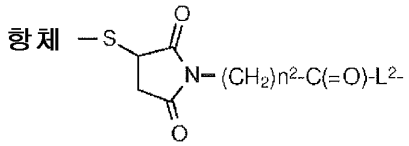
[0657] [화학식 44]



[0658]

[0659] 으로 나타내는 구조를 갖는다. 이 부분 구조에 있어서의 3 위치가 항체에 대한 결합 부위이다. 또한 이 3 위치에서의 항체와의 결합은 티오에테르를 형성하여 결합하는 것이 특징이다. 한편, 이 구조 부분의 1 위치의 질소 원자는 이 구조가 포함되는 링커 내에 존재하는 메틸렌의 탄소 원자와 결합한다. 즉 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-L^2- 는 다음 식으로 나타내는 구조이다 (여기서, 「항체 -S-」 는 항체 유래이다.).

[0660] [화학식 45]



[0661]

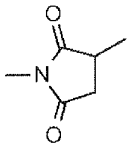
[0662] 식 중, n^2 는 2 내지 8 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 5 이다.

[0663] L^1 중의 -CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)- 로 나타내는 구조의 링커에 있어서, n^3 은 1 내지 8 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 6 이다. 이 링커는 항체와는 말단의 메틸렌의 탄소 원자 상에서 결합하지만, 이전과 마찬가지로 티오에테르를 형성하여 결합하는 다음의 구조를 갖는다 (여기서, 「항체 -S-」 는 항체 유래이다.) :

[0664] 항체 -S-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-.

[0665] L^1 중의 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 로 나타내는 구조의 링커이지만, 여기서 「-(N-ly-3-diminiccuS)-」 는 다음 식 :

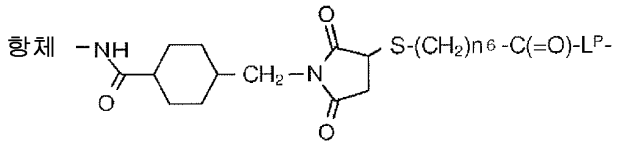
[0666] [화학식 46]



[0667]

[0668] 으로 나타내는 구조를 갖는다. 이 구조 부분에 있어서, 1 위치의 질소 원자는 동 구조를 포함하는 링커 내에 존재하는 메틸렌탄소 원자와 결합한다. 3 위치의 탄소 원자는 링커 L^2 중의 -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 와, 그 말단의 황 원자에 있어서 결합한다. 또한, 이 L^2 의 링커인 -S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 는 L^1 링커 중의 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 와만 조합된 링커 구조를 형성한다. 여기서, 링커에 포함되는 「-cyc.Hex(1,4)-」 는 1,4-시클로헥사렌기를 나타낸다. 링커 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 는 항체와는 말단의 카르보닐탄소에서 아미드 결합을 형성하여 결합한다 (다음 식 ; 여기서, 「항체 -NH-」 는 항체 유래이다.).

[0669] [화학식 47]



[0670]

[0671] 이 아미드 결합을 형성하는 항체의 아미노기로서는 항체의 리신 잔기의 측사슬의 말단의 아미노기, 혹은 항체 N 말단의 아미노기이면 된다. 또한, 당해 구조의 링커는 아미드 결합 외에, 항체의 아미노산의 수산기와 에스테르 결합을 형성하여 결합할 수도 있다.

[0672] 또, 당해 링커에 포함되는 「-cyc.Hex(1,4)-」 구조 부분이지만, 1,4-시클로헥사렌기 외에, 이것 이외의 2 가의 포화 고리형 알킬렌기인, 시클로부틸렌기, 시클로펜틸렌기, 시클로헵타렌기, 시클로옥타렌기 등의 2 가의 고리형 포화 탄화수소기여도 되고, 페닐렌기, 나프틸렌기 등의, 2 가의 방향족 탄화수소기여도 되고, 또, 5 원자 고리, 6 원자 고리의 포화, 부분 포화, 혹은 방향족인, 1 또는 2 의 복소 원자를 포함하는 2 가의 복소 고리기여도 된다. 나아가서는, 탄소수 1 내지 4 의 2 가의 알킬렌기여도 된다. 또한, 2 가기에 대한 결합은 인접한 위치이거나 떨어진 위치이거나 어느 것이어도 된다.

[0673] 링커 L^1 중의 $-C(=O)-(CH_2)n^4-C(=O)-$ 로 나타내는 구조의 링커에 있어서, n^4 는 1 내지 8 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 6 이다. 이 링커도, 상기의 링커와 마찬가지로, 말단의 카르보닐기에 있어서 항체의 아미노기와 아미드 결합을 형성하여 결합한다 (다음 식 ; 당해 구조에 있어서 「항체 -NH-」 는 항체 유래이다.).

[0674] 항체 $-NH-C(=O)-(CH_2)n^4-C(=O)-L^2-$.

[0675] 링커 L^1 의 구체예로서는,

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-CH_2-C(=O)-、

-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-Aryl-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-cyc.Het-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0676]

[0677] 등을 들 수 있다 (Aryl 은 2 가의 방향족 탄화수소기, cyc.Het 는 2 가의 고리형 복소 고리기를 나타낸다.).

[0678] 2. L^2

[0679] 링커 L^2 는

[0680] $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$, 또는

[0681] $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$,

[0682] 로 나타내는 구조의 링커이지만, 링커 L^2 는 존재하지 않아도 되고, 이 경우 L^2 는 단결합이 된다. 또, n^5 는 1 내지 6 의 정수이며, n^6 은 1 내지 6 의 정수이다.

[0683] 링커 L^2 중의, $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 로 나타내는 구조의 링커에 있어서, n^5 는 1 내지 6 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 4 이다. 당해 링커는 말단의 아미노기로 링커 L^1 에 결합하고, 반대의 말단의 카르보닐기에서 링커 L^P 와 결합한다.

[0684] 링커 L^2 중의, $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 에 있어서, n^6 은 1 내지 6 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 4 이다.

[0685] 링커 L^2 의 구체예로서는,

[0686]
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$、

[0687] 등을 들 수 있다.

[0688] 또한 링커 L^2 가 $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 의 경우, 조합되는 링커 L^1 은 $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$ 이므로, $-L^1-L^2-$ 링커의 구체예로서는,

[0689]
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2-C(=O)-$
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-$
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

[0690] 등을 들 수 있다.

[0691] 3. L^P

[0692] 링커 L^P 는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기이다. 즉, 2 내지 6 개의 아미노산이 펩티드 결합한 올리고펩티드의 잔기에 의해 구성된다. 링커 L^P 는 N 말단에 있어서 링커 L^2 에 결합하고, C 말단에 있어서 링커의 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 부분의 아미노기에 결합한다. 링커 L^P 를 구성하는 아미노산은 특별히 한정되는 경우는 없지만, 예를 들어, L- 또는 D-아미노산이며, 바람직하게는 L-아미노산이다. 또, α-아미노산 외에, β-알라닌, ε-아미노카프로산, γ-아미노부티르산 등의 구조의 아미노산이어도 되고, 나아가서는 예를 들어 N-메틸화된 아미노산 등의 비천연형의 아미노산이어도 된다.

[0693] 링커 L^P 의 아미노산 배열은 특별히 한정되지 않지만, 구성하는 아미노산으로서 페닐알라닌 (Phe ; F), 티로신 (Tyr ; Y), 류신 (Leu ; L), 글리신 (Gly ; G), 알라닌 (Ala ; A), 발린 (Val ; V), 리신 (Lys ; K), 시톨린 (Cit), 세린 (Ser ; S), 글루탐산 (Glu ; E), 아스파르트산 (Asp ; D) 등을 들 수 있다. 이들 중에서 바람직하게는, 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시톨린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산을 들 수 있다. 아미노산의 종류에 따라, 약물 유리의 패턴을 컨트롤할 수 있다. 아미노산의 수는 2 내지 7 개면 된다.

[0694] 링커 L^P 의 구체예로서

-GGF-

-DGGF-

-(D-)D-GGF-

-EGGF-

-GGFG-

-SGGF-

-KGGF-

-DGGFG-

-GGFGG-

-DDGGFG-

-KDGGFG-

-GGFGGGF-

[0695]

[0696] 를 들 수 있다 [상기의 「(D-)D」 는 D-아스파르트산을 의미한다]. 본 발명 항체-약물 콘주게이트의 특히 바람직한 링커 L^P 로서 -GGFG- 를 들 수 있다.

[0697] 링커의 $-NH-(CH_2)n^1-$ 로 나타내는 구조 부분이지만, n^1 은 0 내지 6 의 정수이지만, 바람직하게는 1 내지 5 의 정수이며, 보다 바람직하게는 1 내지 3 이다. 이 부분의 아미노기 부분이 링커 L^P 의 C 말단에 결합한다.

[0698] 4. L^a

[0699] 링커의 L^a 는 -C(=O)-NH-, $-NR^1-(CH_2)n^7-$, -O- 의 각 구조 중 어느 것이거나, 또는 단결합이지만, n^7 은 1 내지 6 의 정수이며, R^1 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^8-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^9-OH$ 이며, n^8 은 정수의 1 내지 4 이며, n^9 는 1 내지 6 의 정수이다.

[0700] 링커의 L^a 중 아미드 구조인 -C(=O)-NH- 는 질소 원자측이 L^b 에 결합한다. 링커의 L^a 중의 $-NR^1-(CH_2)n^7-$ 인 구조 부분에 있어서, n^7 은 1 내지 6 의 정수이며, 바람직하게는 1 내지 3 이다. 당해 부분은 메틸렌측이 L^b 에 결합한다. R^1 은 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기이지만, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기의 경우에는, 직사슬형이거나 분지 사슬형이어도 된다. 예를 들어, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, sec-부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 이소펜틸기, 2-메틸부틸기, 네오펜틸기, 1-에틸프로필기, 헥실기, 이소헥실기, 4-메틸펜틸기, 3-메틸펜틸기, 2-메틸펜틸기, 1-메틸펜틸기, 3,3-디메틸부틸기, 2,2-디메틸부틸기, 1,1-디메틸부틸기, 1,2-디메틸부틸기, 1,3-디메틸부틸기, 2,3-디메틸부틸기 및 2-에틸부틸기 등을 들 수 있다. 이들 중에서 바람직하게는, 메틸기 또는 에틸기이다. R^1 이 $-(CH_2)n^8-COOH$ 로 나타내는 구조일 때, n^8 은 정수의 1 내지 4 이지만, 바람직하게는 1 또는 2 이다. R^1 이 $-(CH_2)n^9-OH$ 로 나타내는 구조일 때, n^9 는 1 내지 6 의 정수이지만, 바람직하게는 1 또는 2 이다. R^1 로서는, 수소 원자, 메틸기, 에틸기,

$-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-COOH$, 또는 $-CH_2CH_2-OH$ 가 바람직하고, 보다 바람직하게는, 수소 원자, 메틸기, $-CH_2COOH$ 이다. 더욱 바람직하게는 수소 원자이다. 또한, 링커의 L^a 부분은 -O-, 또는 단결합이어도 된다.

[0701] 5. L^b

[0702] 링커의 L^b 는 $-CR^2(-R^3)-$, -O-, $-NR^4-$ 의 각 구조 중 어느 것이거나, 또는 단결합이며, R^2 및 R^3 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^c-OH$ 이며, R^4 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기이며, n^a 는 0 내지 6 의 정수이며, n^b 는 정수의 1 내지 4 이며, n^c 는 정수의 0 내지 4 이지만, n^a 또는 n^c 가 0 일 때는, R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않는다.

[0703] R^2 및 R^3 이 알킬기일 때, 이 알킬기는 R^1 에 있어서의 알킬기와 동일하게 해석되는 알킬기이다. R^2 및 R^3 이 $-(CH_2)n^a-NH_2$ 의 구조일 때, n^a 는 0 내지 6 의 정수이지만, 바람직하게는 0 이거나, 혹은 3 내지 5 이다. 또한, n^a 가 0 일 때는 R^2 및 R^3 은 동일하게는 되지 않는다. R^2 및 R^3 이 $-(CH_2)n^b-COOH$ 의 구조일 때, n^b 는 정수의 1 내지 4 이지만, 바람직하게는 1 또는 2 이다. R^2 및 R^3 이 $-(CH_2)n^c-OH$ 의 구조일 때, n^c 는 정수의 0 내지 4 이지만, 바람직하게는 1 또는 2 이다.

[0704] R^2 및 R^3 으로서 바람직하게는, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, $-NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-COOH$, $-CH_2OH$, 또는 $-CH_2CH_2-OH$ 가 바람직하고, 보다 바람직하게는, 수소 원자, 메틸기, $-NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-COOH$, $-CH_2OH$, 또는 $-CH_2CH_2-OH$ 이다. 더욱 바람직하게는 수소 원자이다.

[0705] R^4 가 탄소수 1 내지 6 의 알킬기이며, 이 알킬기는 R^1 에 있어서의 알킬기와 동일하게 해석되는 알킬기이다. R^4 로서는 수소 원자 또는 메틸기가 바람직하고, 보다 바람직하게는 수소 원자이다.

[0706] 링커의 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 로 나타내는 구조의 구체예로서,

$-NH-CH_2-$

$-NH-CH(-Me)-$

$-NH-C(-Me)_2-$

$-NH-CH_2-CHMe-$

$-NH-CH(-CH_2OH)-$

$-NH-CH(-CH_2COOH)-$

$-NH-CH(-CH_2CH_2COOH)-$

$-NH-CH(-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-$

$-NH-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2-O-$

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2C(-Me)_2-$

$-NH-CH_2CH_2NH-$

$-NH-CH_2CH_2NH-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NH-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2COOH)-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2OH)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2COOH)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

[0707] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)-$

[0708] 등을 들 수 있다.

[0709] 이들 중 바람직하게는,

$-NH-CH_2-$

$-NH-CH_2-CH(Me)-$

$-NH-CH(-CH_2OH)-$

$-NH-CH(-CH_2CH_2COOH)-$

$-NH-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2-O-$

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2C(-Me)_2-$

$-NH-CH_2CH_2NH-$

$-NH-CH_2CH_2NH-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2COOH)-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2OH)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2COOH)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$

[0710] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

[0711] 등을 들 수 있다.

[0712] 보다 바람직하게는,

$-NH-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2-O-$

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NH-$

$-NH-CH_2CH_2NH-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2COOH)-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2COOH)-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$

[0713] $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

[0714] 를 들 수 있다.

[0715] 더욱 바람직하게는,

[0716] $-NH-(CH_2)_3-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-$、

$-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-$

[0717] 이다.

[0718] 6. L^c

[0719] 링커의 L^c 는 $-CH^2-$ 또는 -C(=O)- 이다. 당해 링커에 있어서 항종양성 화합물과 결합한다. 링커의 L^c 로서는, -C(=O)- 가 보다 바람직하다.

[0720] 링커의 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$ 는 사슬 길이로서 4 내지 7 원자의 사슬 길이인 것이 바람직하지만, 더욱 바람직하게는 5 또는 6 원자의 사슬 길이를 갖는 것이다.

[0721] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는 종양 세포 내로 이동한 후에는 링커 부분이 절단되고, $NH_2-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$ 로 나타내는 구조의 약물 유도체가 유리되어 항종양 작용을 발현한다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트로부터 유리되어 항종양 효과를 발현하는 항종양성 유도체로서는, 먼저 예시한 링커의 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 로 나타내는 구조에 L^c 를 결합시켜, 말단이 아미노기가 된 구조 부분을 갖는 항종양성 유도체를 들 수 있지만, 특히 바람직한 것은 다음의 것이다 :

[0722] $NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CHCH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

[0723] 또한, $NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 의 경우에는 동 분자 내에 있는 아미날 구조가 불안정하기 때문에, 추가로 자기 분해하여

[0724] $HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

[0725] 가 유리되는 것이 확인되었다. 이들의 화합물은 본 발명의 항체-약물 콘주게이트의 제조 중간체로서도 바람직하게 사용할 수 있다.

[0726] 약물을 엑사테칸으로 하는 본 발명의 항체-약물 콘주게이트에 있어서는, 하기의 구조의 약물-링커 구조 부분 [$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$] 를 항체에 결합시킨 것이 바람직하다. 이들의 약물-링커 구조 부분은, 1 항체당 평균 결합수로서, 1 내지 10 을 결합시키면 되지만, 바람직하게는 2 내지 8 이며, 보다 바람직하게는 3 내지 8 이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0727]

[0728] 이들 중에서 보다 바람직하게는, 다음의 것이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0729]

[0730] 더욱 바람직하게는, 다음의 것이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0731]

[0732] 본원의 항체-약물 콘주게이트에 있어서, 항체와 약물을 결합하는 링커 구조는, 지금까지 기술한 링커 각 부에 있어서 나타낸 바람직한 구조의 것을 결합함으로써 바람직한 링커를 구축할 수 있다. 이와 같은 링커 구조로서 이하의 구조의 것을 바람직하게 사용할 수 있다. 또한 구조의 좌단이 항체와의 결합 부위이며, 우단이 약물과의 결합 부위이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

[0733]

[0734] 이들 중에서 보다 바람직하게는, 다음의 것이다.

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

[0735]

[0736] 또한, 바람직하게는, 다음의 것을 들 수 있다.

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

[0737]

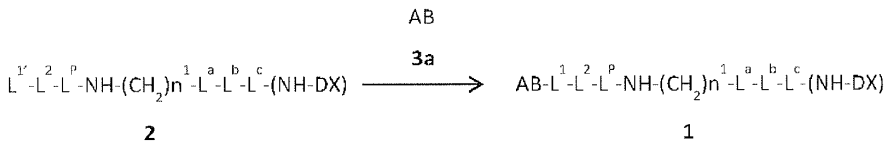
[0738] [제조 방법]

[0739] 다음으로, 본 발명의 항체-약물 콘주게이트 혹은 그 제조 중간체의 대표적인 제조 방법에 대해 설명한다. 또한, 이하에 있어서, 화합물을 나타내기 위해, 각 반응식 중에 나타내는 화합물의 번호를 사용한다. 즉, 「식 (1) 의 화합물」, 「화합물 (1)」 등으로 칭한다. 또 이것 이외의 번호의 화합물에 대해서도 동일하게 기재한다.

[0740] 1. 제조 방법 1

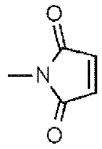
[0741] 식 (1) 로 나타내는 항체-약물 콘주게이트 중, 티오에테르를 개재하여 항체와 링커 구조가 결합하고 있는 것은 예를 들어 하기 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0742] [화학식 48]

[0743] 

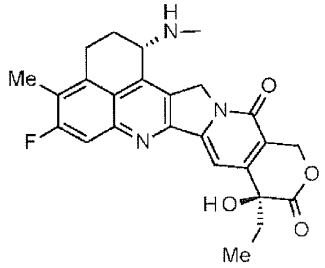
[0744] [식 중, AB 는 술프하이드릴기를 갖는 항체를 나타내고, $L^{1'}$ 는, L^1 로 나타내는 링커 구조에 있어서, 링커 말단이 말레이미딜기 (다음 식)

[0745] [화학식 49]

[0746] 

[0747] 로 된 구조이거나 (여기서, 질소 원자가 결합 부위이다.), 또는 말단이 할로겐이 된 구조의 링커를 나타내지만, L^1 중 -(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)- 에 있어서 -(Succinimid-3-yl-N)- 부분이 말레이미딜기로 된 기, 또는 L^1 에 있어서의 -CH_2C(=O)NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)- 의 말단의 메틸렌이 할로겐화되어 할로아세트아미드가 된, Halogen-CH_2C(=O)NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)- 기를 나타낸다. 또, -(NH-DX) 는 다음 식 :

[0748] [화학식 50]

[0749] 

[0750] 으로 나타내는 구조이며, 엑사테칸의 1 위치의 아미노기의 수소 원자 1 개가 제거되어 생성되는 기를 나타낸다. 또, 상기의 반응식에 있어서 식 (1) 의 화합물에서는, 약물로부터 링커 말단까지의 구조 부분 1 개가 1 의 항체에 대해 결합한 구조로서 기재되어 있지만, 이것은 설명을 위한 편의적인 기재로서, 실제로는 당해 구조 부분이 항체 분자에 대해 복수개가 결합하고 있는 경우가 많다. 이 상황은 이하의 제조 방법의 설명에 있어서도 동일하다.]

[0751] 즉, 후술하는 방법에 의해 입수할 수 있는 화합물 (2) 와, 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 를 반응시킴으로써, 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다.

[0752] 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 는 당업자 주지의 방법으로 얻을 수 있다 (Hermanson, G.T, Bioconjugate

Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). 예를 들어, Traut's 시약을 항체의 아미노기에 작용시킨다 ; N-숙신이미딜S-아세틸티오알카노에이트류를 항체의 아미노기에 작용시킨 후, 하이드록실아민을 작용시킨다 ; N-숙신이미딜3-(피리딜디티오)프로피오네이트를 작용시킨 후, 환원제를 작용시킨다 ; 디티오트레이톨, 2-메르캅토에탄올, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 (TCEP) 등의 환원제를 항체에 작용시켜 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원하여 술프하이드릴기를 생성시킨다 등등의 방법을 들 수 있지만 이들로 한정되는 경우는 없다.

[0753] 구체적으로는, 환원제로서 TCEP 를, 항체 내 힌지부 디술파이드 한 개당에 대해 0.3 내지 3 몰 당량 사용하고, 킬레이트제를 포함하는 완충액 중에서, 항체와 반응시킴으로써, 항체 내 힌지부 디술파이드가 부분적 혹은 완전하게 환원된 항체를 얻을 수 있다. 킬레이트제로서는, 예를 들어 에틸렌디아민 4 아세트산 (EDTA) 이나 디에틸렌트리아민 5 아세트산 (DTPA) 등을 들 수 있다. 이들을 1 mM 내지 20 mM 의 농도로 사용하면 된다. 완충액으로서는, 인산나트륨이나 붕산나트륨, 아세트산나트륨 용액 등을 사용할 수 있다. 구체적인 예에 있어서, 항체는 4 ℃ 내지 37 ℃ 에서 1 내지 4 시간 TCEP 와 반응시킴으로써 부분적 혹은 완전하게 환원된 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 를 얻을 수 있다.

[0754] 또한, 여기서 술프하이드릴기를 약물-링커 부분에 부가시키는 반응을 실시시킴으로써 티오에테르 결합에 의해 약물-링커 부분을 결합시킬 수 있다.

[0755] 다음으로, 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 한 개당, 2 내지 20 몰 당량의 화합물 (2) 를 사용하여, 항체 1 개당 2 개 내지 8 개의 약물이 결합한 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다. 구체적으로는, 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 를 포함하는 완충액에, 화합물 (2) 를 용해시킨 용액을 첨가하여 반응시키면 된다. 여기서, 완충액으로서는, 아세트산나트륨 용액, 인산나트륨이나 붕산나트륨 등을 이용하면 된다. 반응 시의 pH 는 5 내지 9 이며, 보다 바람직하게는 pH 7 부근에서 반응시키면 된다. 화합물 (2) 를 용해시키는 용매로서는, 디메틸술폭시드 (DMSO), 디메틸포름아미드 (DMF), 디메틸아세트아미드 (DMA), N-메틸-2-피리돈 (NMP) 등의 유기 용매를 사용할 수 있다. 화합물 (2) 를 용해시킨 유기 용매 용액을, 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 를 포함하는 완충액에 1 내지 20 % v/v 를 첨가하여 반응시키면 된다. 반응 온도는 0 내지 37 ℃, 보다 바람직하게는 10 내지 25 ℃ 이며, 반응 시간은 0.5 내지 2 시간이다. 반응은 미반응의 화합물 (2) 의 반응성을 티올 함유 시약에 의해 실활시킴으로써 종료할 수 있다. 티올 함유 시약은, 예를 들어, 시스테인 또는 N-아세틸-L-시스테인 (NAC) 이다. 보다 구체적으로는, NAC 를, 사용한 화합물 (2) 에 대해, 1 내지 2 몰 당량 첨가하여, 실온에서 10 내지 30 분 인큐베이트함으로써 반응을 종료할 수 있다.

[0756] 제조한 항체-약물 콘주게이트 (1) 은, 이하의 공통 조작에 의해 농축, 버퍼 교환, 정제, 항체 농도 및 항체 1 분자당 약물 평균 결합수의 측정을 실시하여, 항체-약물 콘주게이트 (1) 의 동정을 실시할 수 있다.

[0757] 공통 조작 A : 항체 혹은 항체-약물 콘주게이트 수용액의 농축

[0758] Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation) 의 용기 내에 항체 혹은 항체-약물 콘주게이트 용액을 넣고, 원심기 (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.) 를 사용한 원심 조작 (2000G 내지 3800G 에서 5 내지 20 분간 원심) 으로, 항체 혹은 항체-약물 콘주게이트 용액을 농축했다.

[0759] 공통 조작 B : 항체의 농도 측정

[0760] UV 측정기 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) 를 사용하여, 메이커 규정의 방법에 따라, 항체 농도의 측정을 실시했다. 그 때에, 항체마다 상이한 280 nm 흡광 계수 (1.3 $m\ell mg^{-1} cm^{-1}$ 내지 1.8 $m\ell mg^{-1} cm^{-1}$) 를 사용했다.

[0761] 공통 조작 C-1 : 항체의 버퍼 교환

[0762] Sephadex G-25 담체를 사용한 NAP-25 칼럼 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) 을, 메이커 설명서의 방법에 따라, 염화나트륨 (137 mM) 및 에틸렌디아민 4 아세트산 (EDTA, 5 mM) 을 포함하는 인산 완충액 (10 mM, pH 6.0) (본 명세서에서 PBS 6.0/EDTA 라고 칭한다.) 으로 평형화시켰다. 이 NAP-25 칼럼 한 개당, 항체 수용액 2.5 mℓ 를 얹은 후, PBS 6.0/EDTA 3.5 mℓ 로 용출시킨 획분 (3.5 mℓ) 을 분취했다. 이 획분을 공통 조작 A 에 의해 농축하고, 공통 조작 B 를 사용하여 항체 농도의 측정을 실시한 후에, PBS 6.0/EDTA 를 사용하여 10 mg/mℓ 로 항체 농도를 조정했다.

[0763] 공통 조작 C-2 : 항체의 버퍼 교환

[0764] Sephadex G-25 담체를 사용한 NAP-25 칼럼 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) 을, 메이커 규정의 방법에 따라, 염화나트륨 (50 mM) 및 EDTA (2 mM) 를 포함하는 인산 완충액 (50 mM, pH 6.5) (본 명세서에서 PBS 6.5/EDTA 라고 칭한다.) 으로 평형화시켰다. 이 NAP-25 칼럼 한 개당, 항체 수용액 2.5 mℓ 를 얹은 후, PBS 6.5/EDTA 3.5 mℓ 로 용출시킨 획분 (3.5 mℓ) 을 분취했다. 이 획분을 공통 조작 A 에 의해 농축하고, 공통 조작 B 를 사용하여 항체 농도의 측정을 실시한 후에, PBS 6.5/EDTA 를 사용하여 20 mg/mℓ 로 항체 농도를 조정했다.

[0765] 공통 조작 D-1 : 항체-약물 콘주게이트의 정제

[0766] 시판되는 인산 완충액 (PBS 7.4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), 염화나트륨 (137 mM) 을 포함하는 인산나트륨 완충액 (10 mM, pH 6.0 ; 본 명세서에서 PBS 6.0 으로 칭한다.) 혹은 Sorbitol (5 %) 을 포함하는 아세트산 완충액 (10 mM, pH 5.5 ; 본 명세서에서 ABS 라고 칭한다.) 중 어느 완충액으로 NAP-25 칼럼을 평형화시켰다. 이 NAP-25 칼럼에, 항체-약물 콘주게이트 반응 수용액 (약 1.5 mℓ) 을 얹고, 메이커 규정의 양의 완충액으로 용출시킴으로써, 항체 획분을 분취했다. 이 분취 획분을 다시 NAP-25 칼럼에 얹고 완충액으로 용출시키는 겔 여과 정제 조작을 합계 2 내지 3 회 반복함으로써, 미결합의 약물 링커나 저분자 화합물 (트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 (TCEP), N-아세틸-L-시스테인 (NAC), 디메틸술폭시드) 을 제거한 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[0767] 공통 조작 E : 항체-약물 콘주게이트에 있어서의 항체 농도 및 항체 1 분자당 약물 평균 결합수의 측정

[0768] 항체-약물 콘주게이트에 있어서의 결합 약물 농도는, 항체-약물 콘주게이트 수용액의 280 nm 및 370 nm 의 2 파장에 있어서의 UV 흡광도를 측정한 후에 하기의 계산을 실시함으로써, 산출할 수 있다.

[0769] 어느 파장에 있어서의 전체 흡광도는 계 내에 존재하는 모든 흡수 화학종의 흡광도의 합에 동일한 [흡광도의 가성성] 점에서, 항체와 약물의 콘쥬게이션 전후에 있어서, 항체 및 약물의 몰 흡광 계수에 변화가 없다고 가정하면, 항체-약물 콘주게이트에 있어서의 항체 농도 및 약물 농도는 하기의 관계식으로 나타내진다.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \varepsilon_{D,280} C_D + \varepsilon_{A,280} C_A \quad \text{식 (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370} C_D + \varepsilon_{A,370} C_A \quad \text{식 (2)}$$

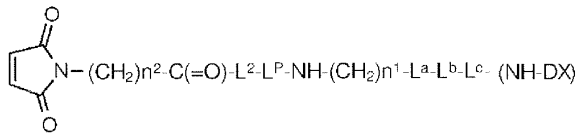
[0770]

[0771] 여기서, A_{280} 은 280 nm 에 있어서의 항체-약물 콘주게이트 수용액의 흡광도를 나타내고, A_{370} 은 370 nm 에 있어서의 항체-약물 콘주게이트 수용액의 흡광도를 나타내고, $A_{A,280}$ 은 280 nm 에 있어서의 항체의 흡광도를 나타내고, $A_{A,370}$ 은 370 nm 에 있어서의 항체의 흡광도를 나타내고, $A_{D,280}$ 은 280 nm 에 있어서의 콘주게이트 전구체의 흡광도를 나타내고, $A_{D,370}$ 은 370 nm 에 있어서의 콘주게이트 전구체의 흡광도를 나타내고, $\varepsilon_{A,280}$ 은 280 nm 에 있어서의 항체의 몰 흡광 계수를 나타내고, $\varepsilon_{A,370}$ 은 370 nm 에 있어서의 항체의 몰 흡광 계수를 나타내고, $\varepsilon_{D,280}$ 은 280 nm 에 있어서의 콘주게이트 전구체의 몰 흡광 계수를 나타내고, $\varepsilon_{D,370}$ 은 370 nm 에 있어서의 콘주게이트 전구체의 몰 흡광 계수를 나타내고, C_A 는 항체-약물 콘주게이트에 있어서의 항체 농도를 나타내고, C_D 는 항체-약물 콘주게이트에 있어서의 약물 농도를 나타낸다.

[0772] 여기서, $\varepsilon_{A,280}$, $\varepsilon_{A,370}$, $\varepsilon_{D,280}$, $\varepsilon_{D,370}$ 은 사전에 준비한 값 (계산 추정치 혹은 화합물의 UV 측정에서 얻어진 실측치) 이 사용된다. 예를 들어, $\varepsilon_{A,280}$ 은, 항체의 아미노산 배열로부터, 이미 알려진 계산 방법 (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) 에 의해 추정할 수 있다. $\varepsilon_{A,370}$ 은, 통상적으로, 제로이다. $\varepsilon_{D,280}$ 및 $\varepsilon_{D,370}$ 은, 사용하는 콘주게이트 전구체를 어느 몰 농도로 용해시킨 용액의 흡광도를 측정함으로써, 람버트·비어의 법칙 (흡광도 = 몰 농도 × 몰 흡광 계수 × 셀 광로 길이) 에 의해, 얻을 수 있다. 항체-약물 콘주게이트 수용액의 A_{280} 및 A_{370} 을 측정하고, 이들의 값을 식 (1) 및 (2) 에 대입하여 연립 방정식을 풀음으로써, C_A 및 C_D 를 구할 수 있다. 또한 C_D 를 C_A 로 나눔으로써 1 항체당 약물 평균 결합수를 구할 수 있다.

[0773] 제조 방법 1 에 있어서의 식 (2) 로 나타내는 화합물이지만, 다음 식 중 어느 것이다.

[0774] [화학식 51]



[0775] Halogen-$CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ (NH-DX)

[0776] 상기 식 중, n^1, n^2, n^3, L^2, L^P, L^a, L^b 및 L^c 는 이미 정의한 바와 같으며, L^c 는 약물과의 결합 부위가 된다.

[0777] 이와 같은 본 발명 화합물의 제조에 유용한 중간체로서 바람직한 것은, n^2 로서는, 정수의 2 내지 5 이며, L^2 는 $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2CH_2-C(=O)-$ 이거나 단결합이며, n^5 는 2 내지 4 이며, L^P 는 GGFG 이며, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 는 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$, $NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$, 또는 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 의 부분 구조가 바람직하다. 또 Halogen 으로서는 브롬 또는 요오드가 바람직하다. 이들의 화합물에 대해 구체적으로는 이하의 것을 예시할 수 있다 [여기서, (maleimid-N-yl) 은 말레이미딜기 (2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl 기) 를 의미한다].

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0778]

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0779]

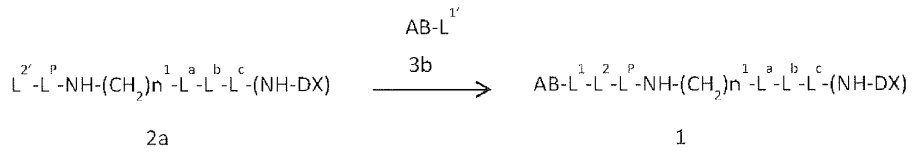
[0780] 여기서, 식 중의 X 는 브롬 원자 또는 요오드 원자를 나타낸다. 이들의 브롬 화합물 및 요오드 화합물은 모두 제조 중간체로서 바람직하게 사용할 수 있다.

[0781] 또한, 콘주게이트의 양을 확보하기 위해서, 동일한 조건으로 제작하여 얻어진 평균 약물수가 동일한 정도의 복수의 콘주게이트 (예를 들어 ± 1 정도) 를 혼합하여 새로운 로트로 할 수 있다. 그 경우, 평균 약물수는 혼합 전의 평균 약물수의 사이에 들어간다.

[0782] 2. 제조 방법 2

[0783] 식 (1) 로 나타내는 항체-약물 콘주게이트 중, 항체와의 결합이 아미드기로서, 티오에테르 결합을 링커 내에 갖는 링커인, 구체적으로는 $-L^1-L^2-$ 가 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 의 구조인 것은 하기 방법에 의해서도 제조할 수 있다.

[0784] [화학식 52]



[0785]

[0786] [식 중, AB-$L^{1'}$ 는 항체와 링커 L^1 이 결합하고, 또한 L^1 의 말단이 N-말레이미딜기로 변환된 기를 나타내지만, 구체적으로는 AB-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)- 에 있어서, -(N-ly-3-diminiccuS)- 가 말레이미딜기로 변환된 구조이다. $L^{2'}$ 는 말단이 메르캅토기가 된 HS-$(CH_2)n^6$-C(=O)- 기를 나타내고, AB 는 항체를 나타낸다.]

[0787] 즉, 후술하는 방법에 의해 입수할 수 있는 화합물 (2a) 와, 말레이미딜기를 갖는 링커를 결합시킨 항체 (3b) 를 반응시킴으로써, 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다.

[0788] 말레이미딜기를 갖는 항체 (3b) 도 당업자 주지의 방법으로 얻을 수 있다 (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). 예를 들어 아미노기, 하이드록실기와의 결합성을 가지며 말레이미딜기를 갖는 숙신이미딜-4-(N-말레이미드메틸)시클로헥산-1-카르복시레이트 (SMCC) 등의 2 관능성 링커를 리간드의 아미노기에 작용시켜 말레이미딜기를 도입하는 등의 방법을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0789] 예를 들어, 아미노기에 대한 반응성 부분과, 티올기에 대한 반응성 부분을 링커로 결합한 화합물이면 바람직하게 사용할 수 있다. 여기서 아미노기에 대한 반응성 부분은 활성 에스테르, 이미드에스테르 등이면 되고, 또 티올 반응성 부분은 말레이미딜, 할로겐화아세틸, 할로겐화알킬, 나아가서는 디티오피리딜 등이면 된다.

[0790] 항체를 구성하는 아미노산의 아미노기 또는 수산기, 특히 아미노기에 있어서 아미드 결합을 개재하여 링커를 구축시키기 위한 방법으로서, 먼저 항체에 반응시키는 화합물은 다음 식 :

[0791] Q^1-L^{1a}-Q^2

[0792] [식 중, Q^1 은 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-, (3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-, R^Q-O-C(=N)-, 또는 O=C=N- 을 나타내고, L^{1a}- 는 -cyc.Hex(1,4)-CH_2-, 탄소수 1 내지 10 의 알킬렌기, 페닐렌기, -$(CH_2)n^4$-C(=O)-, -$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-$(CH_2)n^{4b}$-, 또는 -$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2- 를 나타내고,

[0793] Q^2 는 (maleimid-N-yl), 할로겐 원자, 또는 -S-S-(2-Pyridyl) 을 나타내지만, R^Q 는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, n^4 는 1 내지 8 의 정수를 나타내고, n^{4a} 는 0 내지 6 의 정수, n^{4b} 는 1 내지 6 의 정수를 나타낸다.]

[0794] 으로 나타내는 화합물이면 된다.

[0795] 여기서, R^Q 는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기이면 되지만, 보다 바람직하게는 메틸기 또는 에틸기이다.

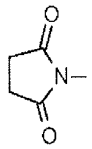
[0796] L^{1a} 에 있어서의 알킬렌기로서는, 탄소수 1 내지 10 의 것이면 된다. 페닐렌기로서는, 오르토, 메타, 파라 어느 것이어도 되지만, 파라, 또는 메타의 것이 보다 바람직하다.

[0797] L^{1a} 로서 바람직한 것은, -cyc.Hex(1,4)-CH_2-, -$(CH_2)_5$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-, -$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-, -$(CH_2)_5$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-, -CH_2-, -$(CH_2)_2$-, -$(CH_2)_3$-, -$(CH_2)_5$-, -$(CH_2)_{10}$-, -(para-Ph)-, -(meta-Ph)-, -(para-Ph)-CH(-CH_3)-, -$(CH_2)_3$-(meta-Ph)-, 또는 -(meta-Ph)-NH-C(=O)-CH_2- 를 들 수 있다.

[0798] Q^1 로서 바람직하게는 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 이며, Q^2 는 (maleimid-N-yl) 이 바람직하지만, 디술파이드 결합을 형성시키고자 할 때에는 -S-S-(2-Pyridyl) 을 사용하면 된다.

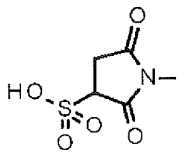
[0799] 여기서, (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)- 은 다음 식

[0800] [화학식 53]

[0801] 

[0802] 으로 나타내는 질소 원자가 결합 부위인 기이며, (3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)- 은 다음 식

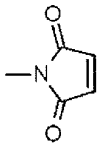
[0803] [화학식 54]

[0804] 

[0805] 으로 나타내는 질소 원자가 결합 부위인 기이며, 이 술폰산은 리튬염, 나트륨염, 칼륨염을 형성할 수 있고, 바람직하게는 나트륨염이며, cyc.Hex(1,4) 는 1,4-시클로헥실렌기를 나타내고,

[0806] (maleimid-N-yl) 은 다음 식

[0807] [화학식 55]

[0808] 

[0809] 으로 나타내는, 질소 원자가 결합 부위인 기이며,

[0810] (2-Pyridyl) 은 2-피리딜기를 나타내고, (para-Ph) 는 파라페닐렌기를 나타내고, (meta-Ph) 는 메타페닐렌기를 나타낸다.

[0811] 이와 같은 화합물로서 예를 들어, 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미딜메틸)시클로헥산-1-카르복시레이트 (sulfo-SMCC), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미딜메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미드카프로에이트) (LC-SMCC), κ-말레이미딜운데칸산N-숙신이미딜에스테르 (KMUA), γ-말레이미딜부티르산N-숙신이미딜에스테르 (GMBS), ε-말레이미딜카프로산N-하이드록시숙신이미드에스테르 (EMCS), m-말레이미딜벤조일- N-하이드록시숙신이미드에스테르 (MBS), N-(α-말레이미딜아세톡시)-숙신이미드에스테르 (AMAS), 숙신이미딜-6-(β-말레이미딜프로피온아미드)헥사노에이트 (SMPH), N-숙신이미딜4-(p-말레이미딜페닐)-부틸레이트 (SMPB), N-(p-말레이미딜페닐)이소시아네이트 (PMPI), N-숙신이미딜-4-(요오드아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙신이미딜요오드아세테이트 (SIA), N-숙신이미딜브로모아세테이트 (SBA) N-숙신이미딜3-(브로모아세트아미드)프로피오네이트 (SBAP), N-숙신이미딜-3-(2-피리도디티오)프로피오네이트 (SPDP), 및 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔 (SMPT) 등의 화합물이다.

[0812] 구체적으로는, 예를 들어, 항체 (3) 에 대해, 2 내지 6 당량의 SMCC 를, pH 6 내지 7 의 인산 완충액 중에서, 실온 또한 1 내지 6 시간 반응시킴으로써, SMCC 의 활성 에스테르가 항체와 반응하여 말레이미딜기를 갖는 항체 (3b) 를 얻을 수 있다. 얻어진 항체 (3b) 는 하기의 공통 조작 D-2 에 의해 정제하고, 다음의 화합물 (2a) 와의 반응에 사용할 수 있다.

[0813] 공통 조작 D-2 : 숙신이미딜4-(N-말레이미딜메틸)-시클로헥산-1-카르복시레이트 (SMCC) 유도체화 항체의 정제

[0814] PBS 6.5/EDTA 로 NAP-25 칼럼을 평형화시켰다. 이 NAP-25 칼럼에, 숙신이미딜4-(N-말레이미딜메틸)-시클로헥산-1-카르복시레이트 (본 명세서에서 SMCC 라고 칭한다.) 유도체화 항체를 포함하는 반응액 (약 0.5 mℓ) 을 얹고, 메이커 규정의 양의 완충액으로 용출시킴으로써, 항체 획분을 분취하여, 정제를 실시했다.

