(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163098
(43) 공개일자 2024년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7033188
(22) 출원일자(국제) 2023년03월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월04일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/085097
(87) 국제공개번호 WO 2023/186015
국제공개일자 2023년10월05일
(30) 우선권주장
202210334522.X 2022년03월30일 중국(CN)

(71) 출원인
듀얼리티 바이올로직스 (쑤저우) 컴퍼니 리미티드
중국 215000 지앙수, 쑤저우 인더스트리얼 파크 쑤저우, 진구 로드, 넘버 99, 바이오메디컬 인더스트리얼 파크 페이즈 3, 존 비, 빌딩 3, 유닛 301
(72) 발명자
주, 종유안
중국, 201204 상하이, 푸둥 뉴 에리아, 임화 로드 868, 유니트 1106
종, 첸
중국, 201204 상하이, 푸둥 뉴 에리아, 임화 로드 868, 유니트 1106
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 30 항

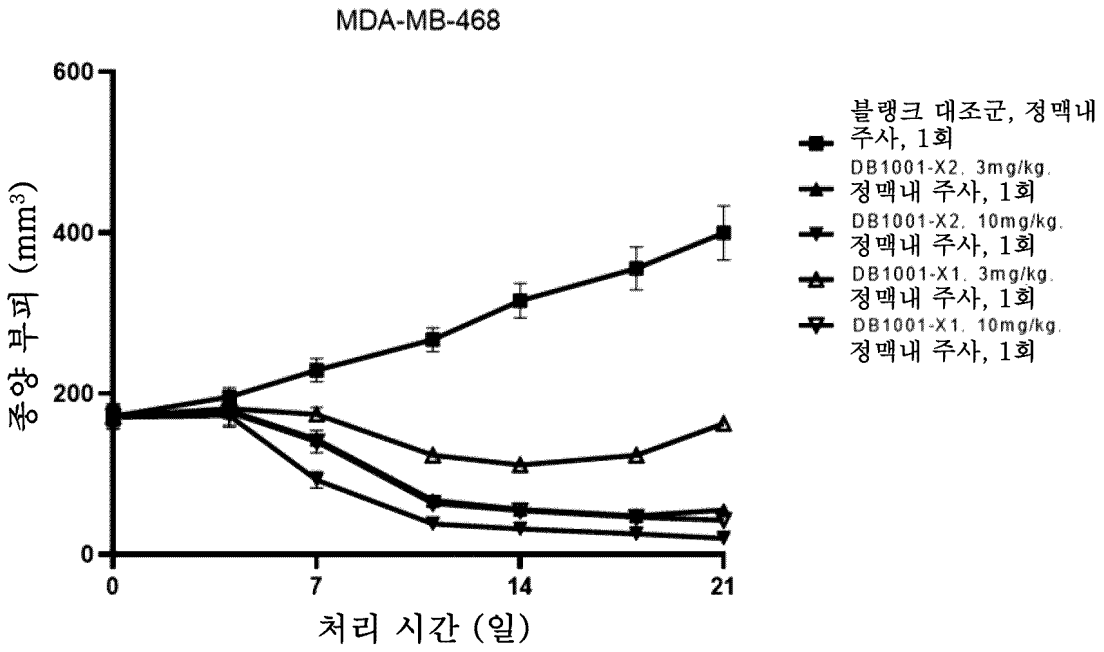
(54) 발명의 명칭 **B7H4 항체-약물 접합체 및 이의 용도**

(57) 요 약

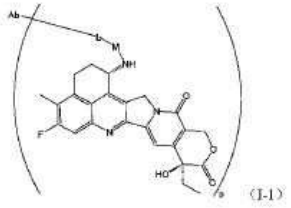
본 발명은 B7H4에 특이적으로 결합하는 항-B7H4 항체-약물 접합체 및 이를 포함하는 조성물을 제공하며, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I-1)로서 도시되어 있다. 본 발명은 본원에 제공된 항체-약물 접합체의 방법 및 용도를 추가로 제공한다. 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체는 시험관내 종양 세포 증식에 대한 더 양호한

(뒷면에 계속)

대 표 도



저해 활성 및 생체내 더 양호한 종양 저해 효과를 갖는다.



(I-1)

(52) CPC특허분류
A61K 47/68 (2017.08)
A61K 47/6801 (2017.08)
A61K 47/68037 (2023.08)
A61K 47/6889 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/18 (2013.01)

(72) 발명자
장, 유
중국, 201204 상하이, 푸둥 뉴 에리아, 임화 로드 868, 유니트 1106

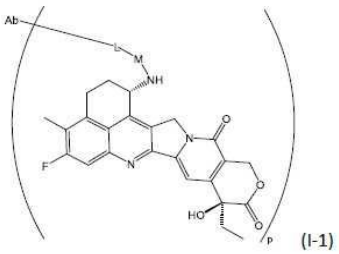
주, 연화
중국, 201204 상하이, 푸둥 뉴 에리아, 임화 로드 868, 유니트 1106

명 세 서

청구범위

청구항 1

항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물로서, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I-1)로서 도시되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물:



(I-1)

식 중,

M은 $-L^{2}-L^{1}-C(O)-$이고;

L^{2}는 -O- 또는 -S-이고;

L^{1}은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_{m}-CH_{2}-$, 포화 $C_{3}-C_{6}$ 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이며, 포화 $C_{3}-C_{6}$ 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 하나 이상의 R^{2a}로 치환되고;

m은 1, 2, 3 또는 4로부터 선택되고; 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 N, O 및 S로부터 선택된 1개 내지 3개의 이종원자를 갖고;

각각의 R^{1a}는 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 $C_{1}-C_{6}$ 알킬로부터 독립적으로 선택되며, $C_{1}-C_{6}$ 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 $C_{1}-C_{6}$ 알킬로부터 선택되며, $C_{1}-C_{6}$ 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

L은 링커 단위이고;

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수이고;

Ab는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편임.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 7과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 쥣과 항체 또는 이의 단편, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, $F(ab')_2$, sdAb, 디아바디 또는 선형 항체로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 형태의 항체인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 9와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 10과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, p는 3 내지 8의 정수 또는 소수인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이며; R^{1a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고; R^{1b}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 10

제9항에 있어서, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이며; R^{1a}는 $-CH_3$이고; R^{1b}는 수소 및 $-CH_3$으로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이며; m은 1 또는 2인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, L^1은 , , , 및 로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, L^1은 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이며, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 하나 이상의 R^{2a}로 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 치환되고, 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 14

제13항에 있어서, L^1은 하나 이상의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이며; 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 15

제14항에 있어서, L^1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이며; 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, L^1은 , , , , , , 및 로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

L^2는 -O-이고;

L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 또는 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이며, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환되고;

m은 1 또는 2로부터 선택되고;

각각의 R^{1a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되며, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되며, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 18

제17항에 있어서,

M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

L^2는 -O-이고;

L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이고;

m은 1 또는 2로부터 선택되고;

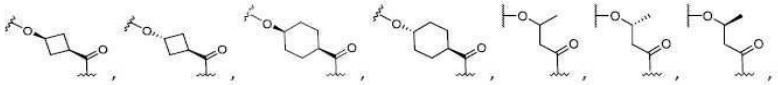
각각의 R^{1a}는 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되며, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되며, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, -M-은

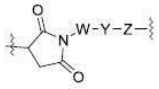


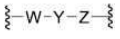
및 로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, L은 $-L_a-L_b-L_c-$이며,

$-L_a-$는



또는  이고,

W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$이고,

wn은 1, 2, 3 또는 6이고,

W의 0개 또는 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{wx})-$ 또는 -C(O)-로

대체되고,

yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고;

zn은 1, 2 또는 3이고,

Z의 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 -C(O)-로 대체되고;

-Cyr-은 3원 내지 10원 포화 사이클로알킬이고, -Cyr-은 비치환되거나 1개 내지 3개의 치환기 R^{cx}로 독립적으로 치환되고;

R^{wa}, R^{wb}, R^{za}, R^{zb}, R^{wx}, R^{zx} 및 R^{cx}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 또는 $-OR^{r}$, 또는 R^{r}로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고,

각각의 R^{r}은 독립적으로 수소, 할로겐 또는 C_{1-6} 알킬이고;

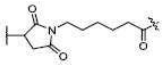
$-L_b-$는 2개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 잔기를 나타내고, $-L_b-$의 펩타이드 잔기는 페닐알라닌, 글리신, 알라닌, 발린, 시트룰린 및 리신의 군으로부터 선택된 아미노산에 의해 형성된 펩타이드 잔기이고;

$-L_c-$는

이고,

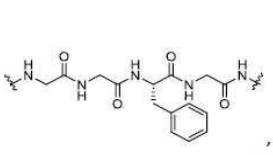
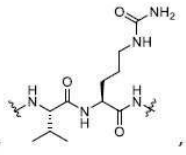
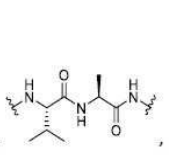
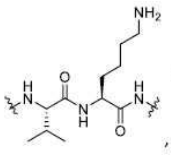
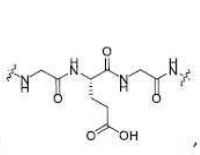
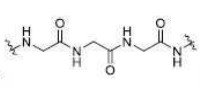
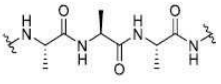
R^{L1} 및 R^{L2}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, -OH 및 C_{1-6} 알킬의 군으로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 21

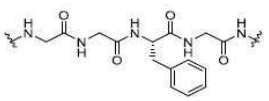
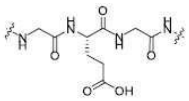
제20항에 있어서, $-L_a-$는  또는 인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 22

제20항에 있어서, $-L_b-$는







및


의 군으로부터 선택되고;

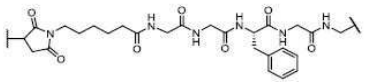
바람직하게는, -L_b-는  또는  인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 23

제20항에 있어서, -L_c-는 인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 24

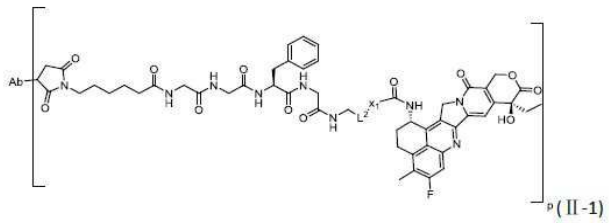
제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, L은

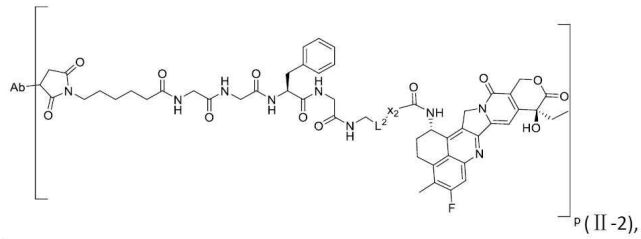


인, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (II-1) 또는 화학식 (II-2)로서 도시되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물:





식 중,

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

Ab는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같고;

L^2는 -O- 또는 -S-, 바람직하게는 -O-이고;

X_1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬, 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 로부터 선택되고;

X_2는 -(C(R^{1a})(R^{1b}))$_m$-CH_2-로부터 선택되고;

m은 1 또는 2로부터 선택되고;

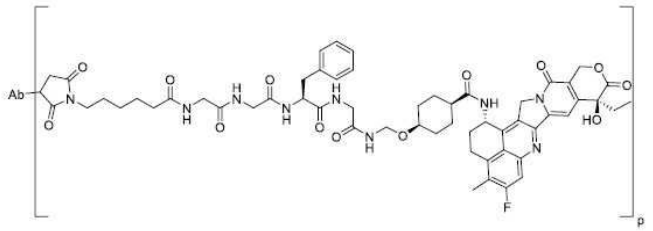
R^{1a}는 수소 또는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

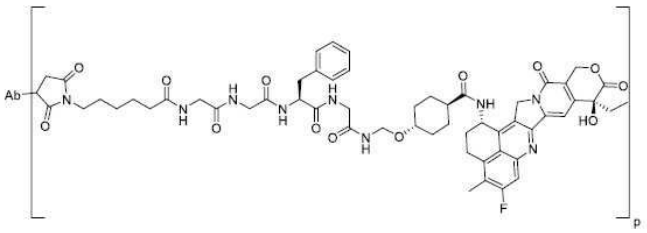
R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬일 수 있고;

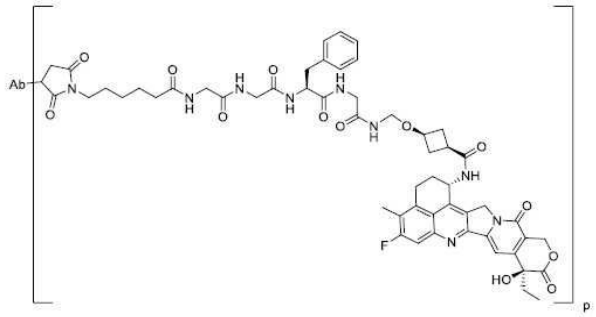
각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있음.

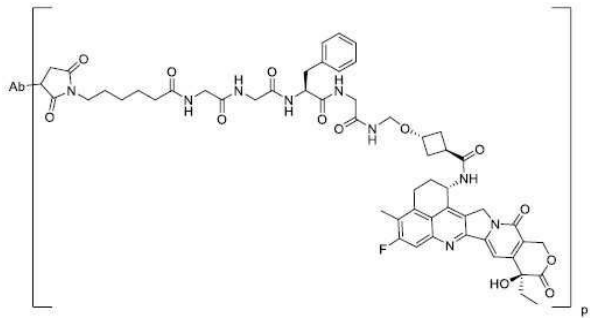
청구항 26

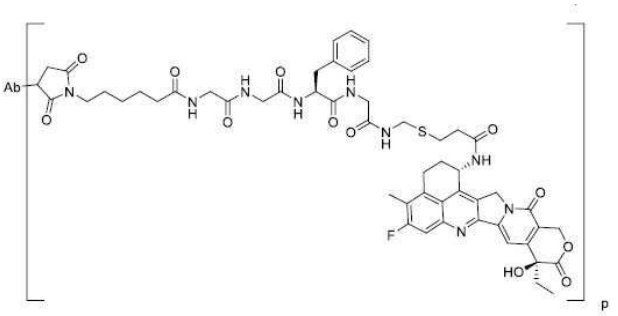
제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항-B7H4 항체-약물 접합체는 하기 구조식으로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물:

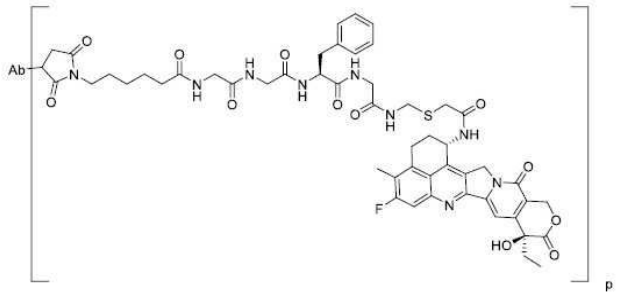


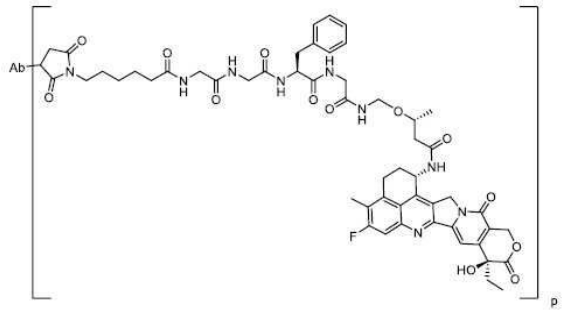


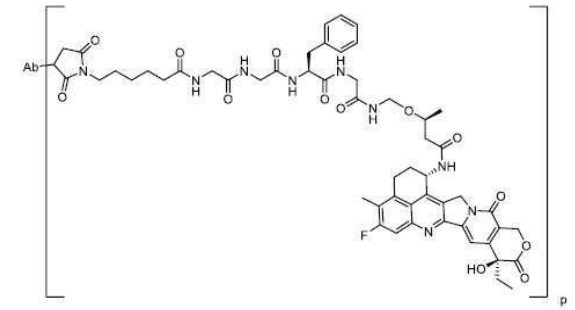


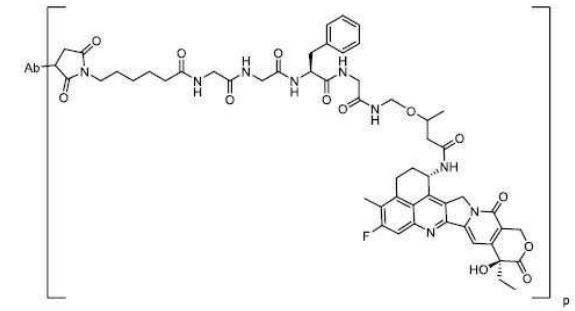


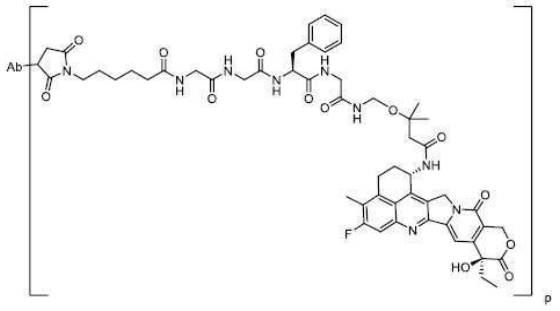












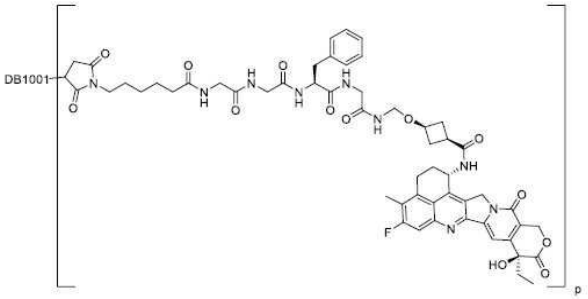
식 중,

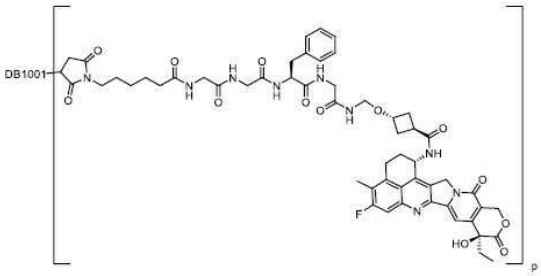
p는 제1항 또는 제8항에 정의된 것과 같고;

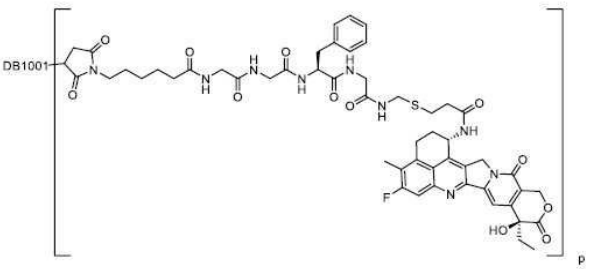
Ab는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같음.

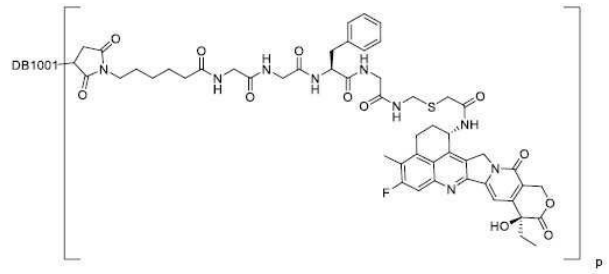
청구항 27

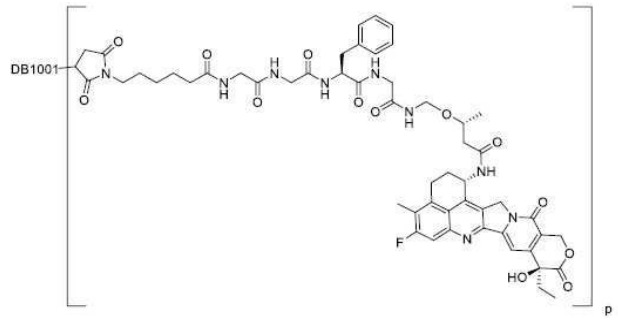
항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물로서, 항-B7H4 항체-약물 접합체는 하기로부터 선택되는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물:

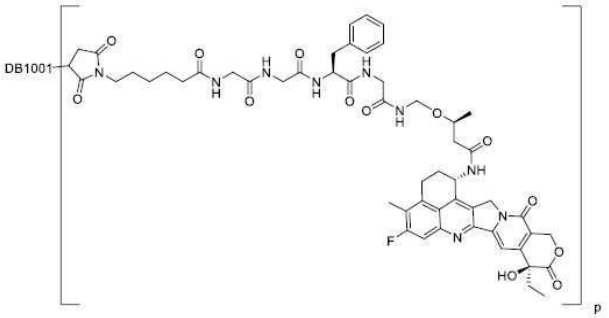


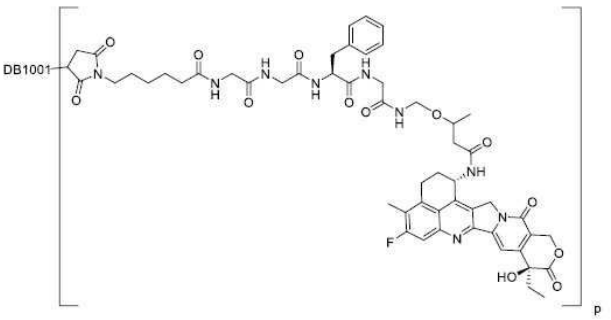












식 중,

p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수임.

청구항 28

약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 29

B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물

또는 제28항에 따른 약제학적 조성물의 용도로서, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이고; 더 바람직하게는 암은 유방암, 난소암 및 자궁내막 종양으로부터 선택되는, 용도.

청구항 30

B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태를 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물 또는 제28항에 따른 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이고; 더 바람직하게는 암은 유방암, 난소암 및 자궁내막 종양으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2022년 3월 30일의 출원일로 중국 특허 출원 202210334522X에 대한 우선권을 주장한다. 이 중국 특허 출원은 본원에 그 전체가 참고로 포함된다.

[0002] **기술분야**

[0003] 본 발명은 B7H4에 특이적으로 결합하는 항체-약물 접합체 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 본원에 제공된 항체-약물 접합체의 방법 및 용도가 제공된다.

배 경 기 술

[0004] 면역 관문 저해제는 종양에 대한 면역요법의 가장 많이 연구된 형태이다. 면역 관문 분자는 종양 미세환경에서 대개 고도로 발현되고, 이는 T 세포 활성화를 저해하고 T 세포 소진을 유도하여서 종양이 면역계로부터의 공격을 피하는 것을 촉진한다. B7 패밀리 및 TNF 패밀리는 공동자극 분자의 2개의 주요 패밀리이고, B7 패밀리는 현재 CD80(B7.1), CD86(B7.2), B7H1(PD-L1/CD274), B7-DC(PD-L2/CD273), B7H2(ICOSL), B7H3(CD276), B7H4(B7S1/B7x/Vtcn1), B7H5(VISTA), B7H6 및 B7H7(HHLA2)의 10개의 분자를 포함한다. B7 패밀리의 몇몇 구성원 및 이들의 수용체, 예컨대 PD-L1/PD1, CTLA4 및 VISTA는 면역 관문인 것으로 나타났다.

[0005] B7H4는 B7 패밀리의 비교적 새로운 구성원이다. 이것이 mRNA 수준에서 유기체의 세포에서 널리 발현되지만, 유관(lactiferous duct), 유선 소엽 및 나팔관과 같은 유기체에서의 일부 도관의 상피 세포 및 자궁내막과 같은 조직에서 오직 낮은 발현으로 단백질 수준에서의 이것의 발현은 매우 제한된다. 그에 반해서, B7H4는 여러 가지의 종양 조직, 예컨대 유방암 종양 세포, 특히 삼중 음성 유방암 종양 세포, 난소암 종양 세포 및 자궁내막 종양 세포에서 풍부하게 발현된다. 발현 프로파일의 면에서, B7H4는 고도로 특이적인 종양 연관된 항원으로 여겨질 수 있다. 다른 한편, B7H4는 새로운 면역 관문 분자이고, 시험관내 실험은 B7H4가 이것의 알려지지 않은 T 세포 수용체와 상호작용하여서 T 세포 증식, 활성화 및 사이토카인 생성을 저해한다는 것을 나타낸다. 종양 미세환경에서 고도로 발현된 B7H4 분자 및 B7H4 분자의 높은 발현을 갖는 억제성 대식세포의 도움에 의해, 종양 세포는 면역감시 회피를 달성하기 위해서 T 세포 활성화를 저해한다. 종양에 대한 B7H4의 발현 프로파일은 PD-L1의 발현 프로파일과 중첩하지 않는다. B7H4 표적화 항체에 의한 처리 및 B7H4의 음성 조절 효과의 봉쇄를 통해 면역계를 재활성화하여서 B7H4 발현에 양성인 종양을 치료하는 것은 유망한 수단이다.

[0006] 몇몇 제약 회사가 B7-H4에 대한 단일클론 항체 또는 항체-약물 접합체 또는 이중특이적 항체를 현재 개발하고 있다. 시판되는 항체-약물 접합체는 Adcetris 및 Kadcyla이다. 몇몇 다국적 제약 회사는 종양에 대한 환자의 면역계의 면역 반응을 향상시키고 직접적인 종양 세포 사멸을 달성하기 위해 현재 B7-H4에 대한 단일클론 항체 또는 항체-약물 접합체를 개발하고 있다. 관련 특허는 WO2013025779, US 20140322129 등을 포함한다. Medimmune 및 FivePrime과 같은 회사로부터의 항-B7-H4 단일클론 항체는 현재 비임상 개발에 있고, Genentech로부터의 항-B7-H4 항체-약물 접합체도 비임상 개발에 있다.

발명의 내용

[0007] **요약**

[0008] 본 발명에 의해 해결되는 기술적 문제는 선행 기술에서 결핍 항-B7H4 항체-약물 접합체의 결함을 극복하기 위한 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이에 대한 제조 방법 및 이의 용도를 제공하는 것이다. 본 발명의 항-B7H4 항체-약

물 접합체는 선행 기술과 비교하여 (1) 시험관내 종양 세포 증식에 대한 더 양호한 저해 활성; (2) 더 양호한 내포작용; (3) 생체내 더 양호한 종양 저해 효과; (4) 인간 및 원숭이 B7H4에 대한 더 양호한 친화도; (5) 더 양호한 B7H4 표적화 특성; (6) 더 양호한 방관자 사멸 효과; (7) 개선된 혈장 안정성; 및 (8) 더 양호한 안전성의 군으로부터 선택된 하나 이상의 유리한 효과를 갖는다.

[0009] 본 발명은 주로 하기 기술적 수단에 의해 상술된 기술적 문제를 해결한다.

[0010] 하나의 양태에서, 본 출원은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I)로서 도시되어 있다:

[0011] $Ab-(L-M-D)_p$ (I)

[0012] 식 중,

[0013] L 및 M은 링커 단위이고;

[0014] D는 세포독성 약물이고;

[0015] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

[0016] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함함.

[0017] 하나의 양태에서, 본 출원은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I)로서 도시되어 있다:

[0018] $Ab-(L-M-D)_p$ (I)

[0019] 식 중,

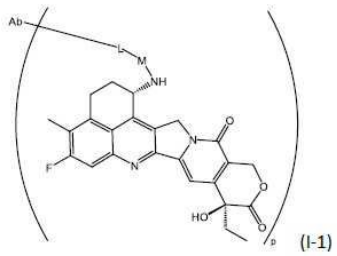
[0020] L 및 M은 링커 단위이고;

[0021] -M-D는 세포독성 약물이고;

[0022] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

[0023] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함함.

[0024] 하나의 양태에서, 본 출원은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I-1)로서 도시되어 있다:



(I-1)

[0025]

[0026] 식 중,

[0027] M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

[0028] L^2는 -O- 또는 -S-이고;

[0029] L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 하나 이상의 R^{2a}로 치환되고;

[0030] m은 1, 2, 3 또는 4로부터 선택되고; 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 N, O 및 S로부터 선택된 1개 내지 3개의 이종원자를 갖고;

[0031] 각각의 R^{1a}는 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0032] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0033] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

[0034] L은 링커 단위이고;

[0035] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수이고;

[0036] Ab는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편임.

[0037] 일부 실시형태에서, 평균 연결 수 p는 바람직하게는 3 내지 8의 임의의 정수 또는 소수이다.

[0038] 본 발명의 소정의 바람직한 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 또는 화학식 (II-2)로서 도시된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에서, 일부 기는 하기에서 정의된 것과 같고, 언급되지 않은 기는 본 출원에서 임의의 반응식에서("일부 실시형태에서"라 약칭됨) 정의된 것과 같다.

[0039] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 각각의 R^{1a}는 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고, 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.

[0040] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0041] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 7과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0043] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 쥣과 항체 또는 이의 단편, 키메라 항체 또는 항원 결합 단편, 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 완전 인간 항체 또는 항원 결합 단편이다.

[0044] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된 항체 또는 이의 단편이다.

[0045] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, $F(ab')_2$, sdAb, 디아바디 또는 선형 항체로부터 선택된다.

[0046] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체는 단일클론 항체이다.

[0047] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 형태의 항체이다.

[0048] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG1의 형태의 항체이다.

[0049] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 9와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열 또는 서열 번호 10과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

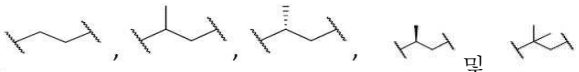
[0050] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0051] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체는 항-B7H4 항체 DB1001이다. DB1001의 아미노산 서열은 서열 목록에 기재된 것과 같다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, M의 L^2 말단은 링커 단위 L에 연결된다.

[0052] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이고; R^{1a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고; R^{1b}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고; 예를 들어, R^{1a}는 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고; R^{1b}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택된다.

[0053] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이고; R^{1a}는 수소 또는 $-CH_3$이고; R^{1b}는 수소 및 $-CH_3$으로부터 선택되고; 예를 들어, R^{1a}는 $-CH_3$이고; R^{1b}는 수소 및 $-CH_3$으로부터 선택된다.

[0054] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이고; m은 1 또는 2이다.