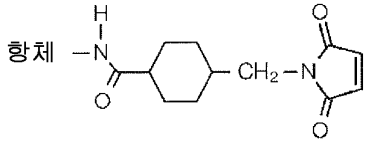
[0815] 링커와의 결합에 제공되는 항체의 아미노기는 N 말단 아미노기 및/또는 리신 잔기가 갖는 아미노기이면 되지만 이들로 한정되는 경우는 없다. 또한 세린 잔기가 갖는 수산기를 이용하여 에스테르 결합을 형성시켜 링커와 결합시킬 수도 있다.

[0816] 화합물 (2a) 와, 말레이미딜기를 갖는 링커를 결합시킨 항체 (3b) 의 반응은, 제조 방법 1 에서 기술한, 화합물 (2) 와, 술프하이드릴기를 갖는 항체 (3a) 의 반응 방법의 경우와 마찬가지로 하여 실시할 수 있다.

[0817] 제조한 항체-약물 콘주게이트 (1) 에 있어서의, 농축, 버퍼 교환, 정제, 항체 농도 및 항체 1 분자당 약물 평균 결합수의 측정에 의한 항체-약물 콘주게이트 (1) 의 동정은 제조 방법 1 과 마찬가지로 실시할 수 있다.

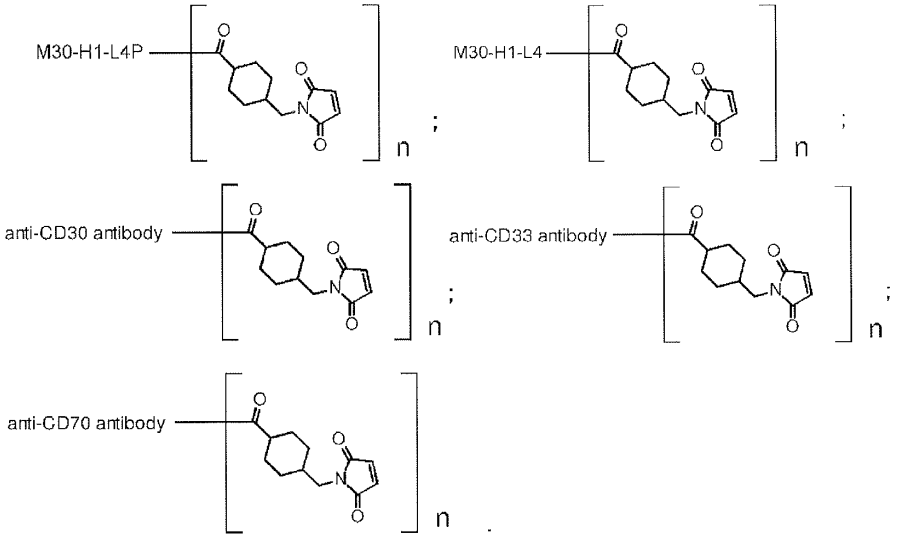
[0818] 제조 방법 2 에 있어서 식 (3b) 로 나타내는 화합물은 다음의 구조를 갖는다 (다음 식 ; 당해 구조에 있어서 「항체-NH-」 는 항체 유래이다.).

[0819] [화학식 56]

[0820] 

[0821] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트를 제조하기 위한 중간체로서 상기의 구조를 갖는 화합물은 다음과 같다 (식중, n 은 1 내지 10 의 정수이지만, 바람직하게는 2 내지 8 이며, 보다 바람직하게는 3 내지 8 이다.).

[0822] [화학식 57]



[0823]

[0824] 또한 말단이 메르캅토기가 된 본 발명의 화합물로서는 이하의 것을 들 수 있다.

[0825]

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

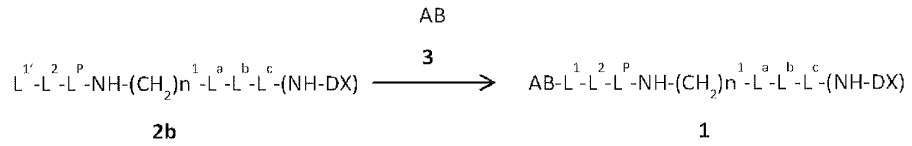
HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0826] 3. 제조 방법 3

[0827] 식 (1) 로 나타내는 항체-약물 콘주게이트로서, 아미드 결합을 개재하여 약물 링커 부분과 항체가 결합한 것은 이하의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어 L^1 이 -C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 이며, 이것이 활성 에스테르가 된 $L^{1'}$, 예를 들어 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 를 바람직하게 사용할 수 있다. 또한 L^2 가 단결합인 경우는 예를 들어 하기의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0828] [화학식 58]

[0829]


[0830] 즉, 후술하는 방법에 의해 입수할 수 있는 화합물 (2b) 와, 항체 (3) 을 반응시킴으로써, 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다.

[0831] 화합물 (2b) 는 항체의 아미노기, 하이드록실기와의 결합성을 갖는다. 항체의 아미노기, 하이드록실기는, 제조 방법 2 에서 기재한 바와 같이, 각각 예를 들어 항체가 갖는 N 말단 아미노기 및/또는 리신 잔기가 갖는 아미노기, 세린 잔기가 갖는 수산기를 나타내지만, 이들로 한정되지 않는다.

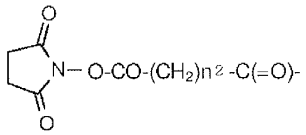
[0832] 화합물 (2b) 는 N-하이드록시숙신이미딜에스테르기로 이루어지는 활성 에스테르이지만, 다른 활성 에스테르, 예를 들어 술포숙신이미딜에스테르기, N-하이드록시프탈이미딜에스테르, N-하이드록시술포프탈이미딜에스테르, 오르토-니트로페닐에스테르, 파라-니트로페닐에스테르, 2,4-디니트로페닐에스테르, 3-술포닐-4-니트로페닐에스테르, 3-카르복시-4-니트로페닐에스테르, 펜타플루오로페닐에스테르 등도 사용할 수 있다.

[0833] 화합물 (2b) 와, 항체 (3) 의 반응은, 항체 (3) 한 개당, 2 내지 20 몰 당량의 화합물 (2b) 를 사용하여, 항체 1 개당 1 개 내지 10 개의 약물이 결합한 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다. 구체적으로는, 항체 (3) 을 포함하는 완충액에, 화합물 (2b) 를 용해시킨 용액을 첨가하여 반응시킴으로써, 항체-약물 콘주게이트 (1) 을 제조할 수 있다. 여기서, 완충액으로서 아세트산나트륨 용액, 인산나트륨이나 붕산나트륨 등을 사용할 수 있다. 반응 시의 pH 는 5 내지 9 이면 되고, 보다 바람직하게는 pH 7 부근에서 반응시키면 된다. 화합물 (2b) 를 용해시키는 용매로서는, 디메틸술폭시드 (DMSO), 디메틸포름아미드 (DMF), 디메틸아세트아미드 (DMA), N-메틸-2-피리돈 (NMP) 등의 유기 용매를 사용할 수 있다. 화합물 (2b) 를 용해시킨 유기 용매 용액을, 항체 (3) 을 포함하는 완충액에 1 내지 20 % v/v 를 첨가하여 반응시키면 된다. 반응 온도는 0 내지 37 ℃, 보다 바람직하게는 10 내지 25 ℃ 이며, 반응 시간은 0.5 내지 20 시간이다.

[0834] 제조한 항체-약물 콘주게이트 (1) 에 있어서의, 농축, 버퍼 교환, 정제, 항체 농도 및 항체 1 분자당 약물 평균 결합수의 측정에 의한 항체-약물 콘주게이트 (1) 의 동정은 제조 방법 1 과 마찬가지로 실시할 수 있다.

[0835] 제조 방법 3 에 있어서 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 는 다음의 구조를 갖는다.

[0836] [화학식 59]

[0837]


[0838] 상기의 부분 구조를 갖는 본 발명의 화합물로서는 이하의 것을 들 수 있다.

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0839]

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

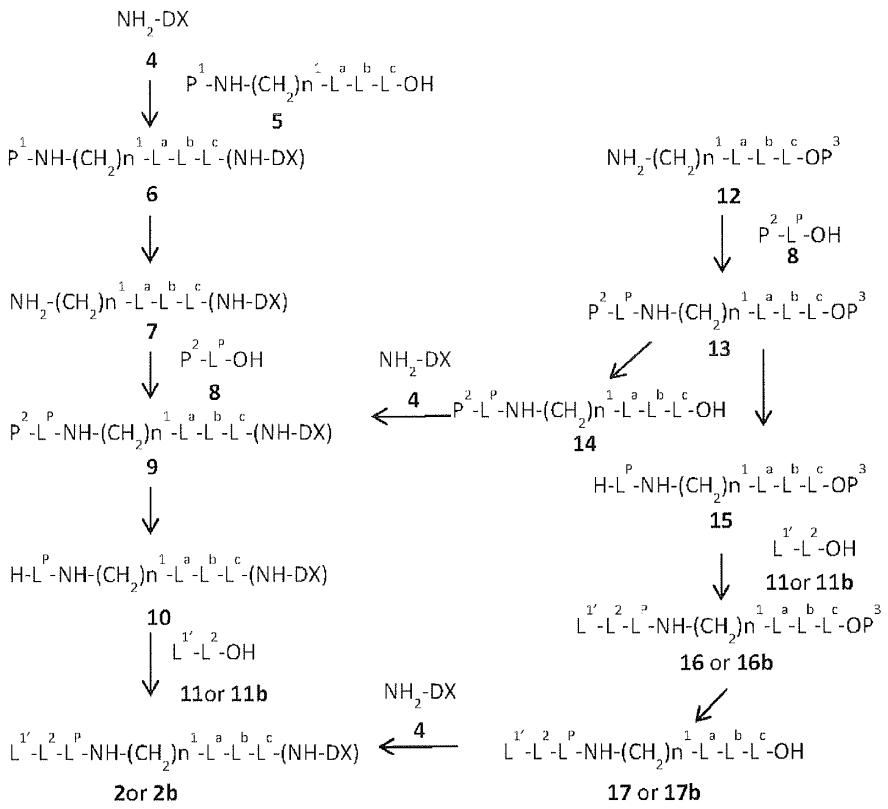
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0840]

[0841] 4. 제조 방법 4

[0842] 이전의 제조 방법에서 사용한 중간체인 식 (2) 또는 (2b) 로 나타내는 화합물 및 그들의 약리상 허용되는 염은 예를 들어 하기 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0843] [화학식 60]



[0844]

[0845] [식 중, L^c 는 -C(=O)- 로서 -(NH-DX) 와의 결합은 아미드 결합을 형성하고, $L^{1'}$ 는 말단 말레이미딜기, 또는 말단 할로아세틸기, 또는 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)- 로 변환된 구조의 L^1 을 나타내고, P^1, P^2 및 P^3 은 보호기를 나타낸다.]

[0846] 카르복실산 (5) 를 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, NH_2-DX [엑사테칸을 나타낸다 ; 화학명 : (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온] (4) 또는 그 약리상 허용되는 염과 반응시킴으로써 화합물 (6) 을 제조할 수 있다.

[0847] 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 된다. 활성 에스테르에는 각종의 것이 있지만, 예를 들어 p-니트로페놀 등의 페놀류, N-하이드록시벤조트리아졸 혹은 N-하이드록시숙신이미드 등과 카르복실산 (5) 를 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 혹은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드·염산염 등의 축합제를 사용하여 반응시키면 제조할 수 있다. 또, 활성 에스테르는 카르복실산 (5) 와 펜타플루오로페닐트리플루오로아세테이트 등과의 반응 ; 카르복실산 (5) 와 1-벤조트리아졸릴옥시트리피롤리디노포스포늄헥사플루오로포스파이트와의 반응 ; 카르복실산 (5) 와 시아노포스폰산디에틸과의 반응 (염입법) ; 카르복실산 (5) 와 트리페닐포스핀 및 2,2'-디피리딜디술파이드와의 반응 (향산법) ; 카르복실산 (5) 와 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄클로라이드 (DMTMM) 와 같은 트리아진 유도체와의 반응 등에 의해서도 제조할 수 있다. 또, 카르복실산 (5) 를 염기 존재하에 염화티오닐, 옥살릴클로라이드 등의 산 할로겐화물로 처리함으로써 제조할 수 있는 산 할라이드법 등에 의해 반응을 실시할 수도 있다. 상기와 같이 얻은 카르복실산 (5) 의 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물을 화합물 (4) 와 적당한 염기 존재하에 불활성인 용매 중에서 -78 ℃ ~ 150 ℃ 에서 반응시킴으로써 화합물 (6) 을 제조할 수 있다 (또한, 「불활성인 용매」 란 그 용매가 채용된 반응에 있어서 실시되는 반응을 저해하는 일이 없는 용매를 의미한다.).

[0848] 상기의 각 공정에 사용하는 구체적인 염기로서는, 예를 들어, 탄산나트륨, 탄산칼륨, 나트륨에톡시드, 칼륨부톡시드, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수소화나트륨, 수소화칼륨과 같은, 알칼리 금속 혹은 알칼리 토금속의 탄산염, 알칼리 금속 알콕시드, 알칼리 금속 수산화물 혹은 수소화물, 또는 n-부틸리튬과 같은 알킬리튬, 리튬

디이소프로필아미드와 같은 디알킬아미노리튬으로 대표되는 유기 금속염기 ; 리튬비스(트리메틸실릴)아미드와 같은 비스실릴아민의 유기 금속염기 ; 또는 피리딘, 2,6-루티딘, 콜리딘, 4-디메틸아미노피리딘, 트리에틸아민, N-메틸모르폴린, 디이소프로필에틸아민, 디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔 (DBU) 과 같은 유기 염기 등을 들 수 있다.

[0849] 본 반응에 사용하는 불활성인 용매로서는, 디클로로메탄, 클로로포름, 사염화탄소 등의 할로겐화 탄화수소계 용매 ; 테트라하이드로푸란, 1,2-디메톡시에탄, 디옥산 등의 에테르계 용매 ; 벤젠, 톨루엔 등의 방향족 탄화수소계 용매 ; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리딘-2-온 등의 아미드계 용매를 들 수 있고, 이들에 더하여 경우에 따라서는 디메틸술폭시드, 술포란 등의 술폭시드계 용매 ; 아세톤, 메틸에틸케톤 등의 케톤계 용매 등을 사용하는 것도 가능하다.

[0850] 화합물 (6) 의 L^a 및 L^b 는, 후술하는 바와 같이, 그 수산기, 카르복시기, 아미노기 등이 유기 화합물의 합성에 통상적으로 사용되는 보호기로 보호되어 있어도 된다. 구체적으로는 수산기의 보호기로서는, 메톡시메틸기 등의 알콕시메틸기 ; 벤질기, 4-메톡시벤질기, 트리페닐메틸기 등의 아릴메틸기 ; 아세틸기 등의 알카노일기 ; 벤조일기 등의 아로일기 ; tert-부틸디페닐실릴기 등의 실릴기 등을 들 수 있다. 카르복시기는 메틸기, 에틸기, tert-부틸기 등의 알킬기, 알릴기, 또는 벤질기 등의 아릴메틸기와의 에스테르 등으로서 보호할 수 있다. 아미노기는 tert-부틸옥시카르보닐기, 메톡시카르보닐기, 에톡시카르보닐기 등의 알킬옥시카르보닐기 ; 알릴옥시카르보닐, 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐기, 벤질옥시카르보닐기, 파라메톡시벤질옥시카르보닐기, 파라 (또는 오르토) 니트로벤질옥시카르보닐기 등의 아릴메틸기 외에, 아세틸기 등의 알카노일기 ; 벤질기, 트리페닐메틸기 등의 아릴메틸기 ; 벤조일기 등의 아로일기 ; 또는 2,4-디니트로벤젠술포닐기, 오르토니트로벤젠술포닐기 등의 아릴술포닐기 등, 펩티드 합성에 통상적으로 사용되고 있는 아미노기의 보호기에 의해 보호할 수 있다. 상기의 보호기의 착탈은 통상적으로 실시되는 방법에 따라 실시하면 된다.

[0851] 화합물 (6) 의 말단 아미노기의 보호기 P^1 로서는, tert-부틸옥시카르보닐기나 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐기, 벤질옥시카르보닐기 등, 펩티드 합성에 통상적으로 사용되고 있는 아미노기의 보호기를 사용할 수 있다. 다른 아미노기의 보호기로서는, 아세틸기 등의 알카노일기 ; 메톡시카르보닐기, 에톡시카르보닐기 등의 알콕시카르보닐기 ; 파라메톡시벤질옥시카르보닐기, 파라 (또는 오르토) 니트로벤질옥시카르보닐기 등의 아릴메톡시카르보닐기 ; 벤질기, 트리페닐메틸기 등의 아릴메틸기 ; 벤조일기 등의 아로일기 ; 또는 2,4-디니트로벤젠술포닐기, 오르토니트로벤젠술포닐기 등의 아릴술포닐기를 들 수 있다. 보호기 P^1 은 아미노기를 보호하는 화합물의 성질 등에 따라 취사 선택하면 된다.

[0852] 얻어진 화합물 (6) 의 말단 아미노기의 보호기 P^1 을 탈보호시킴으로써 화합물 (7) 을 제조할 수 있다. 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

[0853] N 말단을 P^2 로 보호한 펩티드카르복실산 (8) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물 등으로 유도하고, 얻어진 화합물 (7) 에 반응시킴으로써, 화합물 (9) 를 제조할 수 있다. 펩티드카르복실산 (8) 과 화합물 (7) 의 펩티드 결합을 형성하는 반응 조건이나 시약, 및 염기, 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다. 보호기 P^2 는 화합물 (6) 의 보호기에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 되고, 아미노기를 보호하는 화합물의 성질 등에 따라 취사 선택하면 된다. 또, 펩티드 합성에 통상적으로 사용되고 있는 바와 같이, 펩티드카르복실산 (8) 을 구성하는 아미노산 또는 펩티드를 순차 반응과 탈보호를 반복하여, 신장시켜 화합물 (9) 를 제조할 수도 있다.

[0854] 얻어진 화합물 (9) 의 아미노기의 보호기 P^2 를 탈보호시킴으로써 화합물 (10) 을 제조할 수 있다. 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

[0855] 카르복실산 (11) 및 (11b) 를 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하여, 얻어진 화합물 (10) 에 반응시킴으로써, 화합물 (2) 또는 (2b) 를 제조할 수 있다. 카르복실산 (11) 또는 (11b) 와 화합물 (10) 의 펩티드 결합을 형성하는 반응 조건이나 시약, 및 염기, 불활성 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

[0856] 화합물 (9) 는 예를 들어 하기 방법으로도 제조할 수 있다.

[0857] N 말단을 P^2 로 보호한 펩티드카르복실산 (8) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물 등으로 유도하고, 염기 존재하,

카르복시기를 P^3 으로 보호한 아민 화합물 (12) 와 반응시킴으로써 화합물 (13) 을 제조할 수 있다. 펩티드 카르복실산 (8) 과 화합물 (12) 의 펩티드 결합을 형성하는 반응 조건이나 시약, 및 염기, 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다. 화합물 (13) 의 아미노기의 보호기 P^2 는 화합물 (6) 의 보호기에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다. 카르복시기의 보호기 P^3 으로서는, 유기 합성 화학, 그 중에서도 펩티드 합성에 있어서 카르복시기의 보호기로서 통상적으로 사용되고 있는 보호기를 사용하면 되고, 구체적으로는 메틸기, 에틸기, tert-부틸 등의 알킬에스테르, 알릴에스테르, 벤질에스테르 등, 화합물 (6) 의 보호기에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다. 이 경우에, 아미노기의 보호기와 카르복시기의 보호기를 상이한 방법 또는 조건으로 제거할 수 있을 필요가 있다. 예를 들어 P^2 가 tert-부틸옥시카르보닐기이며, P^3 이 벤질기인 조합 등을 대표적인 것으로 들 수 있다. 그들의 보호기는 아미노기와 카르복시기를 보호하는 화합물의 성질 등에 따라 상기 서술한 것에서 취사 선택하면 되고, 그들의 보호기의 절단에 있어서도 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

[0858] 얻어진 화합물 (13) 의 카르복시기의 보호기 P^3 을 탈보호시킴으로써 화합물 (14) 를 제조할 수 있다. 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

[0859] 얻어진 화합물 (14) 를 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, 화합물 (4) 와 반응시킴으로써 화합물 (9) 를 제조할 수 있다. 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 되고, 반응 조건이나 시약, 및 염기나 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

[0860] 화합물 (2) 또는 (2b) 는 예를 들어 하기 방법으로도 제조할 수 있다.

[0861] 화합물 (13) 의 아미노기의 보호기 P^2 를 탈보호시킴으로써 화합물 (15) 를 제조할 수 있다. 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

[0862] 카르복실산 유도체 (11) 또는 (11b) 를 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, 얻어진 화합물 (15) 와 반응시킴으로써 화합물 (16) 또는 (16b) 를 제조할 수 있다. 펩티드카르복실산 (11) 또는 (11b) 와 화합물 (15) 의 아미드 결합을 형성하는 반응 조건이나 시약, 및 염기, 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

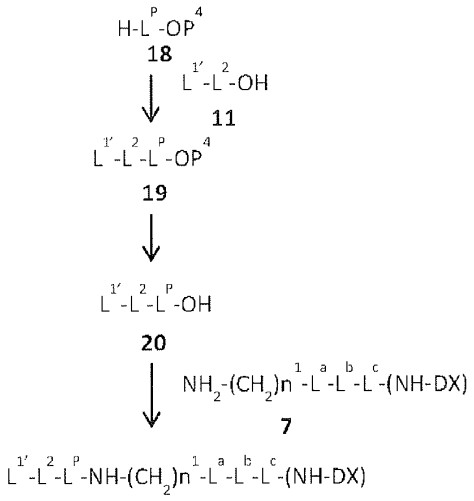
[0863] 얻어진 화합물 (16) 또는 (16b) 의 카르복시기의 보호기를 탈보호시킴으로써 화합물 (17) 또는 (17b) 를 제조할 수 있다. 화합물 (14) 의 제조에 있어서의 카르복시기의 탈보호와 마찬가지로 실시할 수 있다.

[0864] 화합물 (17) 또는 (17b) 를 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, 화합물 (4) 와 반응시킴으로써 화합물 (2) 또는 (2b) 를 제조할 수 있다. 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 되고, 반응 조건이나 시약, 및 염기나 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

[0865] 5. 제조 방법 5

[0866] 중간체의 식 (2) 로 나타내는 화합물은 하기 방법에 의해서도 제조할 수도 있다.

[0867] [화학식 61]



[0868]

[0869] [식 중, $L^{1'}$ 는 말단이 말레이미딜기, 또는 할로아세틸기로 변환된 구조의 L^1 이며, P^4 는 보호기를 나타낸다.]

[0870] 화합물 (11) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물 등으로 유도하고, 염기 존재하, C 말단을 P^4 로 보호한 펩티드카르복실산 (18) 과 반응시킴으로써 화합물 (19) 를 제조할 수 있다. 펩티드카르복실산 (18) 과 화합물 (11) 의 펩티드 결합을 형성하는 반응 조건이나 시약, 및 염기, 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다. 화합물 (18) 의 카르복시기의 보호기 P^4 는 화합물 (6) 의 보호기에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

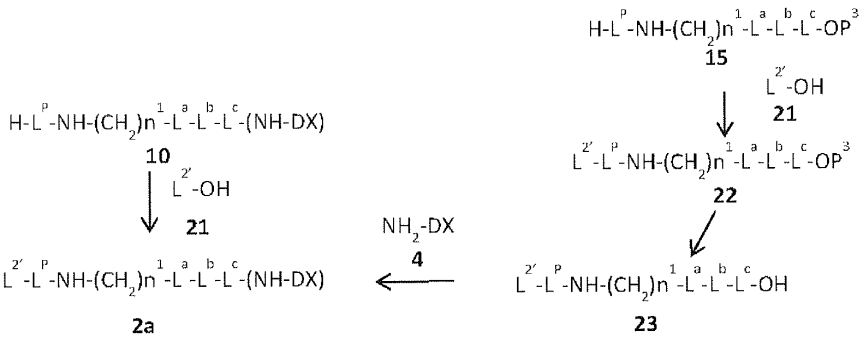
[0871] 얻어진 화합물 (19) 의 카르복시기의 보호기를 탈보호시킴으로써 화합물 (20) 을 제조할 수 있다. 화합물 (14) 의 제조에 있어서의 카르복시기의 탈보호와 동일하게 실시할 수 있다.

[0872] 얻어진 화합물 (20) 을 활성 에스테르, 또는 혼합 산무수물 등으로 유도하고, 화합물 (7) 에 반응시킴으로써, 화합물 (2) 를 제조할 수 있다. 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 되고, 반응 조건이나 시약, 및 염기나 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

[0873] 6. 제조 방법 6

[0874] 제조 방법 2 에 기재된 제조 중간체 (2a) 로서, $L^{2'}$ 가 말단 메르캅토알카노일기로 변환된 구조의 L^2 인 화합물은 하기의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0875] [화학식 62]



[0876]

[0877] 말단 메르캅토기를 갖는 카르복실산 (21) 을 활성 에스테르, 또는 혼합 산무수물 등으로 유도하고, 화합물 (10) 에 반응시킴으로써, 화합물 (2a) 를 제조할 수 있다. 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 되고, 반응 조건이나 시약, 및 염기나 불활성인 용매는 화합물 (4) 의 합성에서 기술

한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

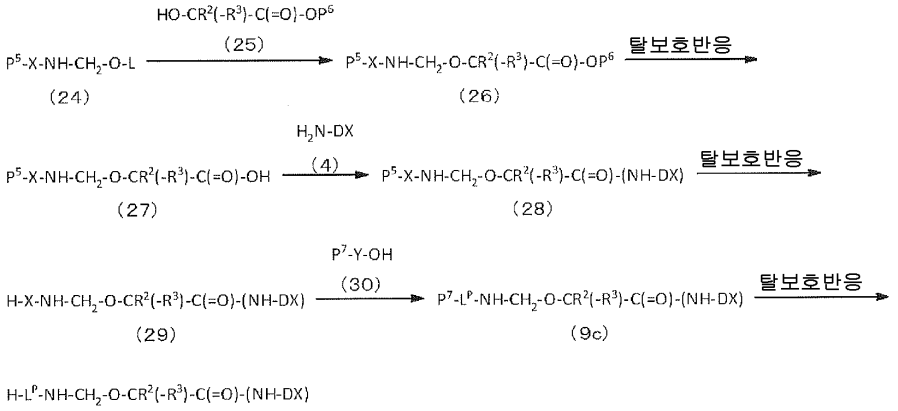
[0878] 또, 화합물 (21) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 화합물 (15) 와 반응시켜, 얻어지는 화합물 (22) 의 카르복시기의 보호기를 탈보호함으로써, 화합물 (23) 을 제조할 수 있다.

[0879] 화합물 (23) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, 화합물 (4) 와 반응시킴으로써 화합물 (2a) 를 제조할 수 있다. 이 반응은 펩티드 합성에 통상적으로 사용하는 반응 시약이나 조건을 준용하면 되고, 반응 조건이나 시약, 및 염기나 불활성인 용매는 화합물 (6) 의 합성에서 기술한 것에서 적절히 선택하여 사용하면 된다.

[0880] 7. 제조 방법 7

[0881] 이하에, 제조 방법 4 에 기재된 제조 중간체 (10) 중, $n^1 = 1$, $L^a = 0$, 및 $L^b = CR^2(-R^3)$ 의 화합물 (10c) 의 제조 방법에 대해 상세히 기술한다. 식 (10c) 로 나타내는 화합물, 그 염 또는 그들의 용매화물, 예를 들어 하기 방법으로 제조할 수 있다.

[0882] [화학식 63]



[0883]

[0884] [식 중, L^P, R^2, 및 R^3 은 상기와 동일한 것을 나타내고, L 은 아세틸기 또는 수소 원자 등을, X 및 Y 는 1 내지 3 개의 아미노산으로 이루어지는 올리고펩티드를, P^5 및 P^7 은 아미노기의 보호기를, P^6 은 카르복시기의 보호기를 나타낸다.]

[0885] 식 (24) 로 나타내는 화합물은, 일본 공개특허공보 2002-60351호에 기재되는 수법이나 문헌 (J. Org. Chem., 51 권, 3196 페이지, 1986 년) 에 기재된 방법, 혹은 그 방법을 응용하여, 필요에 따라 보호기의 제거나 관능기 변환을 실시함으로써, 제조할 수 있다. 또는, 말단 아미노기가 보호된 아미노산 또는 아미노기가 보호된 올리고펩티드의 산아미드를 알데히드 또는 케톤과 처리함으로써 얻을 수 있다.

[0886] 화합물 (24) 를, 불활성인 용매 중, 산 또는 염기 존재하에 냉각하 ~ 실온하에서 수산기를 갖는 화합물 (25) 와 반응시킴으로써, 화합물 (26) 을 제조할 수 있다. 사용하는 산으로서는 예를 들어, 불화수소산, 염산, 황산, 질산, 인산, 붕산 등의 무기산, 아세트산, 시트르산, 파라톨루엔술폰산, 메탄술폰산 등의 유기산, 테트라플루오로보레이트, 염화아연, 염화주석, 염화알루미늄, 염화철 등의 루이스산 등을 들 수 있다. 특히 파라톨루엔술폰산이 바람직하다. 사용하는 염기로서는, 상기의 염기 중에서 적절히 선택하여 사용하면 되고, 특히 칼륨tert-부톡시드 등의 알칼리 금속 알콕시드, 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 알칼리 금속 수산화물, 수소화나트륨, 수소화칼륨 등의 알칼리 금속 수소화물, 리튬디이소프로필아미드 등의 디알킬아미노리튬으로 대표되는 유기 금속염기, 리튬비스(트리메틸실릴)아미드 등의 비스실릴아민의 유기 금속염기 등이 바람직하다. 반응에 사용하는 용매로서는, 테트라하이드로푸란, 1,4-디옥산 등의 에테르계 용매 ; 벤젠, 톨루엔 등의 방향족 탄화수소계 용매 등이 사용된다. 상기의 용매는 물과의 혼합물로 해도 된다. 또, P^5 로 예시되는 아미노기의 보호기로서는, 통상적으로, 아미노기의 보호에 사용되는 기이면 특별히 제한은 없고, 대표적인 것으로서 제조 방법 4 에서 기재한 아미노기의 보호기를 들 수 있지만, 본 반응 중에 있어서 P^5 로 예시되는 아미노기의 보호기가 절단되는 경우가 있다. 그 경우에는, 필요에 따라 적당한 아미노기의 보호 시약과 반응시킬 필요

가 있다.

[0887] 화합물 (27) 은 화합물 (26) 의 보호기 P^6 을 제거함으로써 제조할 수 있다. 여기서, P^6 으로서 예시되는 카르복시기의 보호기로서는, 대표적인 것을 제조 방법 4 에 기재했지만, 이 경우에는 아미노기의 보호기 P^5 와 카르복시기의 보호기 P^6 이 상이한 방법 또는 조건으로 제거할 수 있는 보호기인 것이 바람직하다. 예를 들어, P^5 가 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐기이며, P^6 이 벤질기인 조합 등을 대표적인 것으로서 들 수 있다. 그들의 보호기는 아미노기 및 카르복시기를 보호하는 화합물의 성질 등에 따라 취사 선택하면 되고, 그들 보호기의 제거에 있어서도 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다.

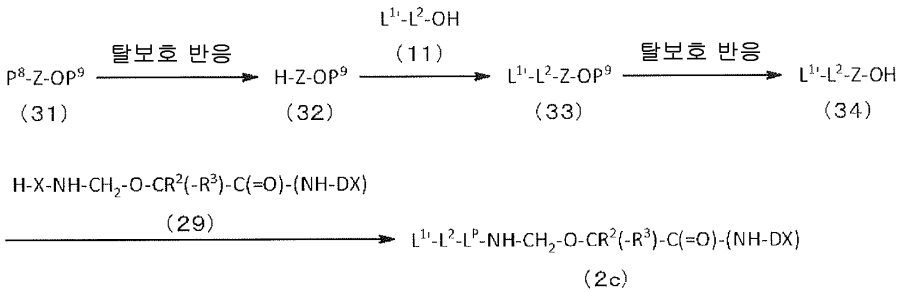
[0888] 카르복실산 (27) 을 활성 에스테르, 혼합 산무수물, 또는 산 할로겐화물 등으로 유도하고, 염기 존재하, 화합물 (4) 및 그들의 약리상 허용되는 염과 반응시킴으로써 화합물 (28) 을 제조하고, 얻어진 화합물 (28) 의 보호기 P^5 를 제거함으로써 화합물 (29) 를 제조할 수 있다. 화합물 (4) 와 카르복실산 (27) 의 반응 및 보호기 P^6 을 제거하는 반응에서는, 제조 방법 4 에서 기술한 시약이나 반응 조건과 동일한 것을 사용하면 된다.

[0889] 화합물 (29) 와 말단 아미노기가 보호된 아미노산 또는 아미노기가 보호된 올리고펩티드 (30) 을 반응시킴으로써 화합물 (9c) 를 제조하고, 얻어진 화합물 (9c) 의 보호기 P^7 을 제거함으로써 화합물 (10c) 를 제조할 수 있다. P^7 로 예시되는 아미노기의 보호기로서는, 통상적으로, 아미노기의 보호에 사용되는 기이면 특별히 제한은 없고, 대표적인 것으로서 제조 방법 4 에서 기재한 아미노기의 보호기를 들 수 있고, 그 보호기의 제거에 있어서도 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다. 화합물 (29) 와 화합물 (30) 의 반응에서는, 펩티드 합성에 통상적으로 사용되는 반응 시약이나 조건을 준용하면 된다. 상기의 방법으로 제조한 화합물 (10c) 는 상기 서술한 제조 방법에 따라 본 발명 화합물 (1) 로 유도할 수 있다.

[0890] 8. 제조 방법 8

[0891] 이하에, 제조 방법 4 에 기재된 제조 중간체 (2) 중, $n^1 = 1$, $L^a = 0$, 및 $L^b = CR^2(-R^3)$ 의 화합물 (2c) 의 제조 방법에 대해 상세히 기술한다. 식 (2c) 로 나타내는 화합물, 그 염 또는 그들의 용매화물은 예를 들어 하기 방법으로 제조할 수 있다.

[0892] [화학식 64]



[0893]

[0894] [식 중, $L^{1'}$, L^2, L^P, R^2, 및 R^3 은 상기와 동일한 것을 나타내고, Z 는 1 내지 3 개의 아미노산으로 이루어지는 올리고펩티드를, P^8 은 아미노기의 보호기를, P^9 는 카르복시기의 보호기를 나타낸다.]

[0895] 말단 아미노기 및 카르복시기가 보호된 아미노산 또는 올리고펩티드 (31) 의 보호기 P^8 을 제거함으로써 화합물 (32) 를 제조하고, 얻어진 아민체 (32) 와 화합물 (11) 을 반응시킴으로써 화합물 (33) 을 제조할 수 있다. P^8 로 예시되는 아미노기의 보호기로서는, 통상적으로, 아미노기의 보호에 사용되는 기이면 특별히 제한은 없고, 대표적인 것으로서 제조 방법 4 에서 기재한 아미노기의 보호기를 들 수 있다. 또, 보호기 P^8 의 제거에 있어서도 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다. 화합물 (32) 와 카르복실산 (11) 의 반응에서는, 제조 방법 4 에서 기술한 시약이나 반응 조건과 동일한 것을 사용하면 된다.

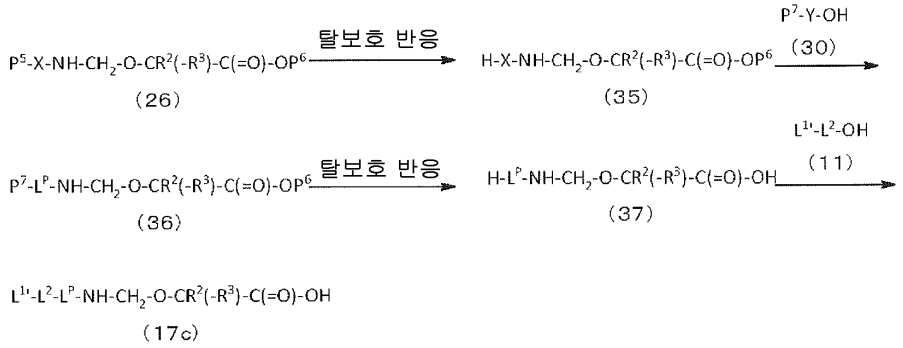
[0896] 화합물 (33) 의 보호기 P^9 를 제거함으로써 화합물 (34) 를 제조하여, 얻어진 카르복실산 (34) 와 화합물 (29)

를 반응시킴으로써 제조 중간체 (2c) 를 제조했다. P^8 로서 예시되는 카르복시기의 보호기로서는, 대표적인 것을 제조 방법 4 에 기재했지만, 그 탈보호 반응에서는 제조 방법 4 에서 기술한 시약이나 반응 조건과 동일한 것을 사용하면 된다. 또, 화합물 (29) 와 카르복실산 (34) 의 반응에서는, 펩티드 합성에 통상적으로 사용되는 반응 시약이나 조건을 준용하면 된다. 상기의 방법으로 제조한 화합물 (2c) 는 상기 서술한 제조 방법에 따라 본 발명 화합물 (1) 로 유도할 수 있다.

[0897] 9. 제조 방법 9

[0898] 이하에, 제조 방법 4 에 기재된 제조 중간체 (17) 중, $n^1 = 1$, $L^a = 0$, 및 $L^b = CR^2(-R^3)$ 의 화합물 (17c) 의 제조 방법에 대해 상세히 기술한다. 식 (17c) 로 나타내는 화합물, 그 염 또는 그들의 용매화물은 예를 들어 하기의 방법에 의해서도 제조할 수 있다.

[0899] [화학식 65]



[0900]

[0901] [식 중, $L^{1'}$, L^2, L^P, R^2, R^3, X, Y, P^5, P^6, 및 P^7 은 상기와 동일한 것을 나타낸다.]

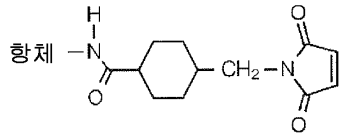
[0902] 말단 아미노기 및 말단 카르복시기가 보호된 화합물 (26) 의 아미노기의 보호기 P^5 를 탈보호함으로써 화합물 (35) 를 제조하고, 얻어진 아민체 (35) 와 말단 아미노기 또는 아미노기가 보호된 올리고펩티드 (30) 을 반응시킴으로써 화합물 (36) 을 제조할 수 있다. P^5 로 예시되는 아미노기의 보호기로서는, 통상적으로, 아미노기의 보호에 사용되는 기이면 특별히 제한은 없고, 대표적인 것으로서 제조 방법 4 에서 기재한 아미노기의 보호기를 들 수 있다. 또, 보호기 P^5 의 제거에 있어서도 그 보호기에 따른 시약이나 조건을 선택하면 된다. 여기서, P^6 으로 예시되는 카르복시기의 보호기 및 P^7 로 예시되는 아미노기의 보호기로서는, 대표적인 것으로서 제조 방법 4 에서 기재한 카르복시기 및 아미노기의 보호기를 들 수 있지만, 카르복시기의 보호기 P^6 과 아미노기의 보호기 P^7 을 동일한 방법 또는 조건으로 제거할 수 있는 보호기가 바람직하다. 예를 들어 P^6 이 벤질에스테르기이며, P^7 이 벤질옥시카르보닐기인 조합 등을 대표적인 것으로서 들 수 있다.

[0903] 화합물 (37) 은 화합물 (36) 의 카르복시기의 보호기 P^6 과 아미노기의 보호기 P^7 을 제거함으로써 제조할 수 있다. 카르복시기의 보호기 P^6 과 아미노기의 보호기 P^7 각각을 순차 제거하는 것에 의해서도 화합물 (37) 을 제조할 수 있고, P^6 과 P^7 이 동일한 방법 또는 조건으로 제거할 수 있는 보호기이면, 양자를 일 공정으로 제거하여 화합물 (37) 을 제조할 수 있다.

[0904] 얻어진 화합물 (37) 과 화합물 (11) 을 반응시킴으로써 화합물 (17c) 를 제조할 수 있다. 화합물 (37) 과 화합물 (11) 의 반응에서는, 제조 방법 4 에서 기술한 시약이나 반응 조건과 동일한 것을 사용하면 된다.

[0905] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트의 제조에 있어서 유용한 제조 중간체로서 다음 식 :

[0906] [화학식 66]



[0907]

[0908] 으로 나타내는 화합물을 먼저 설명했지만, 추가로 다음 식 :

[0909] $Q-(CH_2)n^{Q}-C(=O)-L^{2a}-L^{P}-NH-(CH_2)n^{1}-L^{a}-L^{b}-L^{c}-(NH-DX)$

[0910] 으로 나타내는 일군의 화합물도 본 발명의 항체-약물 콘주게이트의 제조에 있어서 유용한 제조 중간체가 되는 화합물이다.

[0911] 즉, 상기 식에 있어서, Q 는 (maleimid-N-yl)-, HS-, $X-CH_2-C(=O)-NH-$, 또는 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 이며,

[0912] X 는 브롬 원자 또는 요오드 원자이며,

[0913] n^{Q} 는 정수의 2 내지 8 이며,

[0914] L^{2a} 는 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^{5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$, 또는 단결합을 나타내고,

[0915] 여기서, n^{5} 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0916] L^{P} 는 2 내지 7 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기를 나타내고,

[0917] n^{1} 은 0 내지 6 의 정수를 나타내고,

[0918] L^{a} 는 -C(=O)-NH-, $-NR^{1}-(CH_2)n^{7}-$, -O-, 또는 단결합을 나타내고,

[0919] 여기서, n^{7} 은 1 내지 6 의 정수를 나타내고, R^{1} 은 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^{8}-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^{9}-OH$ 를 나타내지만, n^{8} 은 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^{9} 는 1 내지 6 의 정수를 나타내고,

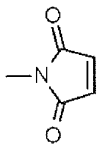
[0920] L^{b} 는 $-CR^{2}(-R^{3})-$, -O-, $-NR^{4}-$, 또는 단결합을 나타내고,

[0921] 여기서, R^{2} 및 R^{3} 은, 각각 독립적으로, 수소 원자, 탄소수 1 내지 6 의 알킬기, $-(CH_2)n^{a}-NH_2$, $-(CH_2)n^{b}-COOH$, 또는 $-(CH_2)n^{c}-OH$ 를 나타내고, R^{4} 는 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 6 의 알킬기를 나타내고, n^{a} 는 0 내지 6 의 정수를 나타내고, n^{b} 는 정수의 1 내지 4 를 나타내고, n^{c} 는 정수의 1 내지 4 를 나타내지만, n^{a} 가 0 일 때는, R^{2} 및 R^{3} 은 동일하게는 되지 않고,

[0922] L^{c} 는 $-CH_2-$ 또는 -C(=O)- 를 나타내고,

[0923] (maleimid-N-yl)- 은 다음 식

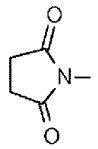
[0924] [화학식 67]



[0925]

[0926] 으로 나타내는 구조의 기 (질소 원자가 결합 부위) 이며, (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)- 은 다음 식

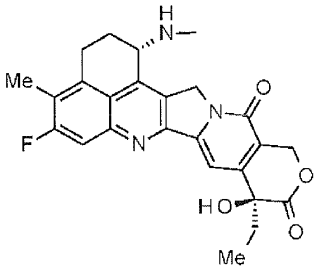
[0927] [화학식 68]



[0928]

[0929] 으로 나타내는 구조의 기 (질소 원자가 결합 부위) 이며, -(NH-DX) 는 다음 식

[0930] [화학식 69]



[0931]

[0932] 으로 나타내는 구조의 기 (1 위치의 아미노기의 질소 원자가 결합 부위) 이다.