[0055] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은  및 로부터 선택되고, 구조 단편의 왼측은 바람직하게는 L^2에 연결된다.

[0056] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 하나 이상의 R^{2a}로 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 치환되고, 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0057] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^2 및 -C(O)-는 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴에서 상이한 원자에 연결된다.

[0058] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 하나 이상의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이고; 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0059] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제

학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이다. 예를 들어, L^1은 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실이고, 바람직하게는 사이클로부틸이다.

[0060] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이고; 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0061] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, L^1은 , , , , , 및 로부터 선택된다.

[0062] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서

[0063] M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

[0064] L^2는 -O-이고;

[0065] L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 또는 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬은 하나 이상의 R^{2a}로 선택적으로 치환되고;

[0066] m은 1 또는 2로부터 선택되고;

[0067] 각각의 R^{1a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0068] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0069] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.

[0070] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서

[0071] M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

[0072] L^2는 -O-이고;

[0073] L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이고;

[0074] m은 1 또는 2로부터 선택되고;

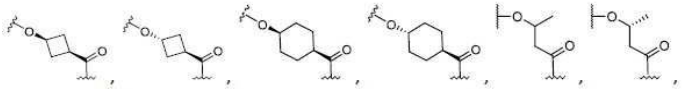
[0075] 각각의 R^{1a}는 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0076] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적

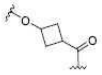
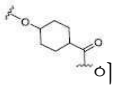
으로 치환되고;

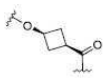
[0077] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.

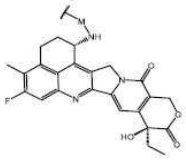
[0078] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, -M-은

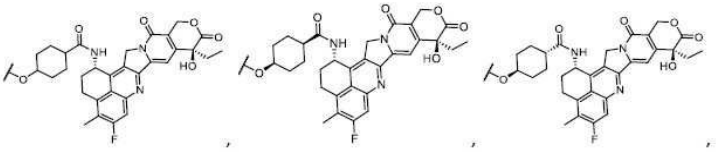
[0079] 

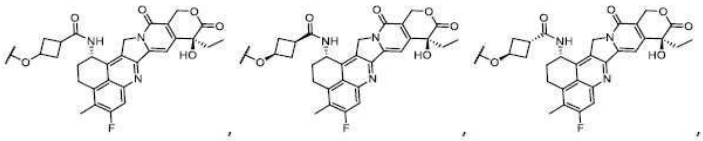
[0080] 및 로부터 선택된다.

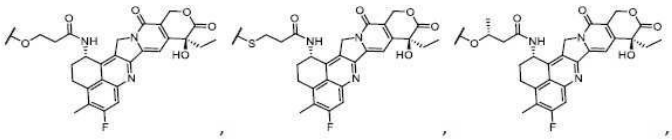
[0081] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, -M-은  또는  이다.

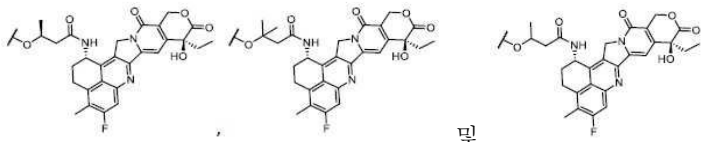
[0082] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, -M-은  또는 이다.

[0083] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체를 제공하고, 세포독성 약물  은

[0084] 

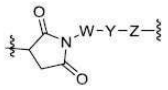
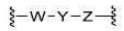
[0085] 

[0086] 

[0087]  및 의 구조 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서 L은 $-L_a-L_b-L_c-$이고,

[0089] $-L_a-$는

[0090]  또는  이고,

[0091] W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$이고,

[0092] wn은 1, 2, 3 또는 6이고,

[0093] W의 0개 또는 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{wx})-$ 또는 -C(O)-로 대체되고,

[0094] yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고;

[0095] zn은 1, 2 또는 3이고,

[0096] Z의 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 -C(O)-로 대체되고;

[0097] -Cyr-은 3원 내지 10원 포화 사이클로알킬이고, -Cyr-은 비치환되거나 1개 내지 3개의 치환기 R^{cx}로 독립적으로 치환되고;

[0098] R^{wa}, R^{wb}, R^{za}, R^{zb}, R^{wx}, R^{zx} 및 R^{cx}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 또는 $-OR^r$, 또는 R^r로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고,

[0099] 각각의 R^r은 독립적으로 수소, 할로겐 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0100] $-L_b-$는 2개 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 잔기를 나타내고, $-L_b-$의 펩타이드 잔기는 페닐알라닌, 글리신, 알라닌, 발린, 시트룰린, 리신, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산의 군으로부터 선택된 아미노산에 의해 형성된 펩타이드 잔기이고; 바람직하게는, $-L_b-$는 2개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 잔기를 나타내고, $-L_b-$의 펩타이드 잔기는 페닐알라닌, 글리신, 알라닌, 발린, 시트룰린 및 리신의 군으로부터 선택된 아미노산에 의해 형성된 펩타이드 잔기이고;

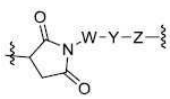
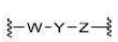
[0101] $-L_c-$는

[0102] 이고,

[0103] R^{L1} 및 R^{L2}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, -OH 및 C_{1-6} 알킬의 군으로부터 선택된다.

[0104] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서 L은 $-L_a-L_b-L_c-$이고,

[0105] $-L_a-$는

[0106]  또는  이고,

[0107] W는 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$이고, Y는 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$이고, Z는 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$이고,

[0108] wn은 1, 2, 3 또는 6이고,

[0109] W의 0개 또는 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{wx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{wx})-$ 또는 -C(O)-로

대체되고,

[0110] yn은 0, 4 또는 8이고, yp는 0 또는 1이고;

[0111] zn은 1, 2 또는 3이고,

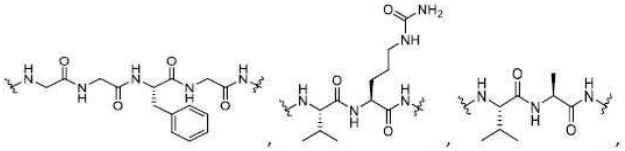
[0112] Z의 1개의 메틸렌 단위는 각각 독립적으로 -Cyr-, $-N(R^{zx})C(O)-$, $-C(O)N(R^{zx})-$ 또는 -C(O)-로 대체되고;

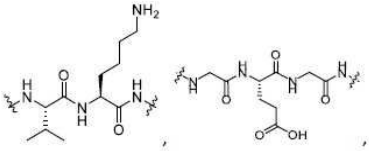
[0113] -Cyr-은 3원 내지 10원 포화 사이클로알킬이고, -Cyr-은 비치환되거나 1개 내지 3개의 치환기 R^{cx}로 독립적으로 치환되고;

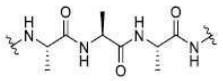
[0114] R^{wa}, R^{wb}, R^{za}, R^{zb}, R^{wx}, R^{zx} 및 R^{cx}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 또는 $-OR^{r}$, 또는 R^{r}로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고,

[0115] 각각의 R^{r}은 독립적으로 수소, 할로겐 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0116] $-L_b-$는

[0117] 

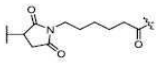
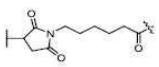
[0118]  및

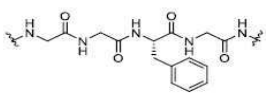
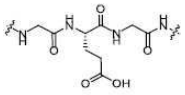
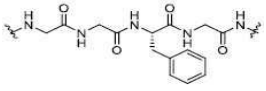
[0119]  의 군으로부터 선택되고;

[0120] $-L_c-$는

[0121] 이고,

[0122] R^{L1} 및 R^{L2}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, -OH 및 C_{1-6} 알킬의 군으로부터 선택된다.

[0123] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, $-L_a-$는  또는 ; 바람직하게는  이다.

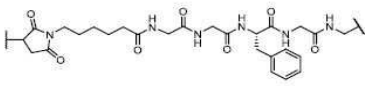
[0124] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, $-L_b-$는  또는  ; 바람직하게는  이다.

[0125] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, $-L_c-$는 이다.

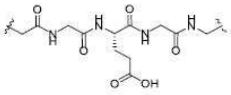
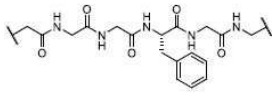
[0126] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 링커 단위 L의 L_a 말단은 Ab에 연결되고, 이의 L_c 말단은 M에 연결된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 링커 단위 L의 L_a 말단은 Ab에 연결되고, 이의 L_c 말단은 링커 단위 M에 연결된다.

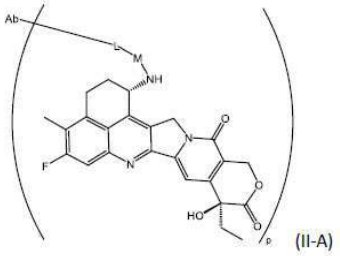
[0128] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서 L은

[0129]  이다.

[0130] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체를 제공하고, 링커 단위 L은

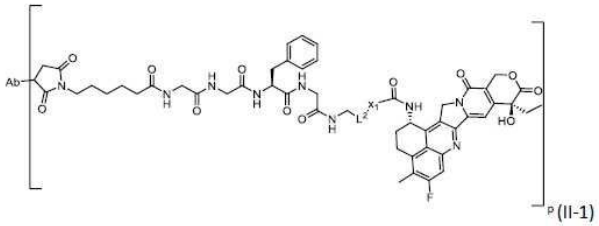
 또는  이다.

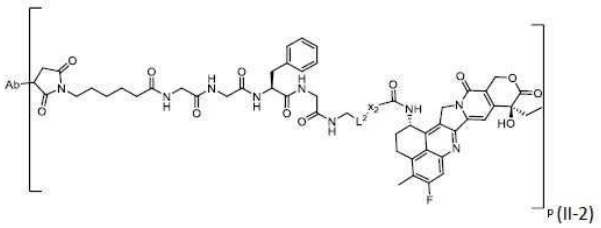
[0131] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체를 제공하고, 접합체의 구조는 화학식 (II-A)로서 도시되어 있다:

[0132] 
(II-A)

[0133] 식 중, p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10의 임의의 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 임의의 정수 또는 소수이고; Ab, L 및 M은 각각 본 발명의 임의의 실시형태에 정의된 것과 같음.

[0134] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (II-1) 또는 화학식 (II-2)로서 도시되어 있다:

[0135] 
(II-1)

[0136] 

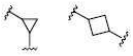
,

[0137] 식 중,

[0138] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

[0139] Ab는 본원에서의 임의의 실시형태에 기재된 것과 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

[0140] L^2는 -O- 또는 -S-, 바람직하게는 -O-이고;

[0141] X_1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬, 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된  , , 및 로부터 선택되고;

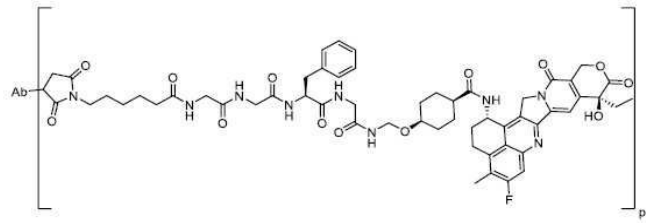
[0142] X_2는 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$로부터 선택되고;

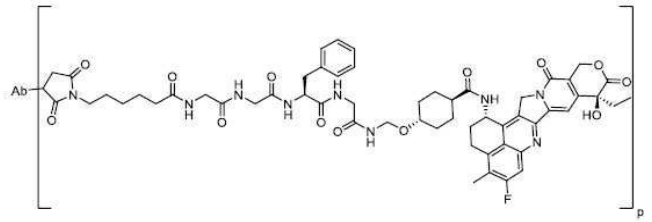
[0143] m은 1 또는 2로부터 선택되고;

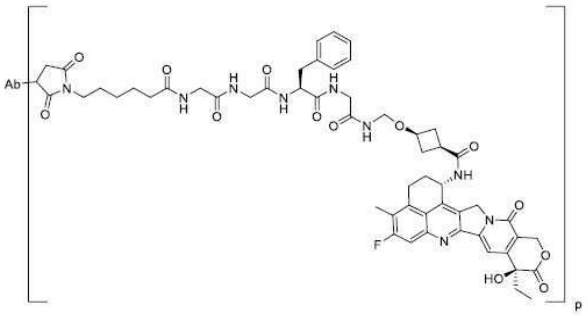
[0144] R^{1a}는 수소 또는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 바람직하게는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고; R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬일 수 있고;

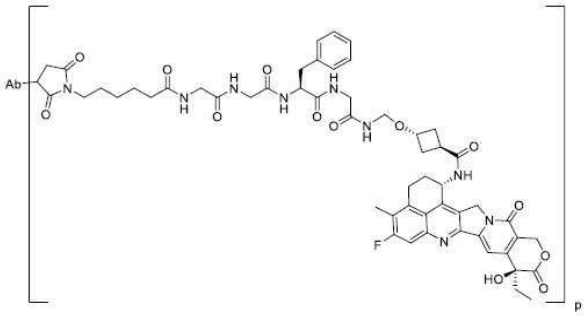
[0145] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있음.

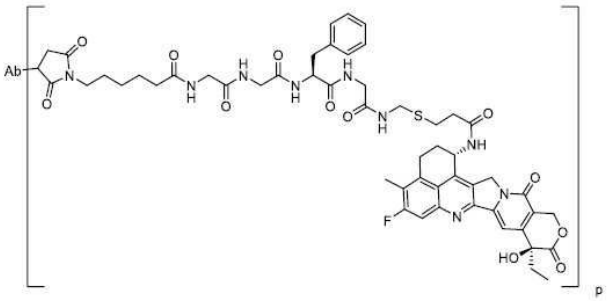
[0146] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체는 하기 구조식으로부터 선택된다:

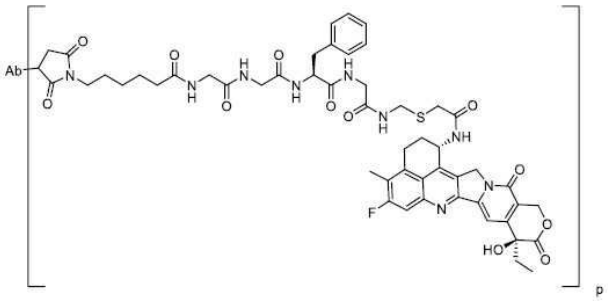
[0147] 

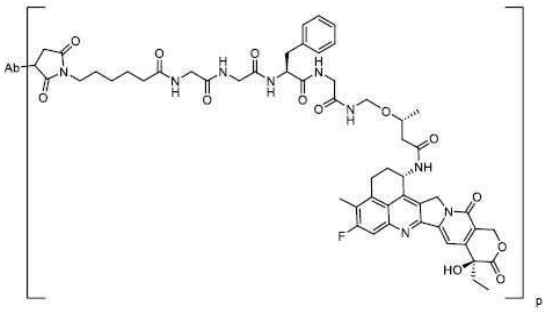
[0148] 

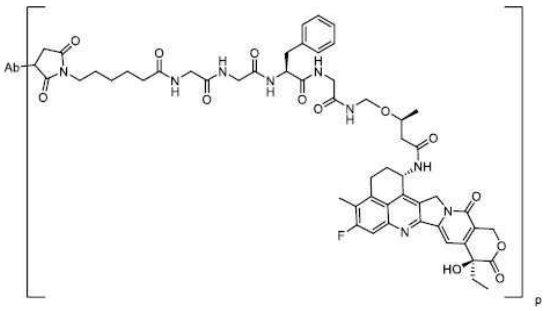
[0149] 

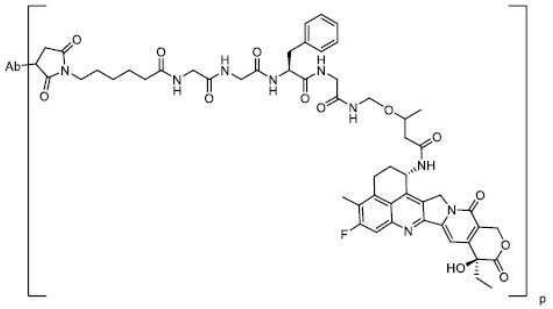
[0150] 

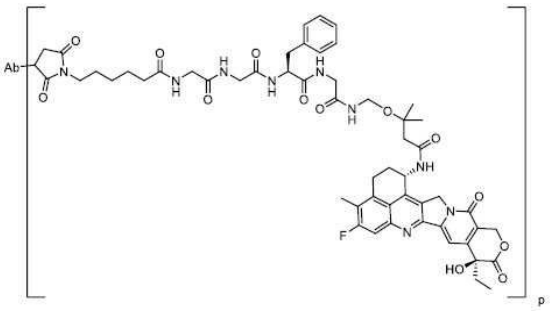
[0151] 

[0152] 

[0153] 

[0154] 

[0155] 

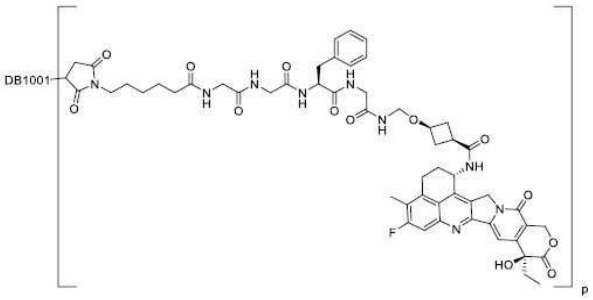
[0156] 

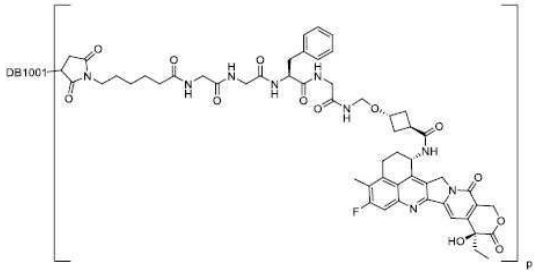
[0157] 식 중,

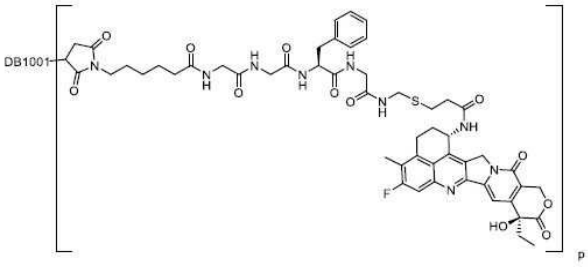
[0158] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

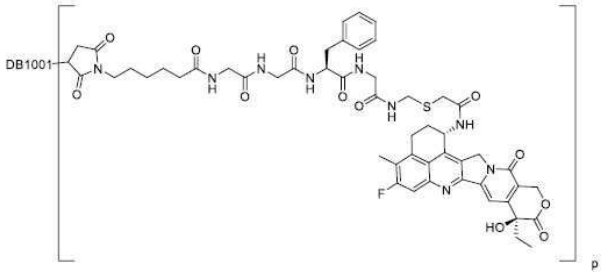
[0159] Ab는 본원에서의 임의의 실시형태에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편임.

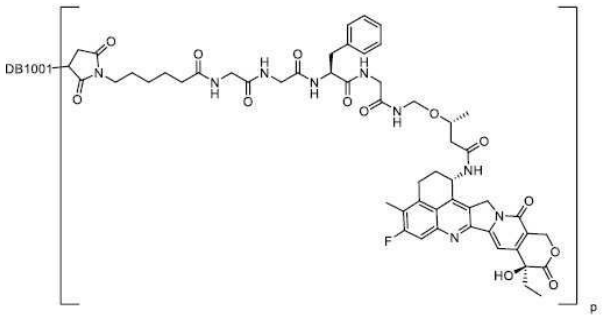
[0160] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체는 하기로부터 선택된다:

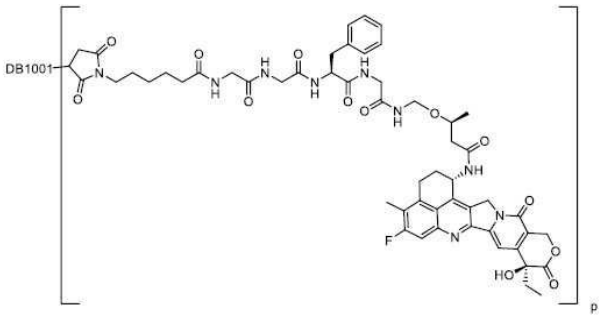
[0161] 

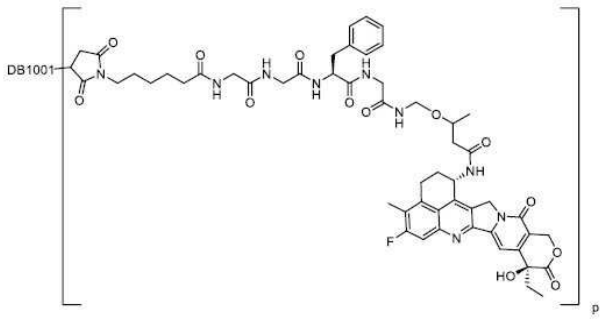
[0162] 

[0163] 

[0164] 

[0165] 

[0166] 

[0167] 

[0168] 식 중,

[0169] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수임. DB1001의 아미노산 서열은 서열 목록에 기재된 것과 같다. 평균 연결 수 p는 3.89이거나, p는 5.4이다.

[0170] 일부 실시형태에서, 본 발명의 평균 연결 수 p는 1 내지 10의 정수 또는 소수로부터 선택된다.

[0171] 일부 실시형태에서, 본 발명의 평균 연결 수 p는 2 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 p는 3 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 p는 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4, 4 내지 5, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수 또는 소수일 수 있다.

[0172] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체-약물 접합체를 얻기 위해 환원제의 존재 하에 완충액에 용해된 항체 및 용매에 용해된 링커-세포독소를 혼합하는 단계를 포함하는 항체-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0173] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0174] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이다.

[0175] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4의 고발현을 갖는 암이다.

[0176] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물 또는 약제학적 조성물을 제공하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이다.

[0177] 일부 실시형태에서, 본 발명의 암은 유방암, 난소암 및 자궁내막 종양으로부터 선택된다.

[0178] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물, 및 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조합을 제공한다.

[0179] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0180] **용어의 정의**

[0181] 본 발명의 실행은, 달리 표시되지 않는 한, 당해 분야의 기술 내에 있는 분자 생물학(제조합 기법을 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 종래의 기법을 이용할 수 있다.

[0182] 본 발명을 더 쉽게 이해하기 위해서, 소정의 기술 용어 및 과학 용어는 하기와 같이 구체적으로 정의된다. 본원에 달리 명확히 어딘가에 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는

분야의 당업자에 의해 흔히 이해되는 의미를 갖는다. 이 분야에서의 정의 및 용어를 위해, 전문가는 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)를 참조할 수 있다. 아미노산 잔기에 대한 약어는 20개의 흔히 사용된 L-아미노산 중 1개를 지칭하기 위해 당해 분야에 사용된 표준 3-철자 및/또는 1-철자 코드이다. 본원(청구항을 포함)에 사용된 것과 같이, 단수 형태는 문맥이 분명히 달리 기술하지 않는 한 이의 상응하는 복수 형태를 포함한다.

[0183] "약"의 용어는 규정된 값의 0.5% 내지 10% 초과 또는 미만의 범위 내의 변경, 예를 들어, 규정된 값의 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5% 또는 10% 초과 또는 미만의 범위 내의 변경을 일반적으로 지칭한다.

[0184] "항체"의 용어는 원하는 생물학적 활성을 보유하는 임의의 항체 형태를 지칭한다. 따라서, 이것은 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 단일클론 항체(전장 단일클론 항체를 포함), 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 항체), 인간화된 항체, 완전 인간 항체, 키메라 항체 및 낙타화된 단독 도메인 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0185] "단일클론 항체"의 용어는 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 얻은 항체를 지칭하고, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이고 단독 항원 에피토프에 대해 지시된다. 그에 반해서, 통상적인 (다중클론) 항체 조제물은 일반적으로 상이한 에피토프에 대한(또는 이것에 특이적인) 다수의 항체를 포함한다. "단일클론"의 수식어는 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 얻은 항체의 특징을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 제조를 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0186] "전장 항체"의 용어는 이것이 자연에서 발생하면서 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중(H)쇄(전장에서의 약 50 내지 70 kDa) 및 2개의 경(L)쇄(전장에서의 약 25 kDa)의 4개의 펩타이드 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 VH라 약칭) 및 중쇄 불변 영역(본원에서 CH라 약칭)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL이라 약칭) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인 CL로 이루어진다. VH 영역 및 VL 영역은 고도로 가변적인 상보성 결정 영역(CDR) 및 CDR에 의해 이격된 프레임워크 영역(FR)이라 칭하는 더 보존된 영역으로 추가로 하위분할될 수 있다. 각각의 VH 영역 또는 VL 영역은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노 말단에서 카복시 말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 숙주 조직 또는 인자(면역계의 다양한 세포(예컨대, 효과기 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 제1 성분(Clq)을 포함)에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0187] "CDR"의 용어는 항체의 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에서 3개의 CDR이 있고, CDR은 각각의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대해 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 또는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로 지정된다. 본 발명의 항체의 가변 영역 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 항체의 3차원 구조 및 CDR 루프의 위상수학에 기초한 쵸티아(Chothia)(Chothia *et al.* (1989) Nature 342:877-883; Al-Lazikani *et al.*, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), 항체 서열 가변성에 기초한 카밧(Kabat)(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM(University of Bath), 접촉(Contact)(University College London), 국제 ImMunoGeneTics 데이터베이스(IMGT)(1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212) 및 많은 수의 결정 구조를 사용한 친화도 전파 클러스터링에 기초한 North CDR 정의를 포함하는 임의의 다수의 잘 알려진 체계를 사용하여 결정될 수 있다. 본 발명의 항체의 CDR의 경계는 당해 분야에서 임의의 체계(예를 들어, 상이한 배정 시스템 또는 조합)에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0188] 항체("모 항체")의 "항원 결합 단편"의 용어는 일반적으로 모 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역(예를 들어, 하나 이상의 CDR)의 적어도 단편을 포함하는 항체의 단편 또는 유도체를 포함하고, 항체의 단편 또는 유도체는 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 보유한다. 항원 결합 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일 가닥 항체 분자, 예컨대 scFv; 및 항체 단편으로부터 형성된 나노바디 및 다중특이적 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 항원의 결합 활성이 몰 농도 기반으로 표현될 때, 결합 단편 또는 유도체는 일반적으로 이것의 항원 결합 활성의 적어도 10%를 보유한다. 바람직하게는 결합 단편 또는 유도체는 모 항체의 항원 결합 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 또는 초과를

보유한다. 항체의 항원 결합 단편이 이것의 생물학적 활성을 유의미하게 변경하지 않는 보존적 아미노산 치환 또는 비보존적 아미노산 치환(항체의 "보존적 변이체" 또는 "기능적 보존적 변이체"라 지칭됨)을 포함할 수 있는 것으로 또한 고려된다.

[0189] "키메라 항체"의 용어는 제1 항체의 가변 도메인 및 제2 항체의 불변 도메인을 갖는 항체이고, 제1 항체 및 제2 항체는 상이한 종 기원이다. 일반적으로, 가변 도메인은 설치류 등의 항체("모 항체")로부터 유래되지만, 불변 도메인 서열은 인간 항체로부터 유래되어서 모 설치류 항체와 비교하여, 얻은 키메라 항체는 인간 대상체에서 유해한 면역 반응을 덜 유도할 것이다.

[0190] "인간화된 항체"의 용어는 인간 및 비인간(예를 들어, 마우스 및 래트) 항체 둘 다로부터의 서열을 함유하는 항체의 형태를 지칭한다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 1개의, 보통 2개의, 가변 도메인을 포함하고, 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 프레임워크(FR) 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린의 것에 상응한다. 인간화된 항체는 인간 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0191] 본 출원에서, "할로겐"의 용어는 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 일반적으로 지칭하고, 예를 들어, 용어는 불소 또는 염소를 지칭할 수 있다.

[0192] 본 출원에서, "알킬"의 용어는 수소 원자를 제거하여서 알칸으로부터 유래된 잔기를 일반적으로 지칭한다. 알킬은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 비대체될 수 있다. "알킬"의 용어는 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여서 모 알칸으로부터 유래된 잔기를 갖는 포화 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소 기를 일반적으로 지칭하고, 이것은 1개 내지 20개의 탄소 원자, 예를 들어, 1개 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 기, 예컨대 1개 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 알킬일 수 있다. 알킬의 비제한적인 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 부틸 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 알킬은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 비대체될 수 있다. 예를 들어, 이것이 치환될 때, 치환기에 의한 치환을 임의의 이용 가능한 연결 부위에서 수행할 수 있고, 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 설프하이드릴, 하이드록실, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소의 하나 이상의 치환기로부터 독립적으로 및 선택적으로 선택될 수 있고, 이것은 예를 들어 수소, 경수소, 중수소, 삼중수소, 할로겐, $-NO_2$, -CN, -OH, -SH, $-NH_2$, -C(O)H, $-CO_2H$, -C(O)C(O)H, $-C(O)CH_2C(O)H$, -S(O)H, $-S(O)_2H$, $-C(O)NH_2$, $-SO_2NH_2$, -OC(O)H, $-N(H)SO_2H$ 또는 C_{1-6} 지방족 기일 수 있다. 예를 들어, 이것은 사이클로알킬로 치환될 때 사이클로알킬알킬이다.