[0933] 제조 중간체로서는, L^c 가 -C(=O)- 인 화합물이 바람직하다.

[0934] 또, L^P 의 펩티드 잔기로서는, 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 아스파르트산에서 선택되는 아미노산으로 이루어지는 아미노산 잔기인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 이와 같은 펩티드 잔기 중, L^P 가 4 개의 아미노산으로 구성되는 펩티드 잔기인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 보다 구체적으로는, L^P 가 -GGFG- 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다.

[0935] 또한, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 로서는, $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하고, 보다 바람직하게는, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는 $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$ 인 화합물이다.

[0936] n^Q 로서는, 정수의 2 내지 6 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다.

[0937] L^{2a} 는 단결합이거나, n^5 가 정수의 2 내지 4 의 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다.

[0938] 또, Q 가 (maleimid-N-yl)- 인 경우, n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며, L^{2a} 가 단결합이며, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가 $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 보다 바람직하게는, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가 $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 화합물이다. 또한, n^Q 가 정수의 2 또는 5 인 화합물이 바람직하다.

[0939] 또한, Q 가 (maleimid-N-yl)- 인 경우, n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며, L^{2a} 가 $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 로서, n^5 가 정수의 2 내지 4 이며, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가 $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, 또는 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 보다 바람직하게는, n^5 가 정수의 2 또는 4 의 화합물이다. 또한, $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 가 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-$

CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이 바람직하다.

[0940] Q 가 HS- 인 경우, n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며, L^{2a} 가 단결합이며, -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b- 가 -NH-CH_2CH_2-, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 보다 바람직하게는, -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b- 가 -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이다.

[0941] Q 가 X-CH_2-C(=O)-NH- 인 경우, X 로서는 브롬 원자인 화합물이 제조 중간체로서 바람직한 화합물이다. n^Q 는 정수의 2 내지 8 인 화합물이 바람직하고, L^{2a} 가 단결합인 화합물이 바람직하고, -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b- 가 -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다.

[0942] Q 가 (Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)- 인 경우, n^Q 가 정수의 2 내지 5 이며, L^{2a} 가 단결합이며, -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b- 가 -NH-CH_2CH_2-, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이 제조 중간체로서 바람직하다. 보다 바람직하게는, -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b- 가 -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- 인 화합물이다.

[0943] 보다 구체적으로는 이하의 것이 제조 중간체로서 바람직한 화합물이다.

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

Br-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0944]

[0945] 또한, 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는, 대기 중에 방치하거나, 또는 재결정함으로써, 수분을 흡수하여, 흡착수가 생기거나, 수화물이 되는 경우가 있고, 그러한 물을 포함하는 화합물 및 염도 본 발명에 포함된다.

[0946] 또, 본 발명에는, 여러 가지의 방사성 또는 비방사성 동위체로 라벨된 화합물도 포함된다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트를 구성하는 원자의 1 이상으로, 원자 동위체의 비천연 비율도 함유할 수 있다. 원자 동위

체로서는, 예를 들어, 중수소 (^{2}H), 트리튬 (^{3}H), 요오드-125 (^{125}I) 또는 탄소-14 (^{14}C) 등을 들 수 있다. 또, 본 발명 화합물은, 예를 들어, 트리튬 (^{3}H), 요오드-125 (^{125}I) 또는 탄소-14 (^{14}C) 와 같은 방사성 동위체로 방사성 표식될 수 있다. 방사성 표식된 화합물은 치료 또는 예방제, 연구 시약, 예를 들어, 어세이 시약, 및 진단제, 예를 들어, 인비보 화상 진단제로서 유용하다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트의 모든 동위체 변이종은 방사성이고 아니고를 불문하고, 본 발명의 범위에 포함된다.

[0947] <의약>

[0948] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는, 암 세포에 대해 세포 상해 활성을 나타내는 점에서, 의약으로서, 특히 암에 대한 치료제 및/또는 예방제로서 사용할 수 있다.

[0949] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트가 적용되는 암의 종류로서는, 폐암, 신암, 요로 상피암, 대장암, 전립선암, 다형 신경교아종, 난소암, 췌암, 유방암, 멜라노마, 간암, 방광암, 위암, 식도암 등을 들 수 있지만, 치료 대상이 되는 암 세포에 있어서 항체-약물 콘주게이트 중의 항체를 인식할 수 있는 단백을 발현하고 있는 암세포이면 이들에는 한정되는 일은 없다.

[0950] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는 포유 동물에 대해 바람직하게 투여할 수 있지만, 보다 바람직하게는 인간이다.

[0951] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트가 포함되는 의약 조성물에 있어서 사용되는 물질로서는, 투여량이나 투여 농도에 있어서, 이 분야에 있어서 통상적으로 사용되는 제제 첨가물 그 외에서 적절히 선택하여 적용할 수 있다.

[0952] 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는 1 종 이상의 약학적으로 적합성의 성분을 포함하는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물은, 대표적으로는, 1 종 이상의 약학적 캐리어 (예를 들어, 멸균된 액체 (예를 들어, 물 및 기름 (석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 기름 (예를 들어, 락카세이유, 대두유, 광유, 참기름 등) 을 포함한다)) 를 포함한다. 물은, 상기 약학적 조성물이 정맥 내 투여되는 경우에, 보다 대표적인 캐리어이다. 식염 수용액, 그리고 덱스트로스 수용액 및 글리세롤 수용액도 또한, 액체 캐리어로서, 특히, 주사용 용액을 위해서 사용될 수 있다. 적절한 약학적 부형제는 당해 분야에서 공지이다. 상기 조성물은 또, 원한다면, 미량의 습윤제 혹은 유화제, 또는 pH 완충화제를 함유할 수 있다. 적절한 약학적 캐리어의 예는 E. W. Martin 에 의한 「Remington's Pharmaceutical Sciences」 에 기재된다. 그 처방은 투여의 양태에 대응한다.

[0953] 여러 가지의 송달 시스템이 공지이며, 본 발명의 항체-약물 콘주게이트를 투여하기 위해서 사용될 수 있다. 도입 방법으로서는, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 및 피하의 경로를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 투여는, 예를 들어, 주입 또는 볼러스 주사에 의한 것일 수 있다. 특정의 바람직한 실시형태에 있어서, 상기 리간드 약물 결합체의 투여는, 주입에 의한 것이다. 비경구적 투여는 바람직한 투여 경로이다.

[0954] 대표적 실시형태에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인간에 대한 정맥내 투여에 적합한 약학적 조성물로서 상습적 순서에 따라 처방된다. 대표적으로는, 정맥내 투여를 위한 조성물은 멸균의 등장성의 수성 완충액 중의 용액이다. 필요한 경우, 상기 의약은 또, 가용화제 및 주사 부위에서의 동통을 완화시키기 위한 국소 마취제 (예를 들어, 리그노카인) 를 포함할 수 있다. 일반적으로, 상기 성분은, (예를 들어, 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사셰 등의 밀봉하여 시일된 용기 중의 건조 동결 건조 분말 또는 무수의 농축물로서, 별개로, 또는 단위 제형 중에서 함께 혼합한 것 중 어느 하나로 공급된다. 상기 의약이 주입에 의해 투여될 예정인 경우, 그것은, 예를 들어, 멸균의 제약 그레이드의 물 또는 식염수를 포함하는 주입 보틀로 투약될 수 있다. 상기 의약이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰플은, 예를 들어, 상기 성분이 투여 전에 혼합될 수 있도록, 제공될 수 있다.

[0955] 본 발명의 의약 조성물에는 본원의 항체-약물 콘주게이트만을 포함하는 의약 조성물이어도 되고, 항체-약물 콘주게이트 및 적어도 하나의 이것 이외의 암치료제를 포함하는 의약 조성물이어도 된다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트는 다른 암치료제와 함께 투여할 수도 있고, 이로써 항암 효과를 증강시킬 수 있다. 이와 같은 목적으로 사용되는 다른 항암제는 항체-약물 콘주게이트와 동시에, 따로 따로, 혹은 연속해서 개체에 투여되어도 되고, 각각의 투여 간격을 변경하여 투여해도 된다. 이와 같은 암치료제로서 abraxane, carboplatin, cisplatin, gemcitabine, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastin 또는 국제 공개 제WO2003/038043호 팜플렛에 기재된 약제, 또한 LH-RH 아날로그 (류프로레린, 고세레린 등), 에스트람스틴·포스페이트, 에스트로겐 길항약 (타목시펜, 라록시펜 등), 아로마타제 저해제 (아나스트로졸, 레트로졸, 엑세

메스탄 등) 등을 들 수 있지만, 항종양 활성을 갖는 약제이면 한정되는 일은 없다.

[0956] 이와 같은 의약 조성물은, 선택된 조성과 필요한 순도를 가지는 제제로서, 동결 건조 제제 혹은 액상 제제로서 제제화하면 된다. 동결 건조 제제로서 제제화할 때에는, 이 분야에 있어서 사용되는 적당한 제제 첨가물이 포함되는 제제여도 된다. 또 액제에 있어서도 동일하게 하여, 이 분야에 있어서 사용되는 각종 제제 첨가물을 포함하는 액상 제제로서 제제화할 수 있다.

[0957] 의약 조성물의 조성 및 농도는 투여 방법에 의해서도 변화하지만, 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 항체-약물 콘주게이트는, 항체-약물 콘주게이트의 항원에 대한 친화성, 즉, 항원에 대한 해리 정수 (Kd 값) 의 점에 있어서, 친화성이 높을수록 (Kd 값이 낮다), 소량의 투여량이어도 약효를 발휘시킬 수 있다. 따라서, 항체-약물 콘주게이트의 투여량의 결정에 있어서는, 항체-약물 콘주게이트와 항원의 친화성의 상황에 기초하여 투여량을 설정할 수도 있다. 본 발명의 항체-약물 콘주게이트를 인간에 대해 투여할 때에는, 예를 들어, 약 0.001 ~ 100 mg/kg 을 1 회 혹은 1 ~ 180 일간에 1 회의 간격으로 복수회 투여하면 된다.

[0958] <u>실시예</u>

[0959] 이하에 나타내는 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들로 한정되는 것은 아니다. 또, 이들은 어떠한 의미에 있어서도 한정적으로 해석되는 것은 아니다. 또, 본 명세서에 있어서, 특히 기재가 없는 시약, 용매 및 출발 재료는 시판되는 공급원으로부터 용이하게 입수 가능하다.

[0960] 참고예 1 M30-H1-L4 항체

[0961] 항 B7-H3 항체의 인간화 항체 중, 배열 번호 9 에 있어서 아미노산 번호 20 내지 471 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 중사슬 및 배열 번호 16 에 있어서 아미노산 번호 21 내지 233 에 기재된 아미노산 배열로 이루어지는 경사슬로 이루어지는 항체를 공지된 방법에 의해 제조하고, 얻어진 인간화 항 B7-H3 항체를 M30-H1-L4 항체 (또는 간단히 「M30-H1-L4」 라고 기재) 로 했다.

[0962] 참고예 2 M30-H1-L4P 항체

[0963] 상기에서 얻어진 M30-H1-L4 항체에 결합하고 있는 당사슬 수식을 공지된 방법에 의해 탈푸코오스화하여 조절하고, 얻어진 당사슬 수식이 조절되어 있는 항체를 M30-H1-L4P 항체 (또는 간단히 「M30-H1-L4P」 라고 기재) 로 했다.

[0964] 참고예 3 항 CD30 항체

[0965] 항 CD30 항체는 일본 공표특허공보 2005-506035 를 참조하여 제작했다. 그 배열을 배열 번호 27, 28 에 나타냈다.

[0966] 참고예 4 항 CD33 항체

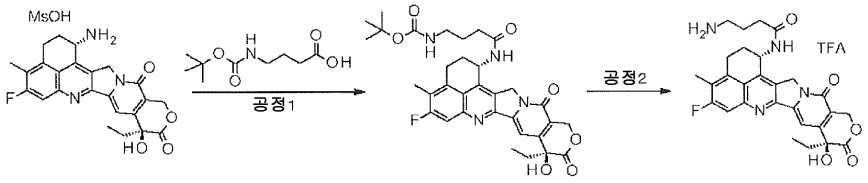
[0967] 항 CD33 항체는 일본 공개특허공보 평8-48637호를 참조하여 제작했다. 그 배열을 배열 번호 29, 30 에 나타냈다.

[0968] 참고예 5 항 CD70 항체

[0969] 항 CD70 항체는 일본 공표특허공보 2008-538292 를 참조하여 제작했다. 그 배열을 배열 번호 31, 32 에 나타냈다.

[0970] 실시예 1 4-아미노-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]부탄아미드

[0971] [화학식 70]



[0972]

[0973] 공정 1 : tert-부틸(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사

하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)카르바메이트

[0974] 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 (0.237 g, 1.13 mmol) 을 디클로로메탄 (10 mℓ) 에 용해하고, N-하이드록시숙신이미드(0.130 g, 1.13 mmol) 및, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염 (0.216 g, 1.13 mmol) 을 첨가하여 1 시간 교반했다. 그 반응 용액을 화합물 (4) 의 메실산염 (0.500 g, 0.94 mmol) 및, 트리에틸아민 (0.157 mℓ, 1.13 mmol) 을 첨가한 N,N-디메틸포름아미드 용액 (10 mℓ) 에 적하하여, 실온에서 1 일간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 8 : 2 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.595 g, 정량적) 을 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 2Hz), 1. 31 (9H, s), 1. 58 (1H, t, J＝7. 2Hz), 1. 66 (2H, t, J＝7. 2Hz), 1. 82－1. 89 (2H, m), 2. 12－2. 21 (3H, m), 2. 39 (3H, s), 2. 92 (2H, t, J＝6. 5Hz), 3. 17 (2H, s), 5. 16 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 24 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 42 (2H, s), 5. 59－5. 55 (1H, m), 6. 53 (1H, s), 6. 78 (1H, t, J＝6. 3Hz), 7. 30 (1H, s), 7. 79 (1H, d, J＝11. 0Hz), 8. 40 (1H, d, J＝8. 6Hz).

[0975] MS (APCI) m／z：621 $(M+H)^+$

[0976] 공정 2 : 4-아미노-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]부탄아미드

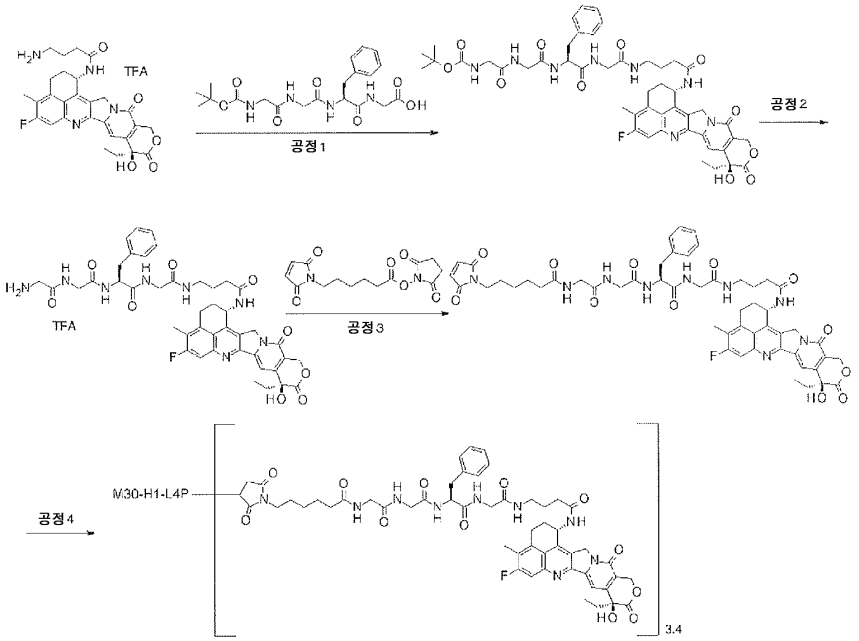
[0977] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (0.388 g, 0.61 mmol) 을 디클로로메탄 (9 mℓ) 에 용해했다. 트리플루오로아세트산 (9 mℓ) 을 첨가하여 4 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물의 트리플루오로아세트산염 (0.343 g, 정량적) 을 얻었다. 항체-약물 콘주게이트 (13), (14) 를 담암 마우스에 투여했을 때에, 이 화합물이 종양 중에서 확인되었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 2Hz), 1. 79－1. 92 (4H, m), 2. 10－2. 17 (2H, m), 2. 27 (2H, t, J＝7. 0Hz), 2. 40 (3H, s), 2. 80－2. 86 (2H, m), 3. 15－3. 20 (2H, m), 5. 15 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 26 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 42 (2H, s), 5. 54－5. 61 (1H, m), 6. 55 (1H, s), 7. 32 (1H, s), 7. 72 (3H, brs), 7. 82 (1H, d, J＝11. 0Hz), 8. 54 (1H, d, J＝8. 6Hz).

[0978] MS (APCI) m／z：521 $(M+H)^+$

[0979] 실시예 2 항체-약물 콘주게이트 (1)

[0980] [화학식 71]



[0981]

[0982] 공정 1 : N-(tert-부톡시카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S, 9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4' : 6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[0983] N-(tert-부톡시카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닐글리신 (0.081 g, 0.19 mmol) 을 디클로로메탄 (3 mℓ) 에 용해하고, N-하이드록시숙신이미드 (0.021 g, 0.19 mmol) 및, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염 (0.036 g, 0.19 mmol) 을 첨가하여 3.5 시간 교반했다. 그 반응 용액을 실시예 1 의 화합물 (0.080 g, 0.15 mmol) 을 첨가한 N,N-디메틸포름아미드 용액 (1.5 mℓ) 에 적하하여, 실온에서 4 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 8 : 2 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.106 g, 73 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0.87 (3H, t, J＝7.4Hz), 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t, J＝7.8Hz), 2.15－2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd, J＝12.7, 8.8Hz), 3.02 (1H, dd, J＝14.1, 4.7Hz), 3.08－3.11 (2H, m), 3.16－3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d, J＝5.9Hz), 3.57－3.77 (4H, m), 4.46－4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d, J＝19.2Hz), 5.25 (1H, d, J＝18.8Hz), 5.42 (2H, s), 5.55－5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t, J＝6.3Hz), 7.17－7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, J＝5.7Hz), 7.80 (1H, d, J＝11.0Hz), 7.92 (1H, t, J＝5.7Hz), 8.15 (1H, d, J＝8.2Hz), 8.27 (1H, t, J＝5.5Hz), 8.46 (1H, d, J＝8.2Hz).

[0984] MS (APCI) m／z：939 $(M+H)^+$

[0985] 공정 2 : 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드트리플루오로아세트산염

[0986] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (1.97 g, 2.10 mmol) 을 디클로로메탄 (7 mℓ) 에 용해했다. 트리플루오로아세트산 (7 mℓ) 을 첨가하여 1 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 톨루엔을 첨가하여 공비하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물 (1.97 g, 99 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 71－1. 73 (2H, m), 1. 82－1. 90 (2H, m), 2. 12－2. 20 (4H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 75 (1H, dd, J＝13. 7, 9. 4Hz), 3. 03－3. 09 (3H, m), 3. 18－3. 19 (2H, m), 3. 58－3. 60 (2H, m), 3. 64 (1H, d, J＝5. 9Hz), 3. 69 (1H, d, J＝5. 9Hz), 3. 72 (1H, d, J＝5. 5Hz), 3. 87 (1H, dd, J＝16. 8, 5. 9Hz), 4. 50－4. 56 (1H, m), 5. 16 (1H, d, J＝19. 2Hz), 5. 25 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 42 (2H, s), 5. 55－5. 60 (1H, m), 7. 17－7. 27 (5H, m), 7. 32 (1H, s), 7. 78－7. 81 (2H, m), 7. 95－7. 97 (3H, m), 8. 33－8. 35 (2H, m), 8. 48－8. 51 (2H, m).

MS (APCI) m／z：839 $(M+H)^+$

[0987]

[0988] 공정 3 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[0989] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (337 mg, 0.353 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (1.2 mℓ) 용액에, 트리에틸아민 (44.3 mℓ, 0.318 mmol), 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 (119.7 mg, 0.388 mmol) 을 첨가하여 실온에서 1 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 5 : 1 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (278.0 mg, 76 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．3Hz），1．12－1．22（2H，m），1．40－1．51（4H，m），1．66－1．76（2H，m），1．80－1．91（2H，m），2．05－2．21（6H，m），2．39（3H，s），2．79（1H，dd，J＝14．0，9．8Hz），2．98－3．21（5H，m），3．55－3．77（8H，m），4．41－4．48（1H，m），5．15（1H，d，J＝18．9Hz），5．24（1H，d，J＝18．9Hz），5．40（1H，d，J＝17．1Hz），5．44（1H，d，J＝17．1Hz），5．54－5．60（1H，m），6．53（1H，s），6．99（2H，s），7．20－7．27（5H，m），7．30（1H，s），7．70（1H，t，J＝5．5Hz），7．80（1H，d，J＝11．0Hz），8．03（1H，t，J＝5．8Hz），8．08（1H，t，J＝5．5Hz），8．14（1H，d，J＝7．9Hz），8．25（1H，t，J＝6．1Hz），8．46（1H，d，J＝8．5Hz）．

[0990] MS（APCI）m／z：1032（M＋H）$^{+}$

[0991] 공정 4 : 항체-약물 콘주게이트 (1)

[0992] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 를 사용하여, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하고, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣어, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.025 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[0993] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.109 mℓ) 와 상기 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.039 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 40 분간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.008 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

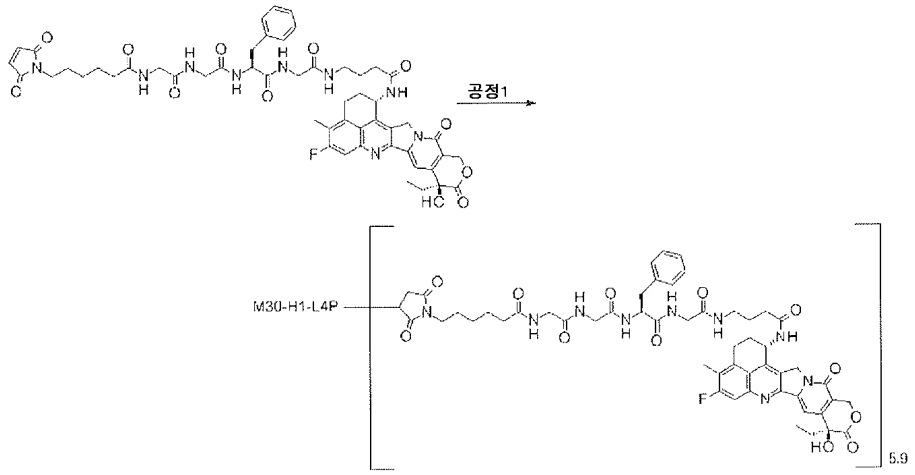
[0994] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[0995] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[0996] 항체 농도 : 13.02 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.1 mg (73 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[0997] 실시예 3 항체-약물 콘주게이트 (2)

[0998] [화학식 72]



[0999]

[1000] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (2)

[1001] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (4.0 mℓ) 을 15 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.118 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.200 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1002] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.236 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.00471 mℓ) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

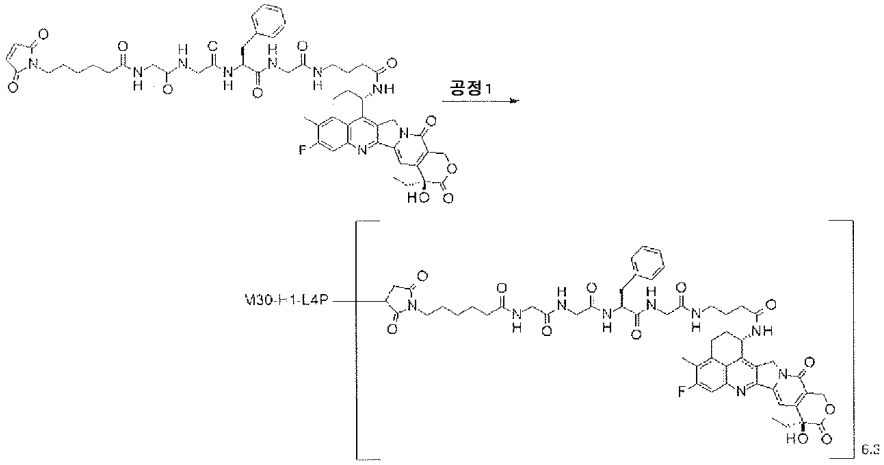
[1003] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 17.5 mℓ 얻었다.

[1004] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1005] 항체 농도 : 1.80 mg/mℓ, 항체 수량 : 26.1 mg (65 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.9

[1006] 실시예 4 항체-약물 콘주게이트 (3)

[1007] [화학식 73]



[1008]

[1009] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (3)

[1010] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 를 사용하여, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하고, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 0.051 mℓ (항체 1 분자에 대해 6.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1011] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.067 mℓ) 와 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.085 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 10.0 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 60 분간 교반하고, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.013 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

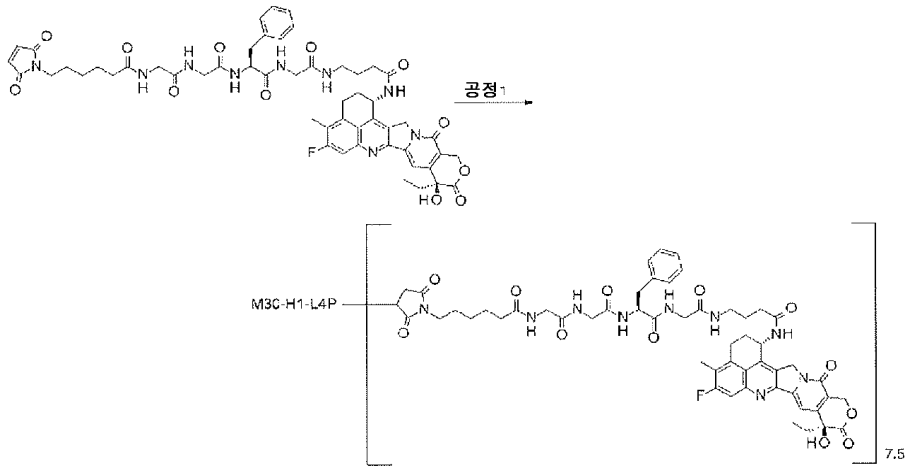
[1012] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1013] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서 $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1014] 항체 농도 : 1.67 mg/mℓ, 항체 수량 : 10.02 mg (80 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.3

[1015] 실시예 5 항체-약물 콘주게이트 (4)

[1016] [화학식 74]



[1017]

[1018] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (4)

[1019] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하여, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하고, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.051 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1020] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.025 mℓ) 와 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.127 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 15.0 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 60 분간 교반하고, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.019 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

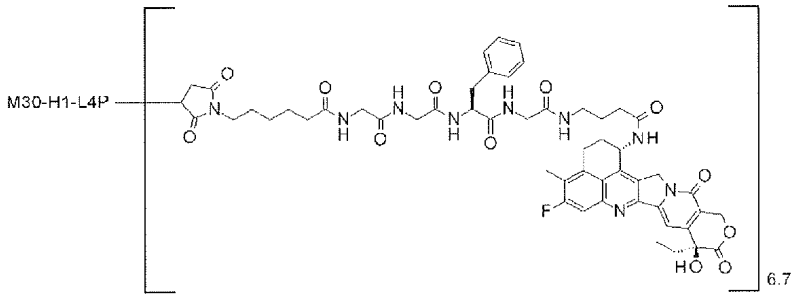
[1021] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1022] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치) , $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1023] 항체 농도 : 1.19 mg/mℓ, 항체 수량 : 7.14 mg (57 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.5

[1024] 실시예 6 항체-약물 콘주게이트 (5)

[1025] [화학식 75]



[1026]

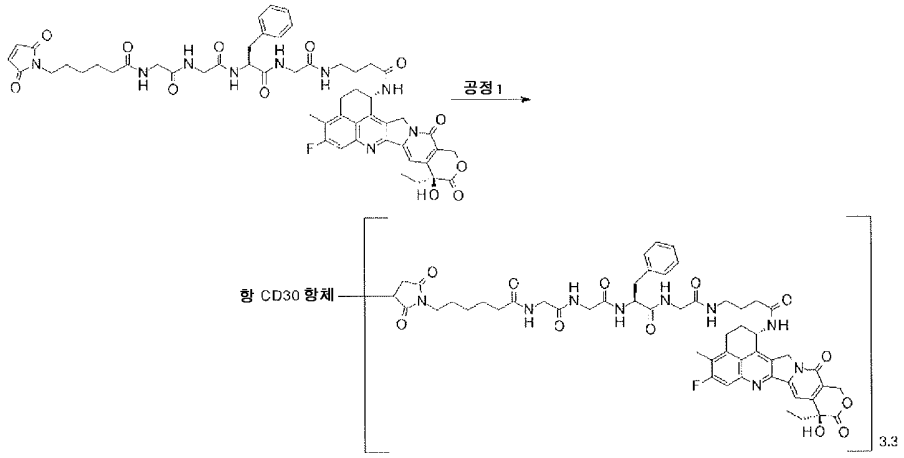
[1027] 실시예 4 와 실시예 5 의 항체-약물 콘주게이트의 거의 전체량을 혼합하고, 공통 조작 A 를 사용하여 용액을 농

축하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1028] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 15.37 mg, 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.7

[1029] 실시예 7 항체-약물 콘주게이트 (6)

[1030] [화학식 76]



[1031]

[1032] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (6)

[1033] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 를 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 2 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 0.0297 mℓ (항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1034] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 10 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0593 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0119 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 18.4 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

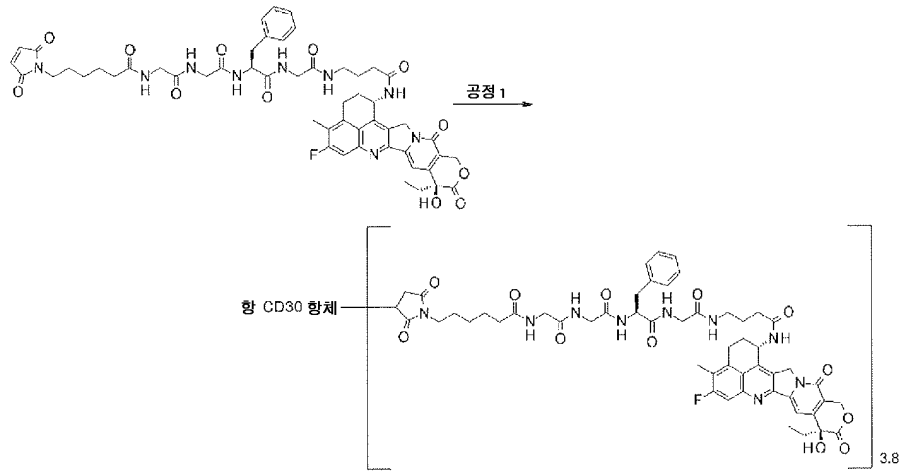
[1035] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1036] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1037] 항체 농도 : 0.99 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.94 mg (59 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.3

[1038] 실시예 8 항체-약물 콘주게이트 (7)

[1039] [화학식 77]



[1040]

[1041] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (7)

[1042] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 를 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 2 mℓ 튜브에 채취하고, 30 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0148 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.9 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1043] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 30 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0297 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 13.8 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0178 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 27.6 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

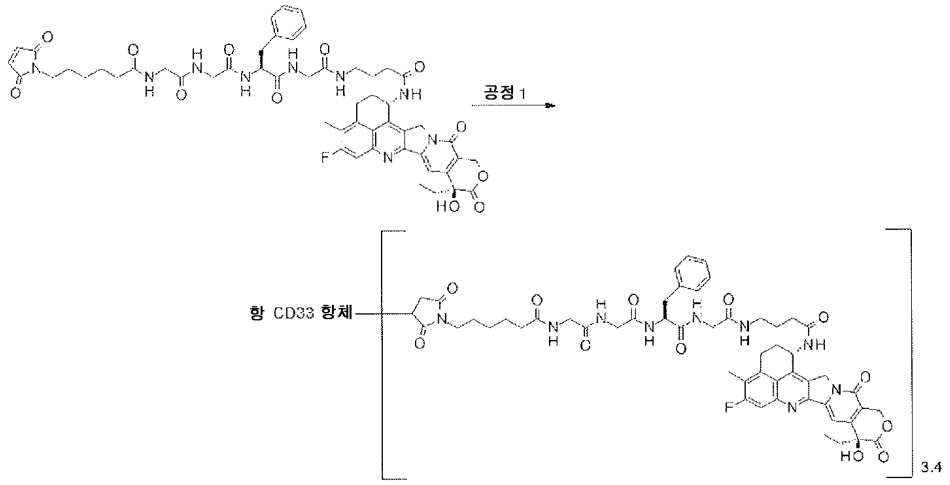
[1044] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1045] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1046] 항체 농도 : 0.99 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.94 mg (59 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.8

[1047] 실시예 9 항체-약물 콘주게이트 (8)

[1048] [화학식 78]



[1049]

[1050] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (8)

[1051] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 2 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0297 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1052] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 10 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0593 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0119 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 18.4 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

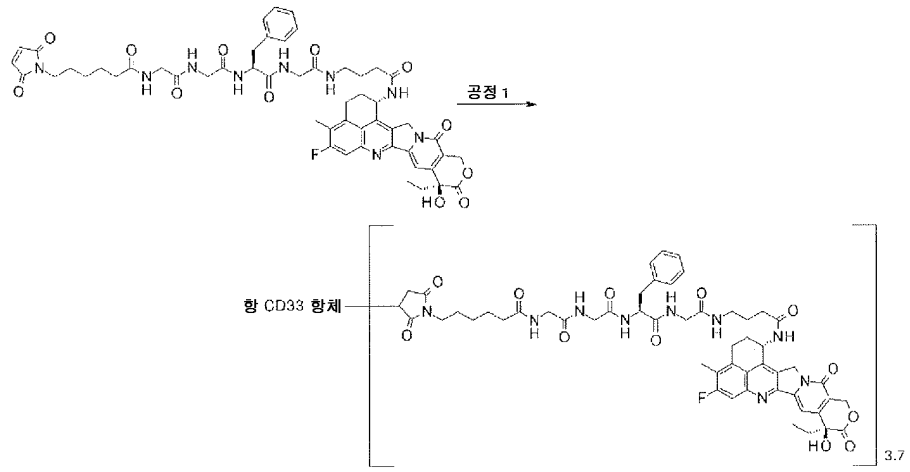
[1053] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1054] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서 $\varepsilon_{A,\,280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1055] 항체 농도 : 1.06 mg/mℓ, 항체 수량 : 6.36 mg (64 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[1056] 실시예 10 항체-약물 콘주게이트 (9)

[1057] [화학식 79]



[1058]

[1059] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (9)

[1060] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 2 mℓ 튜브에 채취하고, 30 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0148 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.9 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1061] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 30 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0297 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 13.8 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0178 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 27.6 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

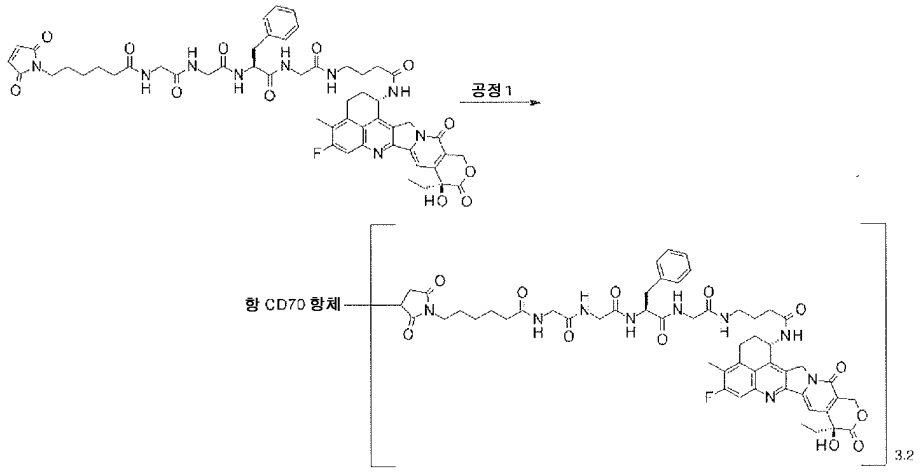
[1062] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1063] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서 $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1064] 항체 농도 : 0.95 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.70 mg (57 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.7

[1065] 실시예 11 항체-약물 콘주게이트 (10)

[1066] [화학식 80]



[1067]

[1068] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (10)

[1069] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 를 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/㎖ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 ㎖) 을 2 ㎖ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0297 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 ㎖) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1070] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 10 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0593 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0119 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 18.4 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

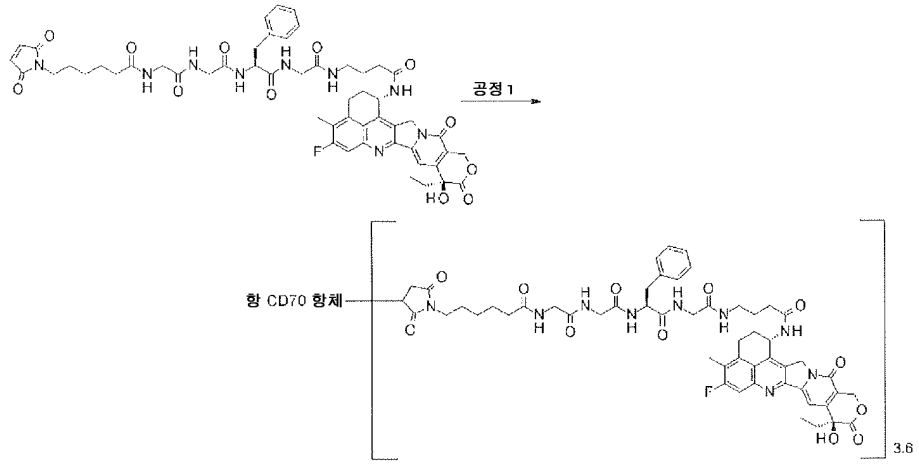
[1071] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 ㎖ 얻었다.

[1072] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서 $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1073] 항체 농도 : 1.00 mg/㎖, 항체 수량 : 6.00 mg (60 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1074] 실시예 12 항체-약물 콘주게이트 (11)

[1075] [화학식 81]



[1076]

[1077] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (11)

[1078] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 를 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 2 mℓ 튜브에 채취하고, 30 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0148 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.9 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1079] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 2 의 공정 3 에서 얻은 화합물 30 mM 디메틸술폭시드 용액 (0.0297 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 13.8 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0178 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 27.6 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

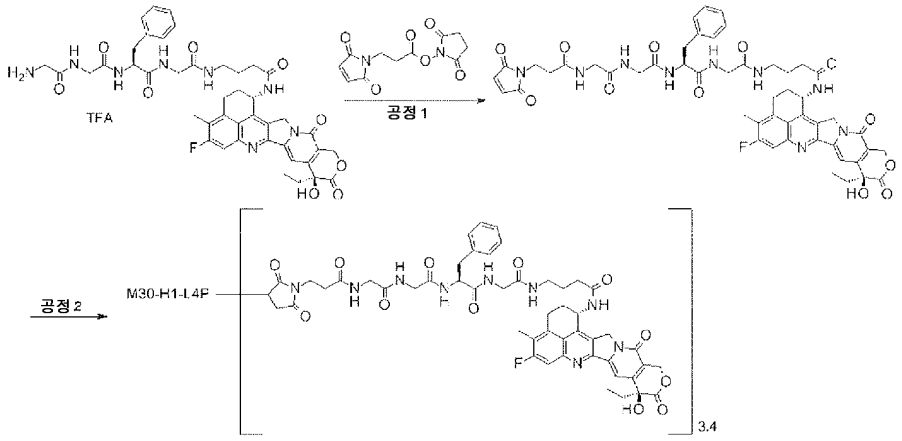
[1080] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1081] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1082] 항체 농도 : 0.96 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.76 mg (58 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.6

[1083] 실시예 13 항체-약물 콘주게이트 (12)

[1084] [화학식 82]



[1085]

[1086] 공정 1 : N-[3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로파노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1087] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (80 mg, 0.084 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 3-말레이미드프로피온산N-숙신이미딜 (24.6 mg, 0.0924 mmol) 을 사용하여, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (60.0 mg, 73 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

[1088] ^{1}H-NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ : 0.89 (3H, t, J=7.3Hz), 1.70-1.78 (2H, m), 1.81-1.94 (2H, m), 2.12-2.23 (4H, m), 2.42 (3H, s), 2.81 (1H, dd, J=13.7, 9.8Hz), 3.01-3.15 (3H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 3.30-3.35 (1H, m), 3.58-3.71 (6H, m), 3.71-3.79 (1H, m), 4.44-4.51 (1H, m), 5.19 (1H, d, J=19.0Hz), 5.27 (1H, d, J=19.0Hz), 5.43 (1H, d, J=17.6Hz), 5.47 (1H, d, J=17.6Hz), 5.57-5.63 (1H, m), 6.56 (1H, s), 7.02 (2H, s), 7.17-7.22 (1H, m), 7.22-7.30 (5H, m), 7.34 (1H, s), 7.73 (1H, t, J=5.6Hz), 7.83 (1H, d, J=10.7Hz), 8.08 (1H, t, J=5.6Hz), 8.15 (1H, d, J=7.8Hz), 8.30 (2H, dt, J=18.7, 5.7Hz), 8.49 (1H, d, J=8.8Hz).
MS (APCI) m/z : 990 $(M+H)^+$

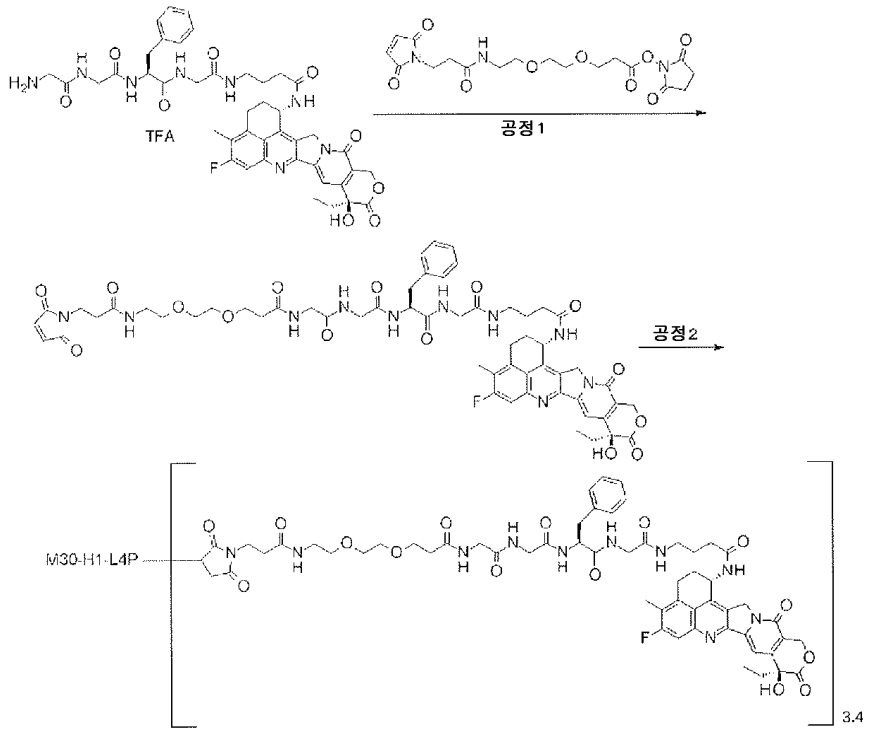
[1089] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (12)

[1090] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 2 의 공정 4 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1091] 항체 농도 : 12.16 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.5 mg (68 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[1092] 실시예 14 항체-약물 콘주게이트 (13)

[1093] [화학식 83]



[1094]

[1095] 공정 1 : N- {3-[2-(2- {[3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로파노일]아미노} 에톡시)에톡시]프로파노일} 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1096] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (100 mg, 0.119 mmol) 을, 트리에틸아민 대신에 디이소프로필에틸아민 (20.8 μℓ, 0.119 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 3-(2-(2-(3-말레인이미드프로판아미드)에톡시)에톡시)프로판산N-숙신이미딜 (50.7 mg, 0.119 mmol) 을 사용하여, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (66.5 mg, 48 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．85（3H，t，J＝7．4Hz），1．65－1．74（2H，m），1．77－1．90（2H，m），2．07－2．19（4H，m），2．30（2H，t，J＝7．2Hz），2．33－2．36（2H，m），2．38（3H，s），2．76（1H，dd，J＝13．7，9．8Hz），2．96－3．18（9H，m），3．42－3．44（4H，m），3．53－3．76（10H，m），4．43（1H，td，J＝8．6，4．7Hz），5．14（1H，d，J＝18．8Hz），5．23（1H，d，J＝18．8Hz），5．38（1H，d，J＝17．2Hz），5．42（1H，d，J＝17．2Hz），5．52－5．58（1H，m），6．52（1H，s），6．98（2H，s），7．12－7．17（1H，m），7．18－7．25（4H，m），7．29（1H，s），7．69（1H，t，J＝5．5Hz），7．78（1H，d，J＝11．3Hz），7．98－8．03（2H，m），8．11（1H，d，J＝7．8Hz），8．16（1H，t，J＝5．7Hz），8．23（1H，t，J＝5．9Hz），8．44（1H，d，J＝9．0Hz）．

MS（APCI）m／z：1149（M＋H）$^+$

[1097]

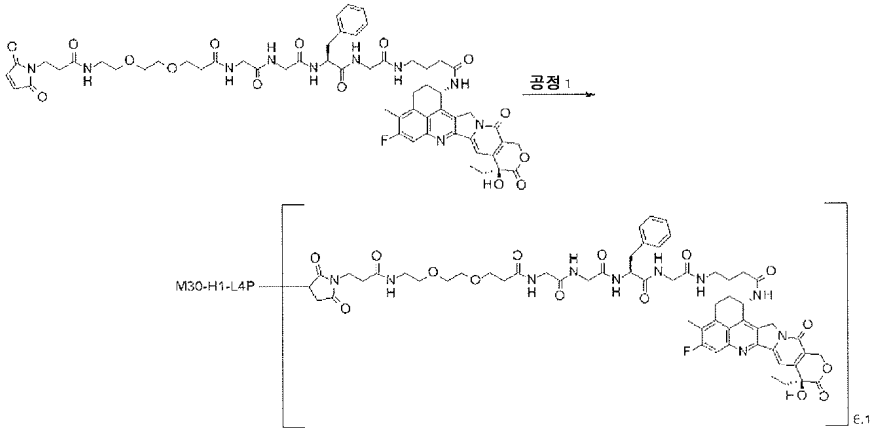
[1098] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (13)

[1099] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 2 의 공정 4 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1100] 항체 농도 : 12.76 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.9 mg (71 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[1101] 실시예 15 항체-약물 콘주게이트 (14)

[1102] [화학식 84]



[1103]

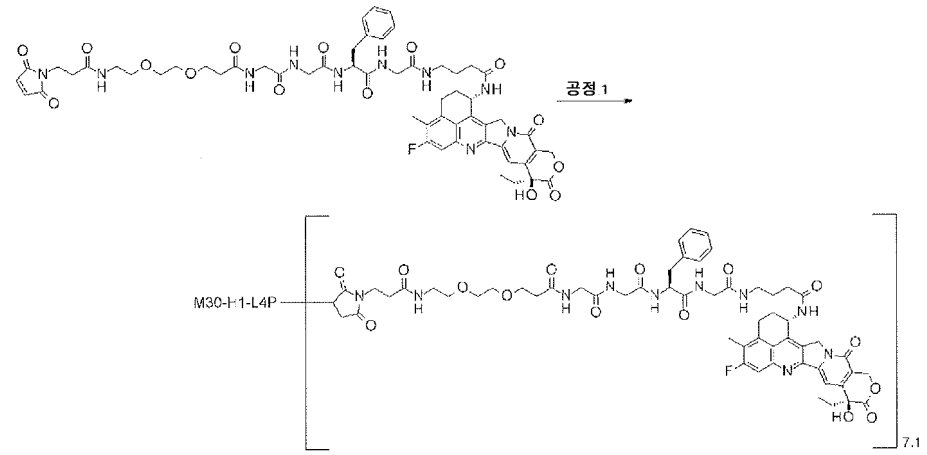
[1104] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (14)

[1105] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 4 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1106] 항체 농도 : 1.60 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.60 mg (77 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.1

[1107] 실시예 16 항체-약물 콘주게이트 (15)

[1108] [화학식 85]



[1109]

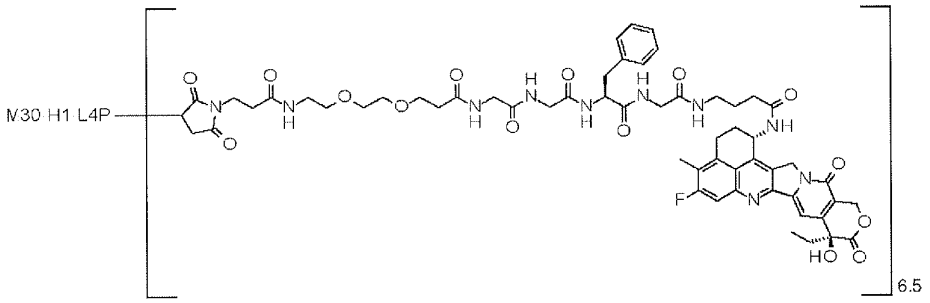
[1110] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (15)

[1111] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 5 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1112] 항체 농도 : 1.64 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.84 mg (79 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.1

[1113] 실시예 17 항체-약물 콘주게이트 (16)

[1114] [화학식 86]



[1115]

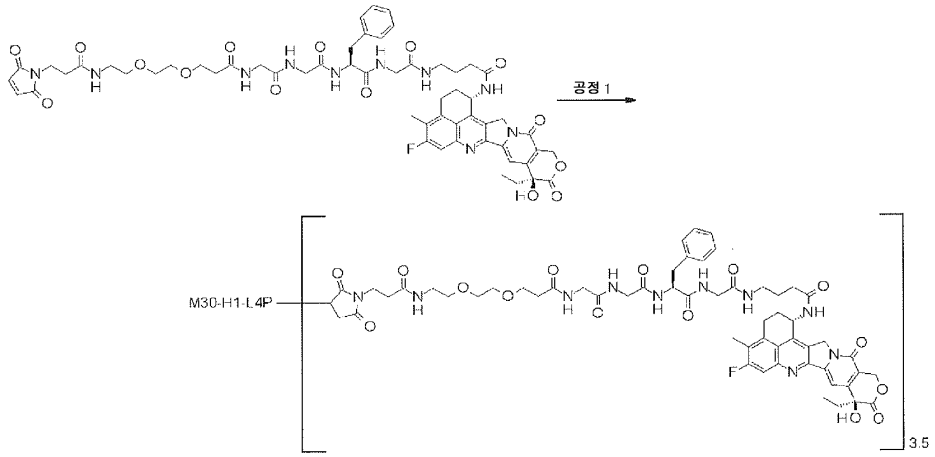
[1116] 실시예 15 와 실시예 16 의 항체-약물 콘주게이트의 거의 전체량을 혼합하고, 공통 조작 A 를 사용하여 용액을 농축하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1117] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 17.30 mg, 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.5

[1118] 실시예 18 항체-약물 콘주게이트 (17)

[1119] [화학식 87]

[1120]



[1121] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (17)

[1122] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (100 mℓ, 항체 1 g) 을 250 mℓ 플라스크에 넣어, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (2.43 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.6 당량) 을 첨가하고, 추가로 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (5 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1123] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (3.51 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 및 디메틸술폭시드 (2.14 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 교반자로 130 분 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.547 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

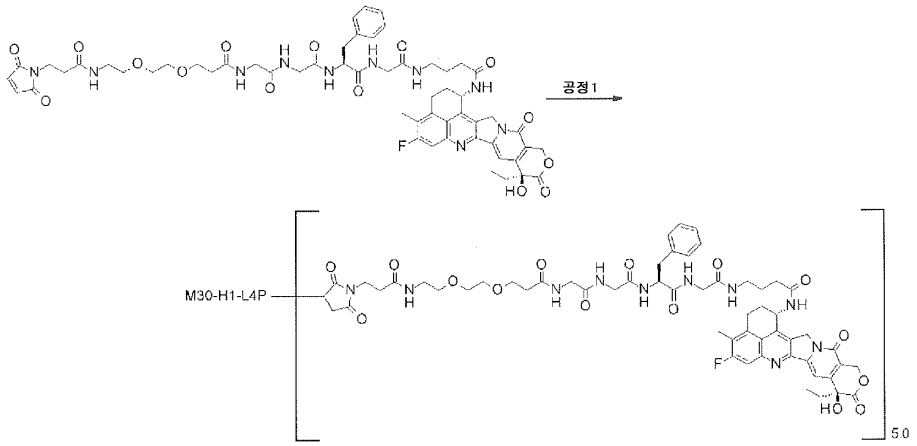
[1124] 정제 : 상기 용액에 대해, 한외 여과막 (머크 주식회사, Pellicon XL Cassette, Biomax 50KDa), 튜브 펌프 (미국 콜 파머사 마스터 플렉스 펌프 model 77521-40, 펌프 헤드 model 7518-00) 및 튜브 (미국 콜 파머사 마스터 플렉스 튜브 L/S16) 로 구성된 한외 여과 장치를 사용하여, 한외 여과 정제를 실시했다. 즉, 반응액에 정제 완충액으로서 ABS 를 적하하면서 (합계 800 mℓ), 한외 여과 정제를 실시함으로써, 미결합의 약물 링커 및 다른 저분자량 시약을 제거함과 함께 완충액을 ABS 로 치환하고, 또한 농축까지 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 약 70 mℓ 얻었다.

[1125] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1126] 항체 농도 : 14.5 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.0 g (약 100 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.5

[1127] 실시예 19 항체-약물 콘주게이트 (18)

[1128] [화학식 88]



[1129]

[1130] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (18)

[1131] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (5 mℓ, 항체 50 mg) 을 15 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.135 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4 당량) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1132] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.219 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.064 mℓ) 를 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 90 분 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.033 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.8 당량) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

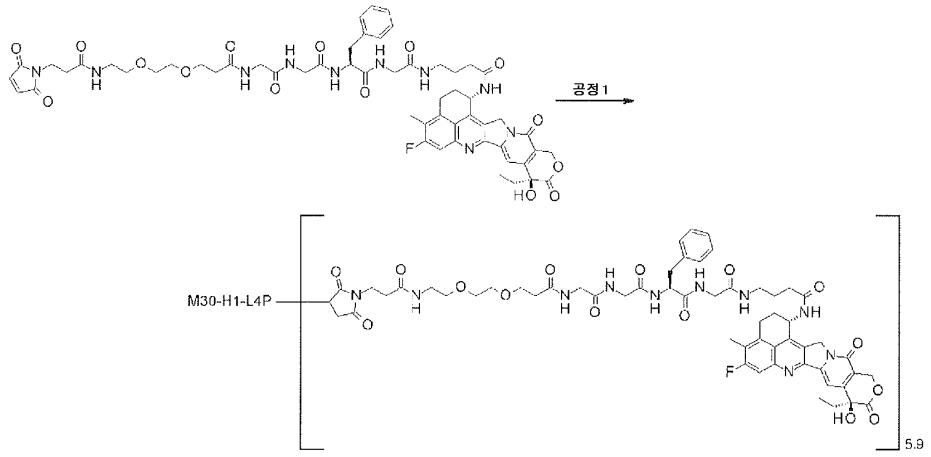
[1133] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 19 mℓ 얻었다.

[1134] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1135] 항체 농도 : 2.17 mg/mℓ, 항체 수량 : 41 mg (82 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.0

[1136] 실시예 20 항체-약물 콘주게이트 (19)

[1137] [화학식 89]



[1138]

[1139] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (19)

[1140] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (4 mℓ, 항체 40 mg) 을 15 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.140 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1141] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.232 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 8.6 당량) 을 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 90 분 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.035 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 12.9 당량) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

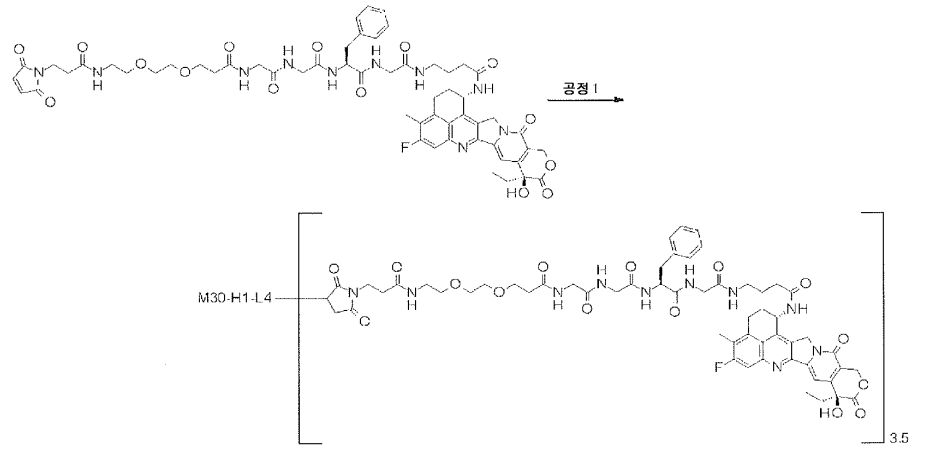
[1142] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 13 mℓ 얻었다.

[1143] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1144] 항체 농도 : 2.36 mg/mℓ, 항체 수량 : 31 mg (77 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.9

[1145] 실시예 21 항체-약물 콘주게이트 (20)

[1146] [화학식 90]



[1147]

[1148] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (20)

[1149] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1150] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0267 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0066 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

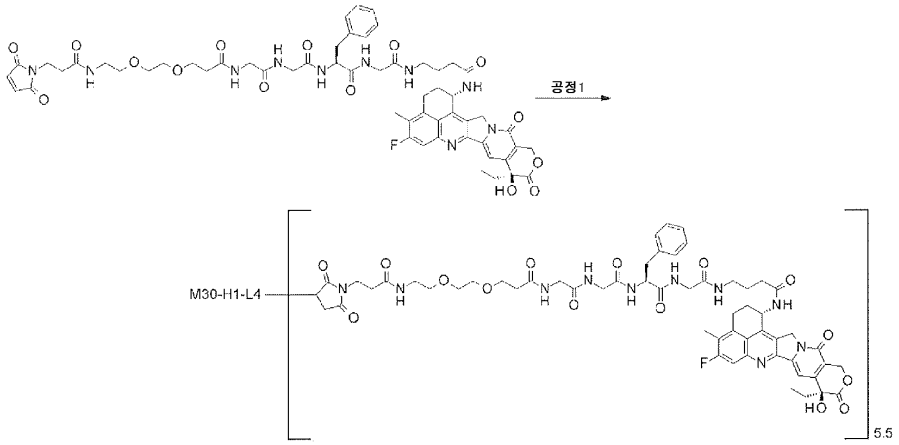
[1151] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1152] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1153] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.7 mg (70 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.5

[1154] 실시예 22 항체-약물 콘주게이트 (21)

[1155] [화학식 91]



[1156]

[1157] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (21)

[1158] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1159] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0726 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 8.6 당량) 을 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.011 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

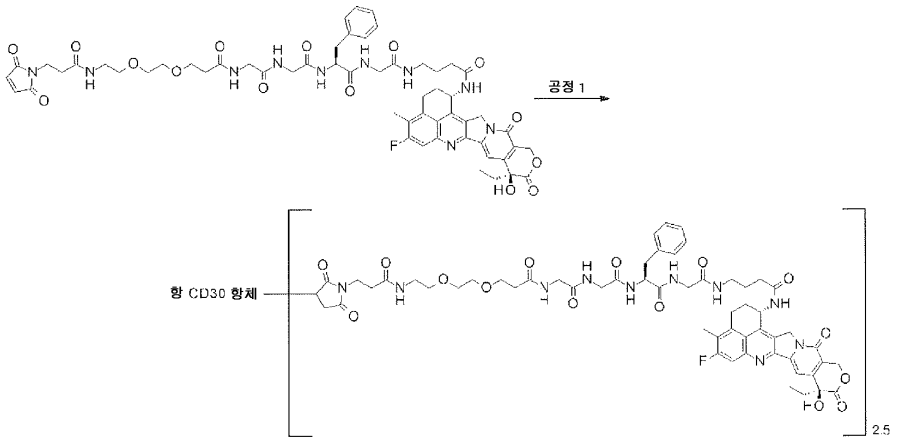
[1160] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 ㎖ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1161] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1162] 항체 농도 : 10.0 mg/㎖, 항체 수량 : 8.3 mg (66 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.5

[1163] 실시예 23 항체-약물 콘주게이트 (22)

[1164] [화학식 92]



[1165]

[1166] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (22)

[1167] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 ㎖$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/㎖ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 ㎖, 항체 4 mg) 을 1.5 ㎖ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 을 첨가하여, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1168] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0098 ㎖) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 ㎖) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

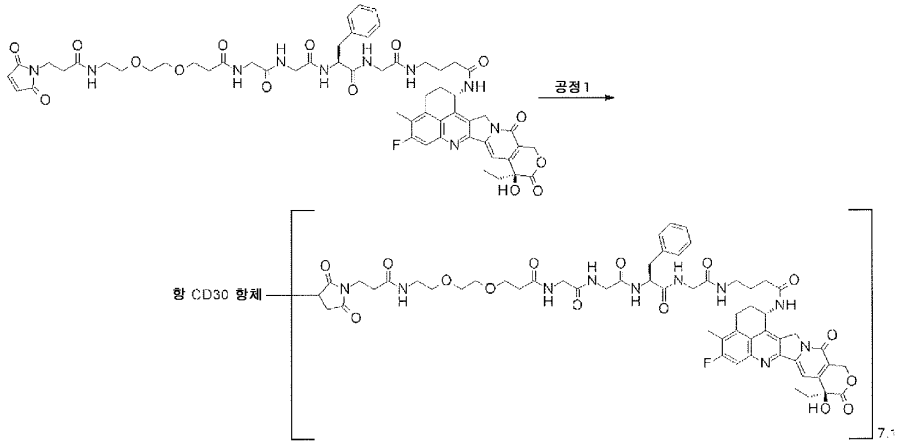
[1169] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 ㎖ 얻었다.

[1170] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1171] 항체 농도 : 0.86 mg/㎖, 항체 수량 : 2.2 mg (54 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 2.5

[1172] 실시예 24 항체-약물 콘주게이트 (23)

[1173] [화학식 93]



[1174]

[1175] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (23)

[1176] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.35 mℓ, 항체 3.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0113 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 을 첨가하여, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1177] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0204 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 및 프로필렌글리콜 (칸토 화학 주식회사, 0.18 mℓ) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0031 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

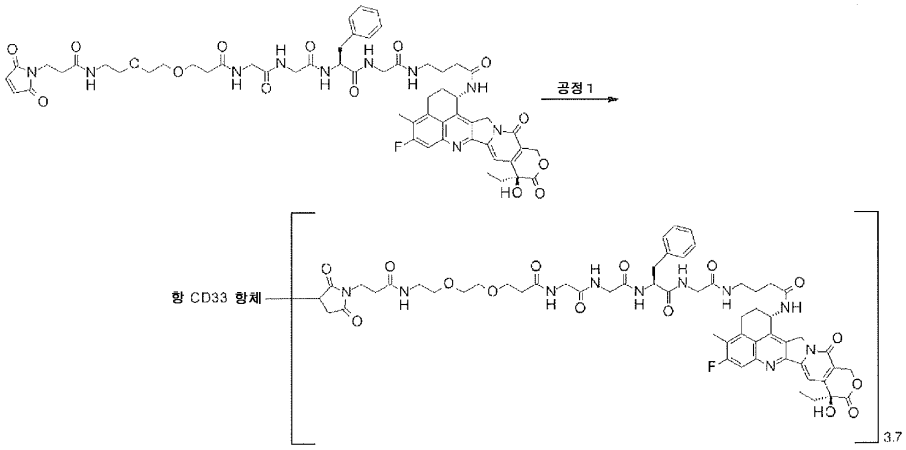
[1178] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1179] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1180] 항체 농도 : 0.41 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.0 mg (29 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.1

[1181] 실시예 25 항체-약물 콘주게이트 (24)

[1182] [화학식 94]



[1183]

[1184] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (24)

[1185] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0058 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1186] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0101 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

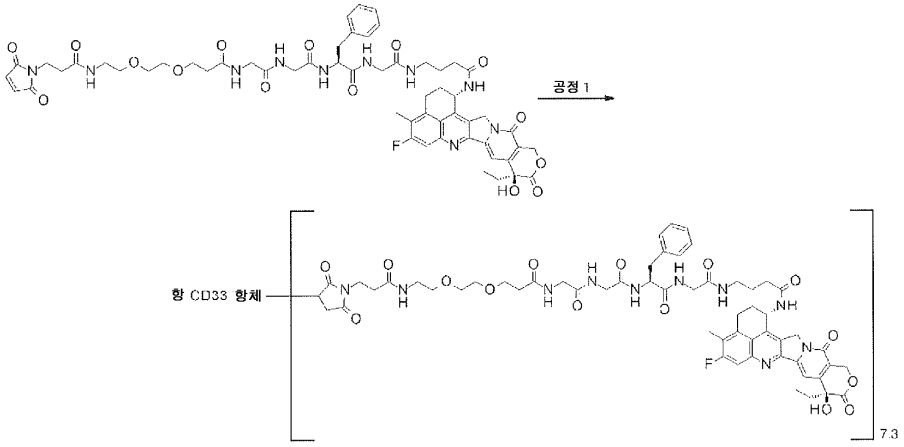
[1187] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1188] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1189] 항체 농도 : 1.25 mg/mℓ, 항체 수량 : 3.1 mg (78 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.7

[1190] 실시예 26 항체-약물 콘주게이트 (25)

[1191] [화학식 95]



[1192]

[1193] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (25)

[1194] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0129 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.006 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1195] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0233 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0035 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

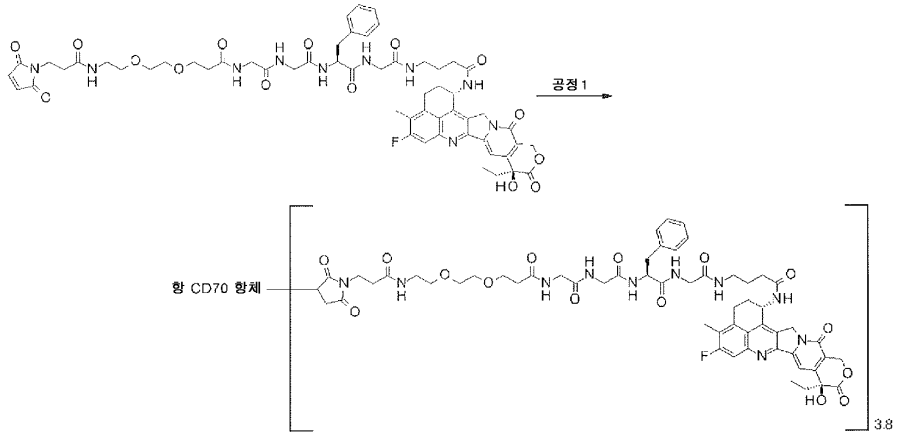
[1196] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1197] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1198] 항체 농도 : 1.17 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.9 mg (73 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.3

[1199] 실시예 27 항체-약물 콘주게이트 (26)

[1200] [화학식 96]

[1201]


[1202] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (26)

[1203] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 $m\ell mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0058 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1204] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0101 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

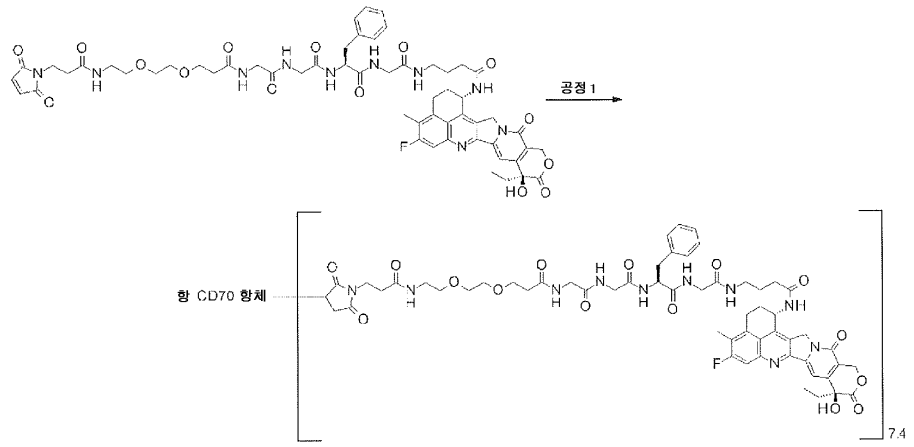
[1205] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1206] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1207] 항체 농도 : 1.14 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.9 mg (71 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.8

[1208] 실시예 28 항체-약물 콘주게이트 (27)

[1209] [화학식 97]



[1210]

[1211] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (27)

[1212] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0129 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.006 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1213] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 14 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0233 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0035 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

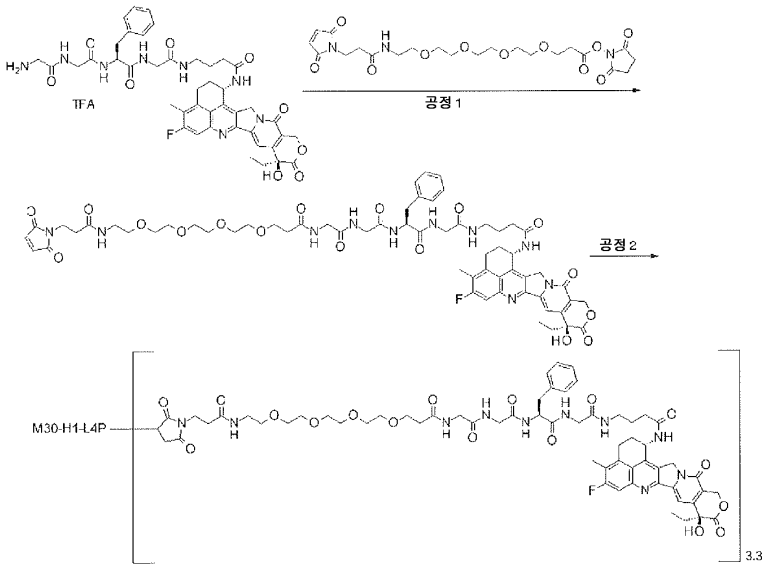
[1214] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1215] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 4964 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 18982 (실측치) 를 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1216] 항체 농도 : 1.13 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.8 mg (71 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.4

[1217] 실시예 29 항체-약물 콘주게이트 (28)

[1218] [화학식 98]



[1219]

[1220] 공정 1 : N-[19-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-17-옥소-4,7,10,13-테트라옥소-16-아자노나데칸-1-오일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1221] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (90 mg, 0.107 mmol) 을, 트리에틸아민 대신에 디이소프로필에틸아민 (18.7 ㎕, 0.107 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 1-말레인이미드-3-옥소-7,10,13,16-테트라옥사-4-아자노나데칸-19-산N-숙신이미딜 (55.1 mg, 0.107 mmol) 을 사용하고, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (50 mg, 37 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0.85 (3H, t, J＝7.2Hz), 1.64－1.74 (2H, m), 1.77－1.90 (2H, m), 2.06－2.19 (4H, m), 2.27－2.32 (2H, m), 2.33－2.37 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.72－2.80 (3H, m), 2.96－3.19 (6H, m), 3.39－3.48 (10H, m), 3.52－3.75 (10H, m), 4.39－4.48 (1H, m), 5.14 (1H, d, J＝18.8Hz), 5.23 (1H, d, J＝18.8Hz), 5.38 (1H, d, J＝17.0Hz), 5.42 (1H, d, J＝17.0Hz), 5.52－5.58 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (1H, s), 7.13－7.24 (5H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t, J＝5.5Hz), 7.78 (1H, d, J＝10.9Hz), 7.98－8.03 (2H, m), 8.10 (1H, d, J＝7.8Hz), 8.16 (1H, t, J＝5.7Hz), 8.23 (1H, t, J＝5.7Hz), 8.44 (1H, d, J＝8.6Hz).

[1222] MS (APCI) m／z：1237 $(M+H)^+$

[1223] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (28)

[1224] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm

흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.025 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1225] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.102 mℓ) 와 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.047 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.5 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 40 분간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.009) mℓ 를 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

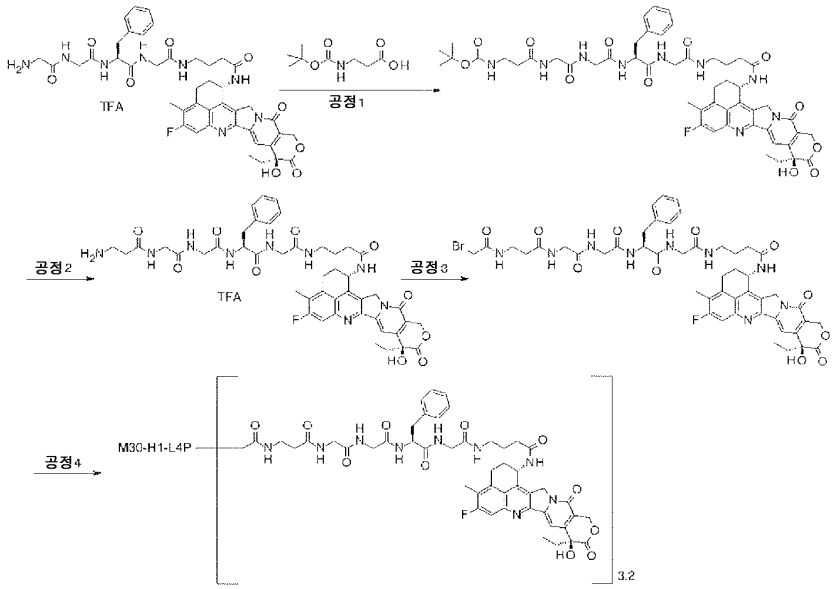
[1226] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1227] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1228] 항체 농도 : 13.60 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.5 mg (76 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.3

[1229] 실시예 30 항체-약물 콘주게이트 (29)

[1230] [화학식 99]



[1231]

[1232] 공정 1 : N-(tert-부톡시카르보닐)-β-알라닐글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1233] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (0.839 g, 1.00 mmol) 을, 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 대신에 N-(tert-부톡시카르보닐)-β-알라닌을 사용하여 실시예 1 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 얻어진 미정제 생성물을 정제하지 않고 다음의 공정에 사용했다.

[1234] 공정 2 : β-알라닐글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1235] 상기 공정 1 에서 얻은 미정제 생성물을, 실시예 2 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.610 g, 67

%) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 67－1. 77 (2H, m), 1. 79－1. 92 (2H, m), 2. 09－2. 22 (4H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 46－2. 55 (2H, m), 2. 82－2. 73 (1H, m), 2. 95－3. 13 (5H, m), 3. 14－3. 21 (2H, m), 3. 55－3. 80 (6H, m), 4. 44－4. 52 (1H, m), 5. 20 (2H, dd, J＝35. 0, 19. 0Hz), 5. 42 (2H, s), 5. 53－5. 60 (1H, m), 6. 54 (1H, s), 7. 14－7. 28 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 67 (2H, brs), 7. 72－7. 78 (1H, m), 7. 80 (1H, d, J＝11. 0Hz), 8. 10－8. 17 (2H, m), 8. 29 (1H, t, J＝5. 9Hz), 8. 42 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 47 (1H, d, J＝8. 6Hz).

[1236]

[1237] 공정 3 : N-(브로모아세틸)-β-알라닐글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1238] 2-브로모아세트산 (96.3 mg, 0.693 mmol) 의 디클로로메탄 (4.5 mℓ) 용액에, N-하이드록시숙신이미드 (79.7 mg, 0.693 mmol), 1,3-디이소프로필카르보디이미드 (0.107 mℓ, 0.693 mmol) 를 첨가하여 실온에서 교반했다. 반응 용액을, 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (473 mg, 0.462 mmol), 트리에틸아민 (0.154 mℓ, 1.11 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (4.5 mℓ) 용액에 0 ℃ 에서 첨가하여, 실온에서 1 시간 교반했다. 반응 용액을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [용출 용매 : 클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 85 : 15 (v/v)] 로 정제하고, 얻어진 고체를 클로로포름 : 메탄올 : 디에틸에테르 혼합 용매로 세정함으로써, 표기 화합물 (191 mg, 40 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 67－1. 77 (2H, m), 1. 79－1. 92 (2H, m), 2. 08－2. 22 (4H, m), 2. 33 (2H, t, J＝7. 0Hz), 2. 40 (3H, s), 2. 74－2. 83 (1H, m), 2. 99－3. 12 (3H, m), 3. 14－3. 21 (2H, m), 3. 24－3. 30 (2H, m), 3. 56－3. 77 (6H, m), 3. 82 (2H, s), 4. 41－4. 51 (1H, m), 5. 20 (2H, q, J＝18. 9Hz), 5. 42 (2H, s), 5. 54－5. 60 (1H, m), 6. 54 (1H, s), 7. 15－7. 27 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 69－7. 74 (1H, m), 7. 80 (1H, d, J＝10. 9Hz), 8. 06 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 13 (1H, d, J＝7. 8Hz), 8. 21－8. 34 (3H, m), 8. 46 (1H, d, J＝8. 6Hz).

MS (ESI) m／z：1030, 1032 $(M+H)^+$

[1239]

[1240] 공정 4 : 항체-약물 콘주게이트 (29)

[1241] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.025 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1242] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.09 mℓ) 와 상기 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.059 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 7.0 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 40 분간 교반하고, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.009 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

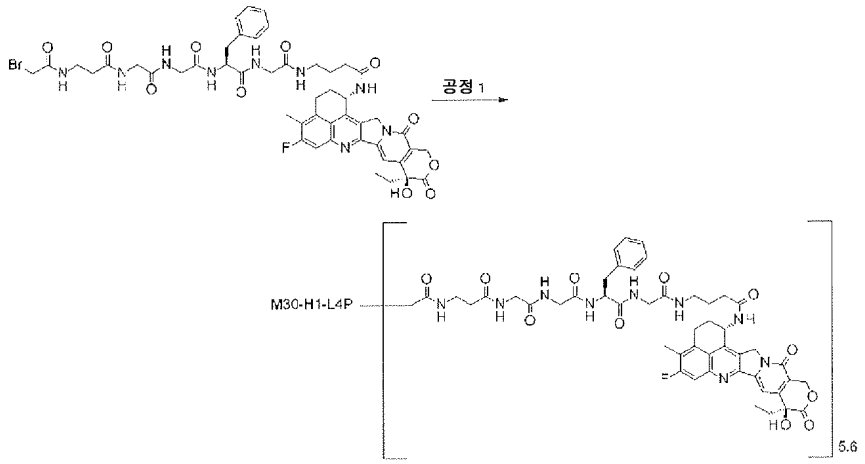
[1243] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1244] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1245] 항체 농도 : 13.9 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.7 mg (78 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1246] 실시예 31 항체-약물 콘주게이트 (30)

[1247] [화학식 100]

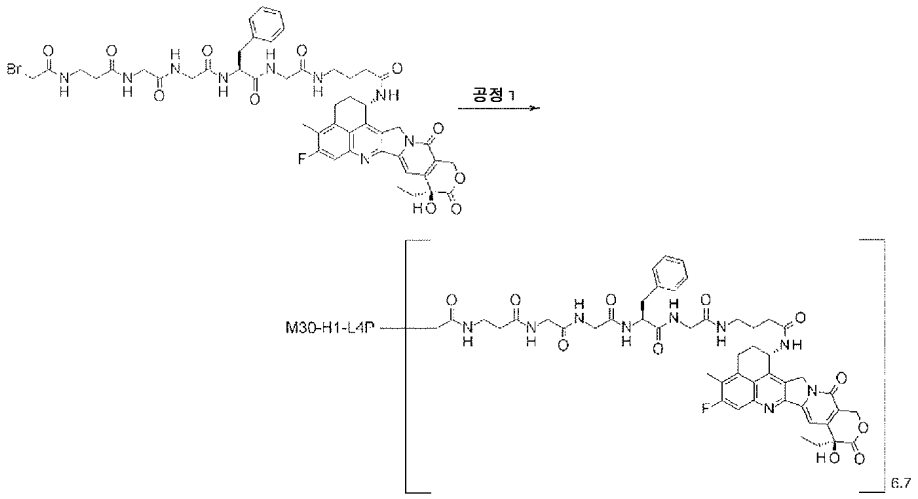
[1248] 

[1249] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 30 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 4 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1250] 항체 농도 : 1.94 mg/mℓ, 항체 수량 : 11.64 mg (93 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.6

[1251] 실시예 32 항체-약물 콘주게이트 (31)

[1252] [화학식 101]



[1253]

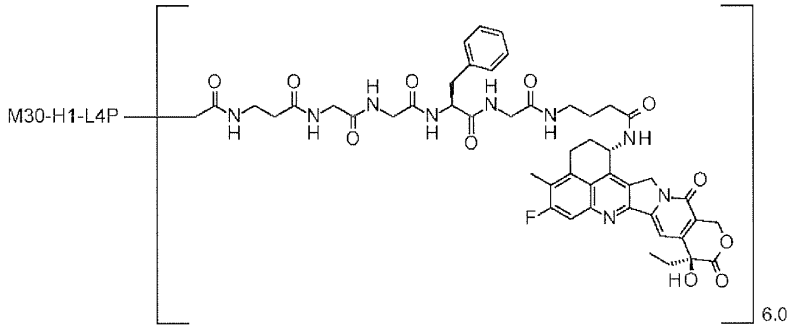
[1254] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (31)

[1255] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 30 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 5 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1256] 항체 농도 : 1.90 mg/㎖, 항체 수량 : 11.40 mg (91 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.7

[1257] 실시예 33 항체-약물 콘주게이트 (32)

[1258] [화학식 102]



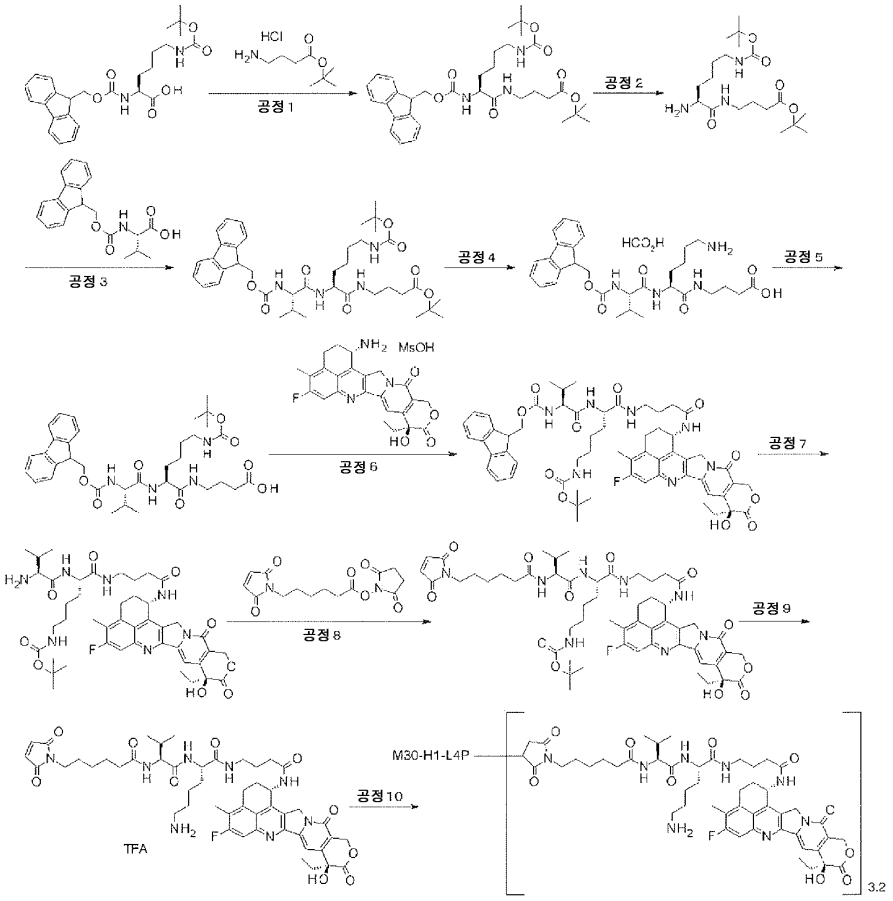
[1259]

[1260] 실시예 31 과 실시예 32 의 항체-약물 콘주게이트의 거의 전체량을 혼합하고, 공통 조작 A 를 사용하여 용액을 농축하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1261] 항체 농도 : 10.0 mg/㎖, 항체 수량 : 21.06 mg, 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.0

[1262] 실시예 34 항체-약물 콘주게이트 (33)

[1263] [화학식 103]



[1264]

[1265] 공정 1 : tert-부틸4-({N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N^2-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-리실} 아미노)부타노에이트

[1266] N^{ε}-(tert-부톡시카르보닐)-N^{α}-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-리신 (1.00 g, 2.14 mmol), N-하이드록시숙신이미드 (0.370 g, 3.20 mmol), 및 tert-부틸4-아미노부탄산에스테르염산염 (0.830 g, 4.27 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (10.0 mℓ) 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염 (0.610 g, 3.20 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (0.410 mℓ, 2.35 mmol) 을 첨가하여, 실온에서 3 일간 교반했다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 10 % 시트르산 수용액, 포화 탄산수소나트륨 수용액, 및 포화 식염수로 세정 후, 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 감압하 용매를 증류 제거하여, 표기 화합물 (1.35 g, 정량적) 을 무색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：1.14－1.42 (4H, m), 1.36 (9H, s), 1.37 (9H, s), 1.48－1.67 (4H, m), 2.18 (2H, t, J＝7.6Hz), 2.84－2.93 (2H, m), 2.99－3.11 (2H, m), 3.84－3.94 (1H, m), 4.18－4.30 (3H, m), 6.76 (1H, t, J＝5.4Hz), 7.33 (2H, t, J＝7.3Hz), 7.39－7.45 (3H, m), 7.73 (2H, dd, J＝7.3, 2.7Hz), 7.85－7.92 (3H, m).