[0193] 본 출원에서, "알킬렌"의 용어는 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여서 모 알칸으로부터 유래된 2개의 잔기를 갖는 포화 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소 기를 일반적으로 지칭하고, 이것은 1개 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 기일 수 있고; 예를 들어, "메틸렌"의 용어는 2개의 수소 원자를 제거하여서 1개 탄소 원자 기로부터 유래된 잔기를 지칭할 수 있다. 메틸렌은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 비대체될 수 있다. 예를 들어, 알킬렌은 1개 내지 12개의 탄소 원자를 함유하고, 예를 들어, 알킬렌 기는 1개 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 알킬렌의 비제한적인 예는 메틸렌($-CH_2-$), 1,1-에틸렌($-CH(CH_3)-$), 1,2-에틸렌($-CH_2CH_2-$), 1,1-프로필렌($-CH(CH_2CH_3)-$), 1,2-프로필렌($-CH_2CH(CH_3)-$), 1,3-프로필렌($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-부틸렌($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), 1,5-부틸렌($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 알킬렌은 치환되거나 비치환되거나, 대체되거나 비대체될 수 있다. 예를 들어, 이것이 치환될 때, 치환기에 의한 치환을 임의의 이용 가능한 연결 점에서 수행할 수 있고, 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 설프하이드릴, 하이드록실, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소의 하나 이상의 치환기로부터 독립적으로 및 선택적으로 선택될 수 있고, 이것은 예를 들어 수소, 경수소, 중수소, 삼중수소, 할로겐, $-NO_2$, -CN, -OH, -SH, $-NH_2$, -C(O)H, $-CO_2H$, -C(O)C(O)H, $-C(O)CH_2C(O)H$, -S(O)H, $-S(O)_2H$, $-C(O)NH_2$, $-SO_2NH_2$, -OC(O)H, $-N(H)SO_2H$ 또는 C_{1-6} 지방족 기일 수 있다. 메틸렌 또는 알킬렌은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0194] "알콕시"의 용어는 -O-(알킬) 및 -O-(비치환된 사이클로알킬)를 지칭하며, 알킬 또는 사이클로알킬은 본원에 정의된 것과 같다. 알콕시의 비제한적인 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 사이클로프로폭시, 사이클로부톡시, 사이클로펜틸옥시 및 사이클로헥실옥시를 포함한다. 알콕시는 선택적으로 치환되거나 비치환되고, 이것이

치환될 때, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 설프하이드릴, 하이드록실, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로부터 독립적으로 선택된 군 중 하나 이상이다.

[0195] 본 출원에서, "알케닐"의 용어는 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 선형 또는 분지형 탄화수소 기를 일반적으로 지칭한다. 알케닐의 예시적인 예는 알릴, 호모알릴, 비닐, 크로틸, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐 등을 포함한다. 하나 초과의 이중 결합을 함유하는 C2-6 선형 또는 분지형 알케닐의 예시적인 예는 부타디에닐, 펜타디에닐, 헥사디에닐 및 헥사트리에닐뿐만 아니라, 이의 분지형 형태를 포함한다. 불포화된 결합(이중 결합)의 위치는 탄소 사슬에서의 임의의 위치일 수 있다. 알케닐은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0196] 본 출원에서, "알케닐렌"의 용어는 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여서 알켄으로부터 유래된 잔기를 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 알케닐렌은 아크롤, 비닐렌, 부테닐렌, 펜테닐렌, 헥세닐렌 등일 수 있다. 알케닐렌은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0197] 본 출원에서, "알키닐"의 용어는 불포화 선형 또는 분지형 탄화수소, 예를 들어, 에티닐, 1-프로피닐, 프로파길 또는 부티닐을 일반적으로 지칭한다. 알키닐은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0198] 본 출원에서, "알키닐렌"의 용어는 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여서 알킨으로부터 유래된 잔기를 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 알키닐렌은 에티닐렌, 프로피닐렌, 프로파길렌, 부티닐렌 등일 수 있다. 알키닐렌은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0199] 본 출원에서, "아릴"의 용어는 수소 원자를 제거하여서 방향족 고리로부터 유래된 잔기를 일반적으로 지칭한다. "방향족 고리"의 용어는 공액된 π 전자 시스템을 갖는 6원 내지 14원 모든 탄소 단환식 고리 또는 융합된 다환식 고리(즉, 탄소 원자의 인접한 쌍을 공유하는 고리)를 지칭할 수 있고, 이것은 6원 내지 10원, 예컨대 벤젠 및 나프탈렌일 수 있다. 방향족 고리는 헤테로아릴, 헤테로사이클릴 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있고, 모 구조에 연결된 고리는 아릴 고리이다. 아릴은 치환되거나 비치환될 수 있고, 이것이 치환될 때, 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 설프하이드릴, 하이드록실, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오의 군으로부터 독립적으로 선택된 군 중 하나 이상일 수 있다. 아릴은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0200] 본 출원에서, "헤테로아릴"의 용어는 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여서 헤테로방향족 고리로부터 유래된 잔기를 일반적으로 지칭한다. "헤테로방향족 고리"의 용어는 1개 내지 4개의 이종원자 및 5개 내지 14개의 고리 원자를 포함하는 헤테로방향족 시스템을 지칭하고, 이종원자는 산소, 황 및 질소의 군으로부터 선택된다. 헤테로아릴은 5원 내지 10원일 수 있고, 5원 또는 6원, 예컨대 푸라닐, 티에닐, 피리디닐, 피롤릴, N-알킬피롤릴, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸릴 및 테트라졸릴일 수 있다. 헤테로아릴 고리는 아릴, 헤테로사이클릴 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있고, 모 구조에 연결된 고리는 헤테로아릴 고리이다. 헤테로아릴은 선택적으로 치환되거나 비치환될 수 있고, 이것이 치환될 때, 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 설프하이드릴, 하이드록실, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오의 군으로부터 독립적으로 선택된 군 중 하나 이상일 수 있다. 헤테로아릴은 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0201] 본 출원에서, "사이클로알킬"의 용어는 포화 또는 부분 불포화 단환식 또는 다환식 탄화수소 치환기를 지칭하고, 사이클로알킬 고리는 3개 내지 20개의 탄소 원자, 바람직하게는 3개 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 3개 내지 10개의 탄소 원자, 바람직하게는 3개 내지 8개의 탄소 원자 및 더 바람직하게는 3개 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 단환식 사이클로알킬의 비제한적인 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로펜테닐, 사이클로헥실, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵틸, 사이클로헵타트리에닐, 사이클로옥틸 등을 포함한다. 다환식 사이클로알킬의 예는 스피로 고리, 융합된 고리 및 브릿징된 고리 사이클로알킬을 포함한다. 사이클로알킬은 치환되거나 비치환될 수 있다. 이것이 치환될 때, 치환기에 의한 치환을 임의의 이용 가능한 연결 부위에서 수행할 수 있고, 바람직하게는, 치환기는 수소 원자, 할로겐, 알킬, 알콕시, 할로알킬, 하이드록실, 하이드록시알킬, 시아노, 아미노, 니트로, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴의 하나 이상의 치환기로부터 독립적으로 및 선택적으로 선택된다.

[0202] 본 출원에서, "부분 불포화"의 용어는 사이클릭 구조가 고리 분자 사이에 적어도 하나의 이중 결합 또는 삼중 결합을 함유한다는 것을 일반적으로 의미한다. "부분 불포화"의 용어는 다수의 불포화 부위를 갖는 사이클릭 구

조를 포함하지만, 본원에 정의된 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하도록 의도되지는 않는다. "불포화"의 용어는 모이어티가 하나 이상의 불포화 정도를 갖는다는 것을 의미한다.

[0203] 본 출원에서, "헤테로사이클릴"의 용어는 3개 내지 20개의 고리 원자를 함유하는 포화 또는 부분 불포화 단환식 또는 다환식 탄화수소 치환기를 지칭하고, 고리 원자 중 하나 이상은 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 이종원자이고, 남은 고리 원자는 탄소이다. 바람직하게는, 헤테로사이클릴은 3개 내지 12개의 고리 원자를 함유하고, 이들의 1개 내지 4개는 이종원자이고; 더 바람직하게는, 헤테로사이클릴은 3개 내지 8개의 고리 원자를 함유하고, 이들의 1개 내지 3개는 이종원자이고; 더 바람직하게는, 헤테로사이클릴은 3개 내지 6개의 고리 원자를 함유하고, 이들의 1개 내지 3개는 이종원자이고; 가장 바람직하게는, 헤테로사이클릴은 5개 또는 6개의 고리 원자를 함유하고, 이들의 1개 내지 3개는 이종원자이다. 단환식 헤테로사이클릴의 비제한적인 예는 피롤리디닐, 테트라하이드로피라닐, 피페리디닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 호모피페라지닐 등을 포함한다. 다환식 헤테로사이클릴의 예는 스피로 헤테로사이클릴, 융합된 헤테로사이클릴 및 브릿징된 헤테로사이클릴을 포함한다. 헤테로사이클릴 고리는 아릴, 헤테로아릴 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있고, 모 구조에 연결된 고리는 헤테로사이클릴이다. 헤테로사이클릴은 치환되거나 비치환될 수 있다. 이것이 치환될 때, 치환기에 의한 치환을 임의의 이용 가능한 연결 부위에서 수행할 수 있고, 바람직하게는, 치환기는 수소 원자, 할로겐, 알킬, 알콕시, 할로알킬, 하이드록실, 하이드록시알킬, 시아노, 아미노, 니트로, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴 중 하나 이상으로부터 독립적으로 및 선택적으로 선택된다.

[0204] 본 출원에서, "고리 형성 원자"의 용어는 사이클릭 구조에 함유된 원자를 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 고리 형성 원자는 벤젠 고리에서의 탄소 원자일 수 있거나, 피리딘 고리에서의 질소 원자일 수 있다. 수소 원자가 고리 형성 원자에 연결될 때, 고리 형성 원자는 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0205] 본 출원에서, "각각 독립적으로"의 용어는 변수가 임의의 경우에 동일한 화합물에서 동일한 정의 또는 상이한 정의를 갖는 변수의 존재 또는 부재와 무관하게 적용된다는 것을 일반적으로 의미한다. 예를 들어, 변수는 화합물에서의 치환기의 유형 또는 수, 화합물에서의 원자의 유형 및 기타 등등을 지칭할 수 있다. 예를 들어, R이 화합물에서 2회 발생하고, R이 "독립적으로 탄소 또는 질소"로서 정의되는 경우, R 둘 다는 탄소일 수 있고, R 둘 다는 질소일 수 있거나, 1개의 R은 탄소일 수 있고, 다른 R은 질소이다.

[0206] 본 출원에서, "선택적인" 또는 "선택적으로"의 용어는 반드시는 아니지만 후속하여 기재된 사건 또는 상황이 발생할 수 있다는 것, 및 설명이 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 일반적으로 의미한다. 예를 들어, "알킬로 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴 기"는 알킬이 반드시는 아니지만 존재할 수 있고, 설명이 헤테로사이클릴 기가 알킬로 치환되거나 이것으로 치환되지 않는다는 것을 의미한다.

[0207] 본 출원에서, "치환된"의 용어는 기에서의 1개 이상의 수소 원자, 예를 들어, 5개 이하(예를 들어, 1개 내지 3개)의 수소 원자가 각각 독립적으로 상응하는 수의 치환기로 치환된다는 것을 일반적으로 의미한다. 치환기는 오직 이것의 가능한 화학 위치에 있고, 당업자는 부당한 노력 없이 가능하거나 불가능한 치환을 (실험 또는 이론에 의해) 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 이것은 유리 수소를 갖는 아미노 또는 하이드록실이 불포화 (예컨대, 올레핀) 결합을 갖는 탄소 원자에 결합될 때 불안정할 수 있다.

[0208] 본 출원에서, "0개 또는 초과(예를 들어, 0개 또는 1개 또는 초과, 0개 또는 1개, 또는 0개)의 메틸렌 단위가 대체된"의 용어는, 구조가 하나 이상의 메틸렌 단위를 포함할 때, 하나 이상의 메틸렌 단위가 대체되지 않을 수 있거나, 메틸렌이 아닌 하나 이상의 기(예를 들어, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NH-, -O-, -S-, -SO-, -SO2-, -PH-, -P(=O)H-, -NHSO2-, -SO2NH-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -N=N-, -C=N-, -N=C- 또는 -C(=N2)-)에 의해 대체될 수 있다는 것을 일반적으로 의미한다.

[0209] 본 출원에서, 기 X의 기 Y에 대한 "연결"은 일반적으로 임의의 배향일 수 있고, 이는 기 X가 링커 Y 및 기 Z에 사용될 때, 기 X의 2개 이상의 연결 부위가 임의로 기 Y 또는 기 Z 중 어느 하나에 연결될 수 있다는 것을 일반적으로 의미한다.

[0210] 본 출원에서, "화합물"의 용어는 2개 이상의 상이한 원소를 갖는 물질을 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 본 출원의 화합물은 유기 화합물일 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 화합물은 분자량이 500 Da 이하인 화합물, 분자량이 1000 Da 이하인 화합물, 분자량이 1000 Da 이상인 화합물 또는 분자량이 10000 Da 이상 또는 100000 Da 이상인 화합물일 수 있다. 본 출원에서, 화합물은 또한 화학 결합에 의한 연결을 수반하는 화합물, 예를 들어, 분자량이 1000 Da 이하인 하나 이상의 분자가 화학 결합에 의해 생물학적 거대분자에 연결된 화합물을 지칭할 수 있고, 생물학적 거대분자는 폴리사카라이드, 단백질, 핵산, 폴리펩타이드 및 기타일 수 있다. 예를 들어, 본

출원의 화합물은 단백질이 분자량이 1000 Da 이하인 하나 이상의 분자에 연결된 화합물을 포함할 수 있고, 단백질이 분자량이 10000 Da 이하인 하나 이상의 분자에 연결된 화합물을 포함할 수 있고, 단백질이 분자량이 100000 Da 이하인 하나 이상의 분자에 연결된 화합물을 포함할 수 있다.

[0211] 본 출원에서, "알킬", "알케닐" 및 "사이클로알킬"과 같은 용어는 당업자에게 알려진 것과 같이 C_1-C_4 알킬, C_3-C_7 사이클로알콕시, C_1-C_4 알킬카보닐아미노 및 기타에서처럼 특정한 상황 하에 그 기에 존재하는 원자의 수를 나타내는 표기가 선행될 수 있고, "C" 뒤의 첨자 숫자는 그 기에 존재하는 탄소 원자의 수를 나타낸다. 예를 들어, C_3 알킬은 3개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기(예를 들어, n-프로필 또는 이소프로필)를 지칭하고; C_{1-10}에서 그 기의 구성원은 1 내지 10의 범위 내의 임의의 수의 탄소 원자를 함유할 수 있다.

[0212] 그 기에서의 1개 이상의 수소 원자, 예를 들어, 5개 이하(예를 들어, 1개 내지 3개)의 수소 원자는 각각 독립적으로 상응하는 수의 치환기로 치환된다. 치환기는 오직 이것의 가능한 화학 위치에 있고, 당업자는 부당한 노력 없이 가능하거나 불가능한 치환을 (실험 또는 이론에 의해) 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 이것은 유리 수소를 갖는 아미노 또는 하이드록실이 불포화 (예컨대, 올레핀) 결합을 갖는 탄소 원자에 결합될 때 불안정할 수 있다.

[0213] 본 출원에서, 본 출원의 화합물 또는 리간드-약물 접합체는 이의 호변이체, 메소머(mesomer), 라세미체, 거울상이성질체 및/또는 부분입체이성질체를 포함한다. 본 출원에서, "부분입체이성질체"의 용어는 2개 이상의 키랄 중심을 갖고 분자가 서로의 거울상이 아닌 입체이성질체를 일반적으로 지칭한다. 부분입체이성질체는 상이한 물성, 예를 들어, 융점, 비점, 스펙트럼 특성 및 반응성을 가질 수 있다. 본 출원에서, "호변이체" 또는 "호변이체성 형태"의 용어는 상호교환 가능하게 사용되고, 낮은 에너지 장벽을 횡단하여 서로 전환될 수 있는 상이한 에너지의 구조 이성질체를 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이체(양성자성 호변이체라고도 알려짐)는 케토-엔올 이성질체화 및 이민-엔아민 이성질체화와 같은 양성자 이동에 의한 상호전환을 포함한다. 원자가 호변이체는 일부 결합 전자의 재조합에 의한 상호전환을 포함한다. 본 출원에서, "메소머"의 용어는 분자가 비대칭 원자를 함유하지만 비대칭 인자의 존재로 인해 총 광학 회전이 0이라는 것을 일반적으로 의미한다. "라세미체" 또는 "라세미 혼합물"의 용어는 등몰량의 2개의 거울상이성질체성 물질의 조성을 지칭한다.

[0214] 본 출원에서, 화합물 또는 리간드-약물 접합체의 "이성질체"의 용어는 화합물의 호변이체, 메소머, 라세미체, 거울상이성질체 및 부분입체이성질체를 일반적으로 포함한다.

[0215] 본 출원에서, "리간드-약물 접합체"의 용어는 리간드가 안정한 연결 단위를 통해 생물학적 활성 세포독성 약물에 연결된다는 것을 일반적으로 의미한다. 본 출원에서, "리간드-약물 접합체"는 항체-약물 접합체(ADC)일 수 있고, 이는 단일클론 항체 또는 항체 단편이 안정한 연결 단위를 통해 생물학적 활성 세포독성 약물에 연결된다는 것을 의미할 수 있다.

[0216] 본 출원에서, "리간드"의 용어는 표적 세포와 연관된 항원 또는 수용체를 인식하고 이에 결합할 수 있는 거대분자 화합물을 일반적으로 지칭한다. 리간드의 역할은 리간드가 결합하는 표적 세포 집단에 약물을 제시하는 것일 수 있고, 리간드는 단백질 호르몬, 렉틴, 성장 인자, 항체 또는 세포, 수용체 및/또는 항원에 결합할 수 있는 다른 분자를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 출원에서, 리간드는 Pc로 표시될 수 있고, 연결 결합은 리간드에서의 이종원자를 통해 리간드 항원과 연결 단위 사이에 형성된다. 리간드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(Ab)일 수 있고, 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체, 완전 인간 항체 또는 쥣과 항체로부터 선택될 수 있고, 항체는 단일클론 항체일 수 있다.

[0217] "세포독성 약물"의 용어는 독성 약물을 일반적으로 지칭하고, 세포독성 약물은 이것의 정상 성장을 파괴하기에 충분히 강한 종양 세포 내의 화학 분자일 수 있다. 세포독성 약물은 충분하게 높은 농도에서 종양 세포를 사멸할 수 있다. "세포독성 약물"은 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 방사성동위원소(예를 들어, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} 또는 Lu의 방사성 동위원소), 독성 약물, 화학치료 약물, 항생제 및 핵산분해 효소를 포함할 수 있고; 예를 들어, 세포독성 약물은 예를 들어 캄프토테신 유도체 엑사테칸(화학명: (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-1H,12H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]이미다조[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온)일 수 있는 비제한적인 예로서 캄프토테신 유도체를 포함하는 독성 약물일 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 세포독성 약물은 또한 세포독소라 지칭된다.

[0218] "링커 단위" 또는 "링커 구조"의 용어는 일 말단에서 리간드에 연결되고 다른 말단에서 세포독성 약물에 연결되

거나, 세포독성 약물에 연결되기 전에 다른 링커에 연결된 화학 구조 단편 또는 결합을 일반적으로 지칭한다. 리간드의 직접 연결 또는 간접 연결은 그 기가 공유 결합을 통해 리간드에 직접 연결되고, 또한 링커 구조를 통해 리간드에 연결될 수 있다는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 산 불안정 링커 구조(예를 들어, 하이드라존), 프로테아제 감수성(예를 들어, 펩티다제 감수성) 링커 구조, 광불안정 링커 구조, 디메틸 링커 구조 또는 디설파이드 함유 링커 구조를 포함하는 화학 구조 단편 또는 결합은 링커 구조로서 사용될 수 있다.

[0219] "다른 분자 모이어티에 선택적으로 연결된" 구조의 용어는 그 구조가 임의의 다른 화학 구조에 연결되지 않거나 그 구조가 (예를 들어, 화학 결합 또는 링커 구조를 통해) 그 구조와 상이한 하나 이상의 다른 화학 구조(예를 들어, 본 출원에 기재된 리간드)에 연결된다는 것을 일반적으로 의미한다.

[0220] "약물 로딩"의 용어는 리간드당 로딩된 세포독성 약물의 평균 양을 일반적으로 지칭하고, 또한 세포독성 약물 양 대 항체 양의 비로 표현될 수 있고, 세포독성 약물 로딩은 리간드(Ab)당 0 내지 12(예를 들어, 1 내지 10)의 세포독성 약물의 범위일 수 있다. 본 출원의 실시형태에서, 약물 로딩은 Na로 표시되고, 예시적인 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 평균일 수 있다. 커플링 반응 후 ADC 분자당 약물 로딩은 통상적인 방법, 예컨대 UV/가시광선 분광법, 질량 분광법, ELISA 검정 및 HPLC에 의해 규명될 수 있다.

[0221] 본 출원에서, 본 출원의 화합물의 소정의 원자는 하나 초과의 동위원소 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 수소는 경수소(^{1}H), 중수소(^{2}H) 및 삼중수소(^{3}H)로서 발생할 수 있고, 탄소는 3개의 상이한 동위원소(^{12}C, ^{13}C 및 ^{14}C)로서 자연적으로 발생할 수 있다. 본 출원의 화합물로 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 또한 ^{15}N, ^{18}O, ^{17}O, ^{18}F, ^{32}P, ^{33}P, ^{129}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I 또는 유사한 동위원소를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 따라서, 본 출원의 화합물은 이들 동위원소의 자연 풍부도에 비해 이들 동위원소 중 하나 이상이 풍부할 수 있다. 이러한 동위원소로 풍부한 화합물은 당업자에게 알려진 것과 같이 여러 가지의 목적에 사용될 수 있다. 예를 들어, 중수소(^{2}H)와 같은 무거운 동위원소에 의한 치환은 아마도 더 높은 대사 안정성으로 인해 소정의 치료학적 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 중수소(^{2}H)의 자연 풍부도는 약 0.015%이다. 따라서, 자연에서 약 6500개 중 1개의 수소 원자는 중수소 원자이다. 따라서, (경우에 따라) 본 출원의 중수소 함유 화합물에서의 하나 이상의 부위의 중수소 풍부도는 0.015% 초과이다. 달리 표시되지 않는 한, 본 출원에 기재된 구조는 또한 하나 이상의 동위원소로 풍부한 원자의 존재 또는 부재만이 다른 화합물을 포함한다. 예를 들어, 중수소 또는 삼중수소에 의한 수소 원자의 치환 또는 탄소 13 또는 탄소 14에 의한 탄소 원자의 치환을 제외하고 본 출원의 구조와 동일한 구조를 갖는 화합물은 본 출원의 범위 내에 있다.

[0222] 본 출원에서, "약제학적 조성물"의 용어는 본 출원에 기재된 화합물 중 하나 이상 또는 이의 생리학적으로/약제학적으로 허용 가능한 염 또는 프로드럭, 및 다른 화학 성분, 예를 들어 생리학적으로/약제학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 함유하는 혼합물을 일반적으로 의미한다. 약제학적 조성물은 유기체에 대한 투여를 촉진할 수 있고, 이는 활성 성분의 흡수를 수월하게 하여서 생물학적 활성을 발휘한다. 통상적인 약제학적 조성물의 제조를 위해, 중국 약전을 참조할 수 있다. 약제학적 조성물은 근육내 투여 및 피하 투여를 위한 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 형태일 수 있다. 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 알려진 기법에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사용 조제물은 또한 비독성의 비경구로 허용 가능한 희석제 또는 용매 중에 제조된 멸균 주사용 용액 또는 현탁액, 예를 들어 1.3-부탄디올 중에 제조된 용액일 수 있다. 또한, 멸균 고정유는 편리하게는 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 블렌드 고정유를 사용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사의 제조에 또한 사용될 수 있다.

[0223] 본 출원에서, "약제학적으로 허용 가능한 염"의 용어는 본 출원의 화합물 또는 리간드-약물 접합체의 염 또는 본 출원에 기재된 화합물의 염을 일반적으로 지칭한다. 이러한 염은 포유류에서 사용될 때 안전하고/하거나 효과적일 수 있고, 필요한 생물학적 활성을 보유할 수 있고, 본 출원의 항체-약물 접합체는 산과 염을 형성할 수 있고, 약제학적으로 허용 가능한 염의 비제한적인 예는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 설페이트, 바이설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트, 아스코르베이트, 옥살레이트, 니트레이트, 소르베이트, 하이드로포스페이트, 디하이드로포스페이트, 살리실레이트, 하이드로시트레이트, 타르트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 메실레이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트 및 p-톨루엔설포네이트를 포함한다.

[0224] 본 출원에서, "약제학적으로 허용 가능한 담체"의 용어는 치료제, 예컨대 항체 또는 폴리펩타이드, 유전자 및

다른 치료제를 제공하는 담체 또는 담체 제제를 일반적으로 지칭한다. 용어는 자체가 조성물을 받는 개체에게 해로운 항체의 생성을 유도하지 않고 부당한 독성을 생성하지 않고 주어질 수 있는 임의의 약제학적 담체를 지칭한다. 적합한 담체는 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(아미노산), 아미노산 공중합체, 지질 응집체 및 불활화된 바이러스 입자일 수 있다. 이러한 담체는 당업자에게 잘 알려져 있다. 치료학적 조성물에서의 약제학적으로 허용 가능한 담체는 액체, 예컨대 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올을 포함할 수 있다. 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질은 또한 이들 담체에 존재할 수 있다.

[0225] 본 출원에서, "치료" 및 "치료하는"의 용어는 비제한적인 예로서 치료학적 이익을 포함하는 유리하거나 원하는 효과를 달성하는 방법을 일반적으로 지칭한다. 치료학적 이익은 치료되는 기저 장애의 소거, 저해, 감소 또는 개선을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 치료학적 이익은 기저 장애와 연관된 하나 이상의 생리학적 증상을 소거하거나 저해하거나 감소하거나 개선하여서 달성되고, 이에 따라 개선은 환자에서 관찰되지만, 환자는 기저 장애를 여전히 겪을 수 있다.

[0226] 본 출원에서, "예방" 및 "예방하는"의 용어는 비제한적인 예로서 예방학적 이익을 포함하는 유리하거나 원하는 효과를 달성하는 방법을 일반적으로 지칭한다. 예방학적 이익의 목적을 위해, 약제학적 조성물은 특정한 질환을 발생시킬 위험에 있는 환자 또는 질환이 아직 진단되지 않더라도 질환의 하나 이상의 생리학적 증상을 갖는 것으로 보고하는 환자에게 투여될 수 있다.

[0227] 본 출원에서, "대상체" 또는 "환자"의 용어는 인간(즉, 임의의 연령 그룹의 남성 또는 여성, 예를 들어, 소아 대상체(예를 들어, 유아, 아동 또는 청소년) 또는 성인 대상체(예를 들어, 어린 사람, 중년 사람 또는 노년 사람)) 및/또는 다른 영장류(예를 들어, 시아노몰거스 원숭이 또는 레서스 원숭이); 상업적으로 관련된 포유류를 포함하는 포유류, 예컨대 소, 돼지, 말, 양, 염소, 고양이 및/또는 개; 및/또는 상업적으로 관련된 가금류, 예컨대 닭, 오리, 거위, 메추라기 및/또는 칠면조를 포함하는 가금류를 일반적으로 지칭한다.

[0228] "치료학적 유효량", "치료학적 유효 용량" 및 "유효량"의 용어는 단독으로 또는 다른 치료학적 약물과 조합되어 세포, 조직 또는 대상체에게 투여될 때 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 질환 또는 병태의 발생을 예방하거나 개선하는 데 유효한 본 발명의 리간드-약물 접합체의 양을 지칭한다. 치료학적 유효 용량은 또한 증상의 개선을 야기하기에 충분한 용량, 예를 들어, 관련된 의학 병태를 치료하거나 치유하거나 예방하거나 개선하거나 이러한 병태의 치료, 치유, 예방 또는 개선을 촉진하기 위한 양을 지칭한다. 활성 성분이 단독으로 개체에게 투여될 때, 치료학적 유효 용량은 오직 그 성분의 양을 지칭한다. 조합에서의 투여의 경우에, 치료학적 유효 용량은 활성 성분이 조합으로, 순차적으로 또는 동시에 투여되는지와 무관하게 치료학적 효과를 생성하는 활성 성분의 합한 양을 지칭한다. 치료제의 유효량은 진단학적 지수 또는 매개변수를 적어도 10%, 일반적으로 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 더 바람직하게는 적어도 40% 및 가장 바람직하게는 적어도 50%만큼 증가시킬 것이다.

[0229] "암"의 용어는 비정상적으로 높은 수준의 증식 및 성장을 나타내는 세포의 군을 지칭하도록 본원에 사용된다. 암은 양성(양성 종양이라고도 지칭됨), 전악성 또는 악성일 수 있다. 암 세포는 고형 암 세포 또는 혈액 암 세포일 수 있다. 본원에 사용된 것과 같은 "종양"의 용어는 암을 포함하는 하나 이상의 세포를 지칭한다. "종양 성장"의 용어는, 암의 크기 또는 정도를 상응하게 증가시키는, 암을 포함하는 하나 이상의 세포의 증식 또는 성장을 지칭하기 위해 본원에 사용된다.

[0230] **항-B7H4 항체**

[0231] "B7-H4" 또는 "B7H4"의 용어는 4개의 Ig 유사 세포외 도메인을 갖는 I형 막관통 단백질인 CD276으로도 알려진 인간 B7 단백질 패밀리의 구성원을 지칭한다. B7-H4는 항원 제시 세포 또는 암 세포의 표면에서 발현된 면역 관문 단백질 중 하나이고, T 세포의 기능적 활성화에 대한 저해 효과를 갖는다. "B7-H4"의 용어는 세포에 의해 자연적으로 발현된 B7-H4의 임의의 변이체 또는 아이소타입을 포함한다. 본 발명의 항체는 비인간 종으로부터 얻은 B7-H4와 교차반응할 수 있다. 대안적으로, 항체는 또한 인간 B7-H4에 특이적일 수 있고, 다른 종과 교차반응성을 나타내지 않을 수 있다. B7-H4 또는 이의 임의의 변이체 또는 아이소타입은 이들이 자연적으로 발현된 세포 또는 조직으로부터 단리되거나 당해 분야에 흔히 사용된 기법 및 본원에 기재된 것을 사용하여 재조합 기법에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게는, 항-B7-H4 항체는 정상 글리코실화 패턴을 갖는 인간 B7-H4를 표적화한다.

[0232] 본 발명에서, "항-B7H4 항체", "항-B7H4", "B7H4 항체" 또는 "B7H4에 결합하는 항체"의 용어는 이것이 충분한

친화도로 B7H4 단백질 또는 이의 단편에 결합할 수 있어서 항체가 B7H4를 표적화하는 진단제 및/또는 치료제로서 사용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0233] 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에서 사용하기 위한 항체의 CDR 서열은 PCT/CN2021/102952에 기재된 항체 PR008199로부터의 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물 또는 용도에서 사용하기 위한 항체의 가변 영역 서열은 PCT/CN2021/102952에 기재된 항체 PR008199로부터의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에서 사용하기 위한 항체의 아미노산 서열은 PCT/CN2021/102952에 기재된 항체 PR008199로부터의 전장 아미노산 서열을 포함한다.