[1267]

[1268] 공정 2 : tert-부틸4- {[N^6-(tert-부톡시카르보닐)-L-리실]아미노} 부타노에이트

[1269] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (1.35 g, 2.22 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (8.00 mℓ) 용액에, 피페리딘 (2.00 mℓ) 을 첨가하여, 실온에서 1.5 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하여, 표기 화합물을 포함하는 혼합물을 얻었다. 본 혼합물은 더 이상의 정제는 실시하지 않고 다음의 반응에 사용했다.

[1270] 공정 3 : N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-발릴-N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N-(4-tert-부톡시-4-옥소부틸)-L-리신아미드

[1271] 상기 공정 2 에서 얻은 혼합물 (2.22 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (30.0 mℓ) 용액에, N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-발린 (1.13 g, 3.32 mmol), N-하이드록시숙신이미드 (0.310 g, 2.66 mmol), 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염 (0.550 g, 2.88 mmol) 을 첨가하여 실온에서 18 시간 교반했다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 포화 탄산수소나트륨 수용액 및 포화 식염수로 세정 후, 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 감압하 용매를 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 9 : 1 (v/v)] 로 정제하여, (0.363 g, 23 %) 를 무색 고체로서 얻었다.

[1272] ^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．84（6H，t，J＝6．0Hz），1．12－1．64（8H，m），1．34（9H，s），1．38（9H，s），1．90－2．04（1H，m），2．17（2H，t，J＝7．3Hz），2．79－2．90（2H，m），2．99－3．09（2H，m），3．83－3．91（1H，m），4．08－4．44（4H，m），6．71（1H，t，J＝5．4Hz），7．32（2H，t，J＝7．3Hz），7．42（3H，t，J＝7．3Hz），7．74（2H，t，J＝7．0Hz），7．85－7．91（4H，m）．
MS（ESI）m／z：709（M＋H）$^+$

[1273] 공정 4 : N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-발릴-N-(3-카르복시프로필)-L-리신아미드포름산염

[1274] 상기 공정 3 에서 얻은 화합물 (0.363 mg, 0.512 mmol) 에 포름산 (10.0 mℓ) 을 첨가하여 실온에서 4 시간 교반했다. 감압하 용매를 증류 제거하여, 표기 화합물을 얻었다. 본 화합물은 더 이상의 정제는 실시하지 않고 다음의 반응에 사용했다.

[1275] 공정 5 : N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-발릴-N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N-(3-카르복시프로필)-L-리신아미드

[1276] 상기 공정 4 에서 얻은 화합물 (0.512 mmol) 의 1,4-디옥산 (5.00 mℓ) 현탁액에, 포화 탄산수소나트륨 수용액 (20.0 mℓ) 및 디-tert-부틸디카르보네이트 (0.178 mℓ, 0.769 mmol) 를 첨가하여 실온에서 3 시간 교반했다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 10 % 시트르산 수용액 및 포화 식염수로 세정 후, 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 감압하 용매를 증류 제거하여, 표기 화합물 (0.295 g, 88 %) 을 무색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．84（6H，t，J＝6．7Hz），1．13－1．39（4H，m），1．35（9H，s），1．48－1．62（4H，m），1．91－2．04（1H，m），2．20（2H，t，J＝7．3Hz），2．80－2．89（2H，m），2．99－3．11（2H，m），3．87（1H，dd，J＝8．5，6．7Hz），4．06－4．35（4H，m），6．71（1H，t，J＝6．0Hz），7．32（2H，t，J＝7．6Hz），7．39－7．46（3H，m），7．74（2H，t，J＝7．6Hz），7．83－7．94（4H，m）．

[1277] MS（ESI）m／z：653（M＋H）$^+$

[1278] 공정 6 :

[1279] N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-L-발릴-N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)-L-리신아미드

[1280] 화합물 (4) 의 메실산염 (0.240 g, 0.452 mmol) 을, 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 대신에 상기 공정 5 에서 얻은 화합물 (0.295 g, 0.452 mmol) 을 사용하고, 실시예 1 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.208 g, 43 %) 을 담등색 고체로서 얻었다.

[1281] MS(ESI)m/z : 1071$(M+H)^+$

[1282] 공정 7 : L-발릴-N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)-L-리신아미드

[1283] 상기 공정 6 에서 얻은 화합물 (0.208 g, 0.194 mmol) 을, 상기 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물을 포함하는 혼합물을 얻었다. 본 혼합물은 더 이상의 정제는 실시하지 않고 다음의 반응에 사용했다.

[1284] 공정 8 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N^6-(tert-부톡시카르보닐)-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)-L-리신아미드

[1285] 상기 공정 7 에서 얻은 혼합물 (0.194 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.133 g, 56 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．77（6H，t，J＝5．7Hz），0．87（3H，t，J＝7．3Hz），1．14－1．71（10H，m），1．35（9H，s），1．77－1．95（3H，m），2．02－2．23（7H，m），2．40（3H，s），2．84（3H，q，J＝6．4Hz），3．05（2H，d，J＝6．7Hz），3．17（2H，s），3．26－3．39（3H，m），4．01－4．16（2H，m），5．15（1H，d，J＝18．7Hz），5．24（1H，d，J＝18．7Hz），5．36－5．48（2H，m），5．51－5．60（1H，m），6．52（1H，s），6．72（1H，t，J＝6．0Hz），6．99（2H，s），7．31（1H，s），7．71－7．85（5H，m），8．41（1H，d，J＝9．1Hz）．

[1286] MS（ESI）m／z：1041（M＋H）$^+$

[1287] 공정 9 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)-L-리신아미드트리플루오로아세트산염

[1288] 상기 공정 8 에서 얻은 화합물 (0.110 mg, 0.106 mmol) 의 디클로로메탄 (10.0 mℓ) 용액에, 트리플루오로아세트산 (4.00 mℓ) 을 첨가하여, 실온에서 5 시간 교반했다. 감압하 용매를 증류 제거하여, 표기 화합물 (70.0 mg, 64 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．76－0．81（6H，m），0．87（3H，t，J＝7．3Hz），1．12－1．31（4H，m），1．39－1．56（8H，m），1．57－1．74（3H，m），1．79－1．96（3H，m），2．06－2．18（7H，m），2．40（3H，s），2．70－2．80（2H，m），3．01－3．10（2H，m），3．13－3．22（2H，m），4．04（1H，t，J＝7．6Hz），4．10－4．20（1H，m），5．15（1H，d，J＝18．7Hz），5．24（1H，d，J＝18．7Hz），5．36－5．47（2H，m），5．52－5．60（1H，m），6．53（1H，s），7．00（2H，s），7．32（1H，s），7．61（3H，brs），7．75－7．88（4H，m），8．43（1H，d，J＝8．5Hz）．

[1289] MS（ESI）m／z：941（M＋H）$^+$

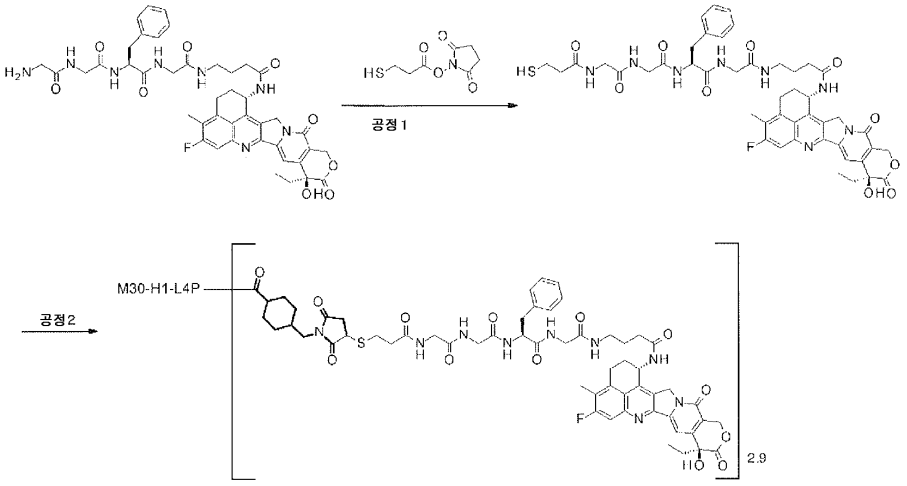
[1290] 공정 10 : 항체-약물 콘주게이트 (33)

[1291] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 9 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 29 의 공정 2 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1292] 항체 농도 : 12.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.4 mg (67 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1293] 실시예 35 항체-약물 콘주게이트 (34)

[1294] [화학식 104]



[1295]

[1296] 공정 1 : N-(3-술파닐프로파노일)글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -4-옥소부틸)글리신아미드

[1297] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (84.0 mg, 0.100 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 3-메르캅토프로피온산N-숙신이미딜을 사용하여 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (61.2 mg, 66 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

[1298] ^{1}H－NMR (DMSO－D_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 77－1. 66 (2H, m), 1. 79－1. 92 (2H, m), 2. 07－2. 24 (4H, m), 2. 31－2. 47 (3H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 59－2. 69 (2H, m), 2. 78 (1H, dd, J＝13. 7, 9. 8Hz), 2. 98－3. 13 (3H, m), 3. 14－3. 23 (2H, m), 3. 54－3. 79 (6H, m), 4. 40－4. 50 (1H, m), 5. 20 (2H, dd, J＝36. 8, 19. 2Hz), 5. 36－5. 47 (2H, m), 5. 52－5. 63 (1H, m), 6. 54 (1H, s), 7. 14－7. 28 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 68－7. 74 (1H, m), 7. 80 (1H, d, J＝10. 9Hz), 8. 03－8. 09 (1H, m), 8. 13 (1H, d, J＝7. 8Hz), 8. 19－8. 29 (2H, m), 8. 46 (1H, d, J＝8. 6Hz).

MS (ESI) m／z：927 $(M+H)^+$

[1299] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (34)

[1300] 항체의 SMCC 유도체화 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 20 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다.

본 용액 (0.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 여기에 succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) 를 27.6 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.0063 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 약 2.55 당량 상당) 을 실온하 첨가하여, 실온에서 2 시간 반응시켰다. 이 반응액을 공통 조작 D-2 를 사용한 정제를 실시하여, SMCC 유도체화된 항체를 약 5 mg 포함하는 용액을 0.7 mℓ 얻었다.

[1301] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, DMSO (0.045 mℓ) 와 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포

함하는 DMSO 용액 (0.015 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 약 2.4 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 16 시간 교반하고, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

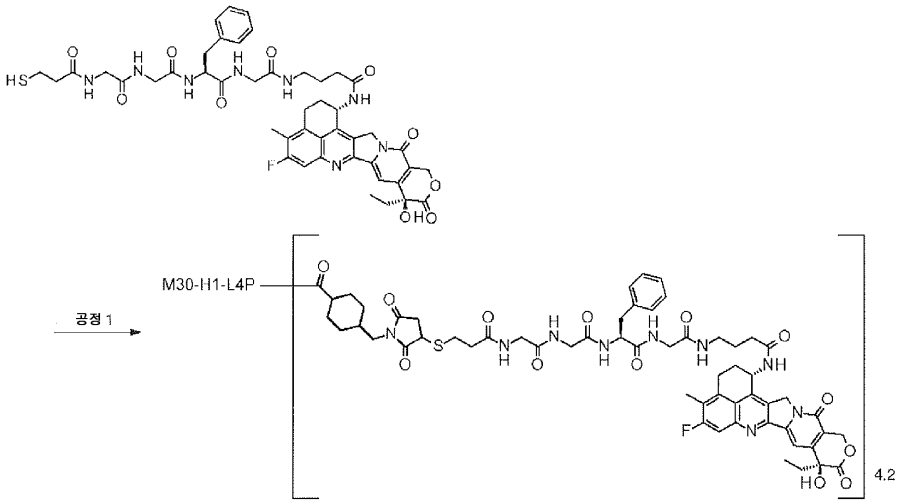
[1302] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 3.5 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1303] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1304] 항체 농도 : 3.85 mg/mℓ, 항체 수량 : 0.8 mg (16 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 2.9

[1305] 실시예 36 항체-약물 콘주게이트 (35)

[1306] [화학식 105]

[1307]


[1308] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (35)

[1309] 항체의 SMCC 유도체화 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓ$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 20 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다.

본 용액 (0.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 여기에 succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) 를 27.6 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.0125 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 약 5.1 당량 상당) 을 실온하 첨가하여, 실온에서 2 시간 반응시켰다. 이 반응액을 공통 조작 D-2 를 사용한 정제를 실시하여, SMCC 유도체화된 항체를 약 5 mg 포함하는 용액을 0.7 mℓ 얻었다.

[1310] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, DMSO (0.03 mℓ) 와 실시예 35 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.03 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 약 4.8 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 16 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

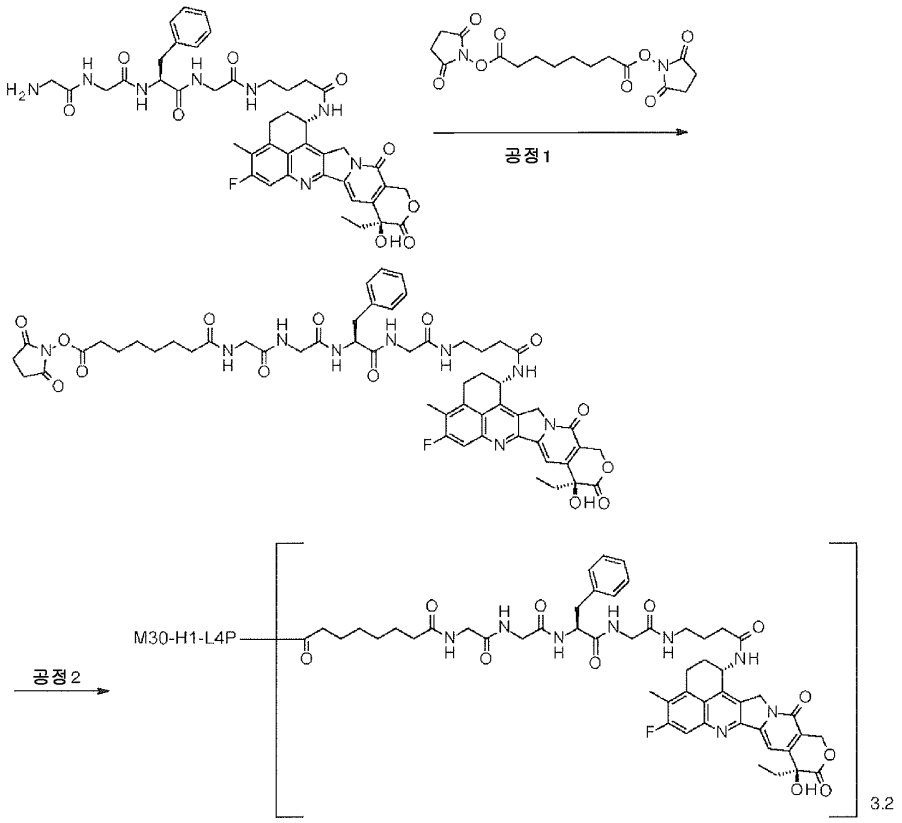
[1311] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 3.5 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1312] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1313] 항체 농도 : 2.43 mg/mℓ, 항체 수량 : 0.5 mg (10 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.2

[1314] 실시예 37 항체-약물 콘주게이트 (36)

[1315] [화학식 106]



[1316]

[1317] 공정 1 : N-{8-[(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시]-8-옥소옥타노일} 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(4-{[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노}-4-옥소부틸)글리신아미드

[1318] 실시예 2 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (84.0 mg, 0.100 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 수베르산디(N-숙신이미딜) 을 사용하여 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (77.1 mg, 71 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2Hz), 1.21-1.38 (4H, m), 1.43-1.50 (2H, m), 1.55-1.63 (2H, m), 1.68-1.76 (2H, m), 1.80-1.91 (2H, m), 2.07-2.22 (6H, m), 2.40 (3H, s), 2.60-2.67 (2H, m), 2.76-2.84 (5H, m), 2.97-3.22 (5H, m), 3.56-3.76 (6H, m), 4.40-4.50 (1H, m), 5.20 (2H, q, J=18.8Hz), 5.37-5.48 (2H, m), 5.53-5.62 (1H, m), 6.54 (1H, s), 7.15-7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, J=5.5Hz), 7.80 (1H, d, J=10.9Hz), 8.04 (1H, t, J=5.9Hz), 8.09 (1H, t, J=5.9Hz), 8.14 (1H, d, J=7.8Hz), 8.26 (1H, t, J=5.9Hz), 8.47 (1H, d, J=8.6Hz).

[1319] MS (ESI) m/z: 1092 $(M+H)^+$

[1320] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (36)

[1321] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 20 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (0.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 여기에, 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 0.025 mℓ (항체 1 분자에 대해 약 3.7 당량 상당) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 16 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

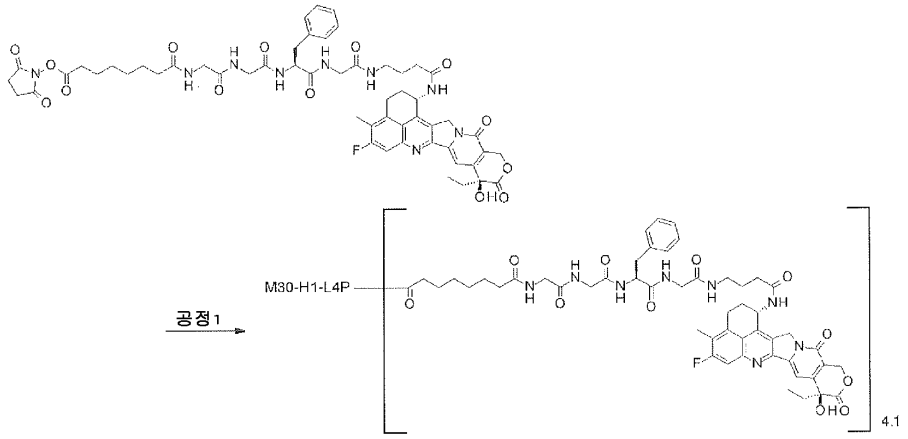
[1322] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 3.5 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1323] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1324] 항체 농도 : 6.25 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.3 mg (26 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1325] 실시예 38 항체-약물 콘주게이트 (37)

[1326] [화학식 107]



[1327]

[1328] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (37)

[1329] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 20 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (0.5 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣은 후, 여기에, DMSO (0.025 mℓ) 와 실시예 37 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.025 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 약 7.4 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 16 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

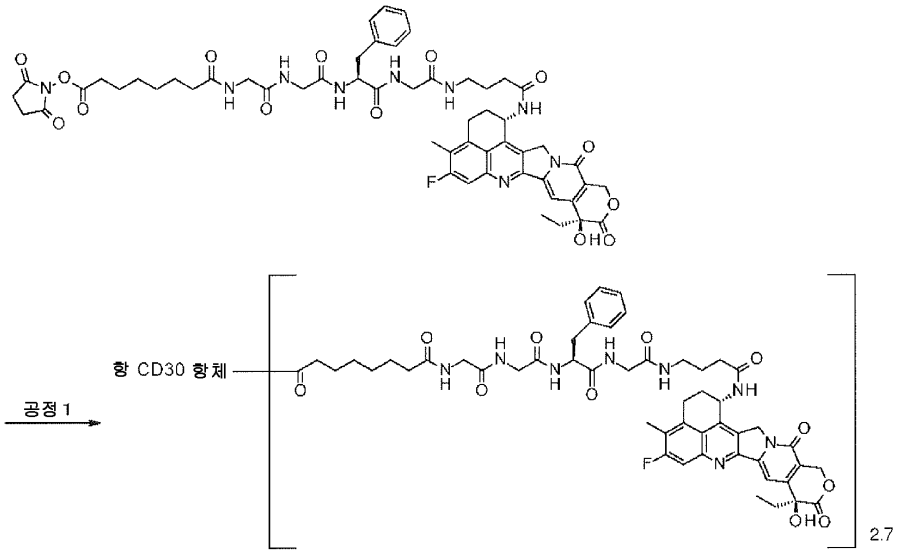
[1330] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 3.5 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1331] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1332] 항체 농도 : 4.36 mg/mℓ, 항체 수량 : 0.9 mg (18 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.1

[1333] 실시예 39 항체-약물 콘주게이트 (38)

[1334] [화학식 108]



[1335]

[1336] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (38)

[1337] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣은 후, 여기에, DMSO (0.017 mℓ) 와 실시예 37 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.023 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 4 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

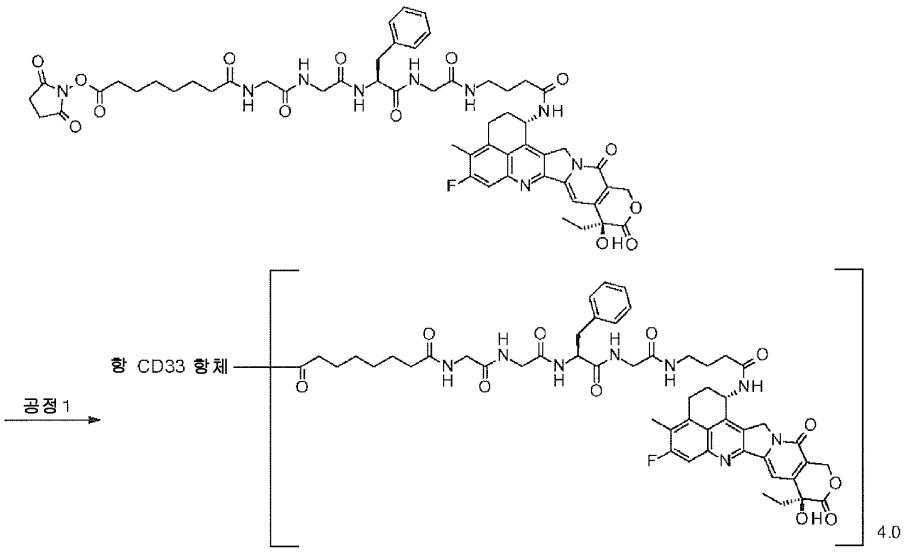
[1338] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1339] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 2670 (실측치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 15820 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1340] 항체 농도 : 0.55 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.4 mg (34 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 2.7

[1341] 실시예 40 항체-약물 콘주게이트 (39)

[1342] [화학식 109]



[1343]

[1344] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (39)

[1345] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣은 후, 여기에, DMSO (0.017 mℓ) 와 실시예 37 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.023 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 4 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

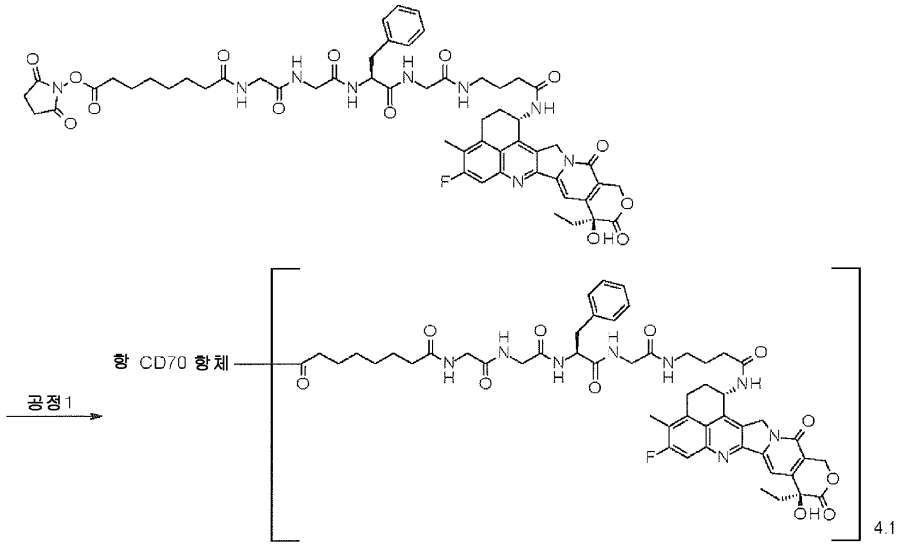
[1346] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1347] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 2670 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 15820 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1348] 항체 농도 : 0.93 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.3 mg (58 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.0

[1349] 실시예 41 항체-약물 콘주게이트 (40)

[1350] [화학식 110]



[1351]

[1352] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (40)

[1353] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 공통 조작 C-2 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 mℓmg^{-1} cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.5/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣은 후, 여기에, DMSO (0.017 mℓ) 와 실시예 37 의 공정 1 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 DMSO 용액 (0.023 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량 상당) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 4 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다.

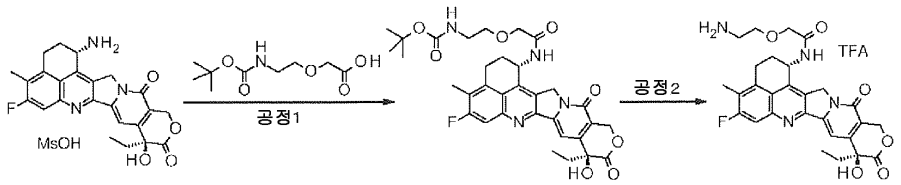
[1354] 정제 : 상기 용액을, 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1355] 특성 평가 : 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 2670 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 15820 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1356] 항체 농도 : 1.04 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.6 mg (65 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.1

[1357] 실시예 42 2-(2-아미노에톡시)-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아세트아미드

[1358] [화학식 111]



[1359]

[1360] 공정 1 : tert-부틸[2-(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)에틸]카르바메이트

[1361] 화합물 (4) 의 메실산염 (3.10 g, 5.47 mol) 을, 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 대신에 {2-[(tert-부톡시카르보닐)아미노]에톡시} 아세트산 (J. Med. Chem., 1992 년, 35 권, 2928 항) (1.55 g, 6.01 mmol) 을 사용하고, 실시예 1 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (2.56 g, 73 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0.87 (3H, t, J＝7.3Hz), 1.26 (9H, s), 1.81－1.91 (2H, m), 2.13－2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 3.08－3.26 (4H, m), 3.43－3.53 (2H, m), 4.00 (1H, d, J＝15.1Hz), 4.05 (1H, d, J＝15.1Hz), 5.14 (1H, d, J＝18.7Hz), 5.22 (1H, d, J＝18.7Hz), 5.40 (1H, d, J＝16.6Hz), 5.44 (1H, d, J＝16.6Hz), 5.59－5.66 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.86 (1H, t, J＝5.4Hz), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d, J＝10.9Hz), 8.49 (1H, d, J＝9.1Hz).

MS (APCI) m／z：637 $(M+H)^+$

[1362]

[1363] 공정 2 : 2-(2-아미노에톡시)-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-

2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아세트아미드

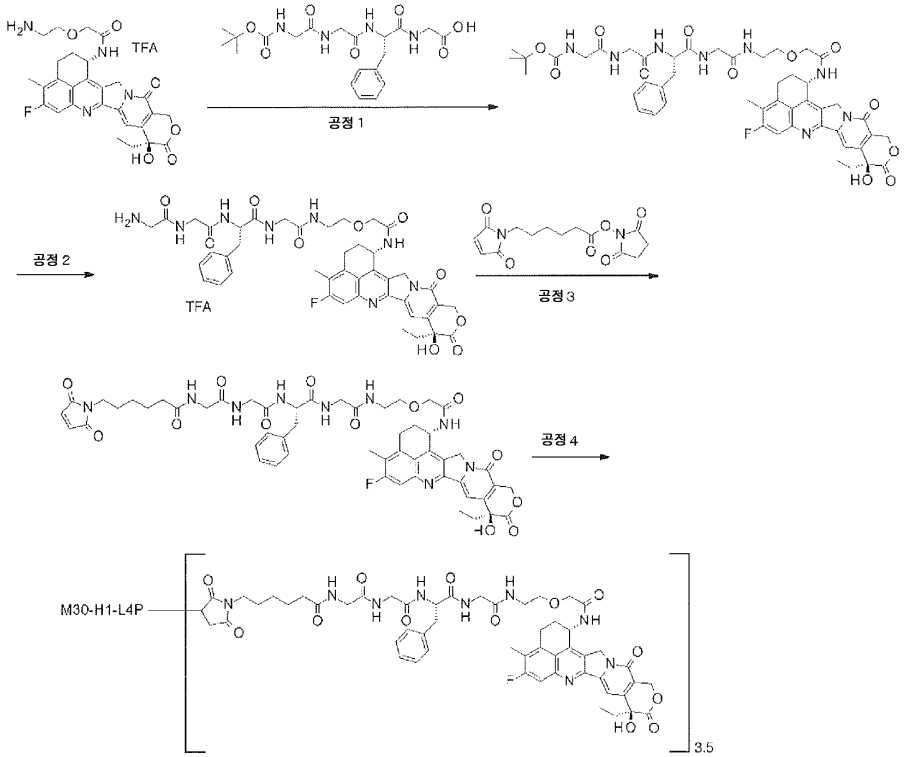
[1364] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (1.50 g, 2.36 mol) 을, 실시예 1 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물의 트리플루오로염산염 (1.50 g, 정량적) 을 담황색 고체로서 얻었다. 항체-약물 콘주게이트 (41) 을 담암 마우스에 투여했을 때에, 이 화합물이 종양 중에서 확인되었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 87 (3H, t, J＝7. 5Hz), 1. 81－1. 92 (2H, m), 2. 15－2. 23 (2H, m), 2. 41 (3H, s), 3. 05 (2H, t, J＝5. 1Hz), 3. 15－3. 23 (2H, m), 3. 71 (2H, t, J＝5. 1Hz), 4. 10 (2H, s), 5. 19 (1H, d, J＝18. 7Hz), 5. 24 (1H, d, J＝18. 7Hz), 5. 43 (2H, s), 5. 58－5. 66 (1H, m), 6. 55 (1H, s), 7. 33 (1H, s), 7. 73－7. 84 (4H, m), 8. 55 (1H, d, J＝9. 1Hz).

[1365] MS (APCI) m／z：537 $(M+H)^+$

[1366] 실시예 43 항체-약물 콘주게이트 (41)

[1367] [화학식 112]



[1368]

[1369] 공정 1 : N-(tert-부톡시카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[2-(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)에틸]글리신아미드

[1370] 실시예 42 의 화합물 (554 mg, 0.85 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (775 mg, 95 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．85（3H，t，J＝7．3Hz），1．36（9H，s），1．78－1．89（2H，m），2．13－2．22（2H，m），2．39（3H，s），2．71（1H，dd，J＝13．4，9．8Hz），2．95（1H，dd，J＝13．4，4．3Hz），3．09－3．23（1H，m），3．23－3．32（2H，m），3．40－3．62（8H，m），3．73（1H，dd，J＝16．5，5．5Hz），4．03（2H，s），4．39－4．47（1H，m），5．17（1H，d，J＝18．9Hz），5．25（1H，d，J＝18．9Hz），5．41（1H，d，J＝16．8Hz），5．45（1H，d，J＝16．8Hz），5．57－5．64（1H，m），6．54（1H，s），6．99（1H，t，J＝5．8Hz），7．13－7．26（5H，m），7．31（1H，s），7．76－7．82（2H，m），7．90（1H，t，J＝5．2Hz），8．13（1H，d，J＝7．9Hz），8．27（1H，t，J＝5．8Hz），8．49（1H，d，J＝8．5Hz）．

MS（APCI）m／z：955（M＋H）$^+$

[1371]

[1372] 공정 2 : 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[2-(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)에틸]글리신아미드트리플루오로아세트산염

[1373] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (630 mg, 0.659 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (588 mg, 92 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．86（3H，t，J＝7．3Hz），1．79－1．90（2H，m），2．13－2．22（2H，m），2．39（3H，s），2．71（1H，dd，J＝13．4，10．1Hz），2．99（1H，dd，J＝13．4，4．3Hz），3．09－3．23（1H，m），3．24－3．32（3H，m），3．41－3．71（7H，m），3．86（1H，dd，J＝16．8，5．8Hz），4．04（2H，s），4．52（1H，td，J＝9．0，4．1Hz），5．17（1H，d，J＝18．9Hz），5．25（1H，d，J＝18．9Hz），5．41（1H，d，J＝16．5Hz），5．45（1H，d，J＝16．5Hz），5．56－5．65（1H，m），6．55（1H，s），7．13－7．26（5H，m），7．32（1H，s），7．80（1H，d，J＝11．0Hz），7．87－8．01（4H，m），8．29－8．36（2H，m），8．46－8．55（2H，m）．

MS（APCI）m／z：855（M＋H）$^+$

[1374]

[1375] 공정 3 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[2-(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[d

e]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)에틸]글리신아미드

[1376] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (240 mg, 0.247 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (162 mg, 62 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 86 (3H, t, J＝7. 6Hz), 1. 13－1. 22 (2H, m), 1. 40－1. 51 (4H, m), 1. 78－1. 90 (2H, m), 2. 09 (2H, t, J＝7. 6Hz), 2. 14－2. 21 (2H, m), 2. 39 (3H, s), 2. 74 (1H, dd, J＝13. 6, 9. 7Hz), 2. 96 (1H, dd, J＝13. 6, 4. 5Hz), 3. 08－3. 24 (1H, m), 3. 24－3. 30 (1H, m), 3. 33－3. 40 (4H, m), 3. 47－3. 68 (7H, m), 3. 72 (1H, dd, J＝16. 6, 5. 7Hz), 4. 03 (2H, s), 4. 42 (1H, td, J＝8. 6, 4. 2Hz), 5. 17 (1H, d, J＝18. 7Hz), 5. 25 (1H, d, J＝18. 7Hz), 5. 40 (1H, d, J＝17. 2Hz), 5. 44 (1H, d, J＝17. 2Hz), 5. 57－5. 64 (1H, m), 6. 52 (1H, s), 6. 99 (2H, s), 7. 13－7. 25 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 74－7. 81 (2H, m), 7. 99 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 03－8. 11 (2H, m), 8. 22 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 47 (1H, d, J＝9. 1Hz).

[1377] MS (APCI) m／z：1048 $(M+H)^+$

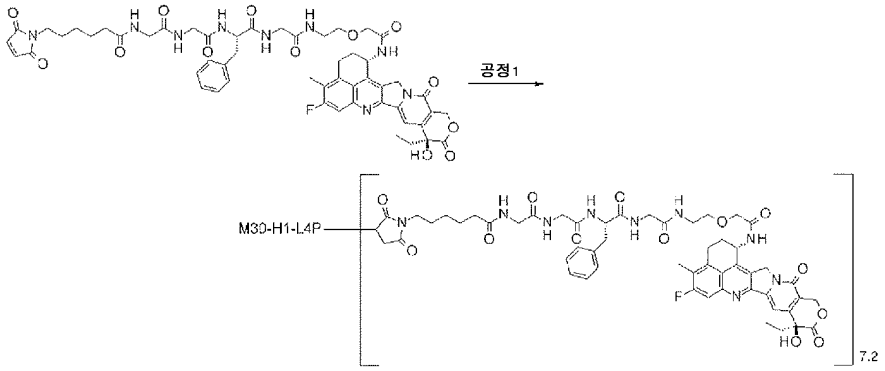
[1378] 공정 4 : 항체-약물 콘주게이트 (41)

[1379] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 29 의 공정 2 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1380] 항체 농도 : 12.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.4 mg (67 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.5

[1381] 실시예 44 항체-약물 콘주게이트 (42)

[1382] [화학식 113]



[1383]

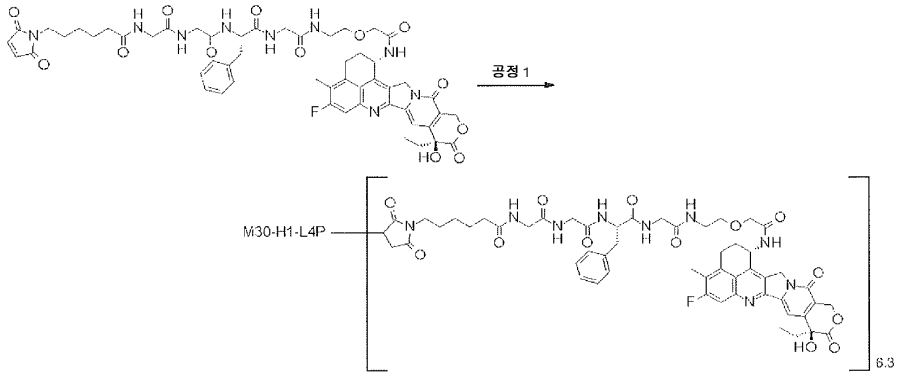
[1384] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (42)

[1385] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 43 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 5 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1386] 항체 농도 : 0.83 mg/㎖, 항체 수량 : 4.98 mg (40 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.2

[1387] 실시예 45 항체-약물 콘주게이트 (43)

[1388] [화학식 114]



[1389]

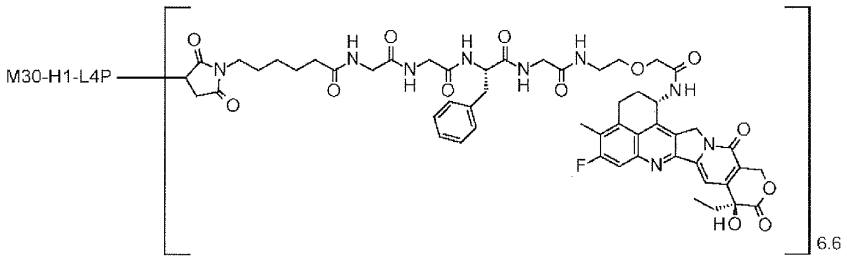
[1390] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (43)

[1391] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 실시예 43 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 4 의 공정 1 과 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1392] 항체 농도 : 1.06 mg/㎖, 항체 수량 : 6.36 mg (51 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.3

[1393] 실시예 46 항체-약물 콘주게이트 (44)

[1394] [화학식 115]



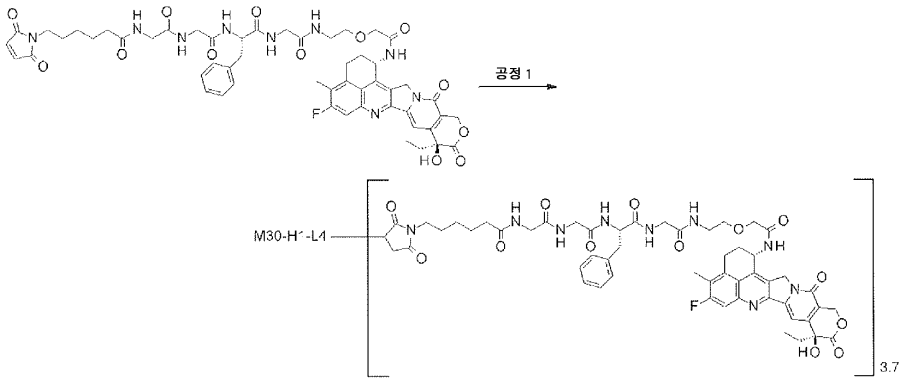
[1395]

[1396] 실시예 44 와 실시예 45 의 항체-약물 콘주게이트의 거의 전체량을 혼합하고, 공통 조작 A 를 사용하여 용액을 농축하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1397] 항체 농도 : 10.0 mg/㎖, 항체 수량 : 10.21 mg, 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.6

[1398] 실시예 47 항체-약물 콘주게이트 (45)

[1399] [화학식 116]



[1400]

[1401] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (45)

[1402] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1403] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 43 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0267 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0066 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

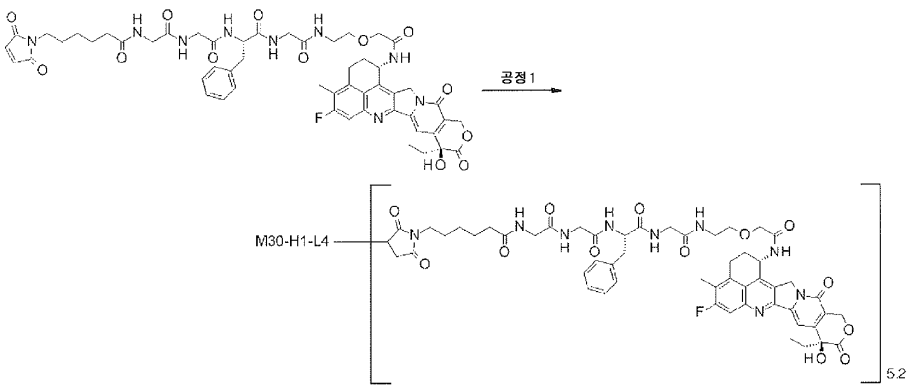
[1404] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1405] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5193 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20347 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1406] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.3 mg (74 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.7

[1407] 실시예 48 항체-약물 콘주게이트 (46)

[1408] [화학식 117]



[1409]

[1410] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (46)

[1411] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1412] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 43 의 공정 3 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0726 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 8.6 당량) 을 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.011 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

[1413] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실

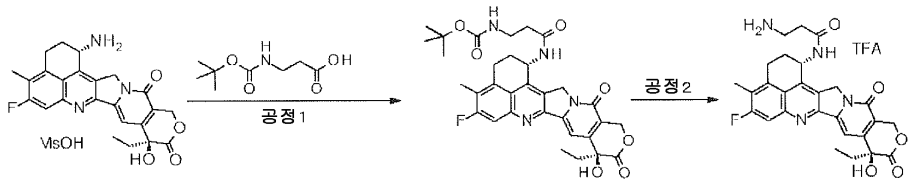
시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1414] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5193 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20347 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1415] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 7.8 mg (62 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.2

[1416] 실시예 49 N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1417] [화학식 118]

[1418] 

[1419] 공정 1 : tert-부틸(3- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -3-옥소프로필)카르바메이트

[1420] 화합물 (4) 의 메실산염 (500 mg, 0.941 mmol) 을, 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 대신에 N-(tert-부톡시카르보닐)-β-알라닌을 사용하여, 실시예 1 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (616 mg, 정량적) 을 황갈색 고체로서 얻었다.

[1421] ^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0.87 (3H, t, J＝7.2Hz), 1.29 (9H, s), 1.86 (2H, dt, J＝15.1, 7.3Hz), 2.04－2.22 (2H, m), 2.31 (2H, t, J＝6.8Hz), 2.40 (3H, s), 3.10－3.26 (4H, m), 5.15 (1H, d, J＝18.8Hz), 5.26 (1H, d, J＝19.2Hz), 5.42 (2H, dd, J＝18.8, 16.4Hz), 5.57 (1H, dt, J＝8.5, 4.2Hz), 6.53 (1H, s), 6.78 (1H, t, J＝5.5Hz), 7.30 (1H, s), 7.80 (1H, d, J＝11.0Hz), 8.46 (1H, d, J＝8.6Hz).

MS (ESI) m／z：607 $(M+H)^+$

[1422] 공정 2 : N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1423] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을, 실시예 1 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (499 mg, 86 %) 의 트리플루오로아세트산염을 황색 고체로서 얻었다.

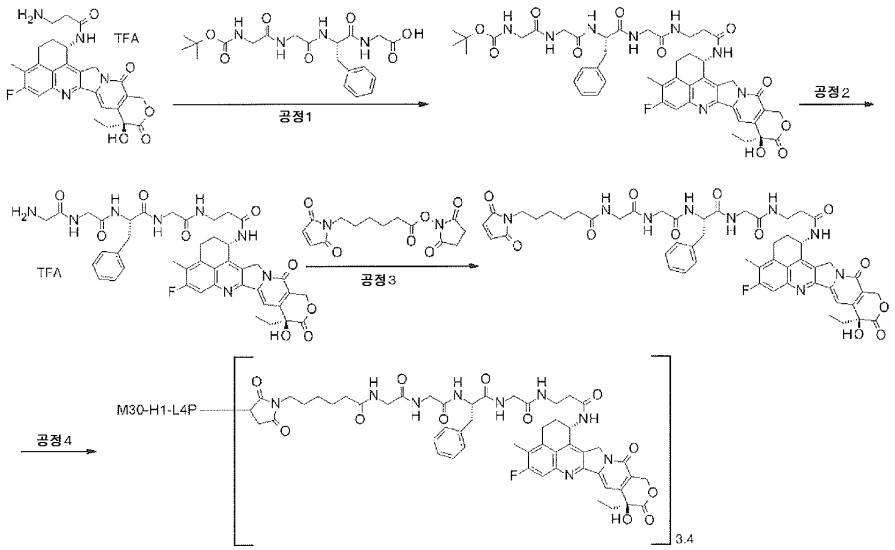
^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．2Hz），1．86（2H，dquin，J＝14．6，7．2，7．2，7．2，7．2Hz），2．06－2．27（1H，m），2．41（3H，s），2．46－2．57（2H，m），3．08（2H，t，J＝6．8Hz），3．14－3．24（2H，m），5．22（1H，d，J＝18．8Hz），5．29（1H，d，J＝18．8Hz），5．43（2H，s），5．58（1H，dt，J＝8．5，4．5Hz），6．55（1H，s），7．32（1H，s），7．74（3H，brs），7．82（1H，d，J＝11．0Hz），8．67（1H，d，J＝8．6Hz）．

MS（ESI）m／z：507（M＋H）$^+$

[1424]

[1425] 실시예 50 항체-약물 콘주게이트 (47)

[1426] [화학식 119]



[1427]

[1428] 공정 1 : N-(tert-부톡시카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1429] 실시예 49 의 화합물 (484 mg, 0.780 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (626 mg, 87 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

[1430] ^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．4Hz），1．27－1．42（9H，m），1．77－1．93（2H，m），2．06－2．22（2H，m），2．36（2H，t，J＝7．2Hz），2．40（3H，d，J＝1．6Hz），2．44－2．54（2H，m），2．76（1H，dd，J＝14．5，10．2Hz），3．02（1H，dd，J＝13．9，4．5Hz），3．12－3．22（2H，m），3．52（6H，d，J＝6．3Hz），4．42－4．54（1H，m），5．19（1H，d，J＝19．2Hz），5．26（1H，d，J＝18．4Hz），5．42（1H，dd，J＝18．4，16．4Hz），5．57（1H，dt，J＝8．7，4．4Hz），6．53（1H，s），6．98（1H，t，J＝5．9Hz），7．14－7．28（5H，m），7．31（1H，s），7．77－7．84（1H，m），7．91（1H，t，J＝5．5Hz），8．16（1H，d，J＝7．8Hz），8．27（1H，t，J＝5．1Hz），8．52（1H，d，J＝9．0Hz）．

[1431] 공정 2 : 글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드트리플루오로아세트산염

[1432] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (624 mg, 0.675 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (626 mg, 92 %) 을 황색 고체로서 얻었다.

[1433] ^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．4Hz），1．86（2H，tt，J＝14．5，7．2Hz），2．07－2．22（2H，m），2．36（2H，t，J＝7．2Hz），2．40（3H，s），2．44－2．54（2H，m），2．75（1H，dd，J＝13．7，9．8Hz），3．04（1H，dd，J＝13．7，4．3Hz），3．12－3．22（2H，m），3．58（2H，d，J＝4．7Hz），3．69（3H，td，J＝11．2，5．7Hz），3．87（1H，dd，J＝17．0，5．7Hz），4．54（1H，m，J＝17．8，4．5Hz），5．19（1H，d，J＝19．2Hz），5．26（1H，d，J＝18．8Hz），5．43（2H，s），5．51－5．60（1H，m），6．55（1H，s），7．14－7．29（5H，m），7．32（1H，s），7．81（1H，d，J＝10．9Hz），7．88（1H，t，J＝5．7Hz），7．97（3H，brs），8．29－8．38（2H，m），8．50（1H，t，J＝5．7Hz），8．55（1H，d，J＝8．6Hz）．

MS（ESI）m／z：825（M＋H）$^+$

[1434] 공정 3 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[d

e]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1435] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (60.0 mg, 0.0646 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (14.0 mg, 21 %) 을 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 86 (3H, t, J＝7. 2Hz), 1. 12－1. 22 (2H, m), 1. 39－1. 51 (4H, m), 1. 79－1. 91 (2H, m), 2. 02－2. 20 (2H, m), 2. 07 (2H, t, J＝7. 4Hz), 2. 30－2. 42 (4H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 78 (1H, dd, J＝14. 1, 9. 4Hz), 3. 02 (1H, dd, J＝14. 7, 4. 9Hz), 3. 12－3. 21 (2H, m), 3. 26－3. 42 (2H, m), 3. 50－3. 80 (6H, m), 4. 40－4. 51 (1H, m), 5. 19 (1H, d, J＝19. 6Hz), 5. 26 (1H, d, J＝19. 2Hz), 5. 42 (2H, brs), 5. 51－5. 62 (1H, m), 6. 53 (1H, s), 6. 99 (2H, s), 7. 13－7. 28 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 74－7. 84 (2H, m), 8. 01 (1H, t, J＝5. 3Hz), 8. 06 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 14 (1H, d, J＝8. 2Hz), 8. 25 (1H, t, J＝5. 7Hz), 8. 53 (1H, d, J＝8. 6Hz).

MS (ESI) m／z：1018 $(M+H)^+$

[1436]

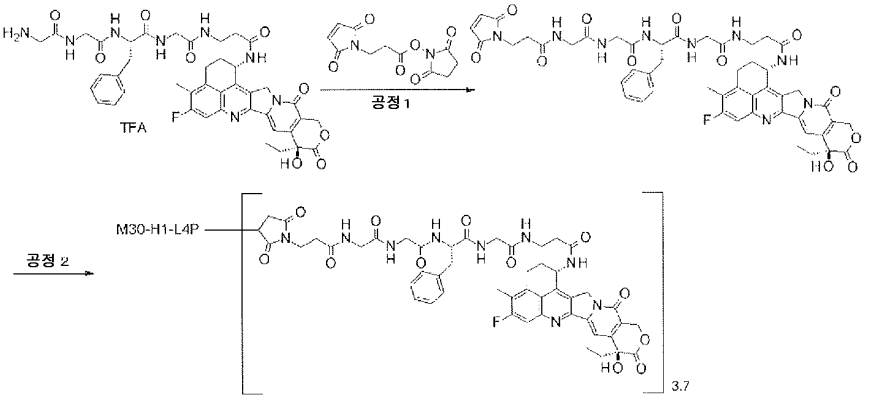
[1437] 공정 4 : 항체-약물 콘주게이트 (47)

[1438] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 3 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 2 의 공정 4 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1439] 항체 농도 : 12.27 mg/㎖, 항체 수량 : 8.6 mg (69 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[1440] 실시예 51 항체-약물 콘주게이트 (48)

[1441] [화학식 120]



[1442]

[1443] 공정 1 : N-[3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로파노일]글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1444] 실시예 50 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (60.0 mg, 0.0646 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 3-

말레이미드프로피온산N-숙신이미딜을 사용하여, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (36.0 mg, 57 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 86 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 85 (2H, dt, J＝14. 4, 7. 5Hz), 2. 05－2. 22 (2H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 30－2. 44 (5H, m), 2. 73－2. 84 (1H, m), 3. 02 (1H, dd, J＝13. 9, 4. 5Hz), 3. 17 (3H, d, J＝5. 1Hz), 3. 26－3. 40 (2H, m), 3. 41－3. 81 (6H, m), 4. 40－4. 51 (1H, m), 5. 19 (1H, d, J＝19. 2Hz), 5. 26 (1H, d, J＝18. 8Hz), 5. 42 (2H, brs), 5. 52－5. 61 (1H, m), 6. 53 (1H, s), 6. 99 (2H, s), 7. 13－7. 28 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 80 (2H, d, J＝10. 2Hz), 8. 03 (1H, t, J＝5. 5Hz), 8. 12 (1H, d, J＝8. 2Hz), 8. 20－8. 31 (2H, m), 8. 52 (1H, d, J＝8. 6Hz).

MS (ESI) m／z：976 $(M+H)^+$

[1445]

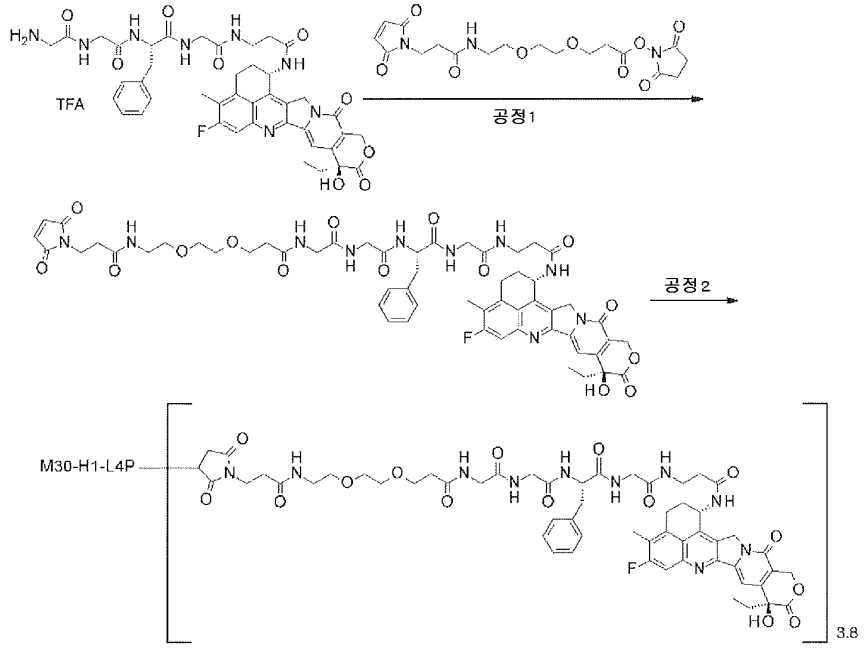
[1446] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (48)

[1447] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 2 의 공정 4 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1448] 항체 농도 : 11.59 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.1 mg (65 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.7

[1449] 실시예 52 항체-약물 콘주게이트 (49)

[1450] [화학식 121]



[1451]

[1452] 공정 1 : N- {3-[2-(2- {[3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로파노일]아미노})에톡시]프로파노일} 글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-

2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1453] 실시예 50 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (60.0 mg, 0.0646 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 3-(2-(2-(3-말레인이미드프로판아미드)에톡시)에톡시)프로판산N-숙신이미딜을 사용하여, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (23.0 mg, 31 %) 을 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d_6) δ：0. 86 (3H, t, J＝7. 4Hz), 1. 77－1. 92 (2H, m), 2. 07－2. 21 (2H, m), 2. 27－2. 42 (6H, m), 2. 40 (3H, s), 2. 74－2. 84 (1H, m), 2. 97－3. 06 (1H, m), 3. 09－3. 21 (4H, m), 3. 25－3. 39 (6H, m), 3. 45 (4H, s), 3. 50－3. 80 (8H, m), 4. 41－4. 51 (1H, m), 5. 19 (1H, d, J＝18. 4Hz), 5. 26 (1H, m, J＝18. 4Hz), 5. 42 (2H, brs), 5. 51－5. 61 (1H, m), 6. 54 (1H, s), 7. 00 (2H, s), 7. 13－7. 28 (5H, m), 7. 31 (1H, s), 7. 74－7. 87 (2H, m), 7. 93－8. 07 (2H, m), 8. 09－8. 21 (2H, m), 8. 26 (1H, brs), 8. 54 (1H, d, J＝8. 6Hz).

[1454] MS (ESI) m／z：1135 $(M+H)^+$

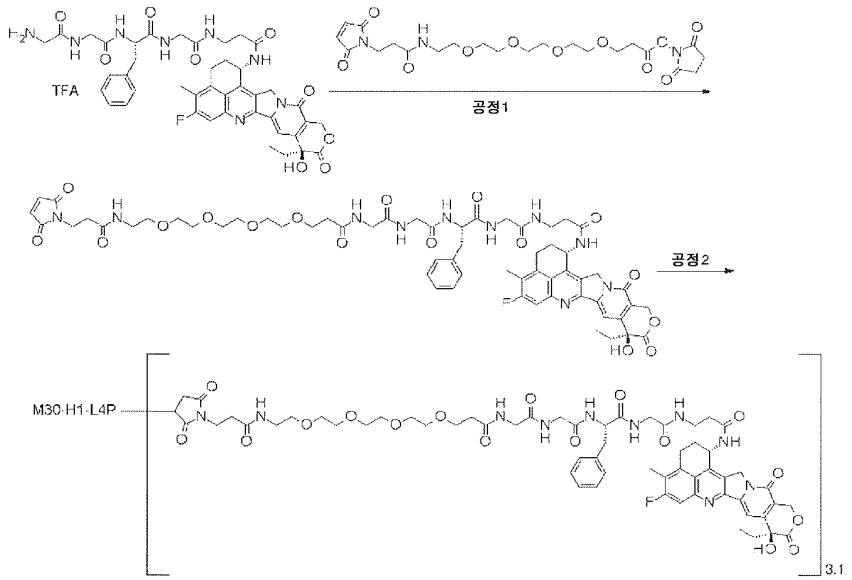
[1455] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (49)

[1456] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 29 의 공정 2 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1457] 항체 농도 : 14.50 mg/mℓ, 항체 수량 : 10.2 mg (82 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.8

[1458] 실시예 53 항체-약물 콘주게이트 (50)

[1459] [화학식 122]



[1460]

[1461] 공정 1 : N-[19-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-17-옥소-4,7,10,13-테트라옥사-16-아자노난데칸-1-오일]글리실글리실-L-페닐알라닐글리실-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-

2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-β-알라닌아미드

[1462] 실시예 50 의 공정 2 에서 얻은 화합물 (60.0 mg, 0.0646 mmol) 을, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 대신에 1-말레인이미드-3-옥소-7,10,13,16-테트라옥사-4-아자노나데칸산N-숙신이미딜을 사용하여, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (23.0 mg, 29 %) 을 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．86（3H，t，J＝7．0Hz），1．85（2H，tt，J＝14．6，7．1Hz），2．06－2．22（2H，m），2．40（3H，s），2．28－2．43（6H，m），2．78（1H，dd，J＝13．7，9．4Hz），3．02（1H，dd，J＝14．1，3．9Hz），3．09－3．22（4H，m），3．27－3．41（4H，m），3．47（12H，d，J＝8．6Hz），3．53－3．81（10H，m），4．41－4．51（1H，m），5．19（1H，d，J＝19．2Hz），5．26（1H，d，J＝18．8Hz），5．42（2H，brs），5．53－5．61（1H，m），6．54（1H，s），7．00（2H，s），7．12－7．29（5H，m），7．31（1H，s），7．74－7．85（2H，m），8．03（2H，d，J＝6．6Hz），8．11－8．21（2H，m），8．27（1H，t，J＝5．9Hz），8．54（1H，d，J＝8．6Hz）．

[1463] MS（ESI）m／z：1224（M＋H）$^+$

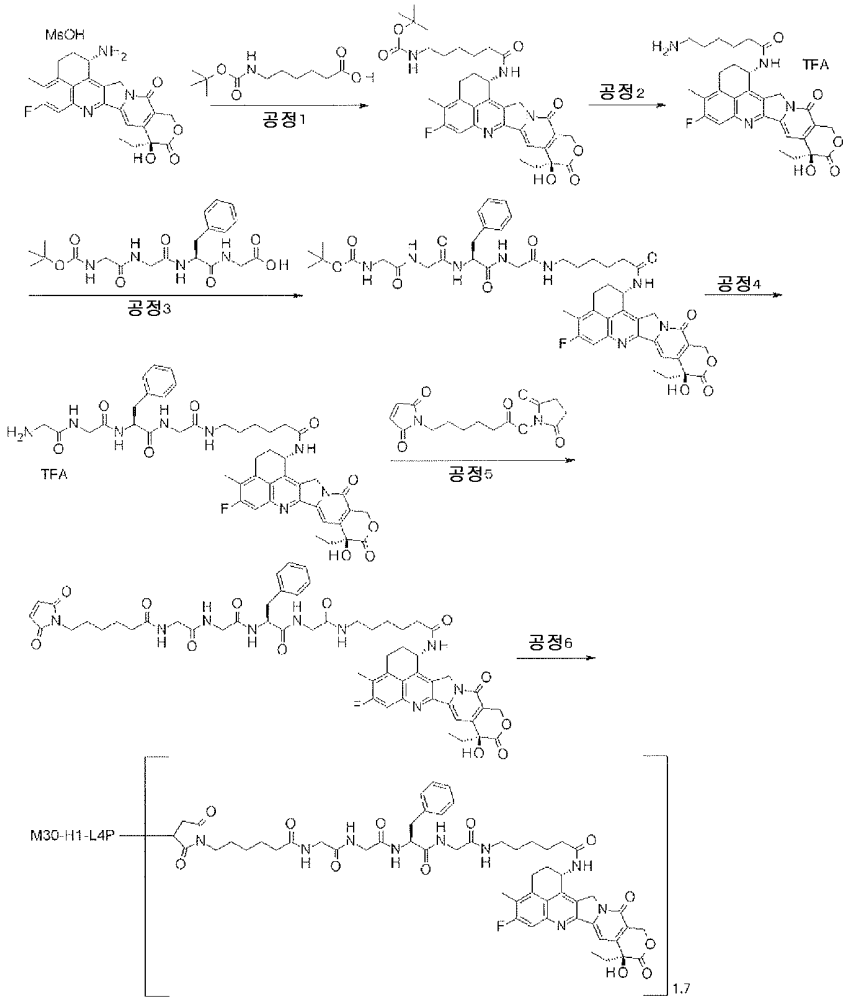
[1464] 공정 2 : 항체-약물 콘주게이트 (50)

[1465] 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체 및 상기 공정 1 에서 얻은 화합물을 사용하여, 실시예 2 의 공정 4 와 동일한 방법에 의해, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1466] 항체 농도 : 13.47 mg/mℓ, 항체 수량 : 9.4 mg (75 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.1

[1467] 실시예 54 항체-약물 콘주게이트 (51)

[1468] [화학식 123]



[1469]

[1470] 공정 1 : tert-부틸(6- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -6-옥소헥실)카르바메이트

[1471] 화합물 (4) 의 메실산염 (0.500 g, 0.882 mmol) 을, 4-(tert-부톡시카르보닐아미노)부탄산 대신에 6-(tert-부톡시카르보닐아미노)헥산산을 사용하여, 실시예 1 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.620 g, 정량적) 을 얻었다.

^{1}H－NMR (DMSO－d_6) δ：0．83 (3H, t, J＝7．8Hz), 1．14－1．28 (2H, m), 1．31 (9H, s), 1．47－1．61 (2H, m), 1．75－1．89 (2H, m), 2．04－2．17 (4H, m), 2．35 (3H, s), 2．81－2．88 (2H, m), 3．09－3．16 (2H, m), 5．10 (1H, d, J＝19．4Hz), 5．16 (1H, d, J＝19．4Hz), 5．39 (2H, s), 5．48－5．55 (1H, m), 6．50 (1H, s), 6．73－6．78 (1H, m), 7．26 (1H, s), 7．74 (1H, d, J＝10．9Hz), 8．39 (1H, d, J＝9．0Hz).

[1472]

[1473] 공정 2 : 6-아미노-N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]헥산아미드트리플루오로아세트산염

[1474] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (0.397 g, 0.611 mmol) 을, 실시예 1 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합

물 (0.342 g, 84 %) 을 얻었다.

[1475] ^{1}H－NMR (DMSO－d_6) δ：0．88 (3H, t, J＝7．2Hz), 1．31－1．41 (2H, m), 1．52－1．70 (4H, m), 1．80－1．94 (2H, m), 2．05－2．18 (2H, m), 2．21 (2H, t, J＝7．4Hz), 2．40 (3H, s), 2．81 (2H, t, J＝7．4Hz), 3．10－3．25 (2H, m), 3．33 (2H, brs), 5．18 (1H, d, J＝19．8Hz), 5．22 (1H, d, J＝19．8Hz), 5．41 (2H, d, J＝16．6Hz), 5．45 (2H, d, J＝16．6Hz), 5．53－5．60 (1H, m), 6．55 (1H, s), 7．32 (1H, s), 7．80 (1H, d, J＝10．9Hz), 8．49 (1H, d, J＝9．2Hz).

[1476] 공정 3 : N-(tert-부톡시카르보닐)글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(6- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -6-옥소헥실)글리신아미드

[1477] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (0.170 g, 0.516 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 1 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.225 g, 91 %) 을 얻었다.

[1478] ^{1}H－NMR (DMSO－d_6) δ：0．88 (3H, t, J＝7．4Hz), 1．43－1．70 (6H, m), 1．87 (2H, td, J＝15．0, 7．4Hz), 2．10－2．22 (3H, m), 2．28－2．37 (1H, m), 2．42 (3H, s), 2．78－2．85 (1H, m), 3．01－3．10 (3H, m), 3．15－3．22 (2H, m), 3．54－3．61 (5H, m), 3．62－3．69 (1H, m), 4．44－4．53 (1H, m), 5．17 (1H, d, J＝19．2Hz), 5．25 (1H, d, J＝19．2Hz), 5．45 (2H, s), 5．54－5．61 (1H, m), 6．55 (1H, s), 7．02 (1H, t, J＝6．1Hz), 7．11－7．28 (5H, m), 7．33 (1H, s), 7．63－7．69 (1H, m), 7．82 (1H, d, J＝11．0Hz), 7．90－7．96 (1H, m), 8．17 (1H, d, J＝7．8Hz), 8．28 (1H, t, J＝5．5Hz), 8．46 (1H, d, J＝9．0Hz).

[1479] 공정 4 : 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(6- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -6-옥소헥실)글리신아미드

[1480] 상기 공정 3 에서 얻은 화합물 (0.105 g, 0.108 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 2 와 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (0.068 mg, 65 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR（DMSO－d_6）δ：0．89（3H，t，J＝7．4Hz），1．15－1．67（6H，m），1．79－1．97（2H，m），2．08－2．24（4H，m），2．42（3H，s），2．76－2．82（1H，m），3．00－3．10（5H，m），3．19（1H，s），3．50－3．63（2H，m），3．64－3．76（3H，m），3．84－3．92（1H，m），4．51－4．59（1H，m），5．17（1H，d，J＝19．4Hz），5．24（1H，d，J＝19．4Hz），5．44（2H，s），5．53－5．61（1H，m），6．55（1H，brs），7．15－7．29（5H，m），7．33（1H，s），7．72－7．78（1H，m），7．82（1H，d，J＝11．0Hz），7．96－8．08（2H，m），8．30－8．38（2H，m），8．46－8．56（2H，m）．

[1481]

[1482] 공정 5 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-(6- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -6-옥소헥실)글리신아미드

[1483] 상기 공정 4 에서 얻은 화합물 (58 mg, 0.060 mmol) 을, 실시예 2 의 공정 3 과 동일하게 반응시켜, 표기 화합물 (39 mg, 62 %) 을 얻었다.

^{1}H－NMR（CD_3OD）δ：0．99（3H，t，J＝7．4Hz），1．27（2H，td，J＝11．6，6．1Hz），1．38－1．44（2H，m），1．50－1．63（6H，m），1．65－1．80（2H，m），1．89－1．98（2H，m），2．17－2．25（3H，m），2．26－2．36（3H，m），2．40（3H，s），2．95（1H，dd，J＝14．3，9．2Hz），3．12（1H，dd，J＝13．7，5．7Hz），3．15－3．25（4H，m），3．44（2H，t，J＝7．2Hz），3．65（1H，d，J＝17．2Hz），3．76（1H，d，J＝17．2Hz），3．79－3．86（4H，m），4．43（1H，dd，J＝8．9，6．0Hz），5．10（1H，d，J＝18．9Hz），5．25（1H，d，J＝18．9Hz），5．35（1H，d，J＝16．6Hz），5．56（1H，d，J＝16．0Hz），5．60－5．64（1H，m），6．76（2H，s），7．12－7．24（6H，m），7．58（1H，s），7．60（1H，d，J＝10．9Hz），7．68（1H，t，J＝5．7Hz）．

MS（ESI）m／z：1060（M＋H）$^+$

[1484]

[1485] 공정 6 : 항체-약물 콘주게이트 (51)

[1486] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0147 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.3 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합

을 환원시켰다.

[1487] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 상기 공정 5 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0295 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.00590 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

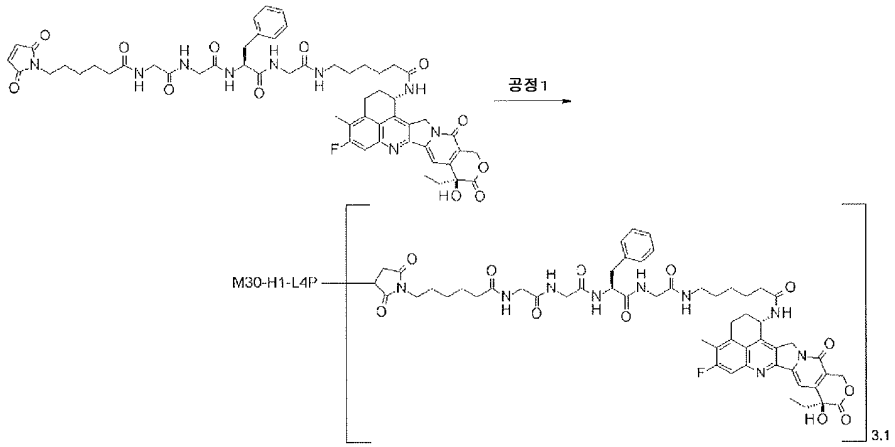
[1488] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 PBS 7.4 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1489] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1490] 항체 농도 : 0.97 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.82 mg (58 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 1.7

[1491] 실시예 55 항체-약물 콘주게이트 (52)

[1492] [화학식 124]



[1493]

[1494] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (52)

[1495] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0295 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1496] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 54 의 공정 5 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0590 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0118 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 18.4 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

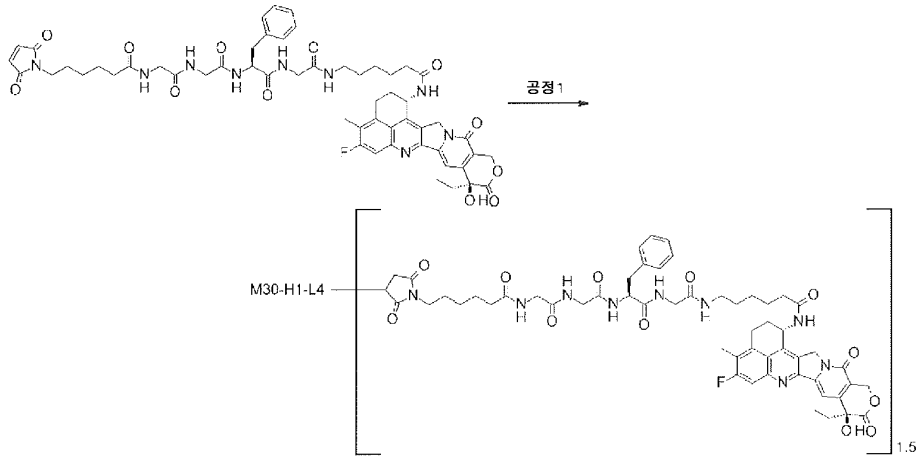
[1497] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 PBS 7.4 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1498] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1499] 항체 농도 : 0.94 mg/㎖, 항체 수량 : 5.64 mg (56 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.1

[1500] 실시예 56 항체-약물 콘주게이트 (53)

[1501] [화학식 125]



[1502]

[1503] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (53)

[1504] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/㎖ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 ㎖) 을 1.5 ㎖ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0147 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 2.3 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 ㎖) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1505] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 54 의 공정 5 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0295 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.00590 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

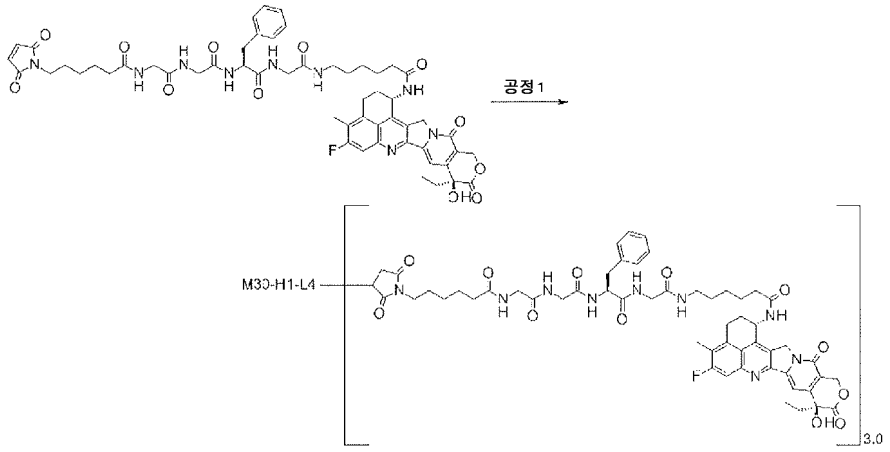
[1506] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 PBS 7.4 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 ㎖ 얻었다.

[1507] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1508] 항체 농도 : 1.22 mg/㎖, 항체 수량 : 7.32 mg (73 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 1.5

[1509] 실시예 57 항체-약물 콘주게이트 (54)

[1510] [화학식 126]



[1511]

[1512] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (54)

[1513] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.0/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.0 mℓ) 을 1.5 mℓ 튜브에 채취하고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0295 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.050 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1514] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액을 22 ℃ 에서 10 분간 인큐베이트한 후에 실시예 54 의 공정 5 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0590 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.2 당량) 을 첨가하고, 22 ℃ 에서 40 분간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0118 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 18.4 당량) 을 첨가하고, 다시 22 ℃ 에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

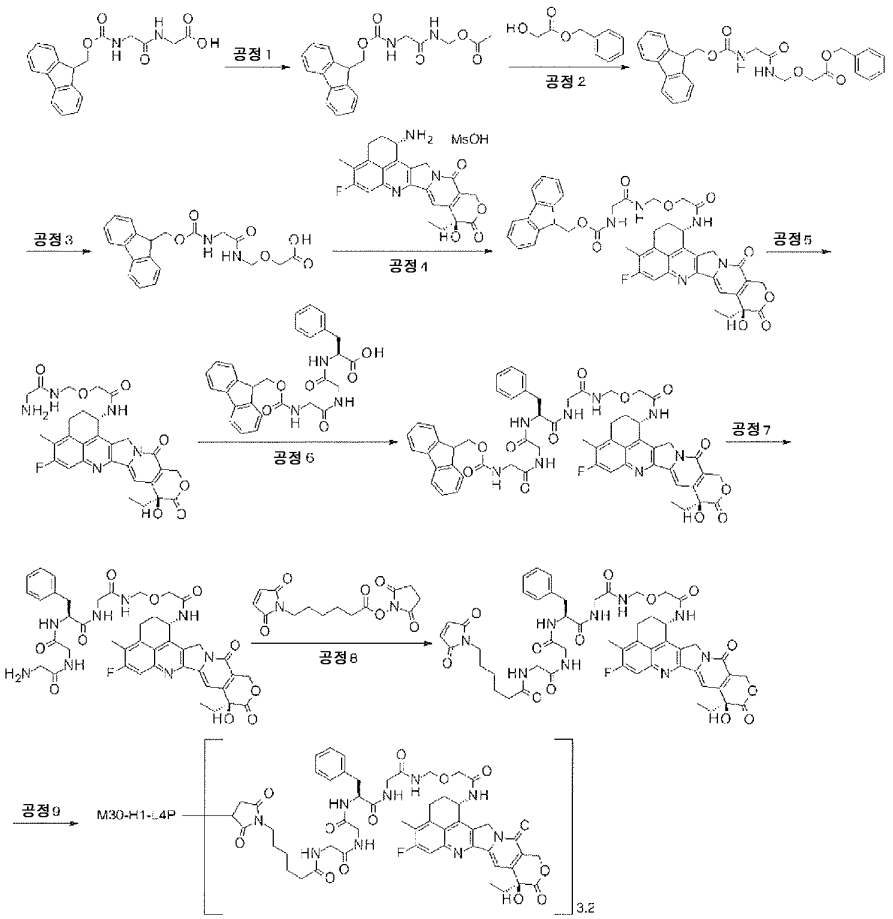
[1515] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 PBS 7.4 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1516] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1517] 항체 농도 : 1.06 mg/mℓ, 항체 수량 : 6.36 mg (64 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.0

[1518] 실시예 58 항체-약물 콘주게이트 (55)

[1519] [화학식 127]



[1520]

[1521] 공정 1 : ({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실} 아미노)메틸아세테이트

[1522] N-9-플루오레닐메톡시카르보닐글리실글리신 (4.33 g, 12.2 mmol), 테트라하이드로푸란 (120 mℓ), 및 톨루엔 (40.0 mℓ) 으로 이루어지는 혼합물에, 피리딘 (1.16 mℓ, 14.7 mmol 및 4 아세트산납 (6.84 g, 14.7 mmol) 을 첨가하여, 5 시간 가열 환류했다. 반응액을 실온까지 냉각시킨 후, 불용물을 셀라이트 여과에 의해 제거하여, 감압하 농축했다. 얻어진 잔류물을 아세트산에틸에 용해하고, 물 및 포화 식염수로 세정 후, 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 용매를 감압하에서 증류 제거한 후, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [헥산 : 아세트산에틸 = 9 : 1 (v/v) ~ 아세트산에틸] 로 정제하여, 표기 화합물 (3.00 g, 67 %) 을 무색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ：2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d, J＝5.1Hz), 4.23 (1H, t, J＝7.0Hz), 4.46 (2H, d, J＝6.6Hz), 5.26 (2H, d, J＝7.0Hz), 5.32 (1H, brs), 6.96 (1H, brs), 7.32 (2H, t, J＝7.3Hz), 7.41 (2H, t, J＝7.3Hz), 7.59 (2H, d, J＝7.3Hz), 7.77 (2H, d, J＝7.3Hz).

[1523]

[1524] 공정 2 : 벤질[({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실} 아미노)메톡시]아세테이트

[1525] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (3.68 g, 10.0 mmol) 및 벤질글리콜레이트 (4.99 g, 30.0 mmol) 의 테트라하이드로푸란 (40.0 mℓ) 용액에, 칼륨tert-부톡시드 (2.24 g, 20.0 mmol) 를 0 ℃ 에서 첨가하여, 실온에서 15 분간 교반했다. 반응 용액에 아세트산에틸, 물을 0 ℃ 에서 첨가하여, 아세트산에틸, 클로로포름으로 추출하고, 얻

어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하여, 얻어진 잔류물을 디옥산 (40.0 mℓ), 물 (10.0 mℓ) 에 용해하고, 탄산수소나트륨 (1.01 g, 12.0 mmol), 클로로포름산9-플루오레닐메틸 (2.59 g, 10.0 mmol) 을 첨가하여, 실온에서 2 시간 교반했다. 반응 용액에 물을 첨가하여, 아세트산에틸로 추출하고, 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [헥산 : 아세트산에틸 = 100 : 0 (v/v) ~ 0 : 100] 로 정제하여, 무색 유상의 표기 화합물 (1.88 g, 40 %) 을 얻었다.

[1526] ^{1}H－NMR (400MHz, CDCl$_3$) δ：3.84 (2H, d, J＝5.5Hz), 4.24 (3H, t, J＝6.5Hz), 4.49 (2H, d, J＝6.7Hz), 4.88 (2H, d, J＝6.7Hz), 5.15－5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H, brs), 7.31－7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t, J＝7.4Hz), 7.61 (2H, d, J＝7.4Hz), 7.79 (2H, d, J＝7.4Hz).

[1527] 공정 3 : [({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실} 아미노)메톡시]아세트산

[1528] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (1.88 g, 3.96 mmol) 을 에탄올 (40.0 mℓ), 아세트산에틸 (20.0 mℓ) 에 용해했다. 팔라듐탄소 촉매 (376 mg) 를 첨가하여, 수소 분위기하, 실온에서 2 시간 교반했다. 불용물을 셀라이트 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 증류 제거하여, 표기 화합물 (1.52 g, 정량적) 을 무색 고체로서 얻었다.

[1529] ^{1}H－NMR (400MHz, DMSO－d$_6$) δ：3.62 (2H, d, J＝6.3Hz), 3.97 (2H, s), 4.18－4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d, J＝6.7Hz), 7.29－7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t, J＝5.9Hz), 7.72 (2H, d, J＝7.4Hz), 7.90 (2H, d, J＝7.4Hz), 8.71 (1H, t, J＝6.5Hz).

[1530] 공정 4 : 9H-플루오렌-9-일메틸(2- {[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]아미노} -2-옥소에틸)카르바메이트

[1531] 빙랭하, 화합물 (4) 의 메실산염 (0.283 g, 0.533 mmol), N-하이드록시숙신이미드 (61.4 mg, 0.533 mmol), 및 상기 공정 3 에서 얻은 화합물 (0.205 g, 0.533 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (10.0 mℓ) 용액에, N,N-디이소프로필에틸아민 (92.9 μℓ, 0.533 mmol) 및 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (0.143 g, 0.693 mmol) 를 첨가하여, 실온에서 3 일간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.352 g, 82 %) 을 담갈색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．81（3H，t，J＝7．4Hz），1．73－1．87（2H，m），2．06－2．20（2H，m），2．34（3H，s），3．01－3．23（2H，m），3．58（2H，d，J＝6．7Hz），3．98（2H，s），4．13－4．25（3H，m），4．60（2H，d，J＝6．7Hz），5．09－5．22（2H，m），5．32－5．42（2H，m），5．50－5．59（1H，m），6．49（1H，s），7．24－7．30（3H，m），7．36（2H，t，J＝7．4Hz），7．53（1H，t，J＝6．3Hz），7．66（2H，d，J＝7．4Hz），7．75（1H，d，J＝11．0Hz），7．84（2H，d，J＝7．4Hz），8．47（1H，d，J＝8．6Hz），8．77（1H，t，J＝6．7Hz）．

[1532] MS（ESI）m／z：802（M＋H）$^+$

[1533] 공정 5 : N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1534] 상기 공정 4 에서 얻은 화합물 (0.881 g, 1.10 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (11.0 mℓ) 용액에, 피페리딘 (1.1 mℓ) 을 첨가하여, 실온에서 2 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하여, 표기 화합물을 포함하는 혼합물을 얻었다. 본 혼합물은 더 이상의 정제는 실시하지 않고 다음의 반응에 사용했다.

[1535] 공정 6 : N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1536] 빙랭하, 상기 공정 5 에서 얻은 혼합물 (0.439 mmol), N-하이드록시숙신이미드 (0.101 g, 0.878 mmol), 및 N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실글리실-L-페닐알라닌 (일본 공개특허공보 2002-60351호에 기재된 화합물) (0.440 g, 0.878 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (50.0 mℓ) 용액에, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (0.181 g, 0.878 mmol) 를 첨가하여, 실온에서 4 일간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 9 : 1 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.269 g, 58 %) 을 담등색 고체로서 얻었다.