[0234] 본 발명의 항-B7H4 항체 DB1001(PR008199) 또는 이의 항원 결합 단편은 PCT/CN2021/102952에서의 설명을 참조하여 제조된다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에서 사용하기 위한 항체의 CDR 서열은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물 또는 용도에서 사용하기 위한 항체의 가변 영역 서열은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에서 사용하기 위한 항체는 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약물 접합체, 조성물, 용도 또는 방법에서 사용하기 위한 항체는 항-B7H4 항체 DB1001이다.

[0235] 항-B7H4 항체 DB1001의 가변 영역 아미노산 서열은 하기와 같고, CDR 영역은 IMGT 넘버링 규칙에 따라 결정된다.

[0236] DB1001 중쇄 가변 영역:

[0237] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYYADSVKGRFIISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTVSS(서열 번호 7)

[0238] HCDR1: SFGMH(서열 번호 1)

[0239] HCDR2: VISYDASNEYYADSVKG(서열 번호 2)

[0240] HCDR3: GGALRWYFAY(서열 번호 3)

[0241] DB1001 경쇄 가변 영역:

[0242] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIK(서열 번호 8)

[0243] LCDR1: RASQSISSNLG(서열 번호 4)

[0244] LCDR2: GASTRAT(서열 번호 5)

[0245] LCDR3: QQYRSWPPLT(서열 번호 6)

[0246] DB1001 중쇄 아미노산 서열

[0247] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYYADSVKGRFIISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 9)

[0248] DB1001 경쇄 아미노산 서열

[0249] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호 10)

[0250] 본 발명의 항체는 항체를 제조하기 위한 임의의 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. B7H4의 임의의 적합한

형태는 항체 제조를 위해 면역원(항원)으로서 사용될 수 있다. 예에 의해 그리고 제한 없이, 임의의 B7H4 변이체 또는 이의 단편은 면역원으로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 쥣과 단일클론 항-인간 B7H4 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는 당해 분야에 잘 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 설치류(예를 들어, 마우스)로부터 유래된 항체는 생체내 치료학적 약물로서 사용될 때 원치 않는 항체 면역원성을 야기할 수 있고, 반복 사용은 치료학적 항체에 대한 인체의 면역 반응으로 이어지고, 이러한 면역 반응은 적어도 치료학적 효능 소실로 이어지고, 중증의 경우에 잠재적으로 치명적인 알레르기 반응으로 이어진다. 설치류 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 접근법은 마우스 가변 영역이 인간 불변 영역에 융합된 키메라 항체의 생성을 포함한다(Liu *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43). 그러나, 키메라 항체에서의 온전한 설치류 가변 영역의 보유는 환자에서 여전히 해로운 면역원성을 야기할 수 있다. 인간 프레임워크에 대한 설치류 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR) 루프의 그래프팅(즉, 인간화)은 설치류 서열을 더 최소화하기 위해 사용되었다(Jones *et al.* (1986) Nature 321:522; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239:1534).

[0251] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 항체 또는 인간화된 항체는 제조된 쥣과 단일클론 하이브리도마 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 면역글로불린 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA를 관심 있는 쥣과 하이브리도마로부터 얻을 수 있고, 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 비쥣과(예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 함유하도록 조작할 수 있다.

[0252] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 B7H4 항체는 키메라 중쇄 및 키메라 경쇄를 얻기 위해 당해 분야에 알려진 방법에 의해 하이브리도마로부터의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 인간 IgG의 불변 영역과 효과적으로 연결하여서(예를 들어, Cabilly *et al.*에 속하는 미국 특허 제4,816,567호 참조) 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 항체에 포함된 불변 영역은 임의의 인간 IgG 하위유형, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 바람직하게는 IgG4로부터 선택될 수 있다.

[0253] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키메라 B7H4 항체를 발현 세포를 "믹스 앤 매치"의 방식으로 키메라 경쇄 및 키메라 중쇄의 발현 플라스미드에 의해 형질주입하여 얻을 수 있고, 상기 결합 검정 및 다른 통상적인 결합 검정(예를 들어, ELISA)은 이러한 "믹스 앤 매치"된 항체의 B7H4 결합을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0254] 본 발명의 인간화된 항체에 대해, 쥣과 CDR 영역은 당해 분야에 알려진 방법을 사용하여 인간 생식선 프레임워크 영역으로 삽입될 수 있다. 미국 특허 제5,225,539호(Winter *et al.*) 및 미국 특허 제5,530,101호; 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,762호 및 미국 특허 제6,180,370호(Queen *et al.*)를 참조한다.

[0255] 일부 실시형태에서, 아미노산 변경은 아미노산 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 아미노산 결실, 삽입 또는 치환에 의해 돌연변이된 아미노산 서열을 갖지만 (특히 상기 서열에 도시된 CDR 영역에서) 상기 항체와 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 여전히 갖는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 특정 서열에 도시된 CDR 영역과 비교할 때 아미노산 결실, 삽입 또는 치환에 의해 CDR 영역에서 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 갖는다.

[0256] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Fc 영역 변이체를 생성하기 위해 본원에 제공된 항체의 Fc 영역으로 도입될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0257] 일부 실시형태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기에 의해 치환된, 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "thioMAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

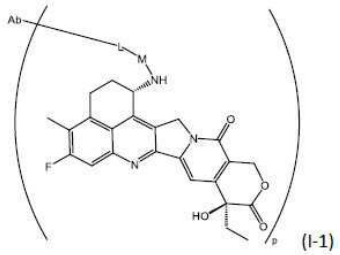
[0258] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항체는 당해 분야에 알려지고 용이하게 이용 가능한 다른 비단백질 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리-1,3-디알킬, 폴리-1,3,6-트리알킬, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동종중합체 또는 랜덤 공중합체) 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 동종중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예컨대, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이의 혼합물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0259] **약물 접합체**

[0260] 본 출원은 (1) 시험관내 종양 세포 증식에 대한 저해 활성을 가짐; (2) 표적화 저해 특성을 가짐; (3) 혈장 안

정성을 가짐; (4) 생체내 종양 저해 효과를 가짐; (5) 방관자 사멸 효과를 가짐; (6) 수송체를 통한 수송을 저해하는 데 있어서의 능력을 가짐; (7) 생체내 종양 표적화 역량을 가짐; 및 (8) 생체내 더 양호한 안전성을 가짐의 군으로부터 선택된 하나 이상의 효과를 가질 수 있는, 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공한다.

[0261] 본 출원은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (I-1)로서 도시되어 있다:



(I-1)

[0262]

[0263] 식 중,

[0264] M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

[0265] L^2는 -O- 또는 -S-이고,

[0266] L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 하나 이상의 R^{2a}로 치환되고;

[0267] m은 1, 2, 3 또는 4로부터 선택되고;

[0268] 각각의 R^{1a}는 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고; 바람직하게는, R^{1a}는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0269] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

[0270] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

[0271] L은 링커 단위이고;

[0272] p는 평균 연결 수를 나타내고, p는 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

[0273] Ab는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편임.

[0274] 일부 실시형태에서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 바람직하게는, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고; 더 바람직하게는, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0275] 일부 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 및 화학식 (II-2)에서, L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$이고, R^{1a}는

할로겐, 하이드록실 및 아미노, 및 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, R^{1b}는 수소, 할로겐, 하이드록실 및 아미노, 및 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, m은 1, 2, 3 또는 4로부터 선택되고, 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있고; 바람직하게는, R^{1a}는 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, R^{1b}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, m은 1 또는 2로부터 선택되고; 바람직하게는, R^{1a}는 $-CH_3$이고; R^{1b}는 수소 및 $-CH_3$으로부터 선택되고, m은 1 또는 2로부터 선택되고; 바람직하게는, L^1은 , , 또는 로부터 선택된다.

[0276] 일부 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 및 화학식 (II-2)에서, L^1은 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 또는 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬 및 3원 내지 6원 포화 헤테로사이클릴은 하나 이상의 R^{2a}로 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 치환되고, 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐, 하이드록실, 아미노 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고; 바람직하게는, L^1은 하나 이상의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이고, 각각의 R^{2a}는 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고; 바람직하게는, L^1은 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이고; 바람직하게는, L^1은 , , , , , 및 로부터 선택된다.

[0277] 일부 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 및 화학식 (II-2)에서, L^1은 , , , , , , , , 및 로부터 선택된다.

[0278] 일부 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 및 화학식 (II-2)에서, M은 $-L^2-L^1-C(O)-$이고;

[0279] L^2는 -O- 또는 -S-, 바람직하게는 -O-이고;

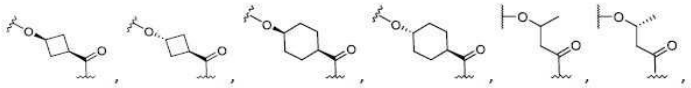
[0280] L^1은 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 또는 포화 C_3-C_6 사이클로알킬이고, 포화 C_3-C_6 사이클로알킬은 하나 이상의 R^{2a}로 선택적으로 치환되고; 바람직하게는, L^1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이고;

[0281] m은 1 또는 2로부터 선택되고;

[0282] 각각의 R^{1a}는 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고;

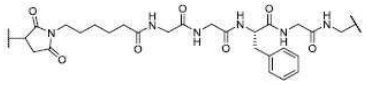
[0283] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소, 할로겐 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되고, C_1-C_6 알킬은 하나 이상의 R로 선택적으로 치환되고; 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.

[0284] 일부 바람직한 실시형태에서, 화학식 (I-1), 화학식 (II-1) 및 화학식 (II-2)에서, M은

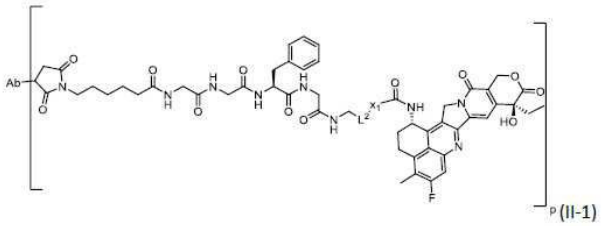
[0285] 

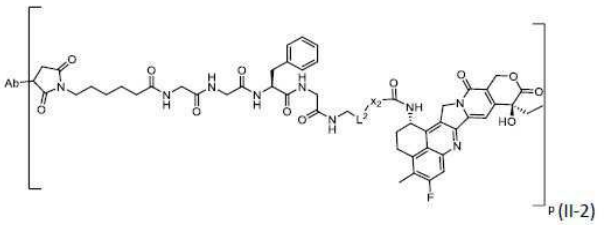
[0286] 또는 로부터 선택된다.

[0287] 일부 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 여기서 L은

[0288]  이다.

[0289] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물을 제공하고, 항-B7H4 항체-약물 접합체의 구조는 화학식 (II-1) 또는 화학식 (II-2)로서 도시되어 있다:

[0290] 



[0291] ;

[0292] 식 중,

[0293] L^2는 -O- 또는-S-이고; 바람직하게는, L^2는 -O-이고;

[0294] X_1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 포화 C_3-C_6 사이클로알킬로부터 선택되고; 바람직하게는, X_1은 1개, 2개 또는 3개의 R^{2a}로 선택적으로 치환된 , , 및 이고;

[0295] X_2는 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$로부터 선택되고;

[0296] m은 1 또는 2로부터 선택되고;

[0297] R^{1a}는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0298] R^{1b} 및 R^{2a}는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐, 또는 1개, 2개 또는 3개의 R로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬일 수 있고;

[0299] 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 할로겐일 수 있고;

[0300] p는 평균 연결 수를 나타내고, n은 1 내지 10으로부터 선택된 정수 또는 소수, 바람직하게는 3 내지 8의 정수 또는 소수이고;

[0301] Ab는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 중쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2

및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호 4, 서열 번호 5 및 서열 번호 6에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 바람직하게는, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고; 더 바람직하게는, 본 발명의 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함함.

[0302] 일부 실시형태에서, 본 발명의 평균 연결 수 p는 2 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 p는 3 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있다. 예를 들어, 평균 연결 수 p는 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4, 4 내지 5, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수 또는 소수일 수 있다.

[0303] **약제학적 조성물 및 약제학적 조제물**

[0304] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항-B7H4 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0305] 본 발명에 제공된 항-B7H4 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 또는 이의 약제학적 조성물이 개선된 수송, 전달, 관용성 및 기타를 제공하기 위해서 조제물에서 적합한 담체, 부형제 및 다른 제제와 조합되어 투여될 수 있다고 이해되어야 한다.

[0306] "약제학적 조성물"의 용어는 여기에 함유된 활성 성분이 생물학적으로 유효한 형태로 존재하게 하고 조제물이 투여되는 대상체에게 허용 불가능하게 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 조제물을 지칭한다.

[0307] 원하는 순도를 갖는 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 바람직하게는 수성 용액 또는 동결건조된 조제물의 형태로 본원에 기재된 항-B7H4 항체를 포함하는 약제학적 조제물을 제조하기 위해 하나 이상의 선택적인 약제학적 보조제 재료(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980))와 혼합될 수 있다.

[0308] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조제물은 치료되는 특정한 적응증에 필요한 것과 같은 하나 이상의 다른 활성 성분, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 미치지 않는 상호보완적인 활성을 갖는 활성 성분을 또한 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 다른 활성 성분은 화학치료제, 면역 관문 저해제, 성장 저해제, 항생제 또는 다양한 알려진 항종양 또는 항암 제제이고, 활성 성분은 의도된 용도에 유효한 양으로 적합한 조합으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 항-B7H4 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 조성물을 추가로 포함한다.

[0309] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물, 및 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조합을 제공한다.

[0310] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체 또는 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물을 포함하고, 바람직하게는 약물 전달 장치를 추가로 포함하는 키트를 제공한다.

[0311] **의학 용도**

[0312] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물의 용도를 제공하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이다.

[0313] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 혼합물, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물을 제공하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4 발현에 양성인 암이다.

[0314] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 B7H4에 의해 매개된 질환 또는 병태를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 것과 같은 항체-약물 접합체, 이의 이성질체, 이의 약제학적으로 허용 가능한

염 또는 이의 혼합물, 또는 본원에 기재된 것과 같은 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 질환 또는 병태는 바람직하게는 B7H4의 고발현을 갖는 암이다.

[0315] 일부 실시형태에서, 암은 유방암, 난소암 및 자궁내막 종양으로부터 선택된다.

[0316] 일부 실시형태에서, 본 발명의 투여 방식은 경구, 정맥내, 피하, 근육내, 동맥내, 관절내(예를 들어, 관절염 관절에서), 흡입을 통함, 에어로졸 전달 또는 종양내 투여 및 기타를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0317] 일부 실시형태에서, 본 발명은 대상체에 대한 치료학적 유효량의 하나 이상의 요법(예를 들어, 치료 양상 및/또는 다른 치료제)와 조합된 투여를 제공한다. 일부 실시형태에서, 요법은 수술 및/또는 방사선 요법을 포함한다.

[0318] 일부 실시형태에서, 본 발명에 제공된 방법 또는 용도는 개체에게 하나 이상의 요법(예를 들어, 치료 양상 및/또는 다른 치료제)를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 단독으로 또는 요법에서 다른 치료제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 이것은 적어도 하나의 추가 치료제와 공동투여될 수 있다.

[0319] 본 발명의 긍정적인 효과는 하기와 같다:

[0320] 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체에서, 항-B7H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 링커 단위를 통해 생물학적 활성 세포독성 약물에 연결되고; 항체-약물 접합체를 종양 세포로 옮길 때, 링커는 절단되어 세포독성 약물 H-M-D를 방출한다. 예를 들어, 본 발명의 항체-약물 접합체인 DB1001-X1을 세포로 옮길 때, 소분자 화합물 P-II-3은 방출되고; 본 발명의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2를 세포로 옮길 때, 소분자 화합물 P-III-30은 방출된다. 본 발명의 세포독성 약물은 NCI-N87 세포, JIMT-1 세포, Colo205 세포 및 MDA-MB-231 세포의 증식에 대한 유의미하게 향상된 저해 활성을 갖고, 훌륭한 항종양 효과를 나타낼 수 있다.

[0321] B7H4 발현에 양성인 MDA-MB-468 세포는 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체에 대한 비교적 양호한 내포작용을 나타내고, 이것은 참조물 ADC-1에 대한 것보다 우수하다.

[0322] 본 출원의 항체-약물 접합체는 B7H4 발현에 대해 양성인 MDA-MB-468 세포, 결장직장암 세포 HT29, 인간 유방암 세포 MX-1 및 자궁내막 암종 세포 RL95-2의 증식에 대한 유의미한 저해 활성을 갖는다.

[0323] 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체는 상이한 공여자로부터 유래된 T 세포에 대한 B7H4 양성 세포의 저해를 차단할 수 있고, 참조물 ADC-1보다 우수하다.

[0324] 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체는 시험관내 인간, 래트 및 원숭이 혈장에서 양호한 안정성을 갖는다. 또한, 세포독성 약물 P-III-30의 낮은 혈장 농도 및 짧은 반감기로 인해, P-III-30은 낮은 전신 노출을 가져서 비교적 높은 안전성 수준을 제공한다.

[0325] 본 발명의 항-B7H4 항체-약물 접합체는 MDA-MB-468 종양 보유 마우스 및 다른 종양(각각 유방암 세포 MX-1, 유방암 세포 MCF-7, 자궁내막 암종 RL95-2 및 난소암 세포 OVCAR-3)을 보유하는 마우스에서 유의미한 항종양 활성을 나타낸다.

[0326] 따라서, 본 발명은 B7H4 발현에 양성인 질환(예컨대, 암)에서 우수한 응용분야 가능성을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0327] 도 1: MDA-MB-468 종양 보유 마우스에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가.

도 2: 인간, 시아노몰거스 원숭이 및 마우스 B7H4 형질주입된 HEK293T 세포에서의 항체-약물 접합체의 종 교차 반응성.

도 3: 인간 B7 패밀리 단백질을 과발현하는 세포에서의 항체-약물 접합체의 결합 특이성.

도 4: MDA-MB-468 세포에 의한 항체-약물 접합체의 내포작용 동안 상이한 시점에 생성된 형광 신호의 적분 면적.

도 5: 항체-약물 접합체에 대한 MDA-MB-468 세포의 내포작용 효율.

도 6: HT29-B7H4의 시험관내 증식에 대한 항체-약물 접합체의 저해율.

도 7: 시험관내 종양 세포 MX-1 증식(3D 세포 배양)을 저해하는 데 있어서의 항체-약물 접합체, 단일클론 항체 및 페이로드(세포독성 약물)의 효율.

도 8: 시험관내 종양 세포 RL95-2 증식(3D 세포 배양)을 저해하는 데 있어서의 항체-약물 접합체, 단일클론 항체 및 페이로드(세포독성 약물)의 효율.

도 9: 시험관내 종양 세포 JIMT-1 증식(3D 세포 배양)을 저해하는 데 있어서의 항체-약물 접합체, 단일클론 항체 및 페이로드(세포독성 약물)의 효율.

도 10: 항체-약물 접합체에 의한 PBMC 유래된 T 세포 활성화.

도 11: 항체-약물 접합체에 의한 PBMC 유래된 T 세포 활성화.

도 12: HT29-B7H4와 공동배양된 HT29-Luc 세포에 대한 항체-약물 접합체의 방관자 사멸 효과.

도 13: 인간, 원숭이 및 래트 혈장에서의 시험관내 항온처리의 21일 후 항체-약물 접합체의 페이로드(세포독성 약물) 방출율.

도 14: 종양 보유 마우스(유방암 MX-1)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가.

도 15: 종양 보유 마우스(자궁내막 암종 RL95-2)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가.

도 16: 종양 보유 마우스(난소암 OVCAR-3)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0328] **샘플 검출**

[0329] **1. ADC DAR 분석 - HIC-HPLC(소수성 상호작용 크로마토그래피)**

[0330] 고성능 액체 크로마토그래피: Waters e2965 고성능 액체 크로마토그래피 시스템.

[0331] 크로마토그래피 칼럼: MabPac™ HIC-부틸 5 μm 4.6 × 100 mm(제조사: Thermo);

[0332] 이동상 A: 1.5 M$(NH4)_2SO_4$ + 50 mM K_2HPO_4(pH 7.0);

[0333] 이동상 B: 50 mM K_2HPO_4(pH 7.0)/이소프로판올(75: 25 V/V);

[0334] 하기 용리 절차에 따라 용리를 수행하고,

[0335]

시간	이동상 B
0-2분	0%-10%
2-22분	10%-65%
22-24분	65%-100%
24-26분	100%-0%
26-30분	0%

[0336] 검출 조건: 이동상의 유속을 1 ml/분이도록 설정하고, 검출 파장은 280 nm이고, 칼럼 온도는 30℃이다.

[0337] **2. SEC 순도 분석 - SEC-HPLC(크기 배제 크로마토그래피)**

[0338] 고성능 액체 크로마토그래피: 1260 Agilent 액체 크로마토그래피.

[0339] 크로마토그래피 칼럼: Waters Xbridge BEH200 SEC(7.8 × 300 mm, 3.5 μm)

[0340] 이동상: 50 mM NaH_2PO_4 + 200 mM 아르기닌(pH 6.80) + 10% 이소프로판올

[0341]

시간	이동상
0-30분	100%

[0342] 검출 조건: 이동상의 유속을 0.5 ml/분이도록 설정하고, 검출 파장은 280 nm이고, 칼럼 온도는 30℃이다.

[0343] 본 발명은 기재된 특정한 실시형태의 모든 조합을 포함한다. 본 발명의 이용 가능성의 추가의 실시형태 및 완전한 범위는 이하에 제공된 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 본 발명의 정신 및 범위 내의 다양한 변경 및 변형이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명해질 것이므로 상세한 설명 및 특정 실시예가 본 발명의 바람직한 실시형태를 나타내면서 오직 예시의 방식으로 주어지는 것으로 이해되어야 한다. 인용문을 포함하는 본원에 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0344] **실시예**

[0345] 하기 실시예는 본 발명의 일부 바람직한 실시형태 및 양태를 나타내고 추가로 설명하도록 제공되고, 이의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0346] **실시예 1. 항-B7H4 항체**

[0347] 본 발명의 항체는 PCT/CN2021/102952를 참조하여 제조되고, 항-B7H4 항체 DB1001(PR008199)의 가변 영역 아미노산 서열은 하기와 같고, CDR 영역은 Kabat 넘버링 규칙에 따라 결정된다.

[0348] DB1001 중쇄 가변 영역:

[0349] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYYADSVKGRFIISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTVSS(서열 번호 7)

[0350] HCDR1: SFGMH(서열 번호 1)

[0351] HCDR2: VISYDASNEYYADSVKG(서열 번호 2)

[0352] HCDR3: GGALRWYFAY(서열 번호 3)

[0353] DB1001 경쇄 가변 영역:

[0354] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIK(서열 번호 8)

[0355] LCDR1: RASQSISSNLG(서열 번호 4)

[0356] LCDR2: GASTRAT(서열 번호 5)

[0357] LCDR3: QQYRSWPPLT(서열 번호 6)

[0358] 상술된 서열에 기초한 프라이머 설계 후, PCR에 의해 VH/VK 유전자 단편을 작제하여 가변 영역을 얻는다. 항체 가변 영역은 이후 DB1001의 완전한 항체 서열을 작제하기 위해 불변 영역 유전자 단편과 상동성으로 재조합된다. CHO 세포의 형질주입 후, 통상적인 발현 및 정제 방법을 통해 항체 DB1001을 얻는다.

[0359] DB1001 중쇄 아미노산 서열

[0360] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYYADSVKGRFIISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 9)

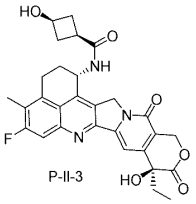
[0361] DB1001 경쇄 아미노산 서열

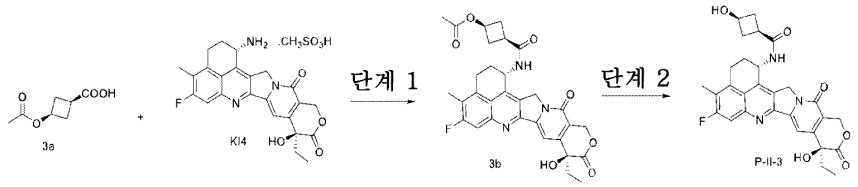
[0362] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호 10)

[0363] **실시예 2. 항-B7H4 항체-약물 접합체(ADC)의 제조**

[0364] **2.1 세포독성 약물(페이로드)의 제조**

[0365] **제조예 1**





[0366]

[0367] 단계 1:

[0368] 질소 보호 하에, 0℃에서의 DMF(18 mL) 중의 KI4(900 mg, 1.69 mmol), HATU(691 mg, 1.88 mmol) 및 3a(320 mg, 2.00 mmol)의 용액에 DIEA(500 mg, 3.87 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 원료가 완전히 반응하였다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 320 mL의 탈이온수에 적가하고, 이후 여과하여 회색의 고체(850 mg, 수율: 87%)를 얻었다.

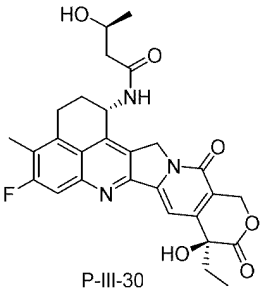
[0369] 단계 2:

[0370] MeOH/DCM(1/1, 3 mL) 중의 3b(100 mg, 0.174 mmol)에 NaHCO3(고체, 42 mg, 0.50 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 여과하고, 이후 저온에서 스핀 건조시켰다. 잔류물을 수성 HCl(0.5 M, 10 mL)로 슬러리화하고, 여과하고, 분취용-HPLC(0.1% TFA)로 처리하고 동결건조하여 회색의 고체(15 mg, 수율: 16%)를 얻었다.

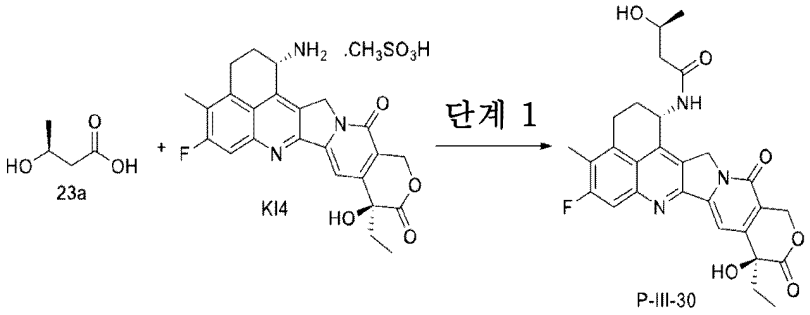
[0371] MS m/z (ESI): 534 [M+1];

[0372] H-NMR (400 MHz, DMSO-D): 8.45(d, 1H), 7.81 (d, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (m, 1H), 5.58-5.56 (m, 1 H), 5.44 (s, 2H), 5.14 (dd, 2 H), 3.96 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.19 (m, 2H), 2.53-2.28 (m, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.20-2.00(m, 4H), 1.95-1.80 (m, 2H), 0.89 (t, 3H).

[0373] **제조예 2**



P-III-30



P-III-30

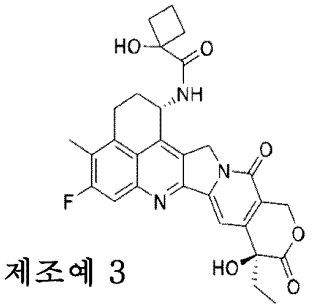
[0374]

[0375] 단계 1

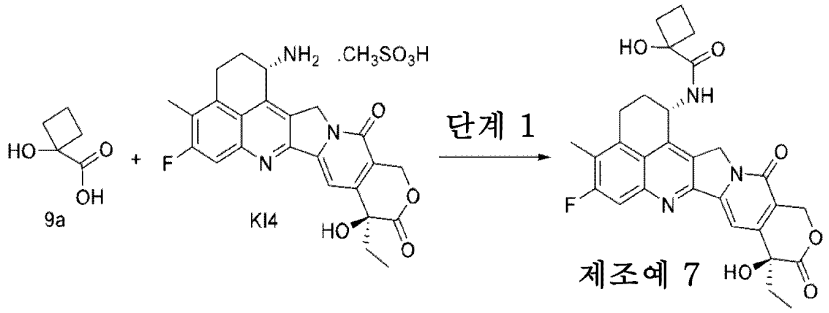
[0376] 질소 보호 하에, DIEA(60.6 mg, 0.47 mmol)를 DMF(2 mL) 중의 KI4(100 mg, 0.19 mmol), HATU(85.7 mg, 0.23 mmol) 및 23a(21.5 mg, 0.21 mmol)의 용액에 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 원료가 완전히 반응하였다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 20 mL의 물에 적가하고, 혼합물을 교반하여 고체를 침전시키고, 이것을 여과하여 회색의 고체 P-III-30(60.2 mg, 수율: 61%)을 얻었다. MS-ESI: m/z 522.2 [M+H]+.

[0377] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.42 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.62 - 5.53 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.30 - 5.16 (m, 2H), 4.63 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.09 - 3.99 (m, 1H), 3.22 - 3.11 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.28 (dd, J = 13.7, 7.2 Hz, 1H), 2.22 - 2.08 (m, 3H), 1.94 - 1.78 (m, 2H), 1.08 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0378] **제조예 3**



제조예 3



[0379]

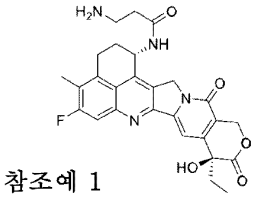
[0380] 단계 1

[0381] KI4(50 mg, 0.094 mmol), 25a(11 mg, 0.094 mmol) 및 HATU(39 mg, 0.103 mmol)를 취하고, DMF(3 mL)에 첨가하였다. 질소 대체 후, DIEA(30 mg, 0.235 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 25 ℃에서 1.5시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 교반(50 mL) 하에 물에 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 5분 동안 정치시키고, 이후 여과하였다. 필터 케이크를 동결건조하여 회색의 고체 25(20 mg, 수율: 40%)를 얻었다.