[1537] MS(ESI)m/z : 1063$(M+H)^+$

[1538] 공정 7 : 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1539] 상기 공정 6 에서 얻은 화합물 (0.269 g, 0.253 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (4.00 mℓ) 용액에, 피페리딘 (0.251 mℓ, 2.53 mmol) 을 첨가하여, 실온에서 2 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하여, 표기 화합물을 포함하는 혼합물을 얻었다. 본 혼합물은 더 이상의 정제는 실시하지 않고 다음의 반응에 사용했다.

[1540] 공정 8 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1541] 상기 공정 7 에서 얻은 화합물 (0.253 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (10.0 mℓ) 용액에, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 (0.156 g, 0.506 mmol) 을 첨가하여, 실온에서 3 일간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 9 : 1 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.100 g, 38 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．83（3H，t，J＝7．2Hz），1．09－1．21（2H，m），1．33－1．47（4H，m），1．75－1．90（2H，m），2．00－2．23（4H，m），2．36（3H，s），2．69－2．81（1H，m），2．94－3．03（1H，m），3．06－3．22（2H，m），3．23－3．74（8H，m），3．98（2H，s），4．39－4．50（1H，m），4．60（2H，d，J＝6．7Hz），5．17（2H，s），5．39（2H，s），5．53－5．61（1H，m），6．50（1H，s），6．96（2H，s），7．11－7．24（5H，m），7．28（1H，s），7．75（1H，d，J＝11．0Hz），7．97（1H，t，J＝5．7Hz），8．03（1H，t，J＝5．9Hz），8．09（1H，d，J＝7．8Hz），8．27（1H，t，J＝6．5Hz），8．48（1H，d，J＝9．0Hz），8．60（1H，t，J＝6．5Hz）．

MS（ESI）m／z：1034（M＋H）$^{+}$

[1542]

[1543] 공정 9 : 항체-약물 콘주게이트 (55)

[1544] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.025 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1545] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC) 0.109 mℓ 와 상기 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.039 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.6 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 40 분간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.008 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

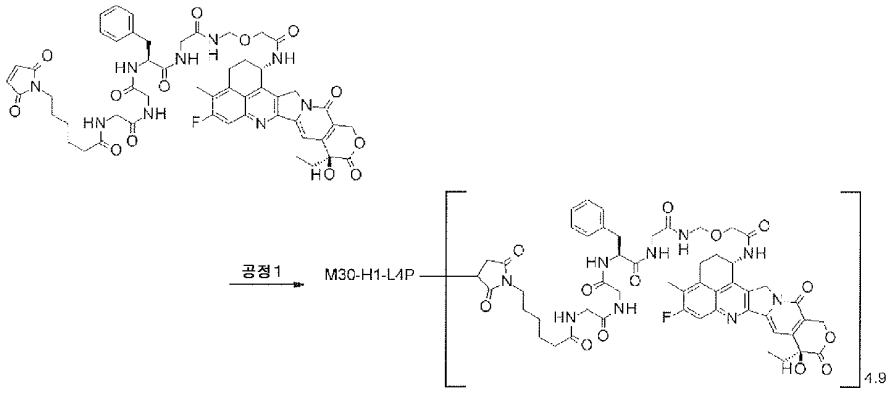
[1546] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1547] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1548] 항체 농도 : 12.57 mg/mℓ, 항체 수량 : 8.8 mg (70 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1549] 실시예 59 항체-약물 콘주게이트 (56)

[1550] [화학식 128]



[1551]

[1552] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (56)

[1553] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.051 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1554] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.067 mℓ) 와 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.085 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 10.0 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 60 분간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.013 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

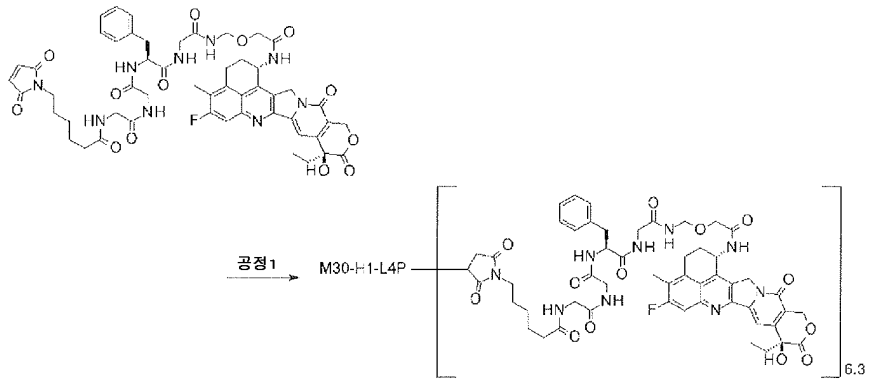
[1555] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻었다.

[1556] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1557] 항체 농도 : 1.33 mg/mℓ, 항체 수량 : 7.98 mg (64 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.9

[1558] 실시예 60 항체-약물 콘주게이트 (57)

[1559] [화학식 129]



[1560]

[1561] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (57)

[1562] 항체의 환원 : 참고예 2 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 C-1 및 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 를 사용하고, 매체를 PBS 6.0/EDTA 로 치환하여, 10 mg/mℓ 의 항체 농도로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ) 을 1.5 mℓ 폴리프로필렌제 튜브에 넣고, 여기에 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.051 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.0 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1563] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에, 디메틸술폭시드 (Sigma-Aldrich Co. LLC ; 0.025 mℓ) 와 실시예 58 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.127 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 15.0 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 60 분간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.019 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온하 20 분간 교반하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

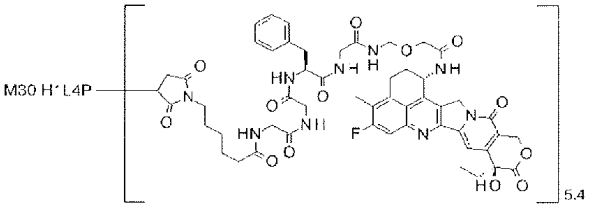
[1564] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1565] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5000 (실측 평균치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 19000 (실측 평균치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1566] 항체 농도 : 0.91 mg/mℓ, 항체 수량 : 5.46 mg (44 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.3

[1567] 실시예 61 항체-약물 콘주게이트 (58)

[1568] [화학식 130]

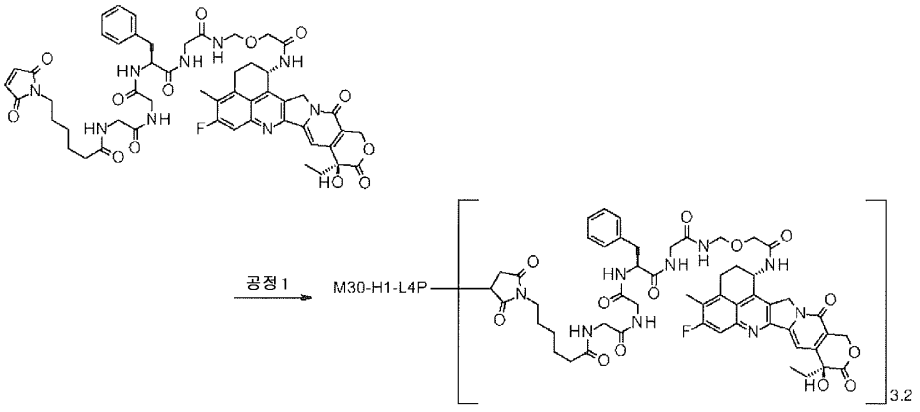
[1569] 

[1570] 실시예 59 와 실시예 60 의 항체-약물 콘주게이트의 거의 전체량을 혼합하고, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 A 를 사용하여 용액을 농축하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 얻었다.

[1571] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 12.30 mg, 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.4

[1572] 실시예 62 항체-약물 콘주게이트 (59)

[1573] [화학식 131]

[1574] 

[1575] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (59)

[1576] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (100 mℓ, 항체 1 g) 을 250 mℓ 플라스크에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (2.43 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.6 당량) 을 첨가하고, 추가로 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (5 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1577] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (3.51 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 및 디메틸술폭시드 (2.14 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 교반자로 130 분 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.547 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

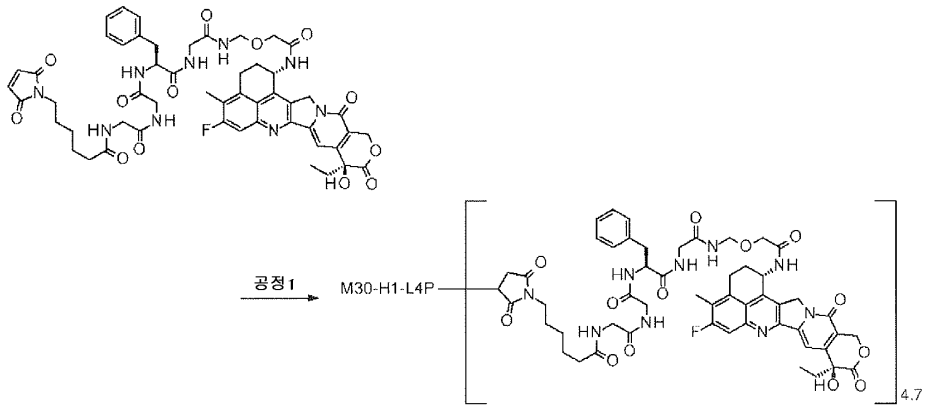
[1578] 정제 : 상기 용액에 대해, 한외 여과막 (머크 주식회사, Pellicon XL Cassette, Biomax 50KDa), 튜브 펌프 (미국 콜 파머사 마스터 플렉스 펌프 model 77521-40, 펌프 헤드 model 7518-00) 및 튜브 (미국 콜 파머사 마스터 플렉스 튜브 L/S16) 로 구성된 한외 여과 장치를 사용하여, 한외 여과 정제를 실시했다. 즉, 반응액에 정제 완충액으로서 ABS 를 적하하면서 (합계 800 mℓ), 한외 여과 정제를 실시함으로써, 미결합의 약물 링커 및 다른 저분자량 시약을 제거함과 함께 완충액을 ABS 로 치환하고, 또한 농축까지 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 약 70 mℓ 얻었다.

[1579] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1580] 항체 농도 : 14.2 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.0 g (약 100 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.2

[1581] 실시예 63 항체-약물 콘주게이트 (60)

[1582] [화학식 132]

[1583]


[1584] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (60)

[1585] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (5 mℓ, 항체 50 mg) 을 15 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.075 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4 당량) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1586] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.219 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 6.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.064 mℓ) 를 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 90 분 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.033 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9.8 당량) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의

반응을 정지시켰다.

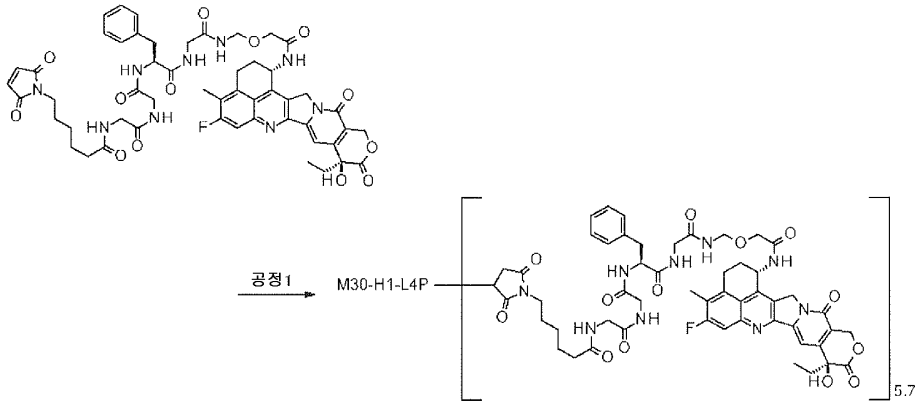
[1587] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 19 ㎖ 얻었다.

[1588] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1589] 항체 농도 : 2.19 mg/㎖, 항체 수량 : 42 mg (83 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 4.7

[1590] 실시예 64 항체-약물 콘주게이트 (61)

[1591] [화학식 133]

[1592] 

[1593] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (61)

[1594] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4P 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 ㎖$mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/㎖ 로 조제했다. 본 용액 (4 ㎖, 항체 40 mg) 을 15 ㎖ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.14 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 부근인 것을 pH 미터로 확인한 후, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1595] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.232 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 8.6 당량) 을 첨가하고, 15 ℃ 수욕 중에서 60 분 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC 수용액 (0.035 ㎖ ; 항체 1 분자에 대해 12.9 당량) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

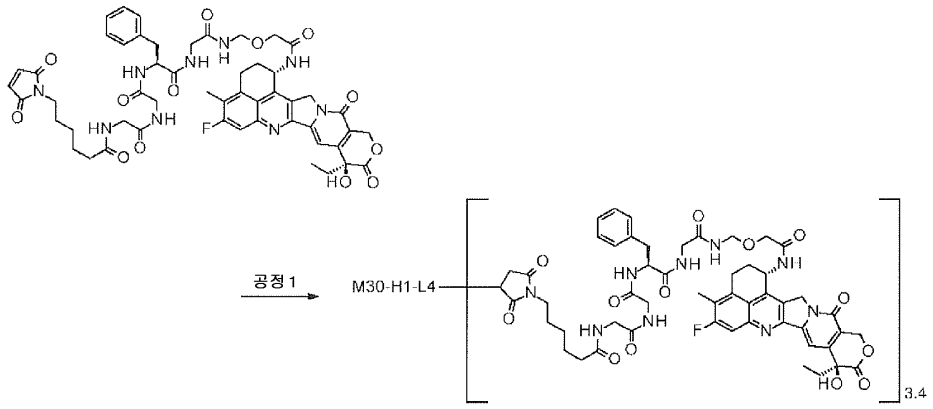
[1596] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 13 ㎖ 얻었다.

[1597] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\ 280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\ 370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\ 280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,\ 370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1598] 항체 농도 : 2.03 mg/㎖, 항체 수량 : 26 mg (66 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.7

[1599] 실시예 65 항체-약물 콘주게이트 (62)

[1600] [화학식 134]



[1601]

[1602] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (62)

[1603] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1604] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0267 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0066 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

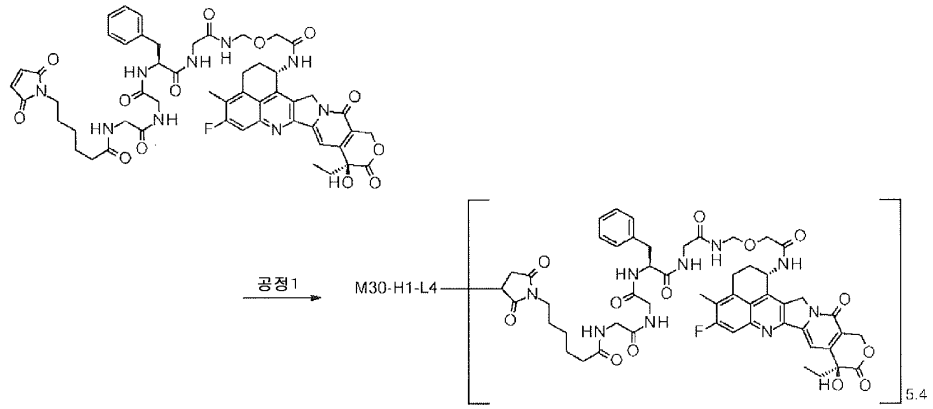
[1605] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1606] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1607] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 7.8 mg (62 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.4

[1608] 실시예 66 항체-약물 콘주게이트 (63)

[1609] [화학식 135]



[1610]

[1611] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (63)

[1612] 항체의 환원 : 참고예 1 에서 제작한 M30-H1-L4 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.61 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (1.25 mℓ, 항체 12.5 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0439 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5.2 당량) (0.0287 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 3.4 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0625 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.4 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1613] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0726 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 8.6 당량) 을 실온하 첨가하고, 15 ℃ 의 수욕 중에서 1 시간 인큐베이트하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.011 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

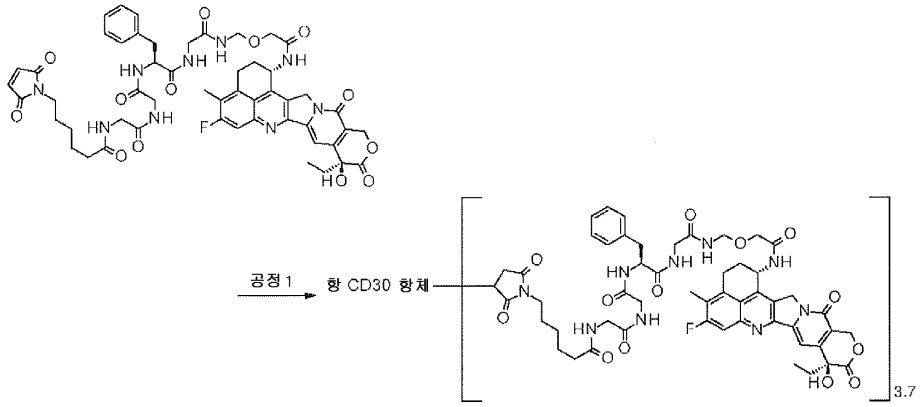
[1614] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하고, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 6 mℓ 얻은 후, 공통 조작 A 를 사용하여, 용액을 농축했다.

[1615] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 235300 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1616] 항체 농도 : 10.0 mg/mℓ, 항체 수량 : 7.3 mg (58 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 5.4

[1617] 실시예 67 항체-약물 콘주게이트 (64)

[1618] [화학식 136]

[1619] 

[1620] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (64)

[1621] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0058 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1622] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0101 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

[1623] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실

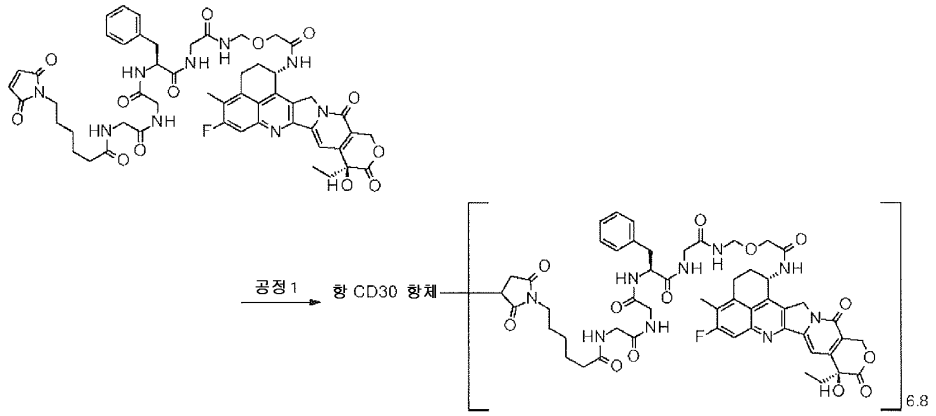
시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1624] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1625] 항체 농도 : 0.96 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.4 mg (60 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.7

[1626] 실시예 68 항체-약물 콘주게이트 (65)

[1627] [화학식 137]

[1628]


[1629] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (65)

[1630] 항체의 환원 : 참고예 3 에서 제작한 항 CD30 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.75 $m\ell mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0129 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.006 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1631] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0233 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0035 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

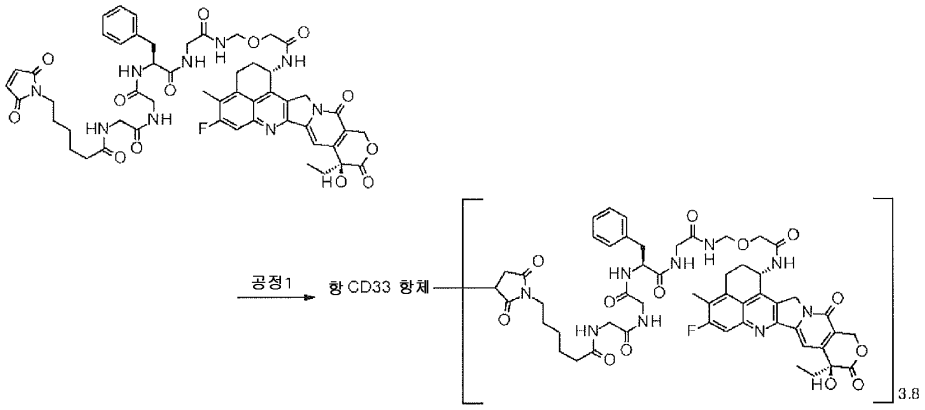
[1632] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1633] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 270400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1634] 항체 농도 : 0.39 mg/mℓ, 항체 수량 : 1.0 mg (24 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 6.8

[1635] 실시예 69 항체-약물 콘주게이트 (66)

[1636] [화학식 138]



[1637]

[1638] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (66)

[1639] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0058 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1640] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0101 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

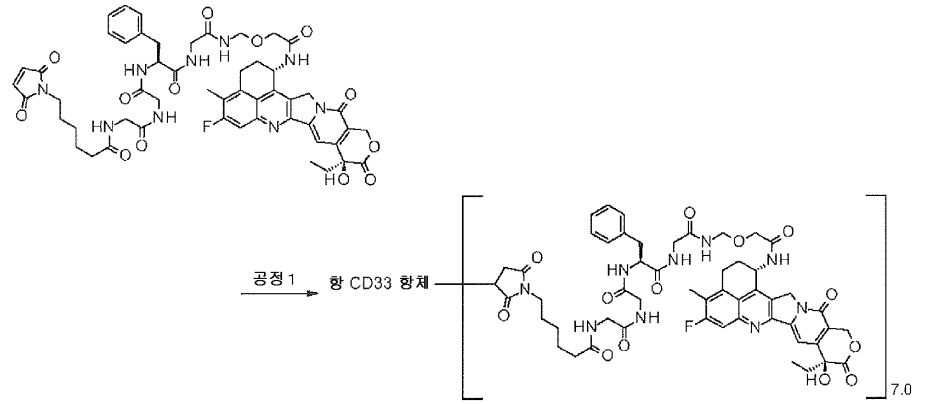
[1641] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1642] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,\,280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,\,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,\,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,\,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1643] 항체 농도 : 1.19 mg/mℓ, 항체 수량 : 3.0 mg (74 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.8

[1644] 실시예 70 항체-약물 콘주게이트 (67)

[1645] [화학식 139]



[1646]

[1647] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (67)

[1648] 항체의 환원 : 참고예 4 에서 제작한 항 CD33 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.66 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0129 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.006 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1649] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0233 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브 · 로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0035 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

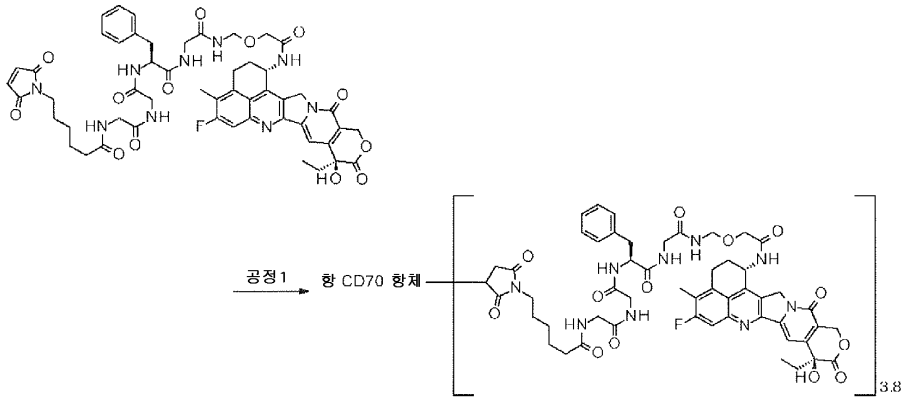
[1650] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1651] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 256400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1652] 항체 농도 : 1.24 mg/mℓ, 항체 수량 : 3.1 mg (78 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.0

[1653] 실시예 71 항체-약물 콘주게이트 (68)

[1654] [화학식 140]

[1655]


[1656] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (68)

[1657] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 mℓmg^{-1}cm^{-1} 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0065 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 2.5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0058 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1658] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0116 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 4.5 당량) 및 디메틸술폭시드 (0.0101 mℓ) 를 실온하 첨가하고, 튜브 · 로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하여, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0017 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

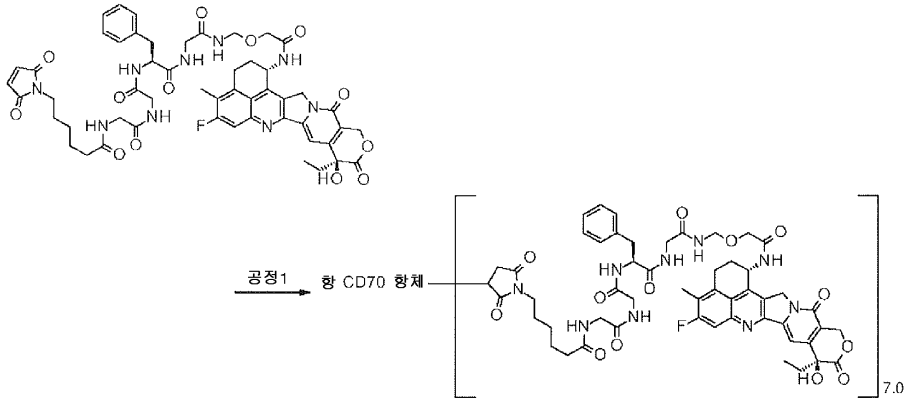
[1659] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1660] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1661] 항체 농도 : 1.10 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.8 mg (69 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 3.8

[1662] 실시예 72 항체-약물 콘주게이트 (69)

[1663] [화학식 141]

[1664] 

[1665] 공정 1 : 항체-약물 콘주게이트 (69)

[1666] 항체의 환원 : 참고예 5 에서 제작한 항 CD70 항체를, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 B (280 nm 흡광 계수로서 1.69 $m\ell mg^{-1}cm^{-1}$ 을 사용) 및 C-1 을 사용하여, PBS 6.5/EDTA 로 10 mg/mℓ 로 조제했다. 본 용액 (0.4 mℓ, 항체 4 mg) 을 1.5 mℓ 튜브에 넣고, 10 mM TCEP (토쿄 화성공업 주식회사) 수용액 (0.0129 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 5 당량) 및 1 M 인산수소 2 칼륨 수용액 (Nacalai Tesque, Inc. ; 0.006 mℓ) 을 첨가했다. 본 용액의 pH 가 7.0 ± 0.1 내인 것을 확인한 후에, 37 ℃ 에서 1 시간 인큐베이트함으로써, 항체 내 힌지부의 디술파이드 결합을 환원시켰다.

[1667] 항체와 약물 링커의 콘쥬게이션 : 상기 용액에 대해, 실시예 58 의 공정 8 에서 얻은 화합물을 10 mM 포함하는 디메틸술폭시드 용액 (0.0233 mℓ ; 항체 1 분자에 대해 9 당량) 을 실온하 첨가하고, 튜브·로테이터 (MTR-103, 아즈원 주식회사) 를 사용하여 실온하 1 시간 교반하고, 약물 링커를 항체에 결합시켰다. 다음으로, 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) 수용액 (0.0035 mℓ) 을 첨가하고, 다시 실온에서 20 분간 인큐베이트하여, 약물 링커의 반응을 정지시켰다.

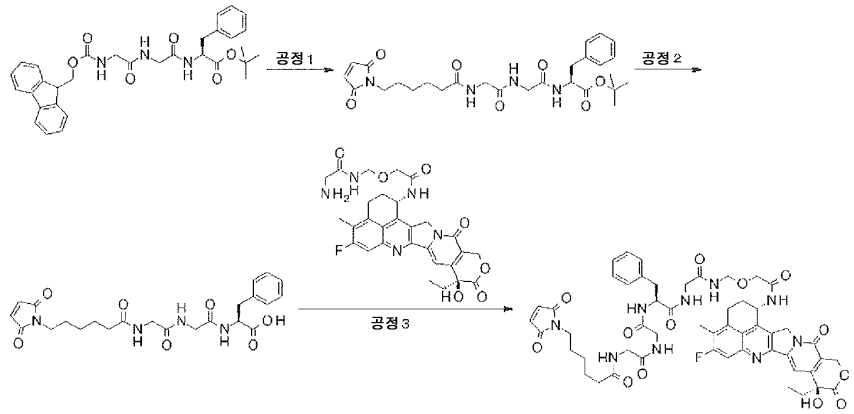
[1668] 정제 : 상기 용액을, 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 D-1 (완충액으로서 ABS 를 사용) 을 사용한 정제를 실시하여, 표기 항체-약물 콘주게이트를 함유하는 용액을 2.5 mℓ 얻었다.

[1669] 특성 평가 : 제조 방법 1 에 기재한 공통 조작 E (몰 흡광 계수로서, $\varepsilon_{A,280}$ = 262400 (계산 추정치), $\varepsilon_{A,370}$ = 0 (계산 추정치), $\varepsilon_{D,280}$ = 5178 (실측치), $\varepsilon_{D,370}$ = 20217 (실측치) 을 사용) 를 사용하여, 하기의 특성치를 얻었다.

[1670] 항체 농도 : 1.16 mg/mℓ, 항체 수량 : 2.9 mg (73 %), 항체 1 분자당 약물 평균 결합수 (n) : 7.0

[1671] 실시예 73 (실시예 58 의 공정 8 의 화합물의 별도 합성법)

[1672] [화학식 142]



[1673]

[1674] 공정 1 : tert-부틸N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라니네이트

[1675] 빙랭하, tert-부틸N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실글리실-L-페닐알라니네이트 (J. Pept. Res., 1999 년, 53 권, 393 항) (0.400 g, 0.717 mmol) 의 THF (12.0 mℓ) 용액에, 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-7-운데센 (0.400 mℓ) 을 첨가하여 실온에서 4 일간 교반한 후, 추가로 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 (0.221 g, 0.717 mmol) 을 첨가하여 3 시간 교반했다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 10 % 시트르산 수용액, 포화 탄산수소나트륨 수용액, 및 포화 식염수로 세정 후, 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 용매를 감압하에서 증류 제거한 후, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 9 : 1 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.295 g, 78 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ：1.28－1.36 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.57－1.71 (4H, m), 2.23 (2H, t, J＝7.6Hz), 3.09 (2H, d, J＝6.0Hz), 3.51 (2H, t, J＝7.6Hz), 3.85－4.02 (4H, m), 4.69－4.78 (1H, m), 6.15 (1H, t, J＝4.6Hz), 6.33 (1H, d, J＝7.3Hz), 6.60 (1H, t, J＝5.0Hz), 6.68 (2H, s), 7.10－7.16 (2H, m), 7.22－7.31 (3H, m).

MS (ESI) m／z：529 $(M+H)^+$

[1676]

[1677] 공정 2 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닌

[1678] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (0.295 g, 0.558 mmol) 의 디클로로메탄 (8.00 mℓ) 용액에, 트리플루오로아세트산 (4.00 mℓ) 을 첨가하여 실온에서 18 시간 교반 했다. 용매를 감압 증류 제거하여, 표기 화합물 (0.240 g, 91 %) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ：1.15－1.23 (2H, m), 1.40－1.53 (4H, m), 2.10 (2H, t, J＝7.6Hz), 2.88 (1H, dd, J＝13.7, 8.9Hz), 3.04 (1H, dd, J＝13.7, 5.0Hz), 3.35－3.43 (2H, m), 3.58－3.77 (4H, m), 4.41 (1H, td, J＝7.8, 5.0Hz), 7.00 (2H, s), 7.16－7.31 (5H, m), 8.00 (1H, t, J＝5.7Hz), 8.06 (1H, t, J＝5.7Hz), 8.13 (1H, d, J＝7.8Hz).

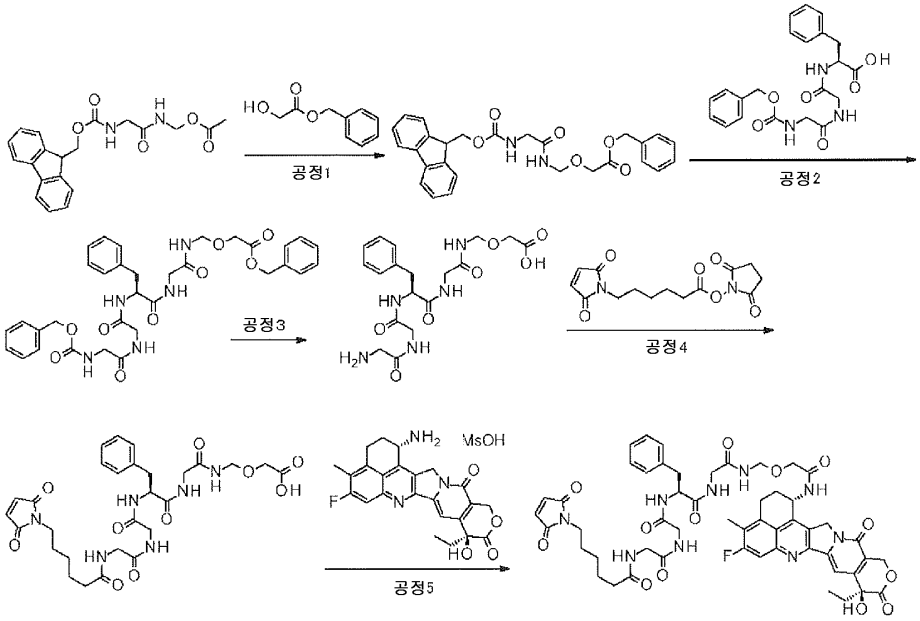
[1679]

[1680] 공정 3 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1681] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (0.572 g, 1.21 mmol) 을 디클로로메탄 (12.0 mℓ) 에 용해하고, N-하이드록시숙신이미드 (0.152 g, 1.32 mmol) 및, 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드염산염 (0.253 g, 1.32 mmol) 을 첨가하여 1 시간 교반했다. 그 반응 용액을 실시예 58 의 공정 5 에서 얻은 혼합물 (1.10 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (22.0 mℓ) 용액에 첨가하여, 실온에서 3 시간 교반했다. 반응 용액에 10 % 시트르산 수용액을 첨가하여, 클로로포름으로 추출하고, 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 8 : 2 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.351 g, 31 %) 을 담황색 고체로서 얻었다. 기기 데이터는 실시예 58 의 공정 8 의 화합물과 동일했다.

[1682] 실시예 74 (실시예 58 의 공정 8 의 화합물의 별도 합성법)

[1683] [화학식 143]



[1684]

[1685] 공정 1 : 벤질[({N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]글리실} 아미노)메톡시]아세테이트

[1686] 실시예 58 의 공정 1 에서 얻은 화합물 (7.37 g, 20.0 mmol) 의 테트라하이드로푸란 (200 mℓ) 용액에, 벤질글리콜레이트 (6.65 g, 40.0 mmol), 및 p-톨루엔술폰 산 1 수화물 (0.381 g, 2.00 mmol) 을 0 ℃ 에서 첨가하고, 실온에서 2 시간 30 분간 교반했다. 반응 용액에 포화 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여, 아세트산에틸로 추출하고, 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [헥산 : 아세트산에틸 = 100 : 0 (v/v) ~ 0 : 100] 로 정제하여, 표기 화합물 (6.75 g, 71 %) 을 무색 고체로서 얻었다. 기기 데이터는 실시예 58 의 공정 2 의 화합물과 동일했다.

[1687] 공정 2 : N-[(벤질옥시)카르보닐]글리실글리실-L-페닐알라닌-N- {[(2-(벤질옥시)-2-옥소에톡시]메틸} 글리신아미드

[1688] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (6.60 g, 13.9 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (140 mℓ) 용액에, 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데카-7-엔 (2.22 g, 14.6 mmol) 을 0 ℃ 에서 첨가하여, 실온에서 15 분간 교반했다. 반응 용액에, N-[(벤질옥시)카르보닐]글리실글리실-L-페닐알라닌 (6.33 g, 15.3 mmol), N-하이드록시숙신이미드 (1.92 g, 16.7 mmol) 및, 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드염산염 (3.20 g, 16.7 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (140 mℓ) 용액을, 미리 실온에서, 1 시간 교반한 것을 첨가하여 실온에서, 4 시간 교반했다. 반응 용액에 0.1 N 염산을 첨가하여 클로로포름으로 추출하고, 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 :

메탄올 = 8 : 2 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (7.10 g, 79 %) 을 무색 고체로서 얻었다.

[1689] ^{1}H－NMR (DMSO－D_6) δ：2．78 (1H, dd, J＝13．9, 9．6Hz), 3．05 (1H, dd, J＝13．9, 4．5Hz), 3．56－3．80 (6H, m), 4．15 (2H, s), 4．47－4．55 (1H, m), 4．63 (2H, d, J＝6．6Hz), 5．03 (2H, s), 5．15 (2H, s), 7．16－7．38 (15H, m), 7．52 (1H, t, J＝5．9Hz), 8．03 (1H, t, J＝5．5Hz), 8．17 (1H, d, J＝8．2Hz), 8．36 (1H, t, J＝5．7Hz), 8．61 (1H, t, J＝6．6Hz).

[1690] 공정 3 : 글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(카르복시메톡시)메틸]글리신아미드

[1691] 상기 공정 2 에서 얻은 화합물 (7.00 g, 10.8 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (216 mℓ) 용액에, 팔라듐탄소 촉매 (7.00 g) 를 첨가하고, 수소 분위기하, 실온에서 24 시간 교반했다. 불용물을 셀라이트 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 증류 제거했다. 얻어진 잔류물을 물에 용해하여, 불용물을 셀라이트 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 증류 제거하는 조작을 2 회 반복하여, 표기 화합물 (3.77 g, 82 %) 을 무색 고체로서 얻었다.

[1692] ^{1}H－NMR (DMSO－D_6) δ：2．84 (1H, dd, J＝13．7, 9．8Hz), 3．08 (1H, dd, J＝13．7, 4．7Hz), 3．50－3．72 (4H, m), 3．77－3．86 (2H, m), 3．87 (2H, s), 4．52－4．43 (1H, m), 4．61 (2H, d, J＝6．6Hz), 7．12－7．30 (5H, m), 8．43 (1H, t, J＝5．9Hz), 8．54 (1H, d, J＝7．8Hz), 8．70 (1H, t, J＝6．3Hz), 8．79 (1H, t, J＝5．5Hz).

[1693] 공정 4 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(카르복시메톡시)메틸]글리신아미드

[1694] 상기 공정 3 에서 얻은 화합물 (3.59 g, 8.48 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (85.0 mℓ) 용액에, 6-말레이미드헥산산N-숙신이미딜 (2.88 g, 9.33 mmol), 및 트리에틸아민 (0.858 g, 8.48 mmol) 을 첨가하여, 실온에서 1 시간 교반했다. 반응 용액에 0.1 N 염산을 첨가하여, 클로로포름, 및 클로로포름과 메탄올의 혼합 용매 [클로로포름 : 메탄올 = 4 : 1 (v/v)] 로 추출하고, 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조시켜, 여과했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물 (3.70 g, 71 %) 을 무색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（DMSO－D_6）δ：1．13－1．24（2H，m），1．42－1．53（4H，m），2．11（2H，t，J＝7．4Hz），2．80（1H，dd，J＝13．7，9．8Hz），3．06（1H，dd，J＝13．9，4．5Hz），3．37（2H，t，J＝7．2Hz），3．56－3．78（6H，m），3．97（2H，s），4．46－4．53（1H，m），4．61（2H，d，J＝6．3Hz），7．00（2H，s），7．15－7．29（5H，m），8．03－8．20（3H，m），8．32（1H，t，J＝5．9Hz），8．60（1H，t，J＝6．7Hz）．

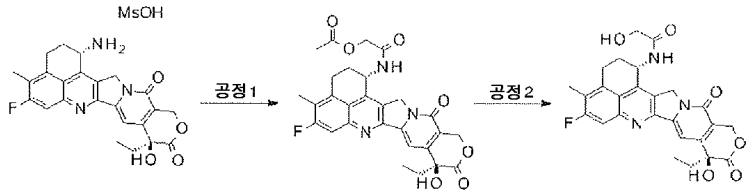
[1695]

[1696] 공정 5 : N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에톡시)메틸]글리신아미드

[1697] 화합물 (4) 의 메실산염 (1.14 g, 2.00 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (40.0 mℓ) 용액에, 트리에틸아민 (0.202 g, 2.00 mmol), 상기 공정 4 에서 얻은 화합물 (1.48 g, 2.40 mmol), 및 16.4 % 함수의 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄클로라이드 (0.993 g, 3.00 mmol) 를 0 ℃ 에서 첨가하여, 실온에서 1 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 = 8 : 2 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (1.69 g, 82 %) 을 담황색 고체로서 얻었다. 기기 데이터는 실시예 58 의 공정 8 의 화합물과 동일했다.

[1698] 실시예 75 N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-2-하이드록시아세트아미드

[1699] [화학식 144]



[1700]

[1701] 공정 1 : 2- {[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노} -2-옥소에틸아세테이트

[1702] 빙랭하, 화합물 (4) 의 메실산염 (0.500 g, 0.941 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (20.0 mℓ) 현탁액에, N,N-디이소프로필에틸아민 (0.492 mℓ, 2.82 mmol) 및 아세톡시아세틸클로라이드 (0.121 mℓ, 1.13 mmol) 를 첨가하여, 실온에서 1 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.505 g, 정량적) 을 담황색 고체로서 얻었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．4Hz），1．81－1．92（2H，m），2．08（3H，s），2．08－2．22（2H，m），2．41（3H，s），3．14－3．21（2H，m），4．51（2H，dd，J＝19．4，14．7Hz），5．22（2H，dd，J＝40．1，19．0Hz），5．43（2H，s），5．56－5．61（1H，m），6．53（1H，s），7．31（1H，s），7．81（1H，d，J＝11．0Hz），8．67（1H，d，J＝8．6Hz）．

[1703] MS（ESI）m／z：536（M＋H）$^+$

[1704] 공정 2 : N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-2-하이드록시아세트아미드

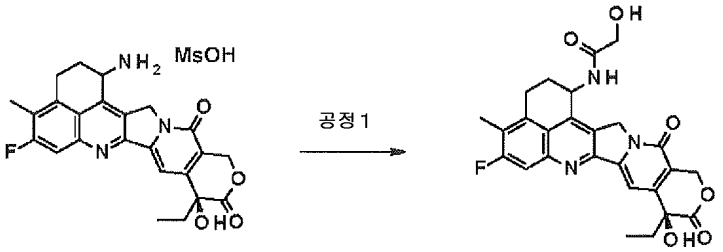
[1705] 상기 공정 1 에서 얻은 화합물 (0.504 g, 0.941 mmol) 의 메탄올 (50.0 mℓ) 현탁액에, 테트라하이드로푸란 (20.0 mℓ) 및 1 N 수산화나트륨 수용액 (4.00 mℓ, 4.00 mmol) 을 첨가하여 실온에서 1 시간 교반했다. 1 N 염산 (5.00 mℓ, 5.00 mmol) 을 첨가하여 반응을 정지하고, 용매를 감압 증류 제거했다. 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 의 분배 유기층] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.412 g, 89 %) 을 담황색 고체로서 얻었다. 항체-약물 콘주게이트 (55), (56) 을 담암 마우스에 투여했을 때에, 이 화합물이 종양 중에서 확인되었다.

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．3Hz），1．78－1．95（2H，m），2．09－2．28（2H，m），2．39（3H，s），3．07－3．27（2H，m），3．96（2H，d，J＝6．0Hz），5．11－5．26（2H，m），5．42（2H，s），5．46－5．54（1H，m），5．55－5．63（1H，m），6．52（1H，s），7．30（1H，s），7．78（1H，d，J＝10．9Hz），8．41（1H，d，J＝9．1Hz）．MS（ESI）m／z：494（M＋H）$^+$

[1706]

[1707] 실시예 76 (실시예 75 의 화합물의 별도 합성법)

[1708] [화학식 145]



[1709]

[1710] 공정 1 : N-[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4'：6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일]-2-하이드록시아세트아미드

[1711] 글리콜산 (0.0201 g, 0.27 mmol) 을 N,N-디메틸포름아미드 (1.0 mℓ) 에 용해하고, N-하이드록시숙신이미드 (0.0302 g, 0.27 mmol) 및, 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드염산염 (0.0508 g, 0.27 mmol) 을 첨가하여 1 시간 교반했다. 그 반응 용액을 화합물 (4) 의 메실산염 (0.1 g, 0.176 mmol) 의 N,N-디메틸포름아미드 (1.0 mℓ) 현탁액에, 트리에틸아민 (0.025 mℓ, 0.18 mmol) 을 첨가하여 실온에서 24 시간 교반했다. 용매를 감압 증류 제거하고, 얻어진 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 [클로로포름 ~ 클로로포름 : 메탄

올 = 10 : 1 (v/v)] 로 정제하여, 표기 화합물 (0.080 g, 92 %) 을 담황색 고체로서 얻었다. 기기 데이터는 실시예 75 의 공정 2 에서 얻은 화합물과 동일했다.

[1712] (시험예 1) 전체 길이 인간 B7-H3 베어리언트 1 발현 벡터의 제작

[1713] LNCaP 세포 (American Type Culture Collection : ATCC) total RNA 로부터 합성한 cDNA 를 주형으로 프라이머 세트 : 프라이머 1 :

[1714] 5'-ctatagggagacccaagctggctagcatgctgcgtcggcggggcag-3' (배열 번호 22)

[1715] 및, 프라이머 2 :

[1716] 5'-aacgggccctctagactcgagcggccgctcaggctatttcttgtccatcatcttctttgctgtcag-3' (배열 번호 23)

[1717] 을 사용하여 PCR 반응을 실시하고, 인간 B7-H3 베어리언트 1 을 코드하는 cDNA 를 증폭했다.

[1718] 다음으로, 얻어진 PCR 산물을 MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO 사) 으로 정제했다. 또한, 제한 효소 (NheI/NotI) 로 소화한 후, MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO 사) 으로 정제했다. pcDNA 3.1 (+) 플라스미드 DNA (라이프 테크놀로지사) 를 동일한 제한 효소 (NheI/NotI) 로 소화한 후, MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO 사) 으로 정제했다.

[1719] 상기 정제 DNA 용액을 혼합하고, 추가로 Ligation high (TOYOBO 사) 를 첨가하고, 16 ℃ 에서 8 시간 인큐베이트하여, 라이게이션했다.

[1720] 상기 반응물을 대장균 DH5α 콘피텐트셀 (라이프 테크놀로지사) 에 첨가하여 형질 전환했다.

[1721] 상기에서 얻어진 콜로니에 대해, PCR 프라이머와 BGH reverse Primer 로 콜로니 다이렉트 PCR 을 실시하여, 후보 클론을 셀렉션했다.

[1722] 얻어진 후보 클론을 액체 배지 (LB/Amp) 에서 배양하고, MagExtractor-Plasmid-(TOYOBO 사) 로 플라스미드 DNA 를 추출했다.

[1723] 얻어진 플라스미드 DNA 를 주형으로

[1724] 프라이머 3 (CMV promoter 프라이머) :

[1725] 5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3' (배열 번호 24)

[1726] 및, 프라이머 4 (BGH reverse 프라이머) :

[1727] 5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (배열 번호 25)

[1728] 간의 시퀀스 해석을 실시하여, 취득 클론과 제공 CDS 배열을 비교했다.

[1729] 배열을 확인 후, 얻어진 클론을 200 mℓ 의 LB/Amp 배지에서 배양하고, VioGene 사 Plasmid Midi V-100 키트를 사용하여, 플라스미드 DNA 의 추출을 실시했다.

[1730] 본 벡터를 pcDNA 3.1-B7-H3 이라고 명명했다. 본 벡터에 클로닝된 B7-H3 베어리언트 1 유전자의 ORF 부분의 배열은 배열표의 배열 번호 26 (도 16) 의 뉴클레오티드 번호 1 내지 1602 에 나타나 있다. 또, B7-H3 베어리언트 1 의 아미노산 배열은 배열표의 배열 번호 1 에 나타나 있다.

[1731] (시험예 2) B7-H3 베어리언트 1 유전자 안정 발현 CCRF-CEM 세포의 조제

[1732] 시험예 1 에서 제작된 pcDNA 3.1-B7-H3 을, CCRF-CEM 세포 (ATCC) 에 Nucleofector II (론자사 제조) 를 이용하여 전기 천공법으로 트랜스펙션했다. 그 후, 10 % 소 태아 혈청 (FBS) 함유 RPMI1640 배지 (라이프 테크놀로지사) (이후 10 % FBS-RPMI1640) 중에서 37 ℃, 5 % CO_2 의 조건하에서 다시 이틀 밤 배양했다.

[1733] 2 일간 배양 후, pcDNA 3.1-B7-H3 이 안정적으로 삽입된 CCRF-CEM 세포를 선택하기 위해, 750 ㎍/mℓ G418 (라이프 테크놀로지사) 함유 10 % FBS-RPMI1640 에서 배양을 개시했다.

[1734] 1 개월간 배양 후, 단일 세포 클론을 얻기 위해 한계 기석법을 이용하여 클로닝을 실시했다. 구체적으로는, G418 에 대한 내성을 가진 세포를 10 cell/mℓ 로 희석하여 96 well 플레이트에 100 ㎕/well 의 농도로 파종, 배양하고, 개별의 well 로부터 증식한 세포를 회수했다.

[1735] 회수된 각 클론의 B7-H3 발현을 확인하기 위해서는, 플로사이트메트리법을 이용했다. 구체적으로는, 회수된 각 클론을 5 % FBS 함유 PBS 로 2 회 세정한 후, 10 ㎍/㎖ M30 을 포함하는 5 % FBS 함유 PBS 를 첨가하여 현탁하고, 4 ℃ 에서 30 분간 정치했다. 5 % FBS 함유 PBS 로 2 회 세정한 후, 5 % FBS 함유 PBS 로 1000 배로 희석한 Fluorescein-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG (Whole Molecule) (ICN Pharmaceuticals 사 제조 #55493) 를 첨가하여 현탁하고, 4 ℃ 에서 30 분간 정치했다. 5 % FBS 함유 PBS 로 2 회 세정한 후, 5 % FBS 함유 PBS 로 재현탁하고, 플로우사이트미터 (FC500 : BeckmanCoulter 사) 로 검출을 실시했다.

[1736] 본 조작에 의해 얻어진, B7-H3 베어리언트 1 유전자 안정 발현 CCRF-CEM 세포를 CEM_V1_3.1_2 세포라고 명명했다. 친주인 CCRF-CEM 세포는 B7-H3 비발현 세포주로서 사용했다.

[1737] (시험예 3) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (1)

[1738] 시험예 2 에서 제작된 CEM_V1_3.1_2 세포, CCRF-CEM 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. CEM_V1_3.1_2 세포, CCRF-CEM 세포를 배지에서 8×10^4 cells/㎖ 가 되도록 조제하고, 65 ㎕ 의 배지를 넣은 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 25 ㎕ 씩 첨가하여 하룻밤 배양했다. 다음날, 배지에서 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 M30-H1-L4 항체, M30-H1-L4P 항체 및 항체-약물 콘주게이트를 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 3 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1739] $$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1740] a : 피검물질의 농도 a

[1741] b : 피검물질의 농도 b

[1742] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1743] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1744] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1745] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1746] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1747] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1748] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 10)

[1749] CEM_V1_3.1_2 세포에 대해, 항체-약물 콘주게이트 (5), (16), (21), (32), (44), (45), (46), (52), (54) 는 IC_{50} < 0.1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 항체-약물 콘주게이트 (1), (12), (13), (20), (28), (29), (35), (36), (37), (41), (49), (53) 은 0.1 < IC_{50} < 1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 항체-약물 콘주게이트 (33), (34), (47), (48), (50), (51) 은 1 < IC_{50} < 100 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 한편, CCRF-CEM 세포에 대해서는 상기의 어느 항체-약물 콘주게이트도 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)). M30-H1-L4 항체 및 M30-H1-L4P 항체는 어느 세포에 대해서도 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)).

[1750] (시험예 4) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (2)

[1751] 항원 양성 세포의 SR 세포 (ATCC), 항원 음성 세포의 Daudi 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. SR 세포, Daudi 세포를 배지에서 2.8×10^4 cells/㎖ 가 되도록 조제하고, 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 90 ㎕ 씩 첨가했다. 2 시간 후,

배지에서 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 320 pM, 64 pM, 12.8 pM, 2.6 pM 으로 희석한 항 CD30 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (6), (7) 을 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 3 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1752] $$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1753] a : 피검물질의 농도 a

[1754] b : 피검물질의 농도 b

[1755] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1756] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1757] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1758] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1759] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1760] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1761] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 12)

[1762] 항체-약물 콘주게이트 (6), (7) 은 SR 세포에 대해 IC_{50} < 0.01 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 한편, Daudi 세포에 대해서는 항체-약물 콘주게이트 (6), (7) 은 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 4.0 (nM)). 또, 항 CD30 항체는 어느 세포에 대해서도 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 4.0 (nM)).

[1763] (시험예 5) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (3)

[1764] 항원 양성 세포의 SR 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. SR 세포를 배지에서 2.8 × 10^4 cells/㎖ 가 되도록 조제하고, 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 90 ㎕ 씩 첨가했다. 2 시간 후, 배지에서 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM 으로 희석한 항 CD30 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (22), (23), (38), (64), (65) 를 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 6 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1765] $$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1766] a : 피검물질의 농도 a

[1767] b : 피검물질의 농도 b

[1768] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1769] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1770] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1771] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1772] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1773] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1774] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 12)

[1775] 항체-약물 콘주게이트 (23), (38), (64), (65) 는 SR 세포에 대해 IC_{50} < 0.01 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 항체-약물 콘주게이트 (22) 는 SR 세포에 대해 IC_{50} < 0.1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 또, 항 CD30 항체는 SR 세포에 대해 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 4.0 (nM)).

[1776] (시험예 6) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (4)

[1777] 항원 양성 세포의 HL-60 세포 (ATCC), 항원 음성 세포의 Raji 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. HL-60 세포, Raji 세포를 배지에서 8 × 10^4 cells/mℓ 가 되도록 조제하고, 65 ㎕ 의 배지를 넣은 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 25 ㎕ 씩 첨가했다. 배지에서 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 항 CD33 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (8), (9) 를 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 3 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1778] $$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1779] a : 피검물질의 농도 a

[1780] b : 피검물질의 농도 b

[1781] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1782] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1783] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1784] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1785] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1786] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1787] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 5)

[1788] 항체-약물 콘주게이트 (8), (9) 는 HL-60 세포에 대해서는 IC_{50} < 0.1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 한편, Raji 세포에 대해서는 항체-약물 콘주게이트 (8), (9) 는 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)). 또, 항 CD33 항체는 어느 세포에 대해서도 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)).

[1789] (시험예 7) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (5)

[1790] 항원 양성 세포의 NOMO-1 세포 (HSRRB) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. NOMO-1 세포를 배지에서 2.8 × 10^4 cells/mℓ 가 되도록 조제하고, 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 90 ㎕ 씩 첨가했다. 2 시간 후, 배지에서 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 항 CD33 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (24), (25), (67) 을 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 6 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음

식으로 산출했다.

[1791] IC_{50} (nM) = antilog ((50 − d) × (LOG_{10}b − LOG_{10}a) ÷ (d − c) + LOG_{10}b)

[1792] a : 피검물질의 농도 a

[1793] b : 피검물질의 농도 b

[1794] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1795] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1796] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1797] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1798] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1799] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1800] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 5)

[1801] NOMO-1 세포에 대해, 항체-약물 콘주게이트 (25) 는 IC_{50} < 0.1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 항체-약물 콘주게이트 (24), (67) 은 1 < IC_{50} < 100 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 또, 항 CD33 항체는 NOMO-1 세포에 대해 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)).

[1802] (시험예 8) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (6)

[1803] 항원 양성 세포의 U251 세포 (ATCC), 항원 음성 세포의 MCF-7 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. U251 세포, MCF-7 세포를 배지에서 2.8 × 10^4 cells/mℓ 가 되도록 조제하고, 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 90 μℓ 씩 첨가하여 하룻밤 배양했다. 다음날, 각 배지에서 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 항 CD70 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (10), (11) 을 마이크로 플레이트에 10 μℓ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 μℓ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 6 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1804] IC_{50} (nM) = antilog ((50 − d) × (LOG_{10}b − LOG_{10}a) ÷ (d − c) + LOG_{10}b)

[1805] a : 피검물질의 농도 a

[1806] b : 피검물질의 농도 b

[1807] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1808] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1809] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1810] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1811] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1812] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1813] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 12)

[1814] 항체-약물 콘주게이트 (10), (11) 은 U251 세포에 대해 IC_{50} < 1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다.

한편, MCF-7 세포에 대해서는 항체-약물 콘주게이트 (10), (11) 은 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (≥ 90 (nM)). 또, 항 CD70 항체는 어느 세포에 대해서도 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)).

[1815] (시험예 9) 항체-약물 콘주게이트의 세포 상해성 시험 (7)

[1816] 항원 양성 세포의 U251 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 RPMI1640 (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. U251 세포를 배지에서 2.8×10^4 cells/㎖ 가 되도록 조제하고, 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트에 90 ㎕ 씩 첨가했다. 2 시간 후, 배지에서 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 항 CD70 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (26), (27), (40), (68), (69) 를 마이크로 플레이트에 10 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 배지를 10 ㎕ 씩 첨가했다. 37 도, 5 % CO_2 하에서 6 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더 (PerkinElmer) 로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1817]
$$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1818] a : 피검물질의 농도 a

[1819] b : 피검물질의 농도 b

[1820] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1821] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1822] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1823] 각 농도에 있어서의 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1824] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1825] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1826] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 12)

[1827] 항체-약물 콘주게이트 (26), (27), (40), (69) 는 U251 세포에 대해 $1 < IC_{50} < 10$ (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 항체-약물 콘주게이트 (68) 은 $10 < IC_{50} < 100$ (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 또, 항 CD70 항체는 U251 세포에 대해 세포 상해 활성을 나타내지 않았다 (> 100 (nM)).

[1828] (시험예 10) 유리 약물의 세포 상해성 시험 (8)

[1829] A375 세포 (ATCC) 는 10 % 의 소 태아 혈청 (MOREGATE) 을 포함하는 DMEM (GIBCO) (이하, 배지) 에서 배양했다. A375 세포를 배지에서 4×10^4 cells/㎖ 가 되도록 조제하고, 65 ㎕ 의 배지를 넣은 96 구멍 세포 배양용 마이크로 플레이트 (CORNING) 에 25 ㎕ 씩 첨가하여 하룻밤 배양했다. 다음날, DMSO 로 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM 으로 희석한 피검물질을 마이크로 플레이트에 0.5 ㎕ 씩 첨가했다. 피검물질 비첨가 웰에는 DMSO 를 0.5 ㎕ 씩 첨가했다. 모든 웰에 배지를 10 ㎕ 씩 첨가하여 배지의 액량을 100 ㎕ 로 하고, 37 도, 5 % CO_2 하에서 6 일간 배양했다. 배양 후, 마이크로 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내어 실온에서 30 분간 정치했다. 배양액과 등량의 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 를 첨가하여 교반했다. 실온에서 10 분간 정치 후에 플레이트 리더로 발광량을 계측했다. IC_{50} 값은 다음 식으로 산출했다.

[1830]
$$IC_{50}(nM) = antilog((50-d) \times (LOG_{10}b - LOG_{10}a) \div (d-c) + LOG_{10}b)$$

[1831] a : 피검물질의 농도 a

[1832] b : 피검물질의 농도 b

[1833] c : 농도 a 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1834] d : 농도 b 의 피검물질을 첨가했을 때의 생세포율

[1835] a, b 는 생세포율 50 % 를 넘는 농도로, a > b

[1836] 세포 생존률은 다음 식으로 산출했다.

[1837] 세포 생존률 (%) = a ÷ b × 100

[1838] a : 피검물질 첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 2)

[1839] b : 피검물질 비첨가 웰의 발광량의 평균치 (n = 10)

[1840] 실시예 (75) 의 화합물, 및 엑사테칸은 A375 세포에 대해 0.1 < IC_{50} < 1 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 실시예 (42) 의 화합물은 1 < IC_{50} < 10 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다. 실시예 (1) 의 화합물은 10 < IC_{50} < 100 (nM) 의 세포 상해 활성을 나타냈다.

[1841] (시험예 11) 항종양 시험 (1)

[1842] 마우스 : 5-6 주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스 (닛폰 찰스·리버사) 를 실험 사용 전에 SPF 조건화로 4 - 7 일간 순화했다. 마우스에는 멸균한 고형 사료 (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) 를 급이하고, 멸균한 수도물 (5 - 15 ppm 차아염소산나트륨 용액을 첨가하여 조제) 을 주었다.

[1843] 측정, 계산식 : 모든 연구에 있어서, 종양의 장경 및 단경을 전자식 디지털 캐리퍼 (CD-15C, Mitutoyo Corp.) 로 1 주간에 2 회 측정하고, 종양 체적 (mm^3) 을 계산했다. 계산식은 이하에 나타내는 바와 같다.

[1844] 종양 체적 (mm^3) = 1/2 × 장경 (mm) × [단경 (mm)]^2

[1845] 항체-약물 콘주게이트는 모두 생리 식염수 (오오츠카 제약 공장) 로 희석하고, 10 mℓ/kg 의 액량을 꼬리 정맥 내 투여했다. 인간 멜라노마주 A375 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식염수에 현탁한 8 × 10^6 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하여 (Day 0), Day 11 에 무작위로 군 분류를 실시했다. M30-H1-L4P 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (2) 를 Day 11, 18, 25 에 모두 10 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다.

[1846] 결과를 도 17 에 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 삼각선은 M30-H1-L4P 항체, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다.

[1847] 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 투여에 의해 종양 체적이 현저하게 감소되고, 최종 투여 후는 추가적인 종양 증식이 보이지 않은 것을 나타낸다. 한편, M30-H1-L4P 항체 투여에서는 종양의 증식이 진행되었다.

[1848] 또, 항체-약물 콘주게이트 (2) 가 투여된 마우스에서는, 체중 감소 등의 특히 눈에 띈 소견도 없고, 항체-약물 콘주게이트 (2) 는 독성적으로도 약하고, 안전성도 높다고 생각된다.

[1849] (시험예 12) 항종양 시험 (2)

[1850] 인간 멜라노마주 A375 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식염수에 현탁한 6 × 10^6 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하고 (Day 0), Day 18 에 무작위로 군 분류를 실시했다. 항체-약물 콘주게이트 (2) (0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg) 를 Day 18, 25, 32 에 각 용량 qw × 3 의 스케줄로 꼬리 정맥 내 투여했다.

[1851] 결과를 도 18 에 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흑색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 0.1 mg/kg 투여 시, 선 -X- 는 0.3 mg/kg 투여 시, 흑색 삼각선은 1 mg/kg 투여 시, 흰색 둥근선은 3 mg/kg 투여 시의 효과를 나타낸다. 항체-약물 콘주게이트 (2) 는 용량 의존적으로 종양의 축소 효과를 발휘했다.

[1852] (시험예 13) 항종양 시험 (3)

[1853] 인간 비소세포 폐암주 Calu-6 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식

염수에 현탁한 5 × 10^6 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하고 (Day 0), Day 11 에 무작위로 군 분류를 실시했다. M30-H1-L4P 항체 및 항체-약물 콘주게이트 (2) 를 Day 11, 18, 25 에 qw × 3 의 스케줄로 모두 10 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다.

[1854] 결과를 도 19 에 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 삼각선은 M30-H1-L4P 항체, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 효과를 나타낸다. 항체-약물 콘주게이트 (2) 의 투여에 의해 종양 체적이 현저하게 감소되고, 최종 투여 후는 추가적인 종양 증식이 보이지 않았다. 한편, M30-H1-L4P 항체 투여에서는 종양의 증식이 진행되었다.

[1855] 또, 항체-약물 콘주게이트 (2) 가 투여된 마우스에서는, 체중 감소 등의 특히 눈에 띈 소견도 없고, 항체-약물 콘주게이트 (2) 는 독성적으로도 약하고, 안전성도 높다고 생각된다.

[1856] (시험예 14) 항종양 시험 (4)

[1857] 인간 멜라노마주 A375 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식염수에 현탁한 8 × 10^6 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하고 (Day 0), Day 21 에 무작위로 군 분류를 실시했다. 항체-약물 콘주게이트 (1), (13), (41), (55) 를 Day 21 에 모두 10 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다.

[1858] 결과를 도 20 에 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (1) 투여 시, 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (13) 투여 시, 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (41) 투여 시, 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (55) 투여 시의 효과를 나타낸다. 항체-약물 콘주게이트 (1), (13), (41), (55) 의 투여에 의해 종양 체적이 현저하게 감소되고, 모두 종양 증식 억제 효과를 발휘했다.

[1859] 또, 항체-약물 콘주게이트 (1), (13), (41), (55) 가 투여된 마우스에서는, 체중 감소 등의 특히 눈에 띈 소견도 없고, 항체-약물 콘주게이트 (1), (13), (41), (55) 는 독성적으로도 약하고, 안전성도 높다고 생각된다.

[1860] (시험예 15) 항종양 시험 (5)

[1861] 인간 비소세포 폐암주 Calu-6 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식염수에 현탁한 5 × 10^6 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하고 (Day 0), Day 12 에 무작위로 군 분류를 실시했다. 항체-약물 콘주게이트 (13), (41), (55) 를 Day 12 에 모두 10 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다. 또 비교 대조로서 DE-310 을 Day 12 에 0.1 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다. 여기서, 투여량의 표기는 항체-약물 콘주게이트에서는 항체의 투여량에 기초하는 값이며, DE-310 에서는 함유 약물의 투여량에 기초하는 값이므로, 항체-약물 콘주게이트와 DE-310 의 함유 약물량은 대략 1 : 100 이며, 상기 투여에 의해 동등량의 함유 약제를 투여한 것이 된다.

[1862] 결과를 도 21 에 나타낸다. 도면 중의 흰색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흰색 둥근선은 DE-310, 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (13), 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (41), 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (55) 의 효과를 나타낸다. 항체-약물 콘주게이트 (13), (41), (55) 의 투여에 의해 종양 체적이 현저하게 감소된 한편, DE-310 의 투여에서는 종양 체적의 감소는 확인되지 않았다.

[1863] 또, 항체-약물 콘주게이트 (13), (41), (55) 가 투여된 마우스에서는, 체중 감소 등의 특히 눈에 띈 소견도 없고, 이들의 항체-약물 콘주게이트는 독성적으로도 약하고, 안전성도 높다고 생각된다.

[1864] (시험예 16) 항종양 시험 (6)

[1865] 인간 멜라노마주 A375 세포를 ATCC (American Type Culture Collection) 로부터 구입했다. 생리 식염수에 현탁한 1 × 10^7 cells 를 암컷 누드 마우스의 우측 복부에 피하 이식하고 (Day 0), Day 11 에 무작위로 군 분류를 실시했다. 항체-약물 콘주게이트 (17), (18), (19), (59), (60), (61) 을 Day 11, 18 에 qw × 2 의 스케줄로 모두 3 mg/kg 의 용량으로 꼬리 정맥 내 투여했다.

[1866] 결과를 도 22 에 나타낸다. 도면 중의 흑색 마름모꼴선은 무처치 종양, 흑색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (17) 투여 시, 흰색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (18) 투여 시, 흰색 둥근선은 항체-약물 콘주게이트 (19) 투여 시, 흑색 삼각선은 항체-약물 콘주게이트 (59) 투여 시, 흰색 사각선은 항체-약물 콘주게이트 (60) 투여 시, 선 -X- 는 항체-약물 콘주게이트 (61) 투여 시의 효과를 나타낸다.

[1867] 항체-약물 콘주게이트 (17), (18), (19), (59), (60), (61) 의 투여에 의해 종양 체적이 현저하게 감소되고, 모두 종양 증식 억제 효과를 발휘했다.

[1868] 또, 항체-약물 콘주게이트 (17), (18), (19), (59), (60), (61) 이 투여된 마우스에서는, 체중 감소 등의 특히 눈에 띈 소견도 없고, 이들의 항체-약물 콘주게이트는 독성적으로도 약하고, 안전성도 높다고 생각된다.

[1869] 배열표 프리텍스트

[1870] 배열 번호 1 - B7-H3 베어리언트 1 의 아미노산 배열

[1871] 배열 번호 2 - B7-H3 베어리언트 2 의 아미노산 배열

[1872] 배열 번호 3 - M30 항체의 CDRH1 의 아미노산 배열

[1873] 배열 번호 4 - M30 항체의 CDRH2 의 아미노산 배열

[1874] 배열 번호 5 - M30 항체의 CDRH3 의 아미노산 배열

[1875] 배열 번호 6 - M30 항체의 CDRL1 의 아미노산 배열

[1876] 배열 번호 7 - M30 항체의 CDRL2 의 아미노산 배열

[1877] 배열 번호 8 - M30 항체의 CDRL3 의 아미노산 배열

[1878] 배열 번호 9 - M30-H1 타입 중사슬의 아미노산 배열

[1879] 배열 번호 10 - M30-H2 타입 중사슬의 아미노산 배열

[1880] 배열 번호 11 - M30-H3 타입 중사슬의 아미노산 배열

[1881] 배열 번호 12 - M30-H4 타입 중사슬의 아미노산 배열

[1882] 배열 번호 13 - M30-L1 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1883] 배열 번호 14 - M30-L2 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1884] 배열 번호 15 - M30-L3 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1885] 배열 번호 16 - M30-L4 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1886] 배열 번호 17 - M30-L5 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1887] 배열 번호 18 - M30-L6 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1888] 배열 번호 19 - M30-L7 타입 경사슬의 아미노산 배열

[1889] 배열 번호 20 - M30 항체 중사슬의 아미노산 배열

[1890] 배열 번호 21 - M30 항체 경사슬의 아미노산 배열

[1891] 배열 번호 22 - PCR 프라이머 1

[1892] 배열 번호 23 - PCR 프라이머 2

[1893] 배열 번호 24 - CMV promoter 프라이머 : 프라이머 3

[1894] 배열 번호 25 - BGH reverse 프라이머 : 프라이머 4

[1895] 배열 번호 26 - B7-H3 베어리언트 1 의 뉴클레오티드 배열

[1896] 배열 번호 27 - 항 CD30 항체 중사슬의 아미노산 배열

[1897] 배열 번호 28 - 항 CD30 항체 경사슬의 아미노산 배열

[1898] 배열 번호 29 - 항 CD33 항체 중사슬의 아미노산 배열

[1899] 배열 번호 30 - 항 CD33 항체 경사슬의 아미노산 배열

[1900] 배열 번호 31 - 항 CD70 항체 중사슬의 아미노산 배열

[1901] 배열 번호 32 - 항 CD70 항체 경사슬의 아미노산 배열

도면

도면1

B7-H3베어리언트 1 의 아미노산 배열 (배열 번호 1)

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

도면2

B7-H3 베어리언트 2 의 아미노산 배열 (배열 번호 2)

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVC
WRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEI
A

도면3

M30-H1 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 9)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면4

M30-H2 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 10)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면5

M30-H3 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 11)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면6

M30-H4 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 12)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면7

M30－L1 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 13)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면8

M30－L2타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 14)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면9

M30－L3타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 15)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면10

M30－L4 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 16)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면11

M30-L5 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 17)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKPWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면12

M30-L6 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 18)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면13

M30-L7 타입 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 19)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

도면14

M30항체 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 20)

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG
YTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV
AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK
IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT
HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

도면15

M30항체 중사슬의 아미노산 배열 (배열 번호 21)

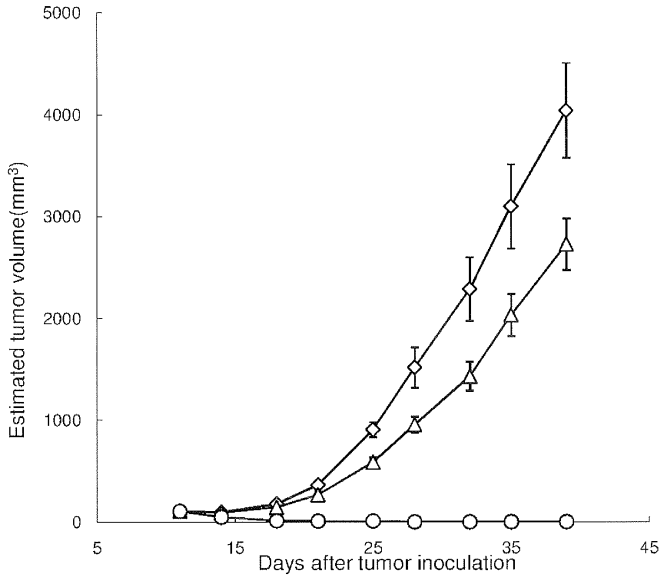
MDFLVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC
RASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGT
SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
IVKSFNRNEC

도면16

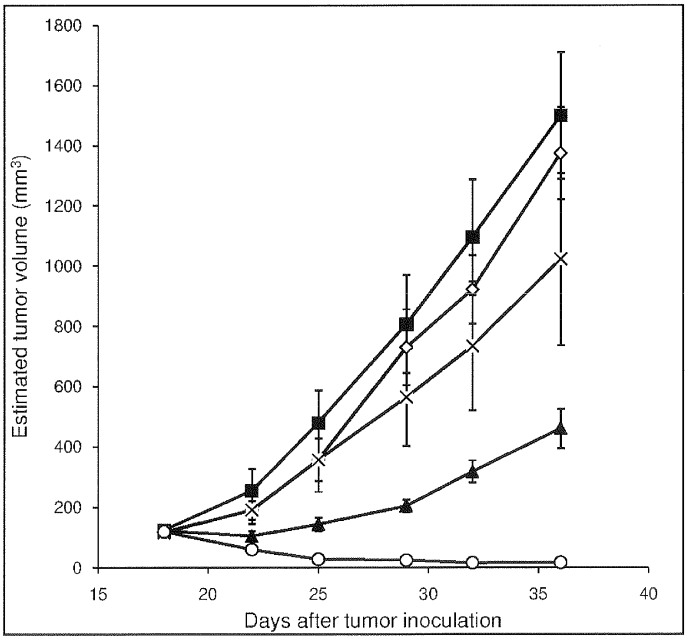
B7-H3 베어리언트 1 의 뉴클레오티드 배열 (배열 번호 26)

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggt
gcagccctgggagcactgtggttctgcctcacaggagccctggag
gtccaggtccctgaagacccagtggtggcactggtggggcaccgat
gccaccctgtgctgctccttctccccctgagcctggcttcagcctg
gcacagctcaacctcatctggcagctgacagataccaaacagctg
gtgcacagctttgctgagggccaggaccagggcagcgcctatgcc
aaccgcacggccctcttcccggacctgctggcacagggcaacgca
tccctgaggctgcagcgcgtgcgtgtgggcggacgagggcagcttc
acctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgctgccgtcagc
ctgcaggtggccgctcccctactcgaagcccagcatgaccctggag
cccaacaaggacctgcggccaggggacacggtgaccatcacgtgc
tccagctaccagggctaccctgaggctgaggtgttctggcaggat
gggcagggtgtgcccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatg
gccaacgagcagggcttgtttgatgtgcacagcatcctgcgggtg
gtgctgggtgcaaatggcacctacagctgcctggtgcgcaaccccc
gtgctgcagcaggatgcgcacagctctgtcaccatcacacccccag
agaagccccacaggagccgtggaggtccaggtcccctgaggacccg
gtggtggcccctagtgggcaccgatgccaccctgcgctgctcccttc
tccccccgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatctgg
cagctgacagacaccaaacagctggtgcacagtttcaccgaaggc
cgggaccagggcagcgcctatgccaaccgcacggccctcttcccg
gacctgctggcacaaggcaatgcatccctgaggctgcagcgcgtg
cgtgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgg
gatttcggcagcgctgccgtcagcctgcaggtggccgctcccctac
tcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcggcca
ggggacacggtgaccatcacgtgctccagctaccggggctaccct
gaggctgaggtgttctggcaggatgggcagggtgtgccccctgact
ggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggcttgttt
gatgtgcacagcgtcctgcgggtggtgctgggtgcgaatggcacc
tacagctgccctggtgcgcaaccccgtgctgcagcaggatgcgcac
ggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattcccccccagag
gccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactg
ctggtggcccctggctttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagc
tgtgaggaggagaatgcaggagctgaggaccaggatggggaggga
gaaggctccaagacagcccctgcagcctctgaaacactctgacagc
aaagaagatgatggacaagaaatagcctgagcggccgccactgtg
ctggatatctgcagaattccaccacactggactagtggatccgag
ctcggtaccaagcttaagtttaaaccgctgatcagcctcgactgt
gccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcc
ttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaata
aaatgaggaaattgc

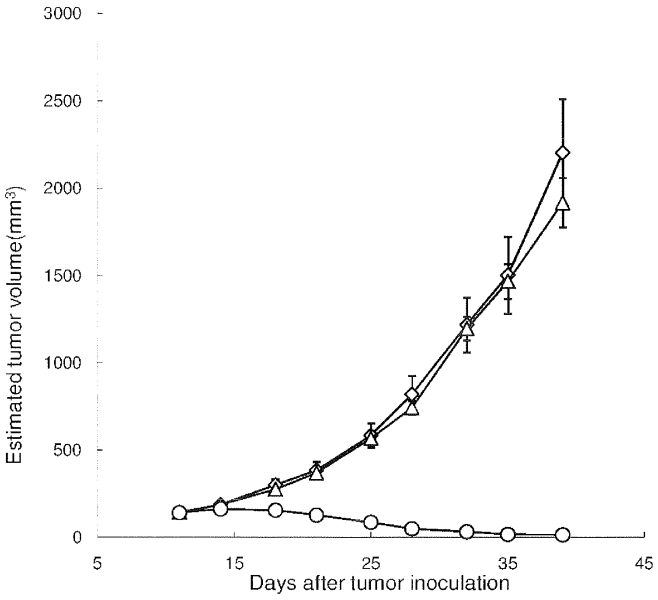
도면17


5000
4000
3000
2000
1000
0
Estimated tumor volume(mm3)
5
15
25
35
45
Days after tumor inoculation

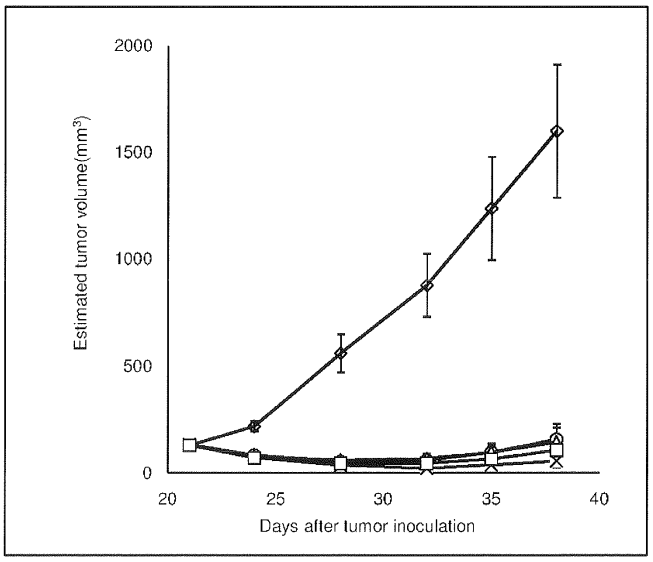
도면18


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Estimated tumor volume (mm3)
15
20
25
30
35
40
Days after tumor inoculation

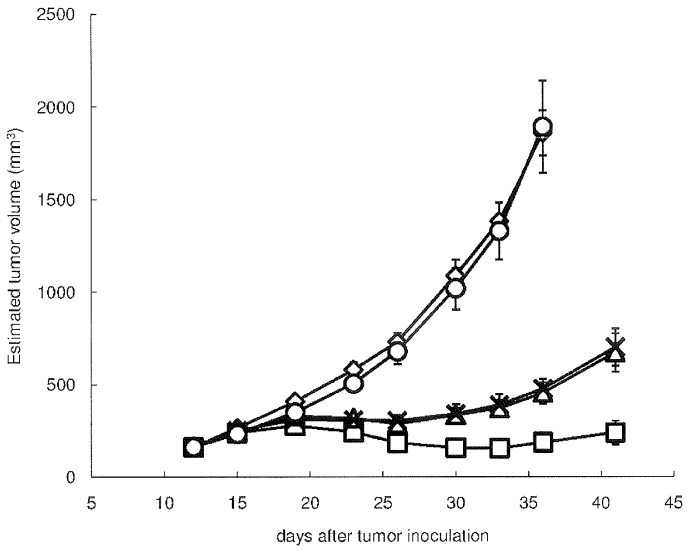
도면19


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume(mm3)
5
15
25
35
45
Days after tumor inoculation

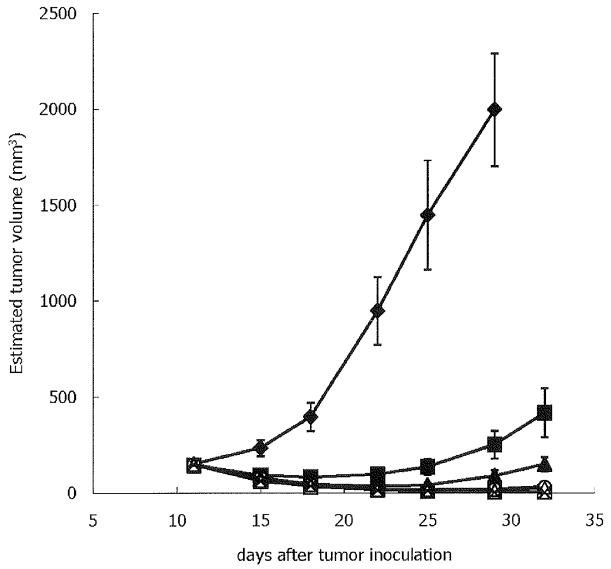
도면20


2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume(mm3)
20
25
30
35
40
Days after tumor inoculation

도면21



도면22



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

<130> PD20-9003WO

<150> JP2012-225887

<151> 2012-10-11

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 534

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn

210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
225 230 235 240
Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
245 250 255
Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
260 265 270
Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
275 280 285

Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
290 295 300
Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
305 310 315 320
Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
325 330 335
Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
340 345 350

Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
355 360 365
Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
370 375 380
Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385 390 395 400
Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
405 410 415

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
420 425 430
Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
435 440 445
Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
485 490 495
Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510
Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525
Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530
<210> 2
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400
> 2
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15
Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30
Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45
Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

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

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

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

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260 265 270
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275 280 285
Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300
Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315
<210> 3
<211
> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 3
Asn Tyr Val Met His
1 5
<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 9

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain of M30

<400> 9

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

180 185 190

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

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470
<210> 10
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized heavy chain of M30
<400> 10
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

85 90 95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 11

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain of M30

<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

340 345 350

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

355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470
<210> 12
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized heavy chain of M30
<400> 12
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

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

65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 13

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg

35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 14

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 14

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg

35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 15

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 16

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 16

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg

35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230
<210> 17
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 17
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45
Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

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

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

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230
<210> 18
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized light chain of M30
<400> 18
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

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

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 19

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain of M30

<400> 19

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg

35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 20

<211> 471

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140
Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr
145 150 155 160

Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
165 170 175
Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
180 185 190
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
195 200 205
Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn
210 215 220

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro
225 230 235 240
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
245 250 255
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
260 265 270
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
290 295 300
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
305 310 315 320
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp

325 330 335

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu

340 345 350

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

355 360 365

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys

370 375 380

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp

385 390 395 400

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys

405 410 415

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser

420 425 430

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser

435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser

450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

465 470

<210> 21

<211> 235

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

50 55 60

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

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

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

<210> 22
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR primer
<400> 22
ctatagggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag 46

<210> 23

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 23

aacgggccct ctagactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca tcttctttgc 60

tgtcag 66

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 24

cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

PCR primer

<400> 25

tagaaggcac agtcgagg 18

<210> 26

<211> 1815

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca 120

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300

gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct 420

ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540

gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600

ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660

ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720

agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg 780

ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840

ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900

cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacaa 960

ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020

ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080

tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140

atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 1200

ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260

gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320

cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380

acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440

ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500

gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560

aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg 1620

ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt 1680

aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg 1740

cccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 1800

aaatgaggaa attgc 1815

<210> 27

<211> 466

<212> PRT

<213>

<220><223>

<400> 27

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Phe Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gly Lys

465

<210> 28

<211> 238

<212> PRT

<213>

<220><223>

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 29

<211> 465

<212> PRT

<213>

<220><223>

<400> 29

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile

35 40 45

Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Lys

465

<210> 30

<211> 238

<212> PRT

<213>

<220><223>

<400> 30

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 31

<211> 467

<212> PRT

<213>

<220><223>

<400> 31

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 32

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser

35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235