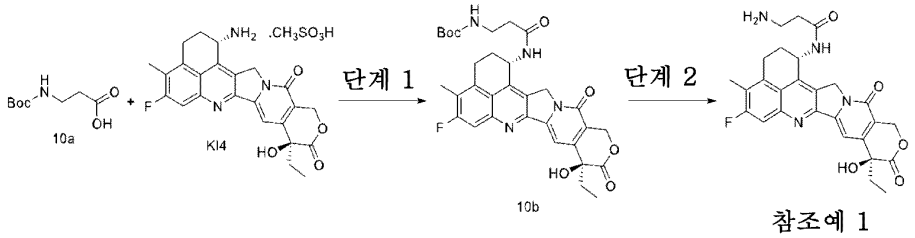
[0382] MS-ESI: m/z 534.3 [M+H]+;

[0383] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.26 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.59 - 5.50 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.15 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 3.28 - 3.16 (m, 1H), 3.15 - 3.02 (m, 1H), 2.74 - 2.52 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.24 - 2.04 (m, 4H), 1.92 - 1.79 (m, 4H), 0.86 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0384] **참조예 1**



참조예 1



[0385]

[0386] 단계 1

[0387] KI4(50 mg, 0.094 mmol), 26a(18 mg, 0.094 mmol) 및 HATU(39 mg, 0.103 mmol)를 취하고, DMF(3 mL)에 첨가하였다. 질소 대체 후, DIEA(48 mg, 0.376 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 25 ℃에서 1.5시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 교반(50 mL) 하에 물에 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 5분 동안 정치시키고, 이후 여과하였다. 필터 케이크를 동결건조하여 회색의 고체 26b(30 mg, 수율: 52%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 607.4 [M+H]+.

[0388] 단계 2

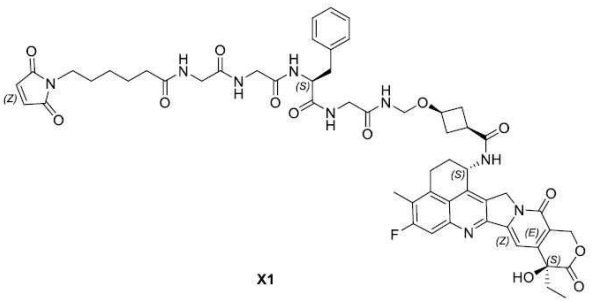
[0389] 26b(30 mg, 0.049 mmol)를 취하고, DCM(2 mL)에 용해시켰다. N2 대체 후, 혼합물을 0℃로 냉각시키고, TFA(0.5 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 1.5시간 동안 반응시킨 후, LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 저온에서 스핀 건조시키고, DCM으로 1회 추출하였다. 이후 동결건조를 위해 아세토니트릴 및 물을 첨가하여 황색의 고체(20 mg, 수율: 80%)를 얻었다.

[0390] MS-ESI: m/z 507.1 [M+H]+;

[0391] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.67 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.86 - 7.66 (m, 4H), 7.32 (s, 1H), 6.56 (brs, 1H), 5.63 - 5.54 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.29 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 3.23 - 3.15 (m, 2H), 3.13 - 3.03 (m, 2H), 2.57 - 2.51 (m, 2H), 2.43 - 2.38 (m, 3H), 2.27 - 2.08 (m, 2H), 1.94 - 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

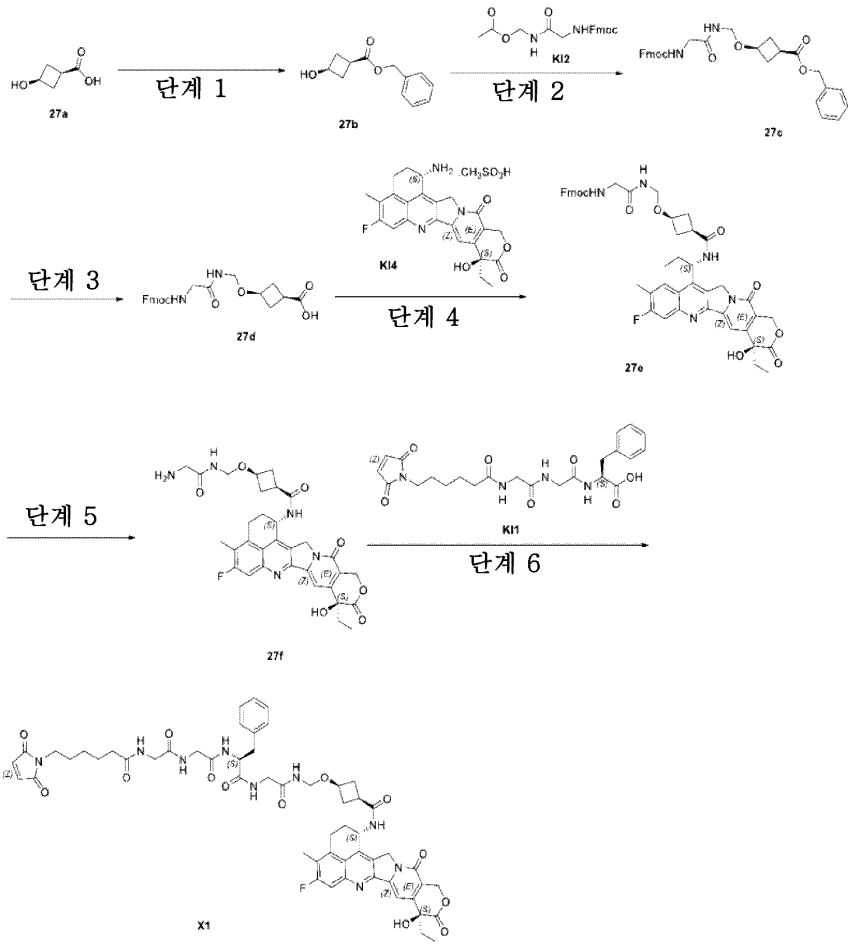
[0392] **2.2 링커-세포독소(링커-페이로드)의 제조**

[0393] **링커-세포독소 X1**



X1

[0394]



[0395]

[0396] 단계 1

[0397] 질소 보호 하에, DMF(50 mL) 중의 27a(5.00 g, 43.0 mmol) 및 NaHCO3(10.9 g, 129 mmol)의 용액에 벤질 브로마이드(11.0 g, 64.6 mmol)를 적가하고, 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(500 mL)에 첨가하고, 생성된 혼합물을 EA(250 mL)로 2회 추출하였다. 액체 분리 후, 유기 상을 포화 염화나트륨 수성 용액(500 mL)으로 세척하고, 무수 Na2SO4 위에서 건조시키고 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(PE: EA = 3: 2)에 의해 정제하여 무색의 액체(5.1 g, 수율: 57.1%)를 얻었다.

[0398] 단계 2

[0399] 질소 보호 하에, THF(10 mL) 중의 27b(4.50 g, 21.8 mmol)의 용액을 0℃에서의 THF(30 mL) 중의 KI2(4.00 g, 10.9 mmol) 및 TsOH(800 mg, 4.65 mmol)의 용액에 적가하고, 생성된 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 1/2)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(200 mL)에 첨가하고, 생성된 혼합물을 EA(200 mL)로 2회 추출하였다. 액체 분리 후, 유기 상을 무수 Na2SO4 위에서 건조시키고 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=3/2)에 의해 정제하여 백색의 고체(1.56 g, 수율: 26%)를 얻었다.

[0400] 단계 3

[0401] 수소 분위기 하에, Pd/C(80 mg)를 0℃에서의 EtOH(8 mL) 및 EA(8 mL) 중의 27c(800 mg, 1.55 mmol)의 혼합 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2.5시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 셀라이트 위로 여과하고, 필터 케이크를 EA(200 mL)로 세척하였다. 농축 후, 잔류물을 THF(20 mL)로 용해시키고 스핀 건조시켜 백색의 고체(600 mg, 수율: 91%)를 얻었다.

[0402] 단계 4

[0403] 질소 보호 하에, DIEA(152 mg, 1.18 mmol)를 0℃에서의 DMF(6 mL) 중의 27d(220 mg, 0.515 mmol), HY-

13631A(250 mg, 0.47 mmol) 및 HATU(214 mg, 0.56 mmol)의 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 시트르산 수성 용액(pH = 4)(150 mL)에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 물(175 mL)로 세척하고, 여과 건조시키고, 이후 오일 펌프에 의해 건조시켜 갈색의 고체(260 mg, 수율: 66%)를 얻었다.

[0404] 단계 5

[0405] 질소 보호 하에, 디에틸아민(8 mL)을 0℃에서의 DCM(30 mL) 중의 27e(260 mg, 0.309 mmol)의 용액에 적가하고, 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 0℃에서의 석유 에테르 용액(600 mL)에 첨가하고, 고체를 침전시키고 정치되게 하였다. 고체가 플라스크의 바닥에 흡착될 때, 용액을 붓고, 고체를 오일 펌프에 의해 건조시켜 갈색의 고체(90 mg, 수율: 47.1%)를 얻었다.

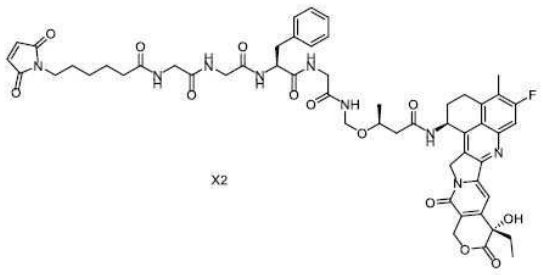
[0406] 단계 6

[0407] 질소 보호 하에, HATU(74 mg, 0.19 mmol)를 0℃에서의 DMF(2.5 mL) 중의 27f(90 mg, 0.13 mmol), KI-1(92 mg, 0.19 mmol) 및 DIEA(50 mg, 0.39 mmol)의 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 실질적으로 완료되었다는 것을 보여주었다. 0℃에서, 반응 액체를 시트르산 수성 용액(PH=4, 30 mL)에 첨가하고, 면상 고체를 침전시키고, 여과하고, 분취용 플레이트(DCM/MecOH=10/1)에 의해 정제하여 담황색의 고체 X1(9.2 mg, 수율: 6%)을 얻었다.

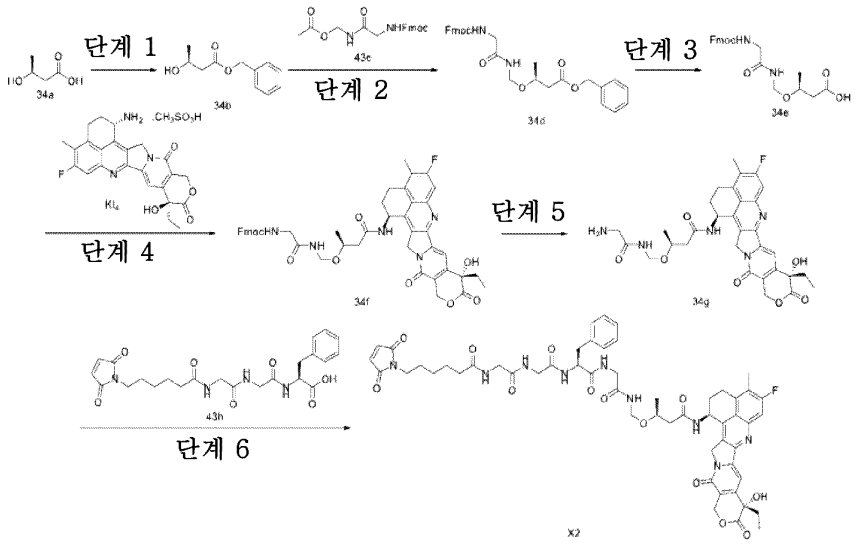
[0408] MS m/z (ESI): 1074 [M+1]

[0409] H-NMR (400 MHz, MeOD): 7.65 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.30-7.21(m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.69-5.65 (m, 1 H), 5.57 (d, 1H), 5.43-5.10 (m, 3H), 4.70 (d, 2H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.01-3.75 (m, 5H),3.46 (t, 2H), 3.22-3.15 (m, 2H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37-2.20 (m, 6H), 2.10-2.02 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 2H) 1.68-1.57 (m, 6H), 1.01 (t, 3H)

[0410] **링커-세포독소 X2**



[0411]



[0412]

[0413] 단계 1

[0414] 34a(5 g, 48.0 mmol) 및 K2CO3(19.9 g, 144.0 mmol)을 DMF(20 mL)에 용해시키고, 벤질 브로마이드(12.3 g, 72.0 mmol)를 이후 적가하고, 생성된 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 3/1)에 의해 모니터링된 원료의 완전한 반응 시, 반응 액체를 물(200 mL)에 첨가하고, 혼합물을 EA(250 mL)로 추출하였다. 액체 분리 후, 유기 상을 포화 NaCl로 세척하고, 무수 Na2SO4 위에서 건조시키고 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(PE:EA = 2:1)에 의해 정제하여 무색의 액체 34b(8.7 g, 수율: 93%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 195.1 [M+H]+.

[0415] 단계 2

[0416] 34c(7.3 g, 19.8 mmol) 및 TsOH(1.46 g, 8.5 mmol)를 취하고, THF(20 mL)에 용해시켰다. 질소 보호 하에, 혼합물을 0℃로 냉각시키고, THF(10 mL) 중의 43b(7.7 g, 39.6 mmol)의 용액을 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)는 대부분의 원료가 반응하였다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(100 mL)에 붓고, 생성된 혼합물을 DCM(100 mL)으로 추출하였다. 액체 분리 후, 유기 상을 포화 NaCl로 세척하고, 무수 Na2SO4 위에서 건조시키고, 칼럼 크로마토그래피(PE/EA = 1/1)에 의해 정제하여 무색의 점성의 물질 34d(3.9 g, 수율: 39%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 503.3 [M+H]+.

[0417] 단계 3

[0418] 수소 분위기 하에, Pd/C(1 g, 10 wt.%)를 0℃에서의 EtOH(100 mL) 및 EA(100 mL) 중의 34d(1.9 g, 3.78 mmol)의 혼합 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 반응시켰다. TLC(PE/EA = 2/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 셀라이트 위로 여과하고, 필터 케이크를 EA/EtOH(1:1, 100 mL×3)로 세척하였다. 여과액을 농축시키고, 잔류물을 THF(50 mL×3)로 용해시키고, 스핀 건조시켰다. 단계를 3회 반복하여 회색의 고체 34e(1 g, 수율: 64%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 435.2 [M+Na]+.

[0419] 단계 4

[0420] 질소 보호 하에, DIEA(303 mg, 2.35 mmol)를 0℃에서의 DMF(20 mL) 중의 34e(426 mg, 1.03 mmol), KI4(500 mg, 0.94 mmol) 및 HATU(429 mg, 1.13 mmol)의 용액에 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(300 mL)에 적가하고 교반하였다. 혼합물을 이후 5분 동안 정치되게 하고 여과하였다. 필터 케이크를 DCM/MeOH(10:1, 100 mL)의 용액으로 용해한 후, 혼합물을 스핀 건조시키고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(EA:MeOH = 30:1)에 대해 교반하여 황색의 고체 34f(600 mg, 수율: 77%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 830.3 [M+H]+.

[0421] 단계 5

[0422] 질소 보호 하에, 디에틸아민(5 mL)을 0℃에서의 DCM(5 mL) 중의 34f(150 mg, 0.18 mmol)의 용액에 적가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 석유 에테르 용액(100 mL×6)을 반응 액체에 첨가하고, 고체를 침전시키고 정치되게 하였다. 침전 후, 용액을 붓고, 고체를 오일 펌프에 의해 건조시켜 백색의 분말 34g(120 mg, LCMS는 생성물 함량이 70%라는 것을 보여주었음, 수율: 76%)을 얻었다. MS-ESI: m/z 608.3 [M+H]+.

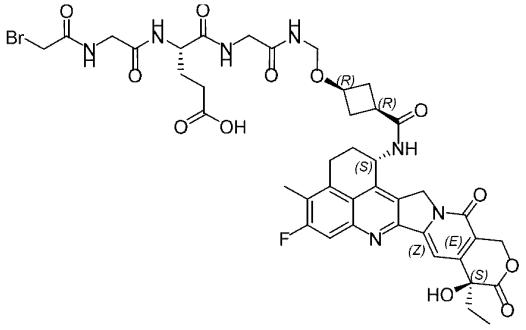
[0423] 단계 6

[0424] 질소 보호 하에, DMF(1 mL) 중의 HATU(45 mg, 0.118 mmol)의 용액을 0℃에서의 DMF(1 mL) 중의 34g(60 mg, 0.099 mmol), 43h(51 mg, 0.108 mmol) 및 DIEA(32 mg, 0.25 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 반응시켰다. LCMS는 원료가 완전히 반응하였다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 역상 칼럼 크로마토그래피(용리제: (MeCN/MeOH = 1/1): H2O = 60%: 40%)에 의해 바로 정제하여 황색의 고체 X2(14.8 mg, 수율: 14%)를 얻었다.

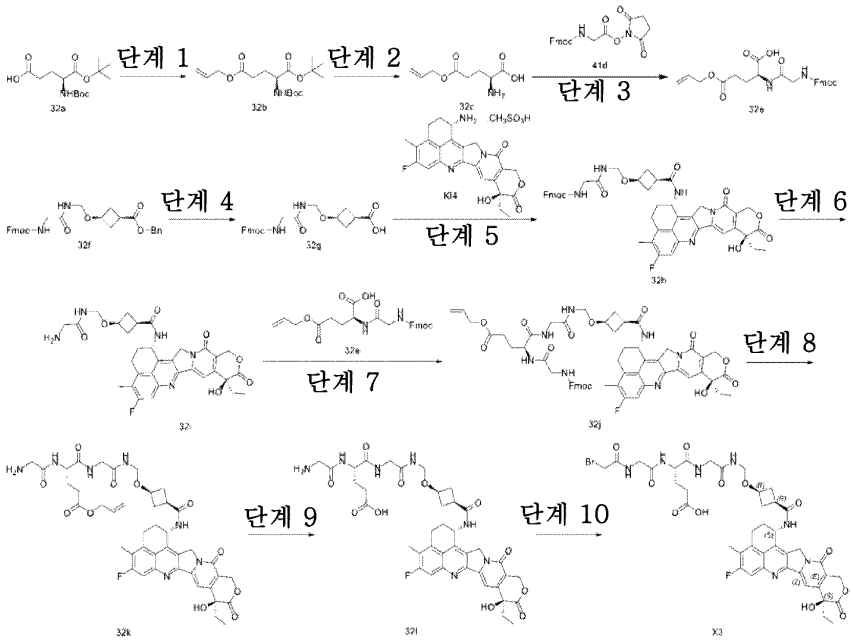
[0425] MS-ESI: m/z 1062.4 [M+H]+.

[0426] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 7.69 - 7.61 (m, 2H), 7.22 - 7.16 (m, 2H), 7.16 - 7.09 (m, 3H), 6.76 (s, 2H), 5.70 - 5.64 (m, 1H), 5.60 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.40 - 5.31 (m, 2H), 5.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.65 - 4.50 (m, 7H), 4.25 - 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.83 - 3.76 (m, 3H), 3.72 (d, J = 17.0 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.25 - 3.17 (m, 2H), 3.10 - 3.02 (m, 1H), 2.92 - 2.83 (m, 1H), 2.45 - 2.39 (m, 5H), 2.32 - 2.20 (m, 5H), 1.97 - 1.89 (m, 2H), 1.63 - 1.50 (m, 4H), 1.34 - 1.20 (m, 6H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0427] **링커-세포독소 X3**



X3



[0428]

[0429] 단계 1

[0430] MeCN(20 mL) 중의 32a(2.00 g, 6.6 mmol) 및 K2CO3(1.82 g, 13.2 mmol)에 브로모프로펜(960 mg, 7.92 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 20℃에서 5시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/2)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(100 mL)에 부었다. 혼합물을 pH 5로 조정하고, EA(100 mL)로 3회 추출하고, 무수 황산나트륨 위에서 건조시키고, 스핀 건조시키고, 칼럼 크로마토그래피(PE/EA = 2/1)에 의해 정제하여 백색의 고체 32b(1.83 g, 수율: 81%)를 얻었다.

[0431] 단계 2

[0432] DCM(10 mL) 중의 32b(1.38 g, 4.02 mmol)에 TFA(10 mL)를 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/3)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 스핀 건조시켜 황색의 점성의 물질 32c(0.91 g, 수율: 계산되지 않음)을 얻었다.

[0433] 단계 3

[0434] DME/H2O(20 mL/10 mL) 중의 32c(910 mg, 4.87 mmol) 및 NaHCO3(613 mg, 7.3 mmol)에 41d(1.92 g, 4.87 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 1/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(100 mL)에 붓고, 혼합물을 수성 HCl(1 N)로 pH 5로 조정하고, EA(150 mL)로 2회 추출하고, 무수 황산나트륨 위에서 건조시키고, 스핀 건조시키고, 칼럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 20/1)에 의해 정제하여 백색의 고체 32e(1.53 g, 수율: 67%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 467.4 [M+H]+.

[0435] 단계 4

[0436] MeOH(50 mL) 중의 32f(3 g, 5.83 mmol)에 Pd/C(600 mg)를 첨가하고, 혼합물을 수소 벌룬 하에 25℃에서 5시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 여과하고 스핀 건조시켜 백색의 고체 32 g(1.9 g, 수율: 77%)를 얻었다.

[0437] 단계 5

[0438] DMF(10 mL) 중의 32g(789 mg, 1.86 mmol), KI4(900 mg, 1.69 mmol) 및 트리에틸아민(342 mg, 3.38 mmol)에 HATU(707 mg, 1.86 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 3.5시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 H2O(80 mL)에 붓고, EA(100 mL)로 2회 추출하고, 무수 황산나트륨 위에서 건조시키고, 스핀 건조시키고, 칼럼 크로마토그래피(EA)에 의해 정제하여 백색의 고체 32h(1.186 g, 수율: 83%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 842.3 [M+H]+.

[0439] 단계 6

[0440] DCM/디에틸아민(20 mL, 20/1) 중의32h(1.186 g, 1.41 mmol)를 25℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 10/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 석유 에테르(200 mL)에 붓고 여과하여 백색의 고체 32i(768 mg, 수율: 88%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 620.3 [M+H]+.

[0441] 단계 7

[0442] DMF(10 mL) 중의 32i(676 mg, 1.09 mmol), 32e(508 mg, 1.09 mmol) 및 DIEA(423 mg, 3.27 mmol)에 HATU(414 mg, 1.09 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 20℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/5)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(30 mL)에 붓고, 여과하고, 필터 케이크를 칼럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 50/1)에 의해 정제하여 백색의 고체 32j(511 mg, 수율: 44%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 1068.3 [M+H]+.

[0443] 단계 8

[0444] 디에틸아민/DCM(10 mL, 1/5) 중의 32j(482 mg, 0.451 mmol)의 용액을 10℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 PE(300 mL)에 붓고 여과하여 백색의 고체 32k(301 mg, 수율: 계산되지 않음)를 얻었다.

[0445] 단계 9

[0446] THF(5 mL) 중의 32k(301 mg, 0.356 mmol) 및 Pd(PPh3)4(82 mg, 0.071 mmol)에 모르폴린(93 mg, 1.07 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 제조 방법으로 처리하여 백색의 고체 32l(108 mg, 수율: 38%)을 얻었다. MS-ESI: m/z 806.3 [M+H]+.

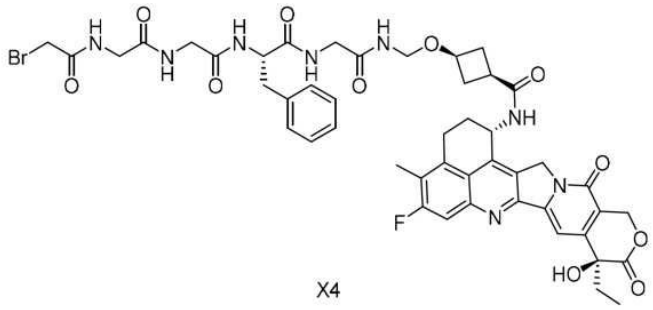
[0447] 단계 10

[0448] THF(2 mL) 및 DMF(2 mL) 중의 32l(108 mg, 0.134 mmol) 및 트리에틸아민(41 mg, 0.402 mmol)에 브로모아세틸 브로마이드(27 mg, 0.134 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 10/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 제조 방법으로 바로 처리하여 백색의 고체 X3(15 mg, 수율: 12%)을 얻었다.

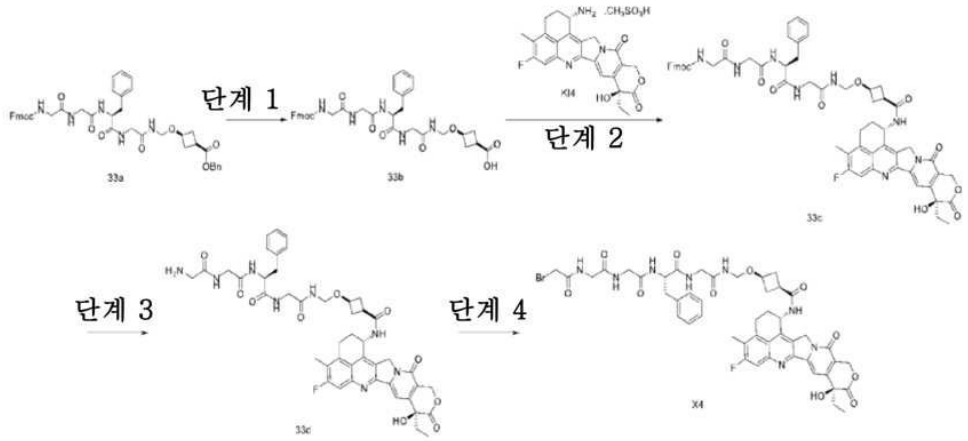
[0449] MS-ESI: m/z 926.3 [M+H]+.

[0450] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.11 (s, 1H), 8.54 - 8.42 (m, 3H), 8.27 - 8.16 (m, 2H), 7.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61 - 5.51 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 - 5.05 (m, 2H), 4.56 - 4.42 (m, 2H), 4.32 - 4.22 (m, 1H), 3.96 - 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.25 - 3.08 (m, 2H), 2.61 - 2.53 (m, 2H), 2.45 - 2.36 (m, 4H), 2.36 - 2.22 (m, 3H), 2.20 - 2.03 (m, 4H), 1.99 - 1.68 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0451] **링커-세포독소 X4**



X4



[0452]

[0453] 단계 1

[0454] MeOH(20 mL) 중의 33a(2.00 g, 2.58 mmol)에 Pd/C(400 mg, 10 wt.%)를 첨가하고, 혼합물을 20℃에서 5시간 동안 교반하였다. TLC(EA)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 여과하고 스핀 건조시켜 백색의 고체 33b(1.3 g, 수율: 74%)를 얻었다.

[0455] 단계 2

[0456] DMF(5 mL) 중의 33b(0.55 g, 0.802 mmol), KI4(427 mg, 0.802 mmol) 및 DIPEA(310 mg, 2.40 mmol)에 HATU(305 mg, 0.802 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 1/10)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 물(40 mL)에 붓고 여과하여 미정제물을 얻고, 이것을 칼럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 20/1)에 의해 정제하여 황색의 고체 33c(360 mg, 수율: 41%)를 얻었다.

[0457] 단계 3

[0458] DCM(10 mL) 중의 33c(360 mg, 0.326 mmol)에 디에틸아민(2 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 17시간 동안 교반하였다. TLC(DCM/MeOH = 5/1)는 반응이 완료되었다는 것을 보여주었다. 반응 액체를 PE(100 mL)에 붓고 여과하여 백색의 고체 33d(205 mg, 수율: 71%)를 얻었다. MS-ESI: m/z 881.3 [M+H]+.

[0459] 단계 4

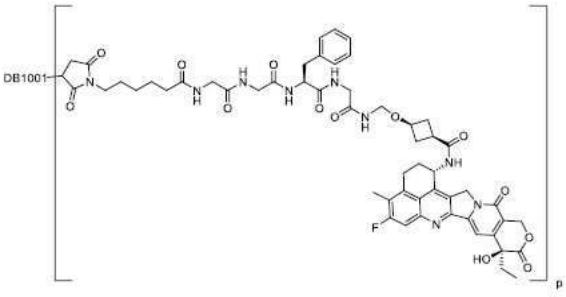
[0460] DMF(1 mL) 및 물(1 mL) 중의 33d(205 mg, 0.233 mmol) 및 트리에틸아민(118 mg, 1.17 mmol)에 THF(2 mL) 중의 브로모아세틸 브로마이드(94 mg, 0.446 mmol)의 용액을 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 액체를 제조 방법으로 바로 처리하여 백색의 고체 X4(15 mg, 수율: 6%)를 얻었다.

[0461] MS-ESI: m/z 1001.2 [M+H]+.

[0462] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.57 - 8.50 (m, 1H), 8.50 - 8.43 (m, 2H), 8.35 - 8.29 (m, 1H), 8.19 - 8.12 (m, 2H), 7.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.27 - 7.14 (m, 7H), 6.53 (s, 1H), 5.59 - 5.51 (m, 1H), 5.44 - 5.39 (m, 2H), 5.20 - 5.07 (m, 2H), 4.56 - 4.44 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.80 - 3.68 (m, 5H), 3.41 (s, 1H), 3.21 - 3.12 (m, 2H), 2.83 - 2.74 (m, 1H), 2.58 - 2.55 (m, 3H), 2.39 (s, 4H), 2.18 - 2.03 (m, 4H), 1.93 - 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[0463] 2.3. 항-B7H4 항체-약물 접합체의 제조

[0464] **항체-약물 접합체(ADC) DB1001-X1의 제조**



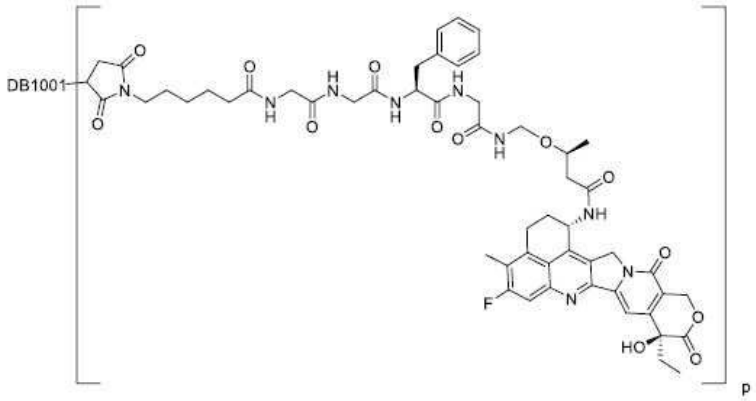
[0465]

[0466] 초순수에 의해 별개로 환원제 2 mg/ml의 수성 TCEP 용액(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 보호제 100 mmol/L의 수성 EDTA 용액(이나트륨 에틸렌디아민 테트라아세트산, 제조사: Sigma)을 제제화하였다.

[0467] 160 mg의 17.99 mg/ml의 DB1001(PR08199) 단일클론 항체를 취하고, 600 ml의 원심분리 병에 위치시켰다. 30 mM His-HAc, pH 5.5 완충액을 첨가하여 10 mg/ml의 농도로 항체를 희석하고, 반응 액체의 총 부피의 5%를 차지하는 100 mM 수성 EDTA 용액을 첨가하였다. 혼합물을 진탕시키고 균일하게 혼합한 후, 항체 환원에 대해 2.3:1의 TCEP 대 항체의 몰 비로 2 mg/ml의 수성 TCEP 용액을 이후 첨가하였다. 이후, 생성된 혼합물을 진탕시키고, 균일하게 혼합하고, 냉동 온도조절믹서에서 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 상술된 링커-페이로드 DMA 용액을 12:1의 약물의 최종 농도 대 항체의 최종 농도의 몰 비에 따라 첨가하고, 반응 용액의 총 부피의 10%를 차지하는 DMA를 첨가하고, 생성된 혼합물을 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 이후 냉동 온도조절믹서에서 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플 보존 완충액의 대체에 한외여과 관(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)을 사용하였다. 한외여과를 10% DMSO를 함유하는 30 mM His-HAc, pH 5.5 완충액으로 3회 수행하고, 이후 30 mM DMSO 비함유 His-HAc, pH 5.5 완충액으로 6회 수행하여 125.6 mg의 항체-약물 접합체인 DB1001-X1(농도: 12.854 mg/mL, 수율: 78.5%)을 얻었다.

[0468] 항체-약물 접합체인 DB1001-X1은 HIC에 의해 검출된 것과 같이 3.89의 약물-대-항체 비율(DAR) 및 100%의 SEC 순도를 가졌다.

[0469] **항체-약물 접합체(ADC) DB1001-X2의 제조**



[0470]

[0471] 초순수에 의해 별개로 환원제 2 mg/ml의 수성 TCEP 용액(트리스-2-카복시에틸-포스핀, 제조사: Thermo) 및 보호제 100 mmol/L의 수성 EDTA 용액(이나트륨 에틸렌디아민 테트라아세트산, 제조사: Sigma)을 제제화하였다.

[0472] 링커-페이로드 X2를 건조 DMA(N,N-디메틸아세타미드, 제조사: Sinopharm)에 용해시켜 10 mg/mL의 링커-페이로드 DMA 용액을 제제화하였다.

[0473] 160 mg의 17.99 mg/ml의 DB1001(PR08199) 단일클론 항체를 취하고, 600 ml의 원심분리 병에 위치시켰다. 30 mM His-HAc, pH 5.5 완충액을 첨가하여 10 mg/ml의 농도로 항체를 희석하고, 반응 액체의 총 부피의 5%를 차지하는 100 mM 수성 EDTA 용액을 첨가하였다. 혼합물을 진탕시키고 균일하게 혼합한 후, 항체 환원에 대해 2.3:1의 TCEP 대 항체의 몰 비로 2 mg/ml의 수성 TCEP 용액을 이후 첨가하였다. 이후, 생성된 혼합물을 진탕시키고, 균

일하게 혼합하고, 냉동 온도조절믹서에서 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 상술된 링커-페이로드 DMA 용액을 12:1의 약물의 최종 농도 대 항체의 최종 농도의 몰 비에 따라 첨가하고, 반응 용액의 총 부피의 10%를 차지하는 DMA를 첨가하고, 생성된 혼합물을 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 이후 냉동 온도조절믹서에서 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 샘플 보존 완충액의 대체에 한외여과 관(MWCO 30 KD, 제조사: Millipore)을 사용하였다. 한외여과를 10% DMSO를 함유하는 30 mM His-HAc, pH 5.5 완충액으로 3회 수행하고, 이후 30 mM DMSO 비함유 His-HAc, pH 5.5 완충액으로 6회 수행하여 128.3 mg의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2(농도: 10.522 mg/mL, 수율: 80.18%)를 얻었다.

[0474] 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 HIC에 의해 검출된 것과 같이 5.4의 약물-대-항체 비율(DAR) 및 98.1%의 SEC 순도를 가졌다.

[0475] **참조물 ADC-1의 제조**

[0476] 참조물 ADC-1을 WO 2020244657 A1에서 화합물 34(hu2F7-엑사테칸)를 참조하여 제조하였다.

[0477] **실시예 3. 소분자 화합물(세포독성 약물)의 시험관내 증식 저해 시험**

[0478] **3.1. 종양 세포에 대한 소분자 화합물(세포독성 약물)의 시험관내 증식 저해 시험**

[0479] 시험 목적

[0480] 시험관내 NCI-N87, JIMT-1 및 MBA-MB-231 종양 세포의 증식에 대한 약물 화합물의 저해 활성을 검출하기 위함. 시험관내 상이한 화합물 농도에 의해 세포를 처리하고, 배양의 6일 후, CTG(CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, 카탈로그 G7558호) 시약을 사용하여 세포 증식을 검출하고, IC_{50} 값에 따라 화합물의 시험관내 활성을 평가하였다.

[0481] 1. 세포 배양: NCI-N87/JIMT-1/MBA-MB-231 세포를 10% FBS RPMI-1640 배지와 배양하였다.

[0482] 2. 세포의 제조: 대수 생장기에서의 NCI-N87/JIMT-1/MBA-MB-231 세포를 취하고, PBS로 1회 세척하고, 이후 소화를 위해 2분 내지 3분 동안 2 내지 3 ml의 트립신을 첨가하였다. 세포를 완전히 소화시킨 후, 10 내지 15 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 소화된 세포를 용리시키고, 세포를 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고, 이후 10 내지 20 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하였다.

[0483] 3. 세포 플레이팅: NCI-N87/JIMT-1/MBA-MB-231 단세포 현탁액을 균일하게 혼합하고, 각각 세포 배양 배지에 의해 $6x10^4$개의 세포/ml의 생 세포 밀도로 조정하고, 밀도 조정된 세포 현탁액을 균일하게 혼합하고, 96웰 세포 배양 플레이트에 50 ul/웰로 첨가하였다. 항온처리기에서 18시간 동안 배양 플레이트를 배양하였다(37℃, 5% CO_2).

[0484] 4. 화합물의 제조: 10 mM의 초기 농도를 갖는 스톡 용액을 제제화하도록 화합물을 DMSO에 용해시켰다.

[0485] 각각 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 및 0.1 nM의 소분자 화합물의 총 8 농도가 관여되었다.

[0486] 5. 샘플 로딩 조작: 각각의 샘플에 대해 2회 반복 웰로, 시험되는 제제화된 샘플의 상이한 농도를 배양 플레이트에 첨가하였다. 항온처리기에서 6일 동안 배양 플레이트를 항온처리하였다(37℃, 5% CO_2).

[0487] 6. 색상 전개 조작: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 50 ul의 CTG 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 10분 동안 항온처리하였다.

[0488] 7. 플레이트 판독 조작: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 마이크로플레이트 판독기에 위치시키고, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 화학발광을 결정하였다.

[0489] 데이터 분석: 데이터를 가공하고, Microsoft Excel 및 Graphpad Prism 5를 사용하여 분석하였다.

표 1

시험관내 종양 세포 증식의 저해에 대한 본 출원의 소분자 화합물의 IC_{50} 값

화합물 번호	NCI-N87	JIMT-1	MDA-MB-231
	IC_{50}(nM)	IC_{50}(nM)	IC_{50}(nM)
제조예 3	-	23.1	-
P-II-3	9.558	5.0	9.4

[0490]

[0491] 결론: 표 1에서의 결과에 따르면, 본 출원의 약물 접합체의 독소는 NCI-N87 세포, JIMT-1 세포 및 MDA-MB-231 세포의 증식에 대한 유의미하게 향상된 저해 활성을 갖는다.

[0492] **3.2. 종양 세포에 대한 소분자 화합물(세포독성 약물)의 시험관내 증식 저해 시험**

[0493] 시험 목적

[0494] 시험관내 NCI-N87 및 Colo205 종양 세포의 증식에 대한 약물 화합물의 저해 활성을 검출하기 위함. 시험관내 상이한 화합물 농도에 의해 세포를 처리하고, 배양의 6일 후, CTG(CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, 카탈로그 G7558호) 시약을 사용하여 세포 증식을 검출하고, IC_{50} 값에 따라 화합물의 시험관내 활성을 평가하였다.

[0495] 1. 세포 배양: NCI-N87/Colo205 세포를 10% FBS RPMI-1640 배지와 배양하였다.

[0496] 2. 세포의 제조: 대수 생장기에서의 NCI-N87/Colo205 세포를 취하고, PBS로 1회 세척하고, 이후 소화를 위해 2분 내지 3분 동안 2 내지 3 ml의 트립신을 첨가하였다. 세포를 완전히 소화시킨 후, 10 내지 15 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 소화된 세포를 용리시키고, 세포를 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고, 이후 10 내지 20 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하였다.

[0497] 3. 세포 플레이팅: NCI-N87/Colo205 단세포 현탁액을 균일하게 혼합하고, 각각 세포 배양 배지에 의해 $6x10^4$개의 세포/ml의 생 세포 밀도로 조정하고, 밀도 조정된 세포 현탁액을 균일하게 혼합하고, 96웰 세포 배양 플레이트에 50 ul/웰로 첨가하였다. 항온처리기에서 18시간 동안 배양 플레이트를 배양하였다(37℃, 5% CO_2).

[0498] 4. 화합물의 제조: 10 mM의 초기 농도를 갖는 스톡 용액을 제제화하도록 화합물을 DMSO에 용해시켰다.

[0499] 각각 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 및 0.1 nM의 소분자 화합물의 총 8 농도가 관여되었다.

[0500] 5. 샘플 로딩 조작: 각각의 샘플에 대해 2회 반복 웰로, 시험되는 제제화된 샘플의 상이한 농도를 배양 플레이트에 첨가하였다. 항온처리기에서 6일 동안 배양 플레이트를 항온처리하였다(37℃, 5% CO_2).

[0501] 6. 색상 전개 조작: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 50 ul의 CTG 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 10분 동안 항온처리하였다.

[0502] 7. 플레이트 판독 조작: 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 마이크로플레이트 판독기에 위치시키고, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 화학발광을 결정하였다.

[0503] 데이터 분석: 데이터를 가공하고, Microsoft Excel 및 Graphpad Prism 5를 사용하여 분석하였다.

표 2

시험관내 NCI-N87 및 Colo205 세포 증식의 저해에 대한 본 출원의 소분자 화합물의 IC_{50} 값

화합물 번호	Abs-IC_{50}(nM)	
	P-III-30	참조예 1
Colo205	102.9	>1000
NCI-N87	6.5	>300

[0504]

[0505] 결론: 표 2에서의 결과에 따르면, 본 출원의 약물 접합체의 독소는 NCI-N87 및 Colo205 세포의 증식에 대한 유의미한 저해 활성을 갖고, 참조예 1보다 유의미하게 우수하다.

[0506] **실시예 4. 항체-약물 접합체에 대한 내포작용 활성**

[0507] 시험 목적

[0508] B7H4 발현 MDA-MB-468 세포에 의한 본 출원의 항-B7H4 항체-약물 접합체의 내포작용을 검출하기 위함. 세포를 고정된 농도의 항체-약물 접합체(ADC) 및 내포작용 표시자 pHrodo와 공동항온처리하고, pHrodo에 의해 상이한 시점에 생성된 형광 신호를 관찰하여서 항체-약물 접합체의 내재화 능력을 평가하고, 이는 항체-약물 접합체와 세포에 들어갔다.

[0509] 실험 방법

[0510] 1. 세포 배양: MDA-MB-468 세포를 10% FB 레보비츠의 L-15 배지와 배양하였다.

[0511] 2. 세포의 제조: 대수 생장기에서의 MDA-MB-468 세포를 취하고, PBS로 1회 세척하고, 이후 2분 내지 3분 동안 소화시켰다. 세포를 완전히 소화시킨 후, 10 내지 15 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 소화된 세포를 용리시키고, 세포를 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 세포 배양 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하고, 단세포 현탁액을 $3x10^5$개의 세포/ml의 생 세포 밀도로 조정하였다.

[0512] 3. 세포 플레이팅: 50 μL/웰로 96웰 세포 배양 플레이트에 단세포 현탁액을 첨가하였다. 항온처리기에서 48시간 동안 배양 플레이트를 배양하였다(37℃, 5% CO_2).

[0513] 4. 샘플 로딩 조작: 시험되는 항체-약물 접합체를 Fab-pHrodo와 공동항온처리하여서 120 nM의 농도로 복합체를 형성하고, 복합체를 5배 구배 희석으로 처리하여 농도를 조정하고, 50 ul/웰로 세포에 첨가하였다. 각각의 농도에 대해 2의 반복 웰로 총 8 농도가 관여되었다.

[0514] 5. 세포 배양: 항온처리기에서 48시간 동안 배양 플레이트를 항온처리하였다(37℃).

[0515] 6. 플레이트 판독 조작: 상응하는 시점에, 96웰 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 세포를 소화시키고, 이후 FACS에 의해 세포수 및 형광 값을 판독하였다.

표 3

MDA-MB-468 세포에 의한 본 출원의 항체-약물 접합체의 내포작용 동안 상이한 시점에 생성된 형광 신호

[0516]

샘플 농도	형광 값 (DB1001-X2)		형광 값 (DB1001-X1)	
30 nM	343	327	334	374
6 nM	219	235	282	219
1.2 nM	119	130	143	139
0.24 nM	103	105	122	121
0.048 nM	97.8	104	106	114
0.0096 nM	97.1	98.2	104	107
0.00192 nM	96.6	97.4	109	102
0.000384 nM	98.2	98.1	103	96.6

[0517] 결론: 표 3에서의 결과에 따르면, B7H4의 높은 발현을 갖는 MDA-MB-468 세포는 본 출원의 항체-약물 접합체에 대한 내포작용을 나타낸다.

[0518] **실시예 5: 종양 세포에 대한 항체-약물 접합체의 시험관내 증식 저해 시험**

[0519] 항-B7H4 ADC인 DB1001-X1 및 DB1001-X2를 7일 동안 B7H4 발현에 양성인 MDA-MB-468 세포 및 B7H4 발현에 음성인 MDA-MB-231 세포와 항온처리한 후 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(즉, CTG)를 사용하여 세포 증식 저해 효과를 평가하기 위함.

[0520] 대수 생장기에서의 세포를 수집하고, 2000개의 세포/웰의 밀도로 플레이팅하고, 세포 플레이트를 37℃에서 5%

CO_2를 갖는 항온처리기에서 밤새 배양하였다. 실험의 제2일에, DB1001-X1 및 DB1001-X2를 완전 배지로 5배 희석으로 처리하여 (300 nM의 가장 높은 농도로부터 시작하여) 약물의 9의 농도 구배를 얻고, 이후 약물을 50 μL/웰로 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 완전 배지를 블랭크 대조군으로서 사용하고; 2의 반복 웰을 설정하고; 플레이트를 또 다른 7일 동안 37℃에서 항온처리기에서 항온처리하였다. 항온처리를 완료한 후, 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 실온으로 평형화하고, 각각의 웰에 50 μL의 CTG 검출 시약(Promega, 카탈로그 G7573호)를 첨가하였다. 후숙하여, 플레이트를 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 암소에서 10분 동안 정치되게 하고, 이후 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 신호 값을 판독하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여, 비선형 회귀 모델을 사용하여 시그모이드 용량 반응 곡선을 작도하고, IC_{50} 값을 계산하였다. 세포 생존력 계산식 = ($Lum_{시험되는 약물}$-$Lum_{블랭크 대조군}$) / ($Lum_{용매 블랭크 대조군}$-$Lum_{블랭크 대조군}$) × 100%.

[0521] 실험 결과는 하기 표에 기재된 것과 같다:

표 4

항체-약물 접합체의 시험관내 증식 저해 활성

세포	약물	IC_{50}(nM)
MDA-MB-468	DB1001-X1	30.3
	DB1001-X2	50.7
MDA-MB-321	DB1001-X1	>200
	DB1001-X2	>200

[0522]

[0523] 실험 결론: 표 4에서의 결과에 따르면, 본 출원의 항체-약물 접합체인 DB1001-X1 및 DB1001-X2는 B7H4 발현에 양성인 MDA-MB-468 세포의 증식에 대한 유의미하게 향상된 저해 활성을 갖는다.

[0524] **실시예 6: 종양 보유 마우스(MDA-MB-468 세포)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가**

[0525] B7H4 발현에 양성인 MDA-MB-468 세포를 갖는 마우스에서 이식된 종양을 확립한 후 DB1001-X1 및 DB1001-X2의 항종양 효과가 평가되는, 생체내 형성된 종양에 대한 DB1001-X1 및 DB1001-X2의 저해 효과를 조사하기 위함.

[0526] 1. 시험 약물 및 재료

[0527] 블랭크 대조군 그룹(대조군 그룹): 생리학적 식염수

[0528] DB1001-X1(처리 그룹): 3 mg/kg

[0529] DB1001-X1(처리 그룹): 10 mg/kg

[0530] DB1001-X2(처리 그룹): 3 mg/kg

[0531] DB1001-X2(처리 그룹): 10 mg/kg

[0532] 2. 제제화 방법: 모든 샘플을 희석하고, 생리학적 식염수에 의해 제제화하였다.

[0533] 3. 실험 동물: Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입한 6주령 내지 8주령 암컷 CB-17 SCID 마우스.

[0534] 4. 실험 방법:

[0535] 6주령 내지 8주령 암컷 NOD/SCID 마우스를 10×10^6개의 MDA-MB-468 세포로 오른쪽 등에 피하로 접종하였다. 종양이 약 172 mm^3으로 성장할 때, StudyDirectorTM을 사용하여 종양 보유 마우스를 무작위로 그룹화하였다. 동일한 일자(제0일)에, 마우스를 총 1의 주사에 대해 각각 3 mg/kg 및 10 mg/kg의 용량에서 DB1001-X1 또는 DB1001-X2에 의해 정맥내(i.v.) 주사하였다. 주 2회 종양 부피 및 체중을 측정하고, 데이터를 기록하였다.

[0536] 각각의 비히클 대조군 그룹 또는 처리 그룹에서 5마리의 마우스가 있었다. 종양 부피를 측정하여서 종양 저해율을 계산하였다.

[0537] 종양 부피 계산식은 $V = 0.5\ a \times b^2$이고, 여기서 a 및 b는 각각 긴 종양 직경 및 짧은 종양 직경을 나타낸다. T/C(%)에 의해 화합물의 종양 저해 효과를 평가하였다. T/C(%)는 백분율의 종양 성장 저해를 반영하는 표시자이고, T 및 C는 각각 투여 그룹 및 대조군 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피를 나타낸다. 하기 식을 사용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다: $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0) / (V_i-V_0)] \times 100$, 여기서 T_i는 투여 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피이고, T_0은 동일한 투여 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이고; V_i는 비히클 대조군 그룹에서 소정의 일자(T_i와 동일한 일자)에 평균 종양 부피이고, V_0은 비히클 대조군 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이다. 1방향 ANOVA에 의해 시험 물품 그룹과 비히클 그룹 사이의 유의성 분석을 수행하였다.

표 5

상이한 시점에 각각의 그룹에서의 종양 부피 [1](mm^3)

[0538]

그룹	1	2	3	4	5
일	블랭크 대조군 그룹	DB1001-X2, 3 mg/kg	DB1001-X2, 10 mg/kg	DB1001-X1, 3 mg/kg	DB1001-X1, 10 mg/kg
0[2]	171 ± 11	172 ± 11	170 ± 14	172 ± 12	172 ± 16
4	196 ± 12	179 ± 10	173 ± 14	181 ± 11	177 ± 17
7	229 ± 15	143 ± 8	93 ± 11	174 ± 9	140 ± 14
11	267 ± 15	67 ± 3	38 ± 1	123 ± 8	63 ± 4
14	315 ± 22	56 ± 3	32 ± 1	111 ± 8	55 ± 4
18	356 ± 27	48 ± 2	25 ± 1	123 ± 8	46 ± 4
21	400 ± 34	55 ± 3	20 ± 0	163 ± 6	42 ± 7

[0539] 주의:

[0540] 1. 종양 부피는 평균 ± 표준 오차로 표현되고;

[0541] 2. 투여의 시작 후 일자.

표 6

MDA-MB-468 세포의 피하 이종이식편 종양 모델에서의 시험 물품의 종양 저해 효능의 평가
(투여 후 제21일에 종양 부피에 기초하여 계산됨)

[0542]

그룹	종양 부피(mm^3) [1]	T/C(%) [2]	TGI(%) [2]	p 값 [3]
블랭크 대조군 그룹,	400 ± 34	--	--	--
DB1001-X2, 3 mg/kg	55 ± 3	13.78	151.33	0.002
DB1001-X2, 10 mg/kg	20 ± 0	4.97	165.84	0.002
DB1001-X1, 3 mg/kg	163 ± 6	40.69	103.95	0.008
DB1001-X1, 10 mg/kg	42 ± 7	10.62	156.50	0.002

[0543] 1. 종양 부피는 평균 ± 표준 오차로 표현되고;

[0544] 2. 종양 성장 저해는 T/C(T/C(%) = T_{21} / V_{21} × 100) 및 TGI(TGI(%) = $[1-(T_{21}-T_0) / (V_{21}-V_0)] \times 100$)에 의해 반영되고;

[0545] 3. p 값은 종양 부피에 기초하여 계산된다($p < 0.05$는 통계 차이를 나타내고, $p < 0.01$은 유의차를 나타낸다).

[0546] 실험 결과는 도 1, 표 5 및 표 6에 기재되어 있다. 항체-약물 접합체인 DB1001-X1 및 DB1001-X2는 단독 용량 후 유의미하게 향상된 용량 의존적 종양 저해 활성을 나타낸다.

[0547] **실시예 7. 항체-약물 접합체의 종 교차반응성**

[0548] 시험 목적

[0549] 인간, 시아노몰거스 원숭이 및 마우스 B7H4에 의해 형질주입된 HEK293T 세포에서의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2의 종 교차반응성을 검출하기 위함.

[0550] 실험 방법

[0551] 1. 모든 세포 균주를 37℃ 및 5% CO_2에서 완전한 배지에서 배양하였다.

[0552] 2. 대수 생장기에서의 세포를 수확하고, 세포 생존력이 90% 또는 초과인 것을 보장하도록 트리판 블루 배제에 의해 세포 생존력을 검출하였다. 세포를 1000 r/분에서 5분 동안 원심분리하고, 이후 상청액을 버렸다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, FACS 완충액으로 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하고, 단세포 현탁액을 5×10^6개의 세포/ml의 세포 밀도로 조정하고;

[0553] 3. 100 nM의 시험 물품 워킹(working) 용액의 가장 높은 농도를 달성하기 위해 50 μL의 각각의 세포 현탁액을 96웰 플레이트에 첨가하였다. 시험 물품 워킹 용액을 후속하여 총 8 농도에 대해 3배 희석하고; 혼합물을 균일하게 혼합하고, 이후 세포를 4℃에서 40분 동안 항온처리하였다.

[0554] 4. 세포를 FACS 완충액(매회에 대해 400 μL)으로 3회 세척하고, 1000 r/분의 속도로 5분 동안 원심분리하고, 마지막으로 100 μL의 FACS 완충액으로 재현탁시키고;

[0555] 5. 2 μL의 PE 표지된 2차 항체(PE 항-인간 IgG Fc 항체)를 첨가하고, 균일하게 혼합하고, 세포를 암소에서 4℃에서 40분 동안 항온처리하고;

[0556] 6. 세포를 FACS 완충액(매회에 대해 400 μL)으로 3회 세척하고, 1000 r/분의 속도로 5분 동안 원심분리하고, 마지막으로 250 μL의 FACS 완충액으로 재현탁시키고;

[0557] 7. 유세포분석법에 의해 형광 값을 검출하였다.

표 7

인간, 원숭이 및 마우스 B7H4에 대한 DB1001-X2의 친화도

[0558]

세포 균주	DB1001-X2	
	EC_{50}(nM)	MFI.Max
인간 B7H4-293T	2.18	10312
원숭이 B7H4-293T	5.36	10869
마우스 B7H4-293T	결합 무	결합 무

[0559] 표 7 및 도 2에 도시된 것과 같이, DB1001-X2는 인간 및 시아노몰거스 원숭이 B7-H4에 대해 유사한 친화도를 갖지만, 마우스 B7-H4에 결합하지 않는다.

[0560] 하기 실시예에서, 아이소타입 ADC는 항체가 음성 대조군 항체이고 링커-세포독소가 X2인 항체-약물 접합체를 지칭하고, DB1001-X2를 참조하여 제조되었다.

[0561] **실시예 8. 항체-약물 접합체의 표적화 특이성**

[0562] 시험 목적

[0563] 유세포분석법에 의해 인간 B7 패밀리 단백질을 과발현하는 세포에 항체-약물 접합체인 DB1001-X2의 결합 특이성을 검출하기 위함.

[0564] 실험 방법

[0565] 1. 인간 PD-L1(B7-H1), PD-L2(B7-DC), ICOSLG(B7-H2), CD276(B7-H3), B7H4, VISTA(B7-H5), CD80(B7-1) 및 CD86(B7-2)을 안정하게 발현하는 HEK293T 단일클론 세포 균주 및 인간 B7-H7(HHLA2)을 안정하게 발현하는 CHO-K1 단일클론 세포 균주를 확립하고;

[0566] 2. 모든 세포 균주를 37℃ 및 5% CO_2에서 완전한 배지에서 배양하고;

[0567] 3. 대수 생장기에서의 세포를 수확하고, 세포 생존력이 90% 또는 초과인 것을 보장하도록 트리판 블루 배제에 의해 세포 생존력을 검출하였다. 세포를 1000 r/분에서 5분 동안 원심분리하고, 이후 상청액을 버렸다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, FACS 완충액으로 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하고, 단세포 현탁액을 5×10^6개의 세포/ml의 세포 밀도로 조정하고;

[0568] 4. 100 nM 또는 300 nM의 시험 물품 워킹 용액의 농도를 달성하기 위해 50 μL의 각각의 세포 현탁액을 96웰 플레이트에 첨가하였다. 총 1 농도가 관여되고; 혼합물을 균일하게 혼합하고, 이후 세포를 4℃에서 40분 동안 항온처리하고;

[0569] 5. 세포를 FACS 완충액(매회에 대해 400 μL)으로 3회 세척하고, 1000 r/분의 속도로 5분 동안 원심분리하고, 마지막으로 100 μL의 FACS 완충액으로 재현탁시키고;

[0570] 6. 2 μL의 PE 표지된 2차 항체(PE 항-인간 IgG Fc 항체)를 첨가하고, 균일하게 혼합하고, 세포를 암소에서 4℃에서 40분 동안 항온처리하고;

[0571] 7. 세포를 FACS 완충액(매회에 대해 400 μL)으로 3회 세척하고, 1000 r/분의 속도로 5분 동안 원심분리하고, 마지막으로 250 μL의 FACS 완충액으로 재현탁시키고;

[0572] 8. 유세포분석법에 의해 형광 값을 검출하였다.

[0573] 실험 결과

[0574] 도 3에 도시된 것과 같이, DB1001-X2는 인간 B7-H4에 결합하고, 다른 인간 B7 패밀리 단백질인 B7-H1, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H5, B7-1, B7-2 및 B7-H7에 대한 결합이 검출되지 않았다.

[0575] 실험 결론

[0576] DB1001-X2는 인간 B7-H4 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고, 다른 B7 패밀리 단백질에 대한 교차반응성을 갖지 않는다.

[0577] **실시예 9: 항체-약물 접합체에 대한 내포작용 활성**

[0578] 시험 목적

[0579] 다른 항-B7H4 항체-약물 접합체와 비교하여 본 출원의 항-B7H4 항체-약물 접합체에 대한 B7H4 발현 MDA-MB-468 세포의 내포작용 효율을 검출하기 위함. 세포를 고정된 농도의 항체-약물 접합체 및 내포작용 표시자 Incucyte® Fabfluor-pH와 공동항온처리하고, 24시간 동안 생 세포의 형광 신호의 변경을 계속해서 관찰하여서 항체-약물 접합체의 내재화 능력을 평가하였다.

[0580] 실험 방법

[0581] 1. 세포 배양: MDA-MB-468 세포를 10% FB 레보비츠의 L-15 배지와 배양하였다.

[0582] 2. 세포의 제조: 대수 생장기에서의 MDA-MB-468 세포를 취하고, PBS로 1회 세척하고, 이후 2분 내지 3분 동안 소화시켰다. 세포를 완전히 소화시킨 후, 10 내지 15 ml의 세포 배양 배지를 첨가하여 소화된 세포를 용리시키고, 세포를 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 세포 배양 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하고, 단세포 현탁액을 1 x 10^5개의 세포/ml의 생 세포 밀도로 조정하였다.

[0583] 3. 세포 플레이팅: 50 μL/웰로 96웰 세포 배양 플레이트에 단세포 현탁액을 첨가하였다. 항온처리기에서 밤새 배양 플레이트를 배양하였다(37℃, 5% CO_2).

[0584] 4. 시험되는 항체-약물 접합체의 표지: 시험 물품 스톡 용액을 240 nM 4×워킹 용액(60 nM의 최종 농도)으로 희석하고, Inducyte® Fabfluor-pH 스톡 용액을 720 nM 4×워킹 용액(180 nM의 최종 농도)으로 희석하고, 2의 희석된 워킹 용액을 완전히 혼합하고, 암소에서 37℃에서 15분 동안 항온처리하였다.

[0585] 5. 영상의 포착 및 분석: 표지된 시험 물품 워킹 용액을 실험 플레이트의 상응하는 웰로 옮기고, 실험 플레이트를 Incucyte 생 세포 분석 장치로 옮기고, 스캐닝 및 사진촬영 프로그램을 설정하고, Incucyte 생 세포 분석 시스템을 사용하여 영상을 획득하였다. 24시간 동안 1시간 간격으로 정량화를 수행하였다. 분석 결과는 총 형광 면적(μm²/영상)으로 표현된다.

[0586] 실험 결과

[0587] MDA-MB-468 세포에 의한 본 출원의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2 및 대조군 항체-약물 접합체 참조물 ADC-1의 내포작용 동안 상이한 시점에 생성된 형광 신호의 적분 면적은 도 4에 도시된 것과 같다. 도 5는 본 출원의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2 및 대조군 항체-약물 접합체에 대한 MDA-MB-468 세포의 내포작용 효율의 비교를 보여준다.

표 8

MDA-MB-468의 항체-약물 접합체 내포작용

[0588]

	총 형광 면적 (μm^2/영상)	블랭크 대조군에 대한 배수
DB1001-X2	14318.1	2.4
참조물 ADC-1	8300.4	1.4
블랭크 대조군(세포+염료)	5856.4	1.0

[0589] 실험 결론

[0590] 표 8, 도 4 및 도 5에서의 결과에 따르면, B7H4 발현 MDA-MB-468 세포는 본 출원의 항체-약물 접합체에 대한 내포작용을 나타내고, 이는 참조물 ADC-1에 대한 것보다 우수하다.

[0591] **실시예 10: 종양 세포(2D 세포 배양)에 대한 항체-약물 접합체의 시험관내 증식 저해 시험**

[0592] 시험 목적

[0593] CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(즉, CTG)를 사용하여 다른 항-B7H4 항체-약물 접합체와 비교하여 B7H4 과발현 인간 결장직장암 세포 HT29의 시험관내 증식에 대한 본 출원의 항-B7H4 항체-약물 접합체의 저해 효과를 검출하기 위함.

[0594] 실험 방법

[0595] 대수 생장기에서의 세포를 수집하고, 15000개의 세포/웰의 밀도로 플레이팅하고, 세포 플레이트를 37℃에서 5% CO_2를 갖는 항온처리기에서 밤새 배양하였다. 실험의 제2일에, 시험 물품을 완전 배지로 희석하여 10 nM의 최종 농도로 약물을 얻고, 약물을 이후 50 μL/웰로 세포 배양 플레이트에 첨가하고, 완전 배지를 블랭크 대조군으로서 사용하고, 3의 반복 웰을 설정하고; 플레이트를 또 다른 7일 동안 37℃에서 항온처리기에서 항온처리하였다. 항온처리를 완료한 후, 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 실온으로 평형화하고, 각각의 웰에 50 μL의 CTG 검출 시약(Promega, 카탈로그 G7573호)를 첨가하였다. 후숙하여, 플레이트를 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 암소에서 10분 동안 정치되게 하고, 이후 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 신호 값을 판독하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하였다. 세포 생존력 계산식 = ($Lum_{시험되는\ 약물}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) / ($Lum_{용매\ 블랭크\ 대조군}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) × 100%.

[0596] 실험 결과

표 9

HT29-B7H4 의 시험관내 증식에 대한 항체 접합체의 저해 효과

[0597]

	세포 생존력(%)
블랭크 대조군	100.0
아이소타입 ADC	106.9
DB1001-X2	28.0
참조물 ADC-1	56.6

[0598] 실험 결론

[0599] 표 9 및 도 6에서의 실험 결과에 따르면, 본 출원의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 B7H4 과발현 인간 결장직장암 세포 HT29의 증식에 대한 유의미한 저해 활성을 갖고, 활성은 참조물 ADC-1의 것보다 우수하다.

[0600] **실시예 11: 종양 세포(3D 세포 배양)에 대한 항체-약물 접합체의 시험관내 증식 저해 시험**

[0601] 시험 목적

[0602] CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(즉, CTG)를 사용하여 3D 배양 조건 하에 B7H4의 높은 발현을 갖는 인간 유방암 세포 MX-1, B7H4의 낮은 발현을 갖는 자궁내막 암종 세포 RL95-2 및 B7H4 발현에 음성인 유방암 세포 JIMT-1에 대한 항-B7H4 ADC DB1001-X2 및 항-B7H4 단일클론 항체 DB1001의 증식 저해 효과를 평가하기 위함.

[0603] 실험 방법

[0604] 대수 생장기에서의 세포를 수집하고, 세포 배양 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켜 단세포 현탁액을 제조하였다. 단세포 현탁액을 1 x 10^5개의 세포/ml의 생 세포 밀도로 조정하고, 3.5 mL의 세포 현탁액을 6.5 mL의 1% 메틸셀룰로스와 균일하게 혼합하여서 가능한 많이 버블을 피했다. 90 μL의 세포 현탁액을 96웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 5% CO_2를 갖는 항온처리기에서 밤새 배양하였다. 실험의 제2일에, 시험 물품을 완전 배지로 희석하여 10× 용액을 얻고, 10 μL의 시험 물품 용액(100 nM의 가장 높은 최종 농도, 9 농도, 3배 희석)을 각각의 웰에 첨가하고, 완전 배지를 블랭크 대조군으로서 사용하고, 3의 반복 웰을 설정하고; 플레이트를 또 다른 6일 동안 37℃에서 항온처리기에서 항온처리하였다. 항온처리를 완료한 후, 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 실온으로 평형화하고, 각각의 웰에 100 μL의 CTG 검출 시약(Promega, 카탈로그 G7573호)을 첨가하였다. 플레이트를 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 이후 암소에서 10분 동안 정치되게 하고, 이후 실온에서 30분 동안 위치시켜 발광 신호를 안정화시켰다. EnVision을 사용하여 발광을 판독하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여, 비선형 회귀 모델을 사용하여 시그모이드 용량 반응 곡선을 작도하고, IC_{50} 값을 계산하였다. 세포 생존력 계산식 = ($Lum_{시험되는\ 약물}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) / ($Lum_{용매\ 블랭크\ 대조군}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) × 100%.

[0605] 아이소타입 ADC: DB1001-X2를 참조하여 제조되는, 항체가 음성 대조군 항체이고, 링커-세포독소가 X2인, 항체-약물 접합체.

[0606] 실험 결과

표 10

종양 세포 균주에 대한 항체-약물 접합체의 증식 저해 활성

[0607]

세포 균주	DB1001-X2		DB1001		아이소타입 ADC		P-III-30	
	IC_{50}(nM)	최대 저해(%)	IC_{50}(nM)	최대 저해(%)	IC_{50}(nM)	최대 저해(%)	IC_{50}(nM)	최대 저해(%)
MX-1	52.396	55.47%	>100	5.78%	>100	7.69%	1.768	84.47%
RL95-2	69.436	60.44%	>100	0.65%	>100	41.56%	0.843	95.07%
JIMT-1	>100	2.53%	>100	1.25%	>100	-4.04%	24.270	70.98%

[0608] 실험 결론

[0609] 표 10 및 도 7, 도 8 및 도 9에 도시된 것과 같이, DB1001-X2는 시험관내 B7H4의 높은 발현 및 낮은 발현을 갖는 종양 세포 균주 둘 다에 대한 강한 사멸 효과를 갖고, B7H4를 발현하지 않는 세포에 대한 사멸 효과를 갖지 않으며, 이는 사멸 효과가 B7H4 발현에 의존적이라는 것을 나타낸다.

[0610] **실시예 12: 항체-약물 접합체의 T 세포 활성화**

[0611] 시험 목적

[0612] 다른 항-B7H4 항체-약물 접합체와 비교하여 T 세포에 대한 B7H4의 저해를 차단하고 IFN-감마 생성에 대해 T 세포를 활성화하는 본 출원의 항-B7H4 항체-약물 접합체의 능력을 검출하기 위함.

[0613] 1. 실험 방법: 대수 생장기에서의 293T-OS8-인간 B7H4 세포(KYinno Biotechnology Co., Ltd.)를

수집하고, 300 g에서 5분 동안 원심분리하였다.

[0614] 2. 세포를 $1x10^5$개의 세포/ml로 재현탁시키고, $1x10^4$개의 세포/100 μL/웰의 밀도로 플레이팅하고, 플레이트를 밤새 배양하였다.

[0615] 3. Miltenyi T 세포 단리 키트(Miltenyi, 카탈로그 130-096-535호)를 사용하여 PBMC를 건강한 공여자 1(Shanghai Milestone, 카탈로그 PB100C-W호, 배치 번호 A10Z983077) 및 건강한 공여자 2 PBMC(Milestone, 카탈로그 PB050C-W호, 배치 번호 P122010104C)로부터 단리하여 인간 1차 T 세포를 얻었다.

[0616] 4. 시험되는 시험 물품을 2×최종 농도에서 제제화하였다. 최종 농도는 0.02 nM였다.

[0617] 5. 배지를 실험 웰로부터 제거하고, 이후 공여자 1 및 공여자 2로부터의 인간 1차 T 세포를 $2×10^5$개의 세포/100 μL/웰의 밀도로 293T-OS8-인간 B7H4 세포를 함유하는 실험 웰에 첨가하였다.

[0618] 6. 이후 처리되는 항체를 100 μL/웰로 첨가하고, 2개의 반복물을 설정하였다.

[0619] 7. 배양의 3일 후, 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 IFN-감마의 농도를 검출하였다.

[0620] 아이소타입 ADC: DB1001-X2를 참조하여 제조되는, 항체가 음성 대조군 항체이고, 링커-세포독소가 X2인, 항체-약물 접합체.

[0621] 실험 결과

표 11

항체-약물 접합체에 의해 IFN-γ를 분비하기 위한 T 세포의 활성화

[0622]

	공여자 1 IFN-γ(pg/ml)	공여자 2 IFN-γ(pg/ml)	평균 IFN-γ(pg/ml)
블랭크 대조군	1914.7	2407.6	2161.1
아이소타입 ADC	2030.4	2111.3	2070.8
DB1001-X2	6491.1	5914.4	6202.8
참조물 ADC-1	4164.0	3645.6	3904.8

[0623] 실험 결론

[0624] 표 11, 도 10 및 도 11에 도시된 것과 같이, DB1001-X2는 상이한 공여자 기원의 T 세포에 대한 B7H4 양성 세포의 저해를 차단할 수 있고, 차단 효과는 참조물 ADC-1의 것보다 유의미하게 우수하다.

[0625] **실시예 13: 항체-약물 접합체의 방관자 사멸 효과**

[0626] 시험 목적

[0627] 다른 항-B7H4 항체-약물 접합체와 비교하여 본 출원의 항-B7H4 항체-약물 접합체의 방관자 효과를 검출하기 위해, 방관자 효과는 내포작용이 B7H4 양성 세포로부터 B7H4 발현에 음성인 근처의 세포로 확산되고, 세포에 대한 세포 사멸을 달성한 후 소분자 약물이 방출되는 것이다.

[0628] 비표지된 B7H4 과발현 HT29 세포(HT29-B7H4) 및 B7H4를 발현하지 않는 루시퍼라제 형질주입된 HT29 세포(HT29-Luc2)를 일정 비율에 따라 혼합하고, 이후 시간 기간 동안 시험 물품과 공동항온처리하였다. 루시퍼라제 기질을 첨가하고, (생 세포에 의해 제조된 루시퍼라제의 촉매작용 하에 기질로부터 제조된) 루시페린의 값에 기초하여 루시퍼라제 함량을 검출하였다. 즉, 루시퍼라제 함량은 생 세포의 수를 반영한다.

[0629] 실험 방법

[0630] 1. 대수 생장기에서의 세포를 수집하고, 2% 혈청을 함유하는 1640 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시키고, HT29-B7H4 세포 및 HT29-Luc2 세포의 수를 조정하였다. 세포 현탁액을 45 ul/웰로 96웰 플레이트에 첨가하고; 플레이트를 37℃에서 5% CO_2를 갖는 항온처리기에서 밤새 배양하며, 세포의 비는 3:1이고, 즉 각각 11250개의 HT29-B7H4 세포/웰 및 3750개의 HT29-Luc2 세포/웰이다.

[0631] 2. 시험 물품 용액을 10×농도에서 제제화하고, 10 μL의 약물 용액을 96웰 세포 플레이트의 각각의 웰에서 세포에 첨가하여 3의 반복 웰로 10 nM의 최종 시험 물품 농도를 달성하였다. 제0일에서의 발광 값을 검출하였다.

[0632] 3. 약물이 첨가된 96웰 플레이트에서의 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 또 다른 7일 동안 배양하였다.

[0633] 4. 항온처리를 완료한 후, 세포 배양 플레이트를 꺼내고, 실온으로 평형화하고, HT29-B7H4가 별개로 항온처리된 각각의 웰에 50 μL의 CTG 검출 시약(Promega, 카탈로그 G7573호)을 첨가하였다. 플레이트를 진탕시키고 균일하게 혼합하고, 암소에서 10분 동안 정치되게 하고, 이후 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 신호 값을 판독하였다.

[0634] 5. 동일한 부피의 Bright-Glo 용액을 HT29-Luc2의 별개의 항온처리 및 공동항온처리가 수행되는 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 오비탈 진탕기에서 15분 동안 진탕시켜서 용해시켰다. 이후 다기능 마이크로플레이트 판독기에 의해 발광 값을 판독하였다.

[0635] 5. 데이터 분석: GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하였다. 세포 생존력 계산식 = ($Lum_{시험되는\ 약물}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) / ($Lum_{용매\ 블랭크\ 대조군}$-$Lum_{블랭크\ 대조군}$) × 100%. 실험 결과

표 12

B7H4 음성 HT29-Luc2에 대한 항체-약물 접합체의 방관자 사멸 효과

[0636]

	HT29-B7H4 세포 생존력(%) 별개의 항온처리	HT29-Luc2 세포 생존력(%) 별개의 항온처리	HT29-Luc2 세포 생존력(%) 공동항온처리
블랭크 대조군	100.0	100.0	100.0
아이소타입 ADC	106.9	76.9	56.7
DB1001-X2	28.0	76.8	20.3

[0637] 실험 결론: 표 12 및 도 12에 도시된 것과 같이, DB1001-X2는 B7H4 양성 세포와 공동항온처리된 B7H4 음성 세포에 대한 양호한 방관자 사멸 효과를 갖는다.

[0638] **실시예 14: 시험관내 인간, 래트 및 원숭이의 혈장에서의 항체-약물 접합체의 안정성**

[0639] 시험 목적

[0640] 상이한 시점에 샘플이 수집되고, 액체 크로마토그래피 및 질량 분광법에 의해 혈장에서 방출된 소분자 독소(세포독성 약물)의 양이 측정되는, 인간, 래트 및 원숭이 혈장에서의 시험관내 항온처리의 21일 후 항체-약물 접합체의 혈장 안정성을 평가하기 위함.

[0641] 실험 방법

[0642] DB1001-X2를 150 μg/mL의 최종 농도로 인간, 래트 또는 시아노몰거스 원숭이의 혈청으로 희석하고, 37℃에서 연속 21일 동안 항온처리하였다. 중간 샘플링 시점은 T0, 2시간, 8시간, 1일, 4일, 7일, 14일 및 21일였다. 1:1의 부피비에 따라 아세토니트릴에 의해 혈장 샘플을 침전시키고 원심분리하여 상청액을 얻고, 이후 LC-MS/MS(액상: Thermo Vanquish; 삼중 사극자 질량 분광법: Thermo TSQ Quantis)에 의해 상청액을 분석하였다. 세포독성 약물 P-III-30의 농도에 기초하여 항체-약물 접합체 방출율을 계산하였다.

[0643] 실험 결과

[0644] 표 13 및 도 13에 도시된 것과 같이, 항온처리의 21일 후, 150 μg/mL의 DB1001-X2는 인간, 래트 및 원숭이 혈장에서 페이로드(세포독성 약물) P-III-30 방출율이 1% 미만이다.

표 13

21일 후 인간, 래트 및 원숭이 혈장에서의 세포독성 약물 P-III-30 방출율

	인간 혈장	시아노몰거스 원숭이 혈장	래트 혈장
P-III-30 방출율(%)	0.66	0.68	0.26

[0645]

[0646] 실험 결론

[0647] DB1001-X2는 시험관내 인간, 래트 및 원숭이 혈장에서 양호한 안정성을 갖는다.

[0648] **실시예 15: 항체-약물 접합체의 약물동력학**

[0649] 시험 목적

[0650] DB1001-X2를 총 2회 투여 동안 3주마다 1회 시아노몰거스 원숭이에게 정맥내 투여하였다. 후속 연구에 대한 참조물을 제공하기 위해 약물동력학 특징을 조사하기 위함.

[0651] 실험 방법

[0652] 4마리의 시아노몰거스 원숭이(그룹화 시에 체중이 2.2 내지 3.6 kg인 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷)를 저용량 DB1001-X2 그룹 및 고용량 DB1001-X2 그룹인 총 2개의 군으로 나누고, 그룹을 총 2회 용량에 대해 3주마다 1회 각각 30 및 80 mg/kg의 용량에서 투여하였다. 투여 부피는 5 mL/kg였다.

[0653] 샘플링 시간: TK 혈액 샘플을 제1 용량 전에 및 제1 용량 후 5분, 0.5시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 72시간, 120시간, 168시간, 336시간 및 504시간에 수집하고; TK 혈액 샘플을 마지막 용량 후 5분, 0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h 및 48 h에 및 절제 전에 수집하였다. 샘플링 방법: 앞다리 정맥 또는 다른 적절한 정맥으로부터 약 0.5 mL의 전혈을 수집하였다.

[0654] 혈액 샘플의 처리: 수집 후, 혈액을 항응고제로서 EDTA·K2를 함유하는 표지된 혈액 수집 관에 위치시켰다. 균일한 혼합을 보장하도록 샘플 관을 수회 부드럽게 도립시키고, 이후 저장을 위해 웨트(wet) 아이스에 즉시 위치시켰다. 샘플을 수집 후 1시간 내에 3800 rpm에서 4℃에서 10분 동안 원심분리하고, 혈장을 피펫팅하고, 2개의 관(100 μL/관)에서 하위포장하고, 관을 드라이 아이스에 일시적으로 저장하고, 4시간 내에 초저온 냉동기(-60℃ 및 미만)로 옮겼다. 실험 보고서에 전혈 수집 시간 및 혈장 수집 시간을 기록하였다.

[0655] 모든 샘플을 수집한 후, 이것을 드라이 아이스 조건 하에 저장하고, 검출관으로 수송하였다.

[0656] 샘플 분석: 확립된 ELISA를 사용하여 혈청에서의 총 항체 및 ADC 약물의 혈액 약물 수준을 분석하였다. 기존의 LC-MS/MS에 의해 혈장에서의 세포독성 약물 P-III-30의 혈액 약물 수준을 분석하였다.

[0657] 실험 결과는 표 14에 기재된 것과 같다.

표 14

시아노몰거스 원숭이 혈장에서의 항체-약물 접합체의 약물동력학

분석물질	용량 Mpk	$T_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{0-t} (h.ng/mL)
총 Ab	30	157.5	0.083	794377	51521254
	80	232	0.083	2088878	174105639
DB1001-X2	30	164.9	0.083	828689	51863287
	80	218.5	0.292	2242292	183899767
P-III-30	30	155	2	4.87	236
	80	150.5	2	12.9	875

[0658]

[0659] 실험 결론

[0660] 표 14에서의 결과에 따르면, DB1001-X2와 총 항체 사이에 약물동력학의 차이가 관찰되지 않으며, 이는 DB1001-X2가 생체내 양호한 혈장 안정성을 갖는다는 것을 나타낸다. 한편, 30 mg/kg 및 80 mg/kg의 용량으로 투여된 시아노몰거스 원숭이에서, P-III-30의 낮은 혈장 농도가 검출되며, 이는 DB1001-X2의 안정성 및 P-III-30의 짧은 전신 반감기로 인해, P-III-30이 낮은 전신 노출을 가져서 비교적 높은 안전성 수준을 제공한다는 것을 나타낸다.

[0661] **실시예 16: 종양 보유 마우스(B7H4의 높은 발현을 갖는 인간 유방암 세포 MX-1)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가**

[0662] 높은 B7H4 발현에 양성인 인간 유방암 세포 MX-1을 갖는 마우스에서 이식된 종양을 확립한 후 DB1001-X2의 항종양 효과가 평가되는, 생체내 형성된 종양에 대한 DB1001-X2의 저해 효과를 조사하기 위함.

[0663] 1. 시험 약물 및 재료

[0664] 블랭크 대조군 그룹(대조군 그룹): 생리학적 식염수

[0665] DB1001-X2(처리 그룹): 1 mg/kg

[0666] DB1001-X2(처리 그룹): 3 mg/kg

[0667] 2. 제제화 방법: 모든 샘플을 희석하고, 생리학적 식염수에 의해 제제화하였다.

[0668] 3. 실험 동물: Jicui Gempharmatech Co., Ltd.로부터 구입한 6주령 내지 8주령 암컷 BALB/c Nude 마우스.

[0669] 4. 실험 방법:

[0670] 6주령 내지 8주령 암컷 BALB/c Nude 마우스를 5×10^6개의 MX-1 세포로 오른쪽 등에 피하로 접종하였다. 종양이 약 160.82 mm^3으로 성장할 때, StudyDirectorTM을 사용하여 종양 보유 마우스를 무작위로 그룹화하였다. 동일한 일자(제0일)에, 마우스를 총 2회의 주사에 대해 2주마다 1회(용량: DB1001-X2: 각각 1 mg/kg 및 3 mg/kg 및 ISO-ADC: 3 mg/kg) 시험 물품에 의해 정맥내(i.v.) 주사하였다. 그룹화 후 제27일에, 실험은 엔드포인트에 도달하고, 주 2회 종양 부피 및 체중을 측정하고, 데이터를 기록하였다.

[0671] 각각의 대조군 그룹 또는 처리 그룹에서 5마리의 마우스가 있었다. 종양 부피를 측정하여서 종양 저해율을 계산하였다.

[0672] 종양 부피 계산식은 $V = 0.5\ a \times b^2$이고, 여기서 a 및 b는 각각 긴 종양 직경 및 짧은 종양 직경을 나타낸다. T/C(%)에 의해 화합물의 종양 저해 효과를 평가하였다. T/C(%)는 백분율의 종양 성장 저해를 반영하는 표시자이고, T 및 C는 각각 투여 그룹 및 대조군 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피를 나타낸다. 하기 식을 사용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다: $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0) / (V_i-V_0)] \times 100$, 여기서 T_i는 투여 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피이고, T_0은 동일한 투여 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이고; V_i는 비히클 대조군 그룹에서 소정의 일자(T_i와 동일한 일자)에 평균 종양 부피이고, V_0은 비히클 대조군 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이다.

[0673] 독립 샘플 T-시험을 사용하여 샘플의 2개의 그룹 사이에 비교를 하고, SPSS를 사용하여 데이터를 분석하고, $P < 0.05$는 유의차를 나타냈다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터를 작도하였다.

표 15

MX-1 세포의 피하 이종이식편 종양 모델에서의 시험 물품의 종양 저해 효능의 평가
(투여 후 제27일에 종양 부피에 기초하여 계산됨)

[0674]

그룹	종양 부피(mm^3) [1]	T/C(%) [2]	TGI(%) [2]	*p* 값 [3]
블랭크 대조군 그룹,	3319.54 ± 119.76	-	-	-
DB1001-X2, 1 mg/kg	1521.41 ± 281.89	45.83	54.17	0.0000800
DB1001-X2, 3 mg/kg	154.12 ± 60.47	4.64	95.36	1.44e-8

[0675] 1. 종양 부피는 평균 ± 표준 오차로 표현되고;

[0676] 2. 종양 성장 저해는 T/C(T/C(%) = T_{27} / V_{27} × 100) 및 TGI(TGI(%) = [1-(T_{27}-T_0) / (V_{27}-V_0)] × 100)에 의해 반영되고;

[0677] 3. p 값은 종양 부피에 기초하여 계산된다($p < 0.05$는 통계 차이를 나타내고, $p < 0.01$은 유의차를 나타낸다).

[0678] 실험 결과는 도 14 및 표 15에 기재된 것과 같다. 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 투여 후 유의미한 용량 의존적 종양 저해 활성을 나타낸다.

[0679] **실시예 17: 종양 보유 마우스(인간 B7H4 양성 유방암 세포 MCF-7)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가**

[0680] B7H4 발현에 양성인 인간 유방암 세포 MCF-7을 갖는 마우스에서 이식된 종양을 확립한 후 DB1001-X2의 항종양 효과가 평가되는, 생체내 형성된 종양에 대한 저해 효과의 면에서 DB1001-X2를 유사한 경쟁 생성물과 비교하기 위함.

[0681] 1. 시험 약물 및 재료

[0682] 블랭크 대조군 그룹(대조군 그룹): 생리학적 식염수

[0683] DB1001-X2(처리 그룹): 3 mg/kg

[0684] 2. 제제화 방법: 모든 샘플을 희석하고, 생리학적 식염수에 의해 제제화하였다.

[0685] 3. 실험 동물: Jiangsu Jicui Gempharmatech Co., Ltd.로부터의 6주령 내지 7주령 암컷 NCG 마우스.

[0686] 4. 실험 방법:

[0687] 대수 생장기에서의 MCF-7 세포(접종 계대배양 N+12)를 수집하고, 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 이후 접종하고(종양 모델 확립 전 및 후의 세포 생존력: 96.03% 및 94.81%), 접종 양은 1×10^7개의 세포/75 μL/마우스였다(1:1 비로 마트리겔을 첨가하였다). 접종 후 제19일에(평균 종양 부피가 107.44 mm^3에 도달할 때), 50마리의 마우스를 선택하고, 각각의 그룹에서 5마리의 마우스로 종양 부피에 기초하여 10개의 군으로 무작위로 나눴다. 그룹화의 일자를 D0으로서 정의하고, 그룹화의 일자(D0)에 투약을 개시하였다. 그룹화 후 남은 마우스를 안락사 처리로 처리하였다. 마우스를 총 1회의 주사에 대해 3 mg/kg의 용량으로 시험 물품에 의해 주사하였다. 주 2회 종양 부피 및 체중을 측정하고, 데이터를 기록하였다.

[0688] 각각의 비히클 대조군 그룹 또는 처리 그룹에서 5마리의 마우스가 있었다. 그룹화 후 제25일에, 실험은 엔드포인트에 도달하고, 종양 부피를 측정하여서 종양 저해율을 계산하였다.

[0689] 종양 부피 계산식은 V = 0.5 a × b^2이고, 여기서 a 및 b는 각각 긴 종양 직경 및 짧은 종양 직경을 나타낸다. T/C(%)에 의해 화합물의 종양 저해 효과를 평가하였다. T/C(%)는 백분율의 종양 성장 저해를 반영하는 표시자이고, T 및 C는 각각 투여 그룹 및 대조군 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피를 나타낸다. 하기 식을 사용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다: TGI(%) = [1-(T_i-T_0) / (V_i-V_0)] × 100, 여기서 T_i는 투여 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피이고, T_0은 동일한 투여 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이고; V_i는 비히클 대조군 그룹에서 소정의 일자(T_i와 동일한 일자)에 평균 종양 부피이고, V_0은 비히클 대조군 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이다.

[0690] 독립 샘플 T-시험을 사용하여 샘플의 2개의 그룹 사이에 비교를 하고, SPSS를 사용하여 데이터를 분석하고, $P < 0.05$는 유의차를 나타냈다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터를 작도하였다.

[0691] 실험 결과: 본 발명의 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 단독 용량 후 유의미한 용량 의존적 종양 저해 활성을 나타낸다.

[0692] **실시예 18: 종양 보유 마우스(B7H4의 낮은 발현을 갖는 인간 자궁내막 암종 세포 RL95-2)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가**

[0693] 낮은 B7H4 발현에 양성인 인간 자궁내막 암종 세포 RL95-2를 갖는 마우스에서 이식된 종양을 확립한 후 DB1001-X2의 항종양 효과가 평가되는, 생체내 형성된 종양에 대한 DB1001-X2의 저해 효과를 조사하기 위함.

[0694] 1. 시험 약물 및 재료

[0695] 블랭크 대조군 그룹(대조군 그룹): 포스페이트 완충 식염수(DPBS)

[0696] DB1001-X2(처리 그룹): 1 mg/kg

[0697] DB1001-X2(처리 그룹): 3 mg/kg

[0698] DB1001-X2(처리 그룹): 10 mg/kg

[0699] 2. 제제화 방법: 모든 샘플을 희석하고, 포스페이트 완충 식염수(DPBS)로 제제화하였다.

[0700] 3. 실험 동물: Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입한 6주령 내지 8주령 암컷 BALB/c Nude 마우스.

[0701] 4. 실험 방법:

[0702] 대수 생장기에서의 RL95-2 세포를 수집하고, 각각의 마우스를 5×106개의 RL95-2 세포에 의해 오른쪽 목 뒷부분에 피하로 접종하고, 접종 부피는 0.2 mL이고, 세포 현탁액을 PBS와 마트리겔(부피비: 1:1)에 의해 제조하였다. 생체내 효능 실험: 세포 접종 후 제20일에(평균 종양 부피가 134 mm^3에 도달할 때), 마우스를 종양 부피에 기초하여 무작위로 나누고(5마리의 마우스/그룹), 약물에 의해 투여하였다. 그룹화의 일자를 D0으로서 정의하고, 그룹화의 일자(D0)에 투약을 개시하였다. 마우스를 총 2회의 주사에 대해 3 mg/kg의 용량으로 2주마다 1회 시험 물품에 의해 주사하였다. 그룹화 후 제28일에, 실험은 엔드포인트에 도달하고, 주 2회 종양 부피 및 체중을 측정하고, 데이터를 기록하였다.

[0703] 종양 부피 계산식은 $V = 0.5\ a \times b^2$이고, 여기서 a 및 b는 각각 긴 종양 직경 및 짧은 종양 직경을 나타낸다. T/C(%)에 의해 화합물의 종양 저해 효과를 평가하였다. T/C(%)는 백분율의 종양 성장 저해를 반영하는 표시자이고, T 및 C는 각각 투여 그룹 및 대조군 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피를 나타낸다. 하기 식을 사용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다: $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0) / (V_i-V_0)] \times 100$, 여기서 T_i는 투여 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피이고, T_0은 동일한 투여 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이고; V_i는 비히클 대조군 그룹에서 소정의 일자(T_i와 동일한 일자)에 평균 종양 부피이고, V_0은 비히클 대조군 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이다.

[0704] 통계 분석: 그룹화 후 제28일로부터의 데이터에 기초하여, 그룹 간의 차이를 평가하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 1방향 ANOVA(Dunnett 다중 비교 시험 및 Tukey 다중 비교 시험)를 사용하여 3개 이상의 그룹 간의 비교를 분석하였다. $p < 0.05$는 유의차로 여겨졌다.

표 16

RL95-2 세포의 피하 이종이식편 종양 모델에서의 시험 물품의 종양 저해 효능의 평가
(투여 후 제28일에 종양 부피에 기초하여 계산됨)

[0705]

그룹	종양 부피(mm^3) [1]	T/C(%) [2]	TGI(%) [2]	*p* 값 [3]
블랭크 대조군 그룹,	1050 ± 197			
DB1001-X2, 1 mg/kg	593 ± 79	57.86	49.92	*
DB1001-X2, 3 mg/kg	258 ± 33	24.06	86.52	****
DB1001-X2, 10 mg/kg	74 ± 5	7.05	106.59	****

[0706] 1. 종양 부피는 평균 ± 표준 오차로 표현되고;

[0707] 2. 종양 성장 저해는 $T/C(T/C(\%) = T_{28}/ V_{28} \times 100)$ 및 $TGI(TGI(\%) = [1-(T_{28}-T_0) / (V_{28}-V_0)] \times 100)$에 의해 반영되고;

[0708] 3. *p* 값은 종양 부피에 기초하여 계산된다(****는 $p < 0.0001$을 나타내고, *는 $p < 0.05$를 나타낸다).

[0709] 실험 결과는 도 15 및 표 16에 기재된 것과 같다. 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 투여 후 유의미한 용량 의존

적 종양 저해 활성을 나타낸다.

[0710] **실시예 19: 종양 보유 마우스(B7H4의 낮은 발현을 갖는 인간 난소암 세포 OVCAR-3)에서의 항체-약물 접합체의 약력학적 평가**

[0711] 낮은 B7H4 발현에 양성인 인간 난소암 세포 OVCAR-3을 갖는 마우스에서 이식된 종양을 확립한 후 DB1001-X2의 항종양 효과가 평가되는, 생체내 형성된 종양에 대한 DB1001-X2의 저해 효과를 조사하기 위함.

[0712] 1. 시험 약물 및 재료

[0713] 블랭크 대조군 그룹(대조군 그룹): 생리학적 식염수

[0714] DB1001-X2(처리 그룹): 1 mg/kg

[0715] DB1001-X2(처리 그룹): 3 mg/kg

[0716] DB1001-X2(처리 그룹): 10 mg/kg

[0717] 2. 제제화 방법: 모든 샘플을 희석하고, 생리학적 식염수에 의해 제제화하였다.

[0718] 3. 실험 동물: Jicui Gempharmatech Co., Ltd.로부터 구입한 6주령 내지 8주령 암컷 BALB/c Nude 마우스.

[0719] 4. 실험 방법:

[0720] 6주령 내지 8주령 암컷 BALB/c Nude 마우스를 1×10^7개의 OVCAR-3 세포(0.2 ml/마우스, 세포를 1:1의 PBS와 마트리겔에서 재현탁시킴)로 오른쪽 등에 피하로 접종하였다. 종양이 약 142.85 mm^3으로 성장할 때, StudyDirectorTM을 사용하여 종양 보유 마우스를 무작위로 그룹화하였다. 동일한 일자(제0일)에, 마우스를 총 2회의 주사에 대해 2주마다 1회(용량: DB1001-X2: 각각 1 mg/kg, 3 mg/kg 및 10 mg/kg) 시험 물품에 의해 정맥내(i.v.) 주사하였다. 그룹화 후 제27일에, 실험은 엔드포인트에 도달하고, 주 2회 종양 부피 및 체중을 측정하고, 데이터를 기록하였다.

[0721] 각각의 대조군 그룹 또는 처리 그룹에서 5마리의 마우스가 있었다. 종양 부피를 측정하여서 종양 저해율을 계산하였다.

[0722] 종양 부피 계산식은 $V = 0.5\ a \times b^2$이고, 여기서 a 및 b는 각각 긴 종양 직경 및 짧은 종양 직경을 나타낸다. T/C(%)에 의해 화합물의 종양 저해 효과를 평가하였다. T/C(%)는 백분율의 종양 성장 저해를 반영하는 표시자이고, T 및 C는 각각 투여 그룹 및 대조군 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피를 나타낸다. 하기 식을 사용하여 종양 성장 저해율을 계산하였다: $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0) / (V_i-V_0)] \times 100$, 여기서 T_i는 투여 그룹에서 소정의 일자에 평균 종양 부피이고, T_0은 동일한 투여 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이고; V_i는 비히클 대조군 그룹에서 소정의 일자(T_i와 동일한 일자)에 평균 종양 부피이고, V_0은 비히클 대조군 그룹에서 투여 시작 시 평균 종양 부피이다.

[0723] 독립 샘플 T-시험을 사용하여 샘플의 2개의 그룹 사이에 비교를 하고, SPSS를 사용하여 데이터를 분석하고, $P < 0.05$는 유의차를 나타냈다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터를 작도하였다.

표 17

OVCAR-3 세포의 피하 이종이식편 종양 모델에서의 시험 물품의 종양 저해 효능의 평가
(투여 후 제27일에 종양 부피에 기초하여 계산됨)

[0724]

그룹	종양 부피(mm^3) [1]	T/C(%) [2]	TGI(%) [2]	*p* 값 [3]
블랭크 대조군 그룹,	1144.84 ± 144.07			
DB1001-X2, 1 mg/kg	390.93 ± 85.40	34.15	65.85	0.0132
DB1001-X2, 3 mg/kg	122.94 ± 17.80	10.74	89.26	0.0000534
DB1001-X2, 10 mg/kg	47.72 ± 7.95	4.17	95.83	5.14e-10

[0725] 1. 종양 부피는 평균 ± 표준 오차로 표현되고;

[0726] 2. 종양 성장 저해는 T/C(T/C(%) = T_{27}/ V_{27} × 100) 및 TGI(TGI(%) = [1-(T_{27}-T_0) / (V_{27}-V_0)] × 100)에 의해 반영되고;

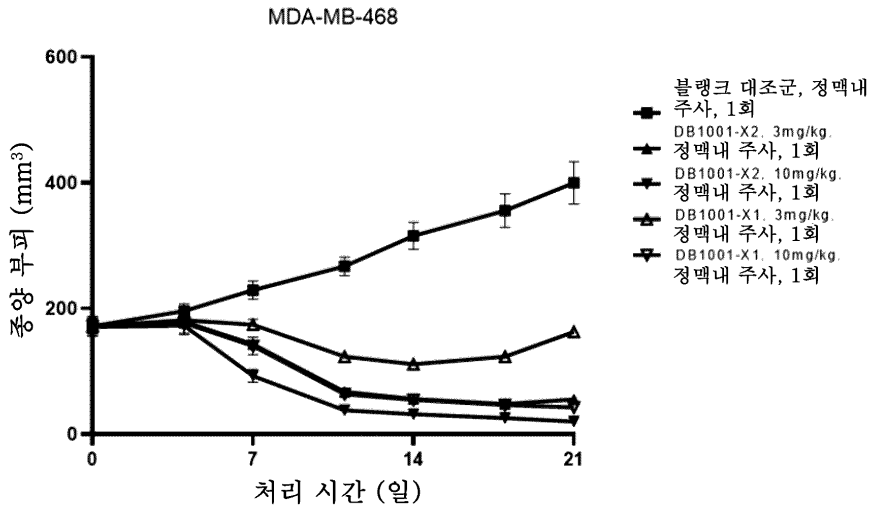
[0727] 3. p 값은 종양 부피에 기초하여 계산된다($p < 0.05$는 통계 차이를 나타내고, $p < 0.01$은 유의차를 나타낸다).

[0728] 실험 결과는 도 16 및 표 17에 기재된 것과 같다. 항체-약물 접합체인 DB1001-X2는 투여 후 유의미한 용량 의존적 종양 저해 활성을 나타낸다.

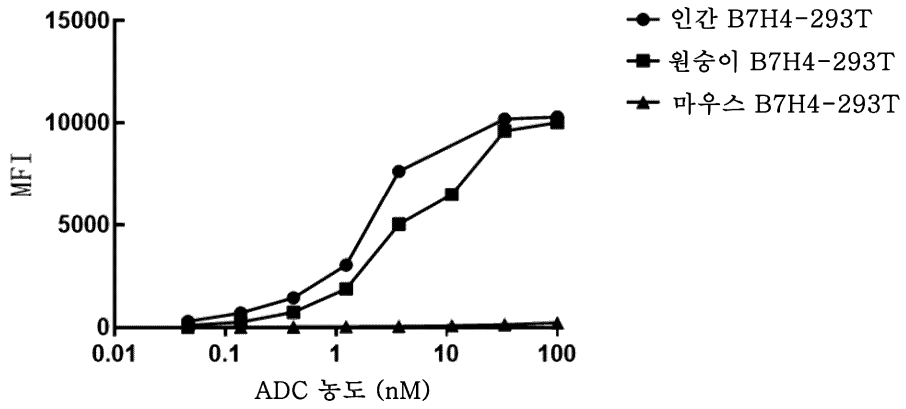
[0729] 본 발명의 특정 실시형태가 상기에 기재되어 있지만, 당업자에 의해 이들이 단순히 예시적이고, 본 발명의 원칙 및 본질로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변경 또는 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 보호 범위는 첨부된 청구항에 의해 정의된다.

도면

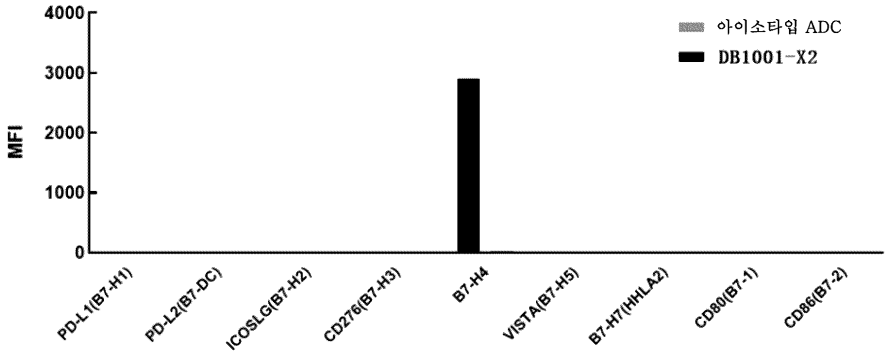
도면1



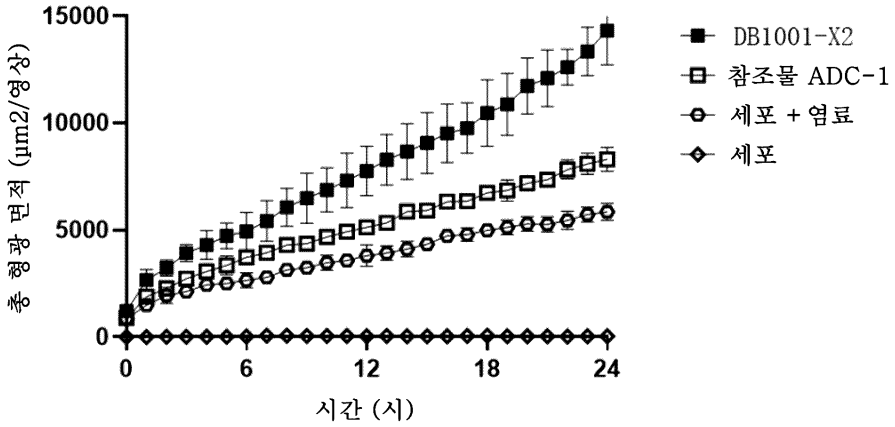
도면2



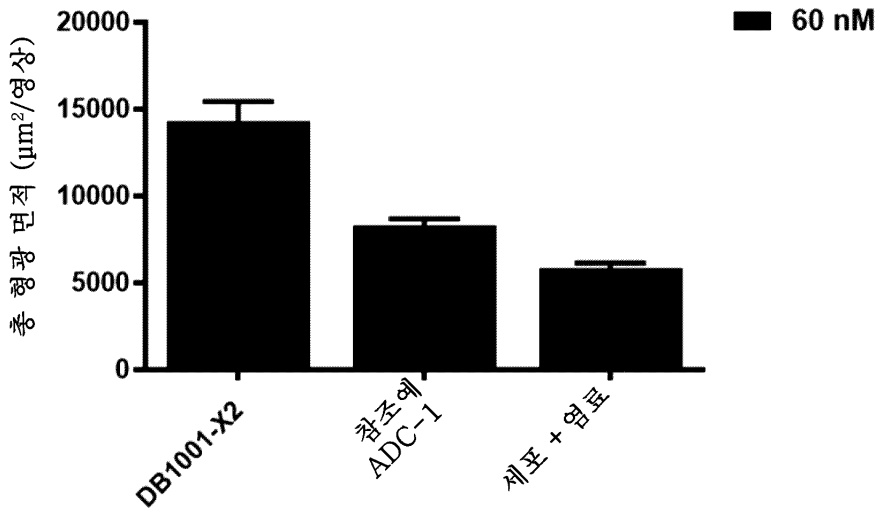
도면3


4000
3000
2000
1000
0
MFI
아이소타입 ADC
DB1001-X2
PD-L1(B7-H1)
PD-L2(B7-DC)
ICOSLG(B7-H2)
CD276(B7-H3)
B7-H4
VISTA(B7-H5)
B7-H7(HHLA2)
CD80(B7-1)
CD86(B7-2)

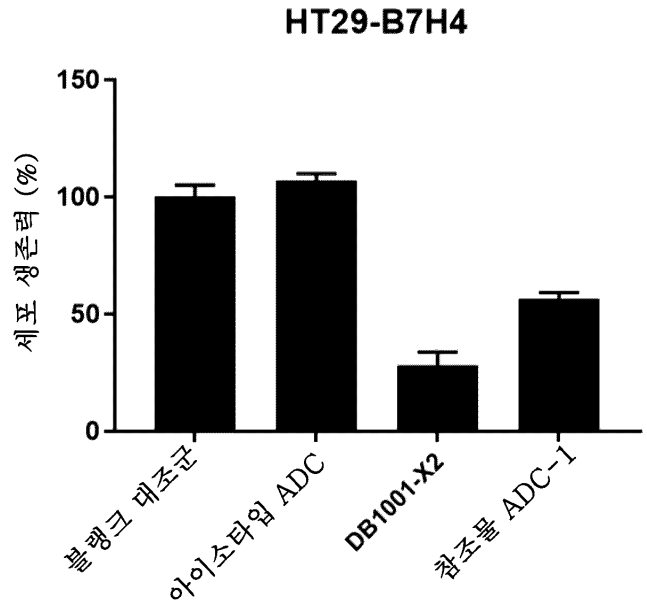
도면4


15000
10000
5000
0
총 형광 면적 (μm2/영상)
0
6
12
18
24
시간 (시)
DB1001-X2
참조물 ADC-1
세포 + 염료
세포

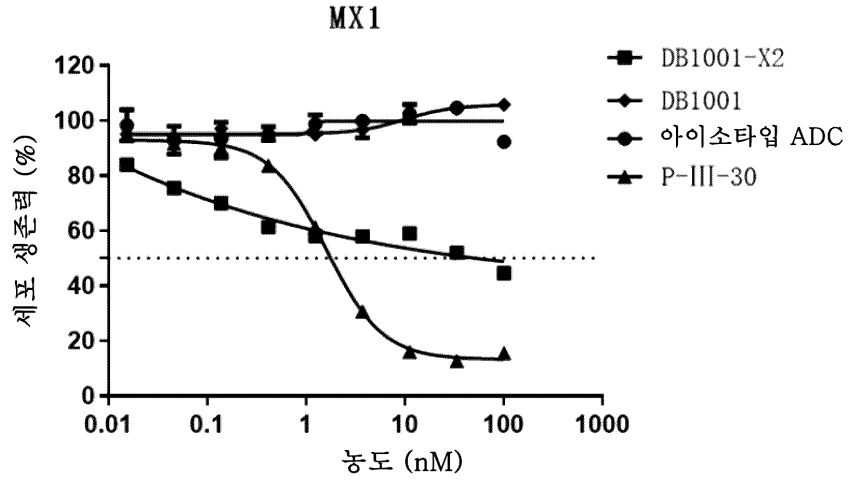
도면5


20000
15000
10000
5000
0
총 형광 면적 (μm²/영상)
60 nM
DB1001-X2
참조예 ADC-1
세포 + 염료

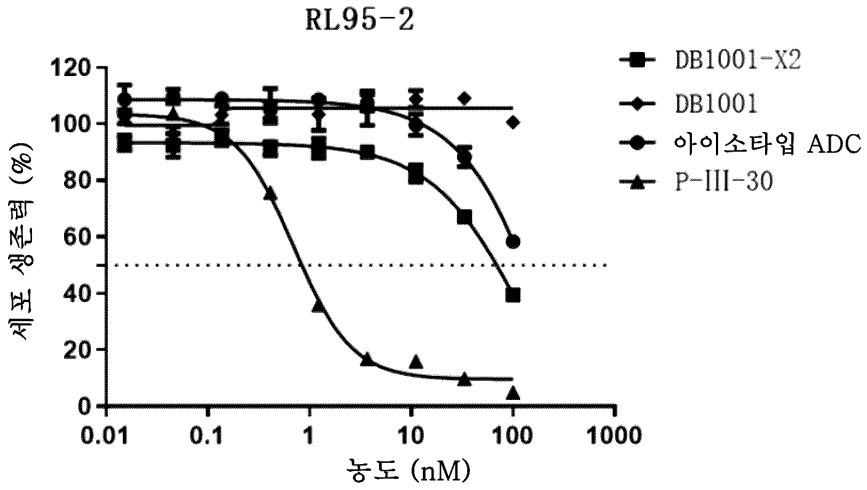
도면6


HT29-B7H4
세포 생존력 (%)
150
100
50
0
블랭크 대조군
아이소타입 ADC
DB1001-X2
참조물 ADC-1

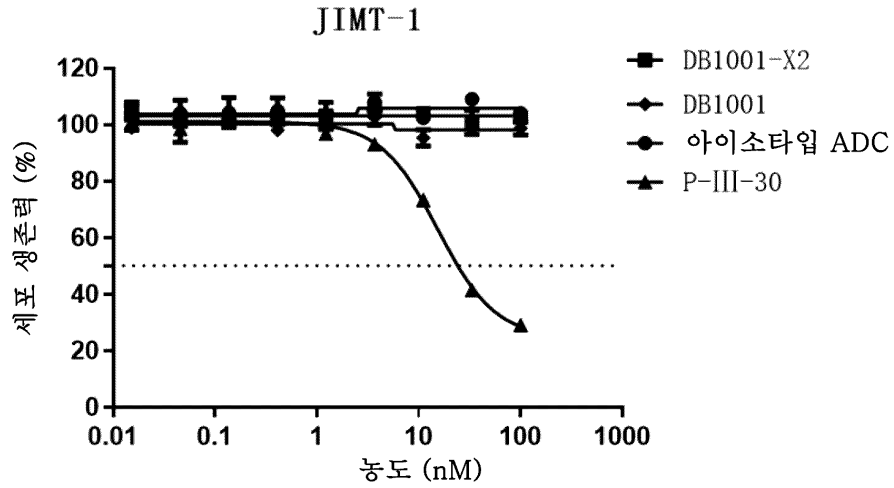
도면7


MX1
세포 생존력 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
DB1001-X2
DB1001
아이소타입 ADC
P-III-30

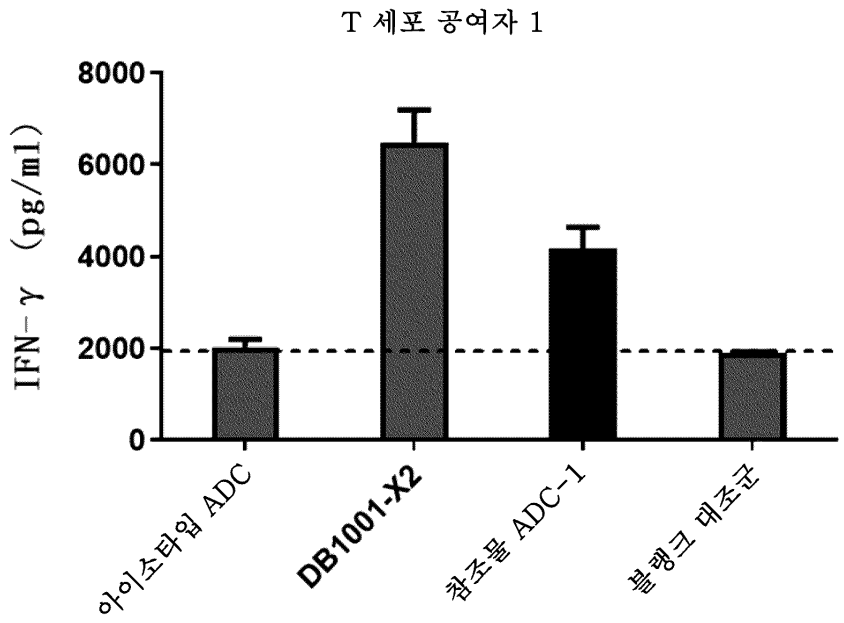
도면8


RL95-2
DB1001-X2
DB1001
아이소타입 ADC
P-III-30
세포 생존력 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)

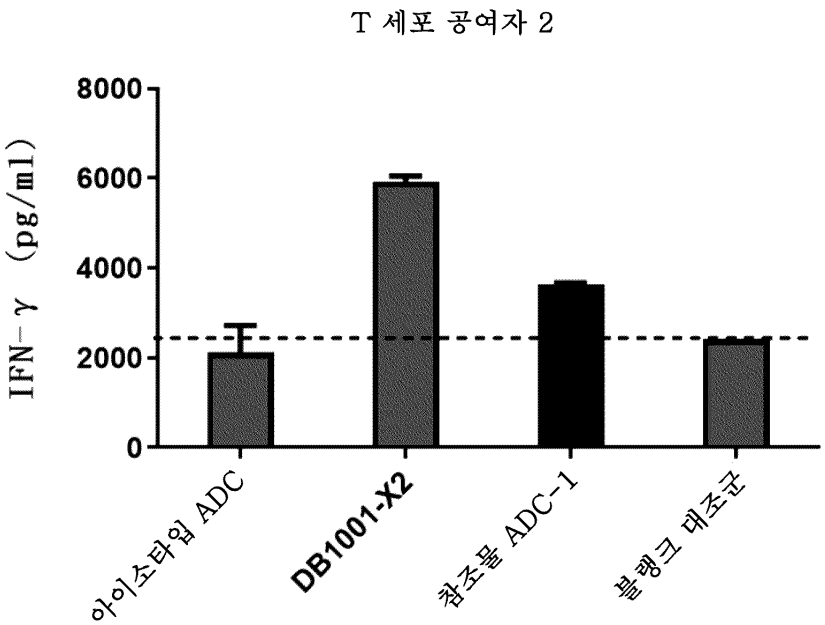
도면9


JIMT-1
DB1001-X2
DB1001
아이소타입 ADC
P-III-30
세포 생존력 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)

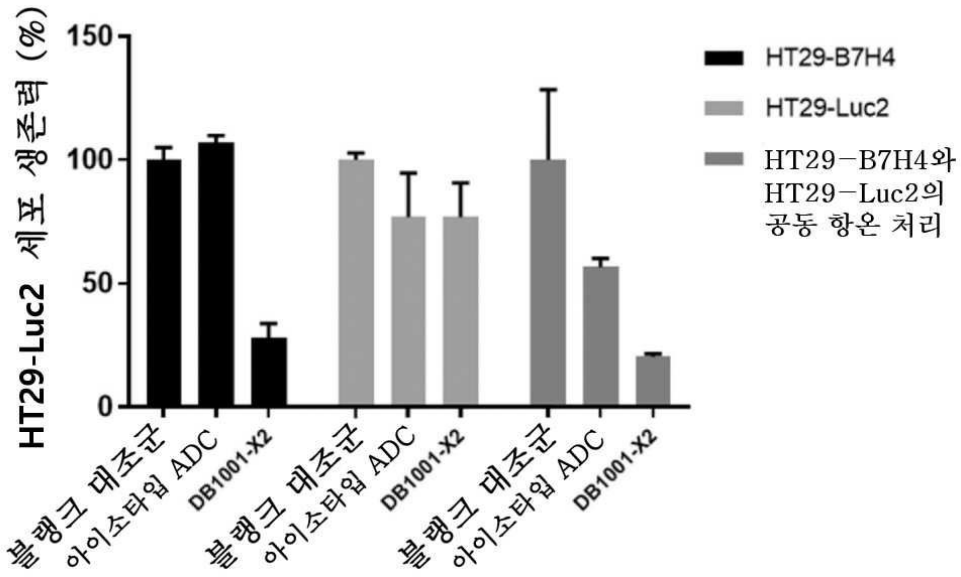
도면10


T 세포 공여자 1
IFN-γ (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
아이소타입 ADC
DB1001-X2
참조물 ADC-1
블랭크 대조군

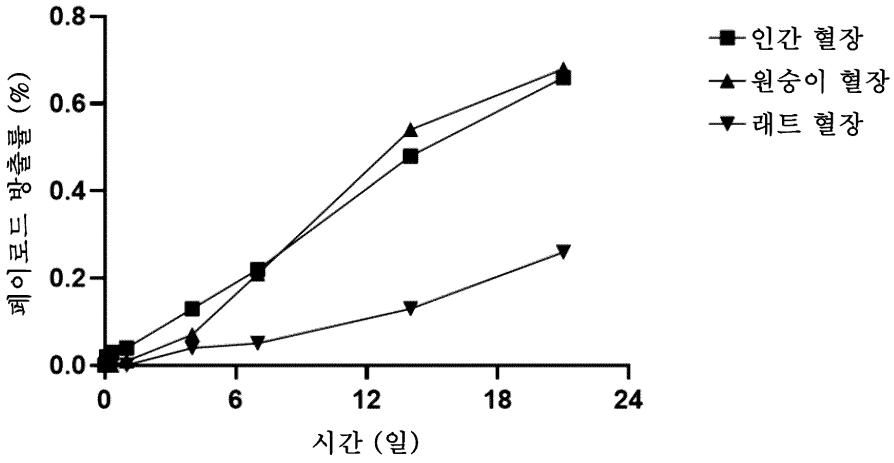
도면11


T 세포 공여자 2
IFN-γ (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
아이소타입 ADC
DB1001-X2
참조물 ADC-1
블랭크 대조군

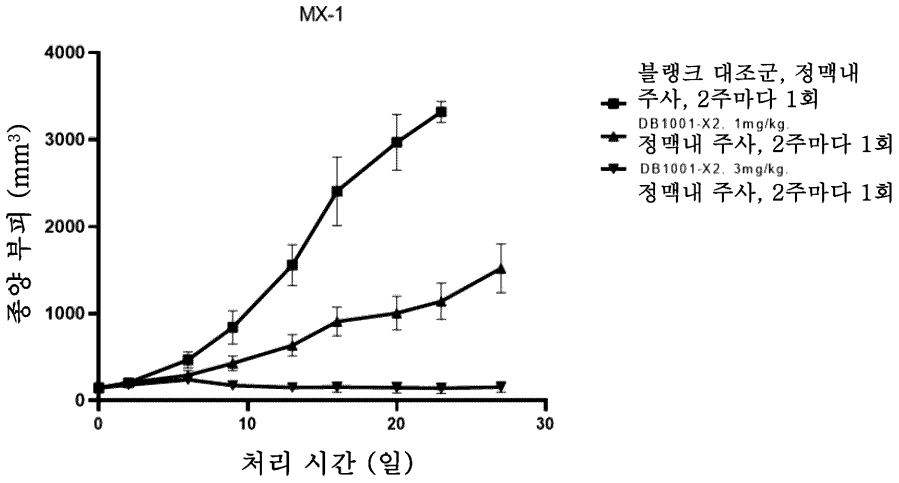
도면12


HT29-Luc2 세포 생존력 (%)
150
100
50
0
블랭크 대조군
아이소타입 ADC
DB1001-X2
블랭크 대조군
아이소타입 ADC
DB1001-X2
블랭크 대조군
아이소타입 ADC
DB1001-X2
HT29-B7H4
HT29-Luc2
HT29-B7H4와
HT29-Luc2의
공동 항온 처리

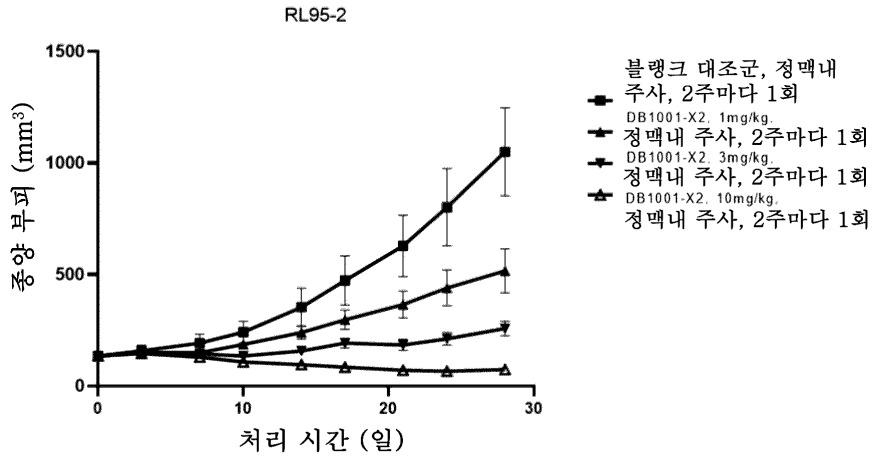
도면13


페이로드 방출률 (%)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
6
12
18
24
시간 (일)
인간 혈장
원숭이 혈장
래트 혈장

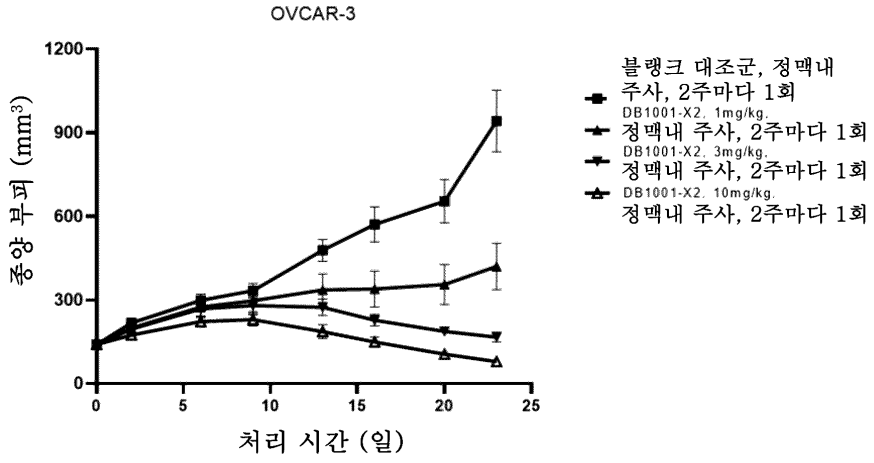
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